

# UPLC-MS/MS法同时测定人血浆中氯吡格雷及其代谢物的浓度<sup>Δ</sup>

孙增先<sup>1\*</sup>, 王海东<sup>1</sup>, 倪善红<sup>1</sup>, 程 聪<sup>1</sup>, 刘乃丰<sup>2#</sup> (1. 连云港市第一人民医院临床药学中心, 江苏 连云港 222002; 2. 东南大学附属中大医院, 南京 210009)

中图分类号 R969.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)35-4942-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.35.15

**摘要** 目的: 建立同时测定人血浆中氯吡格雷(CLO)及其活性代谢产物(CATM)、非活性代谢产物(CCAM)浓度的方法, 并用于药动学研究。方法: 取烷化剂2-溴-3'-甲氧基苯乙酮(MPB)保护的的血浆样品, 经乙腈沉淀蛋白后, 以卡马西平为内标, 采用超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)法测定。色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC HSS T<sub>3</sub>, 流动相为水(含0.1%甲酸)-乙腈(含0.1%甲酸), 梯度洗脱, 流速为0.50 ml/min。采用电喷雾电离源(ESI), 多反应监测(MRM)方式进行正离子监测, 用于定量分析的离子对分别为  $m/z$  322.1→211.8(CLO)、 $m/z$  504.1→155.0(CATM 烷化衍生物, CATMD)、 $m/z$  308.3→198.0(CCAM)、 $m/z$  273.2→194.3(内标)。结果: CLO、CATMD、CCAM 血药浓度分别在0.03~20.00、0.30~200.00、10.00~10 000.00 ng/ml 范围内线性关系良好; 日内、日间 RSD < 15%, 相对误差(RE)为-3.5%~5.7。5名健康受试者单剂量口服 CLO 300 mg 后, CLO、CATM、CCAM 的  $c_{max}$  分别为(7.89 ± 5.46)、(15.58 ± 8.08)、(8 023.33 ± 1 047.39) ng/ml,  $t_{max}$  分别为(1.25 ± 0.43)、(1.25 ± 0.43)、(1.67 ± 0.29) h,  $t_{1/2}$  分别为(2.31 ± 0.61)、(0.64 ± 0.08)、(6.53 ± 2.55) h, AUC<sub>0-τ</sub> 分别为(17.19 ± 14.59)、(21.39 ± 9.58)、(30 648.85 ± 8 026.63) ng·h/ml。结论: 该方法操作简便、灵敏度高、分析时间短, 适用于 CLO 及其代谢物血药浓度测定及药动学研究。

**关键词** 氯吡格雷; 活性代谢产物; 非活性代谢产物; 超高效液相色谱-串联质谱法; 血药浓度; 药动学

## Simultaneous Determination of Clopidogrel and Its Metabolites in Human Plasma by UPLC-MS/MS

SUN Zeng-xian<sup>1</sup>, WANG Hai-dong<sup>1</sup>, NI Shan-hong<sup>1</sup>, CHENG Cong<sup>1</sup>, LIU Nai-feng<sup>2</sup> (1. Clinic Pharmacy Research Center, Lianyungang First People's Hospital, Jiangsu Lianyungang 222002, China; 2. Zhongda Hospital, School of Medicine, Southeast University, Nanjing 210009, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish the method for the simultaneous determination of clopidogrel (CLO) and its active metabolites (CATM) and inactive metabolites (CCAM), and to conduct pharmacokinetic study. METHODS: The plasma sample had been derivatized by 2-bromine-3'-methoxy acetophenone (MPB), and was precipitated by acetonitrile. Using carbamazepine as internal standard, UPLC-MS/MS was adopted. The separation was performed on Waters ACQUITY UPLC HSS T<sub>3</sub> column with mobile phase consisted of water (containing 0.1% formic acid)-acetonitrile (containing 0.1% formic acid) using a gradient elution program at the flow rate of 0.50 ml/min. The ESI was equipped and quantitative analysis was operated in positive ion and MRM mode. The mass transition ion-pairs were followed as  $m/z$  322.1→211.8(CLO),  $m/z$  504.1→155.0 (the alkylation derivatives of CATM, CATMD),  $m/z$  308.3→198.0 (CCAM),  $m/z$  273.2→194.3 (internal standard). RESULTS: The linear calibration curves for CLO, CATMD and CCAM were obtained in the concentration range of 0.03-20.00 ng/ml, 0.30-200.00 ng/ml and 10.00-10 000.00 ng/ml in plasma, respectively; intra-day and inter-day RSD for them were all less than 15%, and relative error (RE) ranged from -3.5% to 5.7%. Main pharmacokinetic parameters of CLO, CATMD and CCAM in 5 healthy volunteers after oral administration of CLO 300 mg were as follows:  $c_{max}$  were (7.89 ± 5.46), (15.58 ± 8.08), (8 023.33 ± 1 047.39) ng/ml;  $t_{max}$  were (1.25 ± 0.43), (1.25 ± 0.43), (1.67 ± 0.29) h;  $t_{1/2}$  were (2.31 ± 0.61), (0.64 ± 0.08), (6.53 ± 2.55) h; AUC<sub>0-τ</sub> were (17.19 ± 14.59), (21.39 ± 9.58), (30 648.85 ± 8 026.63) ng·h/ml. CONCLUSIONS: The established method is sensitive, rapid and convenient, which is suitable for pharmacokinetic study and plasma concentration determination of CLO and its metabolites.

**KEYWORDS** Clopidogrel; Active metabolite; Inactive metabolite; UPLC-MS/MS; Plasma concentration; Pharmacokinetics

氯吡格雷(CLO)为噻吩并吡啶类衍生物, 可选择性地与血小板膜上二磷酸腺苷(ADP)受体P2Y<sub>12</sub>结合, 抑制ADP介导

的血小板聚集, 广泛应用于急性冠脉综合征和经皮冠状动脉介入术后抗血小板治疗<sup>[1-2]</sup>。作为前体药物, CLO本身并无药理活性。口服后, 约85%的CLO经羧酸酯酶水解为无活性的氯吡格雷酸(CCAM), 余下的经细胞色素P<sub>450</sub>两步代谢为活性巯基代谢物(CATM)<sup>[3]</sup>。体内CATM血药浓度与CLO临床疗效密切相关, 且存在较大的个体差异, 因此CATM血药浓度监测可用于患者用药依从性评价和CLO反应性分级<sup>[4-6]</sup>。曾有以

Δ 基金项目: 连云港市社会发展计划项目(No.SH1216)

\* 主任药师, 博士。研究方向: 临床药学。电话: 0518-85605518。E-mail: sunzx715@163.com

# 通信作者: 主任药师, 博士生导师。研究方向: 临床药学、心内科及糖尿病学。E-mail: liunf\_2006@126.com

CCAM 替代 CATM 评价 CLO 用药依从性和疗效的建议<sup>[7-9]</sup>, 也有采用液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法同时测定人血浆中 CLO、CCAM、CATM 浓度的文献报道<sup>[3,10-11]</sup>。然而, 由于 CATM 的巯基非常活泼, 通常难以获得准确可靠的血药浓度, 故笔者采用烷化剂 2-溴-3'-甲氧基苯乙酮(MPB)保护血浆样品, 建立同时测定人血浆中 CLO、CATM 烷化衍生物(CATMD)及 CCAM 浓度的超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)法, 并将其用于 CLO 及其代谢物的临床药动学研究。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Esigent ekspert ultra LC110XL 液相系统(包括四元输液泵、进样器和柱温箱)、AB Qtrap 4500 型 MS 仪、Analyst 1.6.2 数据处理软件(美国 Applied Biosystems 公司); T1 型氮气发生器(瑞士普利塞斯公司); AE-240 电子天平(瑞士梅特勒-托利多仪器有限公司); Peqlab 多功能高速离心机(离心半径: 8.4 cm, 德国 Deutschland 公司); MS2 振荡器(德国 IKA 公司)。

### 1.2 药品与试剂

CLO 片(商品名: 波立维, 杭州赛诺菲有限公司, 规格: 75 mg/片, 批号: 4A812); CLO 对照品(批号: 5-XJY-64-5, 纯度: 95%)、CCAM 对照品(批号: 3-JHY-32-3, 纯度: 98%)、CATMD 对照品(批号: 5-MNZ-188-22, 纯度: 99.9%)均购自加拿大 Toronto Research Chemicals 公司; 卡马西平对照品(CBZ, 内标, 批号: 106H0889, 纯度: 99.9%)、MPB(烷化剂, 批号: 151910100, 纯度: 97%)均购自美国 Sigma 公司; 乙腈、甲酸为色谱纯, 水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱与 MS 条件

色谱柱: Waters ACQUITY UPLC HSS T<sub>3</sub>(50 mm×2.1 mm, 1.8 μm); 流动相: 水(A相, 含 0.1% 甲酸)-乙腈(B相, 含 0.1% 甲酸), 梯度洗脱(0~0.7 min, B相从 20% 上升至 90%; 0.7~1.2 min, B相为 90%; 1.2~1.3 min, B相从 90% 降至 20%; 1.3~1.5 min, B相为 20%); 分析时间: 1.5 min; 流速: 0.50 ml/min; 柱温: 30 °C; 进样量: 10 μl。

采用电喷雾电离源(ESI), 以多反应监测(MRM)模式扫描, 正离子方式检测。离子化电压: 5 500 V; 温度: 500 °C; 喷雾气(N<sub>2</sub>)压力: 55 psi; 辅助加热气(N<sub>2</sub>)压力: 55 psi; 气帘气体(N<sub>2</sub>)压力: 30 psi; 碰撞气模式: Medium; 扫描时间: 100 ms。其余参数见表 1。

表 1 MS 参数

Tab 1 Parameters of MS

化合物	分子式	分子量	母离子 m/z	子离子 m/z	碰撞能量, V	去簇电压, V
CLO	C <sub>16</sub> H <sub>18</sub> ClNO <sub>2</sub> S	321.8	322.1	211.8	23	70
CATMD	C <sub>28</sub> H <sub>30</sub> ClNO <sub>2</sub> S	503.1	504.1	155.0	59	119
CCAM	C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> ClNO <sub>2</sub> S	307.4	308.3	198.0	10	70
CBZ	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O	236.2	237.2	194.3	25	83

### 2.2 溶液的制备

精密称取 CLO、CATMD、CCAM 对照品各适量, 用乙腈溶解并稀释, 配制成 CLO、CATMD、CCAM 质量浓度分别为 1 170.0、92.0、960.0 μg/ml 的对照品贮备液, 备用。

精密称取 CBZ 对照品适量, 用乙腈溶解并稀释, 配制成质

量浓度为 1.00 mg/ml 的内标贮备液。精密量取内标贮备液适量, 用乙腈稀释, 配制成质量浓度为 50.00 ng/ml 的内标溶液, 备用。

精密称取 MPB 适量, 用乙腈超声溶解并稀释, 配制成质量浓度为 500 mmol/L 的烷化剂保护液, 备用。

### 2.3 血浆样品处理

取空白血浆 50 μl, 加入内标溶液 50 μl, 再加入乙腈 200 μl, 涡旋 5 min, 11 400 r/min 离心 5 min, 取上清液 10 μl, 进样分析。

### 2.4 方法学考察

2.4.1 专属性考察 分别取空白血浆 50 μl, 按“2.3”项下处理(用乙腈替代含内标乙腈工作液), 进样分析, 得色谱图 1A; 配制 CLO、CATMD、CCAM 定量下限浓度(0.03、0.30、10.00 ng/ml) 血浆样品, 按“2.3”项下处理, 得色谱图 1B; 取受试者服药 1.5 h 后的血浆样品, 按“2.3”项下处理, 得色谱图 1C。由色谱图可见, CLO、CATMD、CCAM、CBZ 的保留时间分别为 1.07、0.96、0.72、0.84 min, 血浆样品中的内源性物质和烷化剂 MPB 对 CLO、CATMD、CCAM 和内标的测定没有干扰。

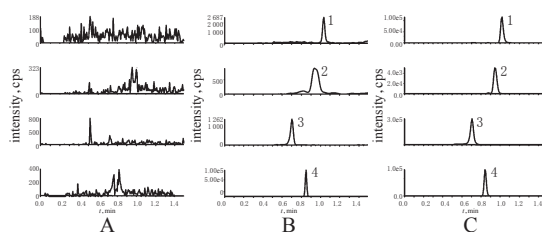


图 1 人血浆中 CLO、CATMD、CCAM、CBZ 的典型色谱图

A. 空白血浆; B. CLO、CATMD、CCAM 血浆样品(质量浓度分别为 0.03、0.30、10.00 ng/ml); C. 受试者口服 300 mg CLO 片 1.5 h 后的血浆样品; 1. CLO; 2. CATMD; 3. CCAM; 4. CBZ

### Fig 1 Representative MRM chromatograms of CLO, CATMD, CCAM and CBZ in human plasma

A. blank plasma; B. plasma sample spiked with CLO, CATMD, CCAM (0.03, 0.30, 10.00 ng/ml respectively); C. plasma sample 1.5 h after po 300 mg CLO tablets; 1. CLO; 2. CATMD; 3. CCAM; 4. CBZ

2.4.2 标准曲线的制备和定量下限的考察 取空白血浆、各对照品贮备液各适量, 分别配制成 CLO 质量浓度为 0.03、0.10、0.30、1.00、3.00、10.00、20.00 ng/ml, CATMD 质量浓度为 0.30、1.00、3.00、10.00、30.00、100.00、200.00 ng/ml, CCAM 质量浓度为 10.00、30.00、100.00、300.00、1 000.00、3 000.00、10 000.00 ng/ml 的系列标准血浆样品, 按“2.3”项下方法处理, 进样测定, 记录色谱图。以待测物质量浓度(x)为横坐标、待测物与内标的峰面积比值(y)为纵坐标, 用加权最小二乘法(加权系数  $w = 1/x^2$ )进行线性回归, 得 CLO、CATMD、CCAM 的回归方程分别为:  $y_{CLO} = 0.816x_{CLO} + 1.49 \times 10^{-2}$  ( $r = 0.9989$ )、 $y_{CATMD} = 1.13 \times 10^{-2}x_{CATMD} + 4.21 \times 10^{-3}$  ( $r = 0.9981$ )、 $y_{CCAM} = 7.43 \times 10^{-2}x_{CCAM} + 3.69 \times 10^{-3}$  ( $r = 0.9998$ )。结果表明, CLO、CATMD、CCAM 血药浓度分别在 0.03~20.00、0.30~200.00、10.00~10 000.00 ng/ml 范围内线性关系良好, 三者的定量下限分别为 0.03、0.30、10.00 ng/ml。

2.4.3 精密度及准确度试验 分别配制成 CLO 定量下限浓度(0.03 ng/ml)血浆样品和低、中、高浓度(0.05、2.00、18.00 ng/ml)质控(QC)样品, CATMD 定量下限浓度(0.30 ng/ml)血浆样品

和低、中、高浓度(0.50、20.00、180.00 ng/ml)QC样品,CCAM定量下限浓度(10.00 ng/ml)血浆样品和低、中、高浓度(20.00、500.00、8 000.00 ng/ml)QC样品,每浓度取6样本分析,连续测3 d,根据当日标准曲线计算各样品的测得浓度,考察各浓度下的精密度和准确度。结果显示,三者日内、日间RSD<15%,相对误差RE为-3.5%~5.7%。精密度和准确度试验结果见表2。

表2 精密度和准确度试验结果

Tab 2 Results of precision and accuracy tests

待测物	加入浓度, ng/ml	日内精密度(n=6)		日间精密度(n=3)		RE, %
		测得值, ng/ml	RSD, %	测得值, ng/ml	RSD, %	
CLO	0.03	0.030±0.002	6.0	0.029±0.001	5.1	-0.4
	0.05	0.053±0.004	7.4	0.049±0.001	2.2	0.4
	2.00	2.06±0.11	5.3	2.00±0.09	4.3	2.9
	18.00	18.53±0.67	3.6	18.93±0.25	1.3	1.1
CATMD	0.30	0.31±0.02	5.8	0.31±0.01	2.9	-2.6
	0.50	0.50±0.06	12.4	0.54±0.02	4.0	2.1
	20.00	19.20±2.07	10.8	19.70±0.70	3.6	-2.6
	180.00	190.00±10.08	5.3	195.67±6.43	3.3	-2.8
CCAM	10.00	10.13±0.34	3.3	10.25±0.35	3.4	2.4
	20.00	20.30±1.91	9.4	20.27±0.68	3.4	-2.5
	500.00	477.17±44.20	9.3	466.67±17.10	3.7	-3.5
	8 000.00	7 773.33±805.35	10.4	7 510.00±193.13	2.6	5.7

2.4.4 基质效应和提取回收率考察 取空白血浆50 μl,加入乙腈250 μl,混匀,离心,分离上清液,吹干,在残渣中分别加入含CLO、CATMD、CCAM的混合溶液(浓度与相应的QC样品相同)50 μl、内标溶液50 μl、乙腈200 μl,涡旋混匀,离心,取上清液进样分析,记录各组峰面积(B)。以水代替空白血浆进行上述操作,进样分析,记录各组峰面积(A)。以当日相应浓度的QC样品,按“2.3”项下方法处理,进样分析,记录各组峰面积(C)。基质效应=B/A×100%,提取回收率=C/B×100%。基质效应考察低、高浓度,提取回收率考察低、中、高浓度。结果表明,各浓度CLO的提取回收率分别为73.8%、86.9%、83.2%,CATMD的提取回收率分别为78.2%、92.4%、87.7%,CCAM的提取回收率分别为82.3%、90.3%、77.5%,内标的提取回收率为92.9%。各浓度CLO的基质效应分别为89.9%、93.6%,CATMD的基质效应分别为91.9%、87.3%,CCAM的基质效应分别为96.4%、99.8%,内标的基质效应为102.7%。表明在本试验所选择的色谱及质谱条件下,可忽略基质效应的影响<sup>[12]</sup>。

2.4.5 稳定性考察 本试验分别考察了CLO、CATMD和CCAM低、高浓度QC样品在不同保存条件下的稳定性(n=3)。结果表明,血浆样品4℃放置4 h稳定(CLO的RE为-7.9%~5.8%,CATMD的RE为-3.4%~7.9%,CCAM的RE为7.3%~9.2%);血浆样品经处理后,4℃放置8 h稳定(CLO的RE为2.7%~5.4%之间,CATMD的RE为-3.9%~7.7%,CCAM的RE为-5.2%~6.7%);血浆样品-20℃放置45 d稳定(CLO的RE为-0.5%~6.3%,CATMD的RE为-2.2%~9.4%,CCAM的RE为-5.4%~8.7%);血浆样品经历3次冷冻-解冻循环稳定(CLO的RE为-5.5%~1.8%,CATMD的RE为-4.7%~-3.8%,CCAM的RE为-7.5%~-2.4%)。

2.4.6 CATM质量浓度换算 由于CATM自身的不稳定性,在方法学的建立和验证过程中都是使用CATMD作为研究对象,在对未知样品的测定时需要加入保护剂MBP,将CATM烷化

为CATMD。因此,在样品分析结束后,需要将所得的CATMD质量浓度乘以系数0.71(据两者分子质量换算所得)折算成CATM的质量浓度。

## 2.5 药动学研究

5名健康受试者,体质量56.5~75.4 kg,年龄28~37岁,心电图、血压、血/尿常规及肝/肾功能检查正常。试验期间统一饮食。试验方案经连云港市第一人民医院医学伦理委员会批准,受试者均了解本试验的目的、方法和意义,自愿参加试验并签署知情同意书。

受试者试验前禁食12 h以上,于第2天早上空腹单剂量口服CLO片300 mg,200 ml温开水送服,服药2 h后可适量饮水,服药后4 h内禁食。分别于服药前和服药后0.25、0.5、1.0、1.5、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、8.0、12.0、24.0 h前臂静脉采血5 ml,置肝素抗凝管中,立即加入500 mmol/L MPB保护液25 μl,上下轻轻颠倒5次,混匀,室温放置10 min,4 000 r/min离心5 min,分离血浆,置-20℃冰箱保存,备测。

采用UPLC-MS/MS法测定给药后不同时间点CLO、CATMD、CCAM的血药浓度,并换算CATM的血药浓度。结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,血浆样品定量分析数据通过Analyst 1.6.2软件处理,药动学参数由DAS 2.0软件分析计算。各组分平均药-时曲线见图2;主要药动学参数见表3。

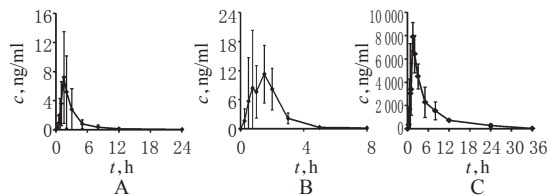


图2 各组分平均药-时曲线

A.CLO;B.CATM;C.CCAM

Fig 2 Mean concentration-time curves of each group

A.CLO;B.CATM;C.CCAM

表3 5名健康受试者单剂量口服CLO片300 mg的药动学参数( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

Tab 3 Main pharmacokinetic parameters of 5 healthy subjects after oral administration of 300 mg CLO tablets ( $\bar{x} \pm s, n=5$ )

药动学参数	CLO	CATM	CCAM
$c_{max}$ , ng/ml	7.89±5.46	15.58±8.08	8 023.33±1 047.39
$t_{1/2}$ , h	2.31±0.61	0.64±0.08	6.53±2.55
$t_{max}$ , h	1.25±0.43	1.25±0.43	1.67±0.29
$AUC_{0-4}$ , ng·h/ml	17.19±14.59	21.39±9.58	30 648.85±8 026.63
$AUC_{0-24}$ , ng·h/ml	17.65±15.19	22.23±8.60	33 454.79±10 470.13

## 3 讨论

CLO在体内经代谢后所得活性代谢物CATM在血浆中的浓度极低,对其血药浓度的定量分析需要灵敏度很高的分析方法。曾有以血药浓度较高的非活性代谢产物CCAM进行药动学研究及采用LC-MS/MS法同时测定血浆中CLO、CCAM浓度的文献报道<sup>[13-14]</sup>,但CLO、CCAM均没有药理活性,不能满足CLO药动学、药效学研究的需要。CATM分子结构中含有活性非常高的游离巯基,在生物样品中极不稳定,易形成自身二硫键或与其他内源性物质形成二硫键,常规手段难以对其血药浓度进行检测,故需要在样品中加入烷化剂(如MPB)对其游离巯基加以保护,再进行定量分析<sup>[13-14]</sup>。在本次试验中,

笔者选用MPB作为烷化剂,对CATM进行衍生化,获得稳定的烷化衍生物CATMD,并对其进行定量分析,再通过分子质量换算,计算得较准确的CATM血药浓度。

Takahashi M等<sup>[13]</sup>考察了人血浆中CATM的稳定性,发现血浆采集后,CATM浓度迅速下降,10 min之内下降至初始浓度的80%,60 min降至30%以下。因此,在血样采集后应立即加入MPB,以确保血浆样品在处理和贮存过程中CATM的稳定性和测定结果的可靠性。MPB对CATM的烷化率超过90%,视同CATM完全转化为CATMD<sup>[13-14]</sup>。笔者比较了采血前在采血管中预先加入MPB和采血后再加入MPB两种处理方法,结果显示,在采血管中预先加入MPB的血浆样本几乎检测不到CATMD,可能是由于MPB的溶媒改变致使MPB析出太快,吸附在管底,不能与CATM充分接触,导致其不能及时衍生为CATMD。

CCAM结构中含有裸露的羧基,理论上在负离子模式下响应更强,本研究在正负离子模式下分别对其进行扫描,结果显示,负离子模式下响应约为正离子模式的10倍。但CLO和CATMD需在正离子模式下检测,考虑到在同一模式下响应稳定,且CCAM在正离子模式下灵敏度可满足检测要求,故最终选择正离子模式进行检测。在方法建立的过程中,CCAM在碰撞能量20 V时响应最强,但在此能量下,CCAM浓度达定量上限时MS响应已经饱和,导致无法检测,故最终选择CCAM的碰撞能量为10 V。

Peer CJ等<sup>[15]</sup>最初认为MPB可能会影响CLO的MS信号,在样本采集时将样本分为两份,一份加入MPB,一份不加MPB,通过1 000多份临床样本的分析,发现样本中是否加入MPB对CLO检测结果没有显著影响,表明MPB没有明显的基质效应。本试验方法学考察也证实,MPB的基质效应不会影响待测物血药浓度的测定。

本试验采用烷化剂对血浆样品进行保护,建立同时测定人体血浆中CLO、CATM、CCAM浓度的UPLC-MS/MS分析方法,该方法具有操作简便、灵敏度高、分析效率高、稳定性好等特点,可用于CLO血药浓度测定和药动学研究。

## 参考文献

[1] Anderson JL, Adams CD, Antman EM, et al. 2012 ACCF/AHA focused update incorporated into the ACCF/AHA 2007 guidelines for the management of patients with unstable angina/non-ST-elevation myocardial infarction: a report of the American college of cardiology foundation/American heart association task force on practice guidelines[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2013, 61(23):e179.

[2] American College of Emergency Physicians, Society for Cardiovascular Angiography and Interventions, O' Gara PT, et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of ST-elevation myocardial infarction: a report of the American college of cardiology foundation/American heart association task force on practice guidelines[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2013, 61(4):e78.

[3] Karażniewicz-Łada M, Danielak D, Teżyk A, et al. HPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of

clopidogrel, its carboxylic acid metabolite and derivatized isomers of thiol metabolite in clinical samples[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2012, doi: 10.1016/j.jchromb.2012.11.005.

- [4] Hurst NL, Nooney VB, Raman B, et al. Clopidogrel "resistance": pre-vs post-receptor determinants[J]. *Vascul Pharmacol*, 2013, 59(5/6):152.
- [5] Delavenne X, Mallouk N, Piot M, et al. Is there really a relationship between the plasma concentration of the active metabolite of clopidogrel and the results of platelet function tests?[J]. *J Thromb Haemost*, 2010, 8(10):2 334.
- [6] Bouman HJ, Parlak E, van Werkum JW, et al. Which platelet function test is suitable to monitor clopidogrel responsiveness? A pharmacokinetic analysis on the active metabolite of clopidogrel[J]. *J Thromb Haemost*, 2010, 8(3): 482.
- [7] Serebruany VL. Plasma clopidogrel metabolites and anti-platelet "resistance": back to the future[J]. *Thromb Res*, 2008, 122(6):725.
- [8] Serebruany VL. The "clopidogrel resistance" trap[J]. *Am J Cardiol*, 2007, 100(6):1 044.
- [9] Mullangi R, Srinivas NR. Clopidogrel: review of bioanalytical methods, pharmacokinetics/pharmacodynamics, and update on recent trends in drug-drug interaction studies [J]. *Biomed Chromatogr*, 2009, 23(1):26.
- [10] 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.
- [11] 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.
- [12] U.S. Food and Drug Administration. *Guidance for industry: bioanalytical method validation*[EB/OL].[2015-11-02]. <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf>.
- [13] 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):1 219.
- [14] Elsinghorst PW. Quantitative determination of clopidogrel and its metabolites in biological samples: a mini-review [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2013, doi:10.1016/j.jchromb.2012.12.024.
- [15] 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.

(收稿日期:2015-10-31 修回日期:2015-11-06)

(编辑:张元媛)