

# HPLC法测定患者血浆中氯吡格雷的羧酸代谢产物浓度

刘丽娜<sup>1\*</sup>, 夏泉<sup>2,3</sup>, 黄燕<sup>2</sup>, 许杜娟<sup>1,2,3#</sup>(1.安徽医科大学药学院,合肥 230032;2.安徽医科大学第一附属医院药剂科,合肥 230032;3.国家中医药管理局中药化学三级实验室,合肥 230032)

中图分类号 R969.1;R973<sup>+.2</sup> 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)06-0531-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.06.18

**摘要** 目的:建立一种简易快速的方法测定人血浆中氯吡格雷代谢产物羧酸氯吡格雷(CCA)的浓度。方法:血浆样品经6%高氯酸液-液萃取后采用高效液相色谱-紫外(HPLC-UV)法进行测定,内标为苯妥英钠,色谱柱为Hypersil ODS C<sub>18</sub>,流动相为0.05 mol/L磷酸二氢钾(三乙胺调pH至5.7)-乙腈(78:22),紫外检测波长为220 nm,流速为1.0 ml/min,柱温为50℃。结果:CCA血药浓度在0.10~8.0 μg/ml范围内线性关系良好( $r=0.9995$ ),分析方法最低检测限为0.05 μg/ml;方法回收率为99.7%~100.2%,提取回收率>75%;日内、日间RSD均小于3%,冻融稳定性RSD均小于10%( $n=5$ )。结论:本方法简便、准确、灵敏度高,专属性和稳定性较好,适用于氯吡格雷的临床研究和药动学研究。

**关键词** 氯吡格雷;羧酸代谢产物;高效液相色谱法;血药浓度

## Concentration Determination of Carboxylic Acid Metabolite of Clopidogrel in Human Plasma by HPLC

LIU Li-na<sup>1</sup>, XIA Quan<sup>2,3</sup>, HUANG Yan<sup>2</sup>, XU Du-juan<sup>1,2,3</sup>(1. School of Pharmacy, Anhui Medical University, Hefei 230032, China; 2. Dept. of Pharmacy, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230032, China; 3. Third-grade Laboratory of TCM and Chemistry, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Hefei 230032, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a simple and rapid method for the determination of carboxylic acid metabolite of clopidogrel (CCA) in human plasma. METHODS: After liquid-liquid extraction with 6% perchloric acid, plasma sample was determined by HPLC-UV using phenytoin sodium as internal standard. The separation was performed on Hypersil ODS C<sub>18</sub> column with mobile phase consisting of 0.05 mol/L monopotassium phosphate (pH adjusted to 5.7 using triethylamine)-acetonitrile(78:22) at the flow rate of 1.0 ml/min. UV detection wavelength was set at 220 nm, and the column temperature was 50 °C. RESULTS: The linear range of CCA were 0.10-8.0 μg/ml( $r=0.9995$ ); the method recovery was 99.7%~100.2%, the extraction recovery was >75%; the LOQ was found to be 0.05 μg/ml. Both the inter-day and intra-day RSD were lower than 3%; the freeze-thaw stability RSD was less than 10% ( $n=5$ ). CONCLUSIONS: The method is convenient, accurate, sensitive, specific and stable, which could be applied for clinical study and pharmacokinetic study of clopidogrel.

**KEYWORDS** Clopidogrel; Carboxylic acid metabolite; HPLC; Plasma concentration

氯吡格雷(Clopidogrel)(结构式见图1A)是一种新型的噻吩吡啶类衍生物,具有抗血小板聚集作用及抗血栓形成作用。其作用机制是通过选择性地与血小板表面ADP受体结合来抑制血小板的聚集,目前已被广泛应用于冠脉支架植入(PCI)术中、术后以预防急、慢性血栓形成<sup>[1]</sup>。氯吡格雷为前体药,在体内约有85%被水解成无活性的羧酸氯吡格雷(CCA,结构式见图1B),而不足15%被代谢为活性的噻醇衍生物。此前药及其活性噻醇衍生物极不稳定,且浓度极低,在血浆中用常规检测方法很难检测到<sup>[2]</sup>。CCA相比其前体药和活性代谢产物,是氯吡格雷在体内的主要组成部分,常用于做氯吡格雷的生物等效性及药动学研究<sup>[2-4]</sup>。本研究旨在建立用高效液相色谱-紫外(HPLC-UV)法测定人血浆中CCA的浓度,该方法具有简便、准确、灵敏度高优点,为临床应用及个体化治疗方案提供参考。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Ailgent 1100 高效液相色谱系统,配DAD-G1315B检测

\*药师。研究方向:临床药学。电话:0551-62922421。E-mail: liulinlnln@126.com

#通信作者:主任药师。研究方向:医院药学。电话:0551-62922442。E-mail: xudujuan6365@yahoo.com.cn

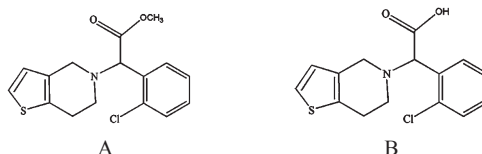


图1 氯吡格雷及CCA结构式  
A.氯吡格雷;B.CCA

Fig 1 Chemical structures of clopidogrel and carboxylic acid metabolite of clopidogrel

A. clopidogrel; B. carboxylic acid metabolite of clopidogrel

器、1100 色谱工作站(美国Ailgent公司);AB135-5 电子天平(上海梅特勒多-托利多公司);XW-80A 旋转振荡器(上海医科大学仪器厂);TGL-185 高速冷冻离心机(长沙平凡仪器仪表有限公司)。

### 1.2 药品与试剂

CCA对照品(加拿大TRC公司,含量:98%,批号:3-JHY-32-3);内标:苯妥英钠对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100210-200401)。甲醇、乙腈为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。健康人血浆由安徽医科大学第一附属医院检验科提供,CCA血浆样品取自安徽医科大学第一附属医院门诊及住院服用氯吡格雷的患者。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱: Hypersil ODS C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.05 mol/L 磷酸二氢钾(三乙胺调pH至5.7)-乙腈(78:22); 流速: 1.0 ml/min; 柱温: 50 ℃; 紫外检测波长: 220 nm; 进样量: 20 μl。

### 2.2 储备液的配制

分别准确称取CCA对照品和苯妥英钠对照品适量,用甲醇溶解并稀释,配制成浓度为100 μg/ml的储备液,置于4 ℃冰箱中保存备用。

### 2.3 血浆样品预处理

精密吸取患者血浆200 μl,置于1.5 ml具塞圆底塑料离心管中,加内标苯妥英钠储备液10 μl,涡旋混匀2 min,加6%高氯酸50 μl涡旋混匀2 min。以离心半径为8 cm、14 000 r/min离心10 min,取上清液再次以离心半径为8 cm、14 000 r/min离心10 min,取上清液置于进样瓶中,进样20 μl。

### 2.4 色谱行为

在“2.1”项色谱条件下,CCA和苯妥英钠的保留时间分别为7.6、19.8 min。CCA和苯妥英钠与血浆中其他组分色谱峰分离良好,理论板数为3 000,分离度(R)>1.5,色谱见图2。

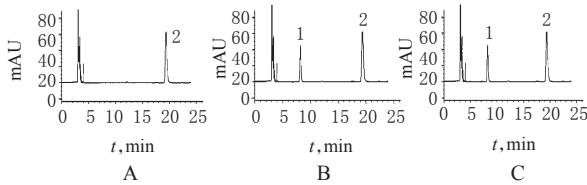


图2 高效液相色谱图

A. 空白血浆; B. 空白血浆+CCA+苯妥英钠; C. 患者血浆; 1. CCA; 2. 苯妥英钠

Fig 2 HPLC chromatograms

A. blank plasma; B. blank plasma+CCA+phenytoin sodium; C. plasma; 1. CCA; 2. phenytoin sodium

### 2.5 标准曲线及线性范围考察

用空白血浆将CCA储备液稀释成0.10、0.25、0.5、1、2、4、8 μg/ml的系列溶液。按“2.3”项下方法处理并测定,记录色谱。以血药浓度(x)为横坐标,所测药物与内标峰面积的比值(y)为纵坐标,进行线性回归,得到回归方程为: $y=0.1499x+0.0551$  ( $r=0.9995$ )。结果表明CCA血药浓度在0.10~8.0 μg/ml范围内线性关系良好,最低检测限为0.05 μg/ml。

### 2.6 精密度试验

分别配制0.5、2.0、4.0 μg/ml的CCA低、中、高3种质量浓度的含对照品血浆,每一质量浓度平行操作5份,于同日内按“2.3”项方法操作后进样分析,计算日内精密度;连续5 d按此法操作,综合5 d的数据计算日间精密度。CCA日内、日间RSD均小于10%,方法精密度良好,结果见表1。

### 2.7 回收率试验

2.7.1 方法回收率:分别配制0.5、2.0、4.0 μg/ml的CCA低、中、高3种质量浓度的含对照品血浆,按“2.3”项下方法操作,每一浓度平行操作5份后进样分析,代入回归方程计算浓度,以测得量和加入量的比值计算方法回收率。结果CCA的方法回收率在99.7%~100.2%之间,确保了定量的准确性和可靠性,见表1。

2.7.2 提取回收率:分别配制0.5、2.0、4.0 μg/ml的CCA低、中、高3种质量浓度的含对照品血浆,按“2.3”项下方法操作,每一浓度平行操作5份后进样分析。另配制与血浆中相同浓度的CCA对照品溶液,与样品中含量相等的CCA比较,记录峰面积

表1 精密度与回收率试验结果(n=5)

Tab 1 Results of precision and recovery tests(n=5)

加入量, μg/ml	日内精密度		日间精密度		方法回 收率,%	提取回 收率,%
	测得量, μg/ml	RSD,%	测得量, μg/ml	RSD,%		
0.5	0.498±0.004	0.72	0.495±0.005	1.00	99.7	75.7
2.0	1.995±0.014	0.70	1.943±0.042	2.10	99.8	76.2
4.0	3.997±0.013	0.35	3.971±0.041	1.18	100.2	75.3

计算提取回收率。结果提取回收率均大于75%,见表1。

上述结果表明,日内、日间RSD均小于3%,平均方法回收率在99.7%~100.2%之间,平均提取率均大于75%。该方法适用于本品血药浓度检测和药动学研究。

### 2.8 冻融稳定性试验

用空白血浆配制0.5、2.0、4.0 μg/ml的CCA低、中、高3种质量浓度的含对照品样品,在-40 ℃冰箱中冷冻后取出,在0、24、48、72 h后按“2.3”项下方法测定CCA的浓度。结果CCA低、中、高3种质量浓度测得值的RSD分别为1.0%、2.1%、1.18%,稳定性RSD均小于10%,表明样品在-40 ℃条件下稳定。

### 2.9 患者血药浓度检测

从门诊及住院病房共收集到15例PCI术后规律服用氯吡格雷75 mg/d超过7 d的患者,患者在当天早上服药后3 h时采集血样测其CCA血药浓度,结果见表2。

表2 患者CCA血药浓度测定结果

Tab 2 Plasma concentration results of CCA in patients

样本序号	性别	年龄,岁	服药剂量,mg/d	实测血药浓度,μg/ml
1	男	64	75	2.927
2	女	57	75	2.721
3	女	54	75	1.982
4	男	69	75	2.002
5	女	61	75	1.678
6	女	59	75	1.923
7	男	56	75	2.302
8	女	63	75	1.781
9	女	57	75	2.313
10	男	71	75	1.957
11	男	64	75	2.134
12	女	56	75	1.879
13	男	65	75	2.137
14	男	61	75	1.981
15	女	58	75	2.074

## 3 讨论

本研究建立了以HPLC-UV法测定血浆中羧酸氯吡格雷的浓度,方法专属性高,方法回收率在99.7%~100.2%之间,提取回收率超过75%,稳定性RSD均小于10%,符合药动学和生物等效性的要求<sup>[2-4]</sup>。因此测定CCA的血药浓度可以对研究氯吡格雷体内过程以及指导氯吡格雷进行个体化给药提供帮助。

氯吡格雷羧酸代谢产物的测定方法目前有HPLC及液-质联用(LC-MS/MS)法等。本研究使用HPLC法,其中流动相中用三乙胺调pH可增加仪器灵敏度。试验过程中曾比较二氯甲烷、正乙烷、乙醚、6%高氯酸萃取CCA,发现6%高氯酸萃取率最高。与文献报道<sup>[4]</sup>方法相比,本法具有以下特点:(1)样品预处理较为简单;(2)和文献中1.7 ml/min的流速相比,该研究流速较低从而使CCA和血浆中杂质峰充分分离。

氯吡格雷药物体内药动学过程中,其吸收和代谢过程受ATP结合盒(ABC)1及细胞色素P<sub>450</sub>酶(CYP)酶单核苷酸多态性(SNP)的影响,基因型不同其CCA的血药浓度也有所

# HPLC法测定人血浆中拉莫三嗪的浓度及其影响因素研究

宋霞<sup>1\*</sup>, 张建隆<sup>2</sup>, 邱雯<sup>1#</sup>(1. 兰州大学第二医院药学部, 兰州 730030; 2. 天水市第一人民医院药剂科, 甘肃天水 741000)

中图分类号 R969.1; R971<sup>+</sup>.6 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)06-0533-04  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.06.19

**摘要** 目的: 建立测定人血浆中拉莫三嗪(LTG)浓度的方法, 分析LTG血药浓度的相关影响因素。方法: 血浆样品以甲醇处理后采用高效液相色谱(HPLC)法进行测定, 其中内标为氯霉素, 流动相为乙腈-磷酸盐缓冲液(30:70), 色谱柱为Luna C<sub>18</sub>, 流速为1 ml/min, 检测波长为306 nm。对收集的病例进行分组, 应用逐步回归法分析影响LTG血药浓度的各类因素; 应用相关分析法分析不同组别中的影响因素。结果: 拉莫三嗪的血药浓度在0.5~20.0 μg/ml范围内线性关系良好( $r=0.999\ 5$ ), 最低检测限为0.5 μg/ml; 低、中、高3种质量浓度的平均方法回收率分别为(94.39±1.57)%、(95.57±2.22)%、(91.81±2.11)%; LTG血药浓度与LTG给药剂量、联用丙戊酸(VPA)呈正相关( $r$ 分别为0.641 7、2.568 0,  $P<0.05$ ), 与联用苯巴比妥(PB)呈负相关( $r=-2.048\ 2$ ,  $P<0.05$ ); 性别、年龄及体质量与其不存在显著的相关关系( $P>0.05$ )。结论: 本试验建立的HPLC法操作简便、快捷、回收率高、精密度好, 适用于临床上常规监测LTG的血药浓度; LTG血药浓度可受LTG给药剂量、联合应用VPA及PB等因素的影响, 因此在临床有必要开展其血药浓度监测, 实行个体化给药。

**关键词** 高效液相色谱法; 拉莫三嗪; 血药浓度; 个体化给药

**Determination of Lamotrigine Concentration in Human Plasma by HPLC and Study on Its Influencing Factors**  
SONG Xia<sup>1</sup>, ZHANG Jian-long<sup>2</sup>, QIU Wen<sup>1</sup>(1. Dept. of Pharmacy, The Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730030, China; 2. Dept. of Pharmacy, Tianshui First People's Hospital, Gansu Tianshui 741000, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method for the determination of lamotrigine (LTG) concentration in human plasma, to analyze the influential factors of plasma concentration of LTG. METHODS: After treated with methanol, the plasma sample was determined by HPLC using chloramphenicol as internal standard. The determination was performed on Luna C<sub>18</sub> column with mobile phase consisted of acetonitrile-phosphate buffer (30:70) at the flow rate of 1ml/min. The detection wavelength was set at 306 nm. The collected cases were divided into groups, and stepwise regression method was used to analyze the influential factors of plasma concentration of LTG; correlation analysis method was adopted to investigate influential factors in different groups. RESULTS: The linear range of LTG were 0.5-20.0 μg/ml ( $r=0.999\ 5$ ). The lowest limit of detection was 0.5 μg/ml. Average recoveries were (94.39±1.57)%, (95.57±2.22)% and (91.81±2.11)% at low, medium and high concentrations, respectively; plasma concentration of LTG had a positive correction with LTG dose ( $r=0.641\ 7$ ,  $P<0.05$ ) and co-medication with VPA ( $r=2.568\ 0$ ,  $P<0.05$ ) and a negative correction with the co-medication with PB ( $r=-2.048\ 2$ ,  $P<0.05$ ); while there was no correction with the sex, age and weight ( $P>0.05$ ). CONCLUSIONS: HPLC method is proved to be simple and rapid with high recovery and precision, and suitable for the plasma concentration monitoring of LTG. LTG dose, co-medication with VPA or PB significantly influence plasma concentration of LTG, therefore, it is necessary to carry out plasma concentration monitoring and implement individualized administration.

**KEYWORDS** HPLC; Lamotrigine; Plasma concentration; Individualized administration

差别。另合并用药的相互作用、年龄、体质量, 患者生活习惯及肝肾功能也会影响其血液浓度<sup>[5]</sup>。

## 参考文献

- [1] Jolanta M, Siller-Matula, Katrin Haberl, et al. The effect of antiplatelet drugs clopidogrel and aspirin is less immediately after stent implantation [J]. *Thrombosis Research*, 2009, 123(6): 874.
- [2] Zydus Research Centre, Bioanalytical and DMPK Department, Sarkhej-Bavla N.H. Estimation of carboxylic acid metabolite of clopidogrel in Wistar rat plasma by HPLC and its application to a pharmacokinetic study[J]. *Journal*

*of Chromatography B*, 2005, 25(821): 173.

- [3] Robinson A, Hilis J, Neal C, et al. The validation of a bio-analytical method for the determination of clopidogrel in human plasma[J]. *Journal of Chromatography B*, 2007, 27(848): 344.
- [4] Bahrami G, Mohammadi M, Sisakhtnezhad S, et al. High-performance liquid chromatographic determination of inactive carboxylic acid metabolite of clopidogrel in human serum: application to a bioequivalence study[J]. *Journal of Chromatography B*, 2008, 28(864): 168.
- [5] Zhou HM, Meng S, Zhao J, et al. Influence of genetic and non-genetic factors on the plasma concentrations of the clopidogrel metabolite (SR26334) among Chinese patients [J]. *Clinica Chimica Acta*, 2013, 416(1): 50.

(收稿日期: 2013-08-27 修回日期: 2013-11-20)

\*药师, 硕士。研究方向: 药物新剂型与临床药学。电话: 0931-8942753。E-mail: qiueyisongxia@163.com

#通信作者: 主任药师, 博士。研究方向: 临床药学。电话: 0931-8942496。E-mail: qiuwenmm@sina.com