

## 同时测定小鼠血浆中氯吡格雷及其代谢产物浓度的 LC-MS/MS 法及其药代动力学研究

张梦然, 邵 婷, 米琼宇, 吉金子, 黄贝贝, 贾雨萌, 谢红光\*

(南京医科大学附属南京医院中心实验室, 江苏 南京 210006)

**[摘要]** 目的: 建立并验证小鼠血浆中氯吡格雷及其代谢物的 LC-MS/MS 检测方法, 研究氯吡格雷在小鼠体内的药代动力学特征。方法: 以吡罗昔康为内标, 经乙腈沉淀蛋白后, 采用电喷雾离子源 (ESI) 正离子扫描模式多反应监测 (multiple reaction monitoring, MRM) 方式检测氯吡格雷及其活性代谢物、羧酸代谢物和葡萄糖醛酸代谢物的血药浓度。色谱柱为安捷伦 Poroshell 120 SB-C18 柱 (100 mm×2.1 mm, 2.7 μm); 流动相为水 (含 0.1% 甲酸) 和乙腈 (含 0.1% 甲酸) 并按梯度洗脱。小鼠单次灌胃给予氯吡格雷 10 mg/kg, 测定氯吡格雷及其 3 种主要代谢物的血药浓度, 并研究其药代动力学特征。结果: 氯吡格雷及其代谢产物在一定测定范围内均呈现良好的线性关系 ( $r > 0.99$ ), 提取回收率均大于 80%, 未见明显基质效应, 其日内、日间精密度的均较好 (RSD < 15%), 准确度相对误差 (RE) 为 -2.40%~5.00%, 稳定性较好。在小鼠的药代动力学研究中, 该方法能达到预期的实验要求。结论: 所建立的 LC-MS/MS 分析方法能快速、准确地测定小鼠血浆中氯吡格雷及其代谢产物浓度, 其专属性、回收率、基质效应、稳定性、精密度和准确度等均符合生物样品测定要求。

**[关键词]** 氯吡格雷; LC-MS/MS; 药代动力学; 药物代谢

**[中图分类号]** R969.1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2017)08-955-06

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20170807

## Determination of clopidogrel and its metabolites in plasma by LC-MS/MS and its application in the pharmacokinetics study in mice

Zhang Mengran, Tai Ting, Mi Qiongyu, Ji Jinzi, Huang Beibei, Jia Yumeng, Xie Hongguang\*

(General Clinical Research Center, Nanjing First Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210006, China)

**[Abstract]** **Objective:** To develop and validate a sensitive high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of clopidogrel and its metabolites and subsequently to use it to investigate pharmacokinetic properties of clopidogrel in mice. **Methods:** Clopidogrel and its metabolites were determined at an electron spray ionization (ESI) source using multiple reaction monitoring (MRM) in positive ion mode after protein precipitation by acetonitrile, in which piroxicam was added as an internal standard. Chromatographic separation was achieved on a Poroshell 120 SB-C18 column (100×2.1 mm, 2.7 μm, Agilent Technologies) using a mobile phase that consisted of both solvent A (0.1% formic acid in water) and solvent B (0.1% formic acid in acetonitrile) in a gradient elution manner. The pharmacokinetics of clopidogrel was investigated in mice receiving a single dose of clopidogrel (10 mg/kg) by gavage administration. **Results:** The simultaneous assay of clopidogrel and its metabolites achieved good linearity ( $r > 0.99$ ) within the range of the spiked plasma concentrations. The recoveries were greater than 80%, and no significant matrix effect was found. The both intra- and inter-day RSDs were less than 15%, and the accuracy ranged from -2.40% to 5.00%. The stability of the method was good. In addition, a series of pharmacokinetics parameters were obtained in mice after receiving a single oral dose of clopidogrel through this analytical method. **Conclusion:** The modified methodology was highly sensitive, accurate, and reproducible for the simultaneous determination of clopidogrel and its three major metabolites in mouse plasma and therefore, it was successfully applied in pharmacokinetic studies of clopidogrel in mice.

**[Key words]** clopidogrel; LC-MS/MS; pharmacokinetics; drug metabolism

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(08):955-960]

**[基金项目]** 国家自然科学基金 (81473286, 81503144)

\*通信作者 (Corresponding author), E-mail: honggxie@163.com

氯吡格雷 (clopidogrel, CLP) 是一种噻吩并吡啶类抗血小板药物, 广泛用于预防急性冠脉综合征或行经皮冠状动脉介入治疗植入支架后患者的支架内血栓<sup>[1-3]</sup>。CLP 是一种前药(本身无药理学作用), 约 85% 的原药在体内被羧酸酯酶 1 水解代谢为无活性的羧酸代谢物 (clopidogrel carboxylate, CLP-C)<sup>[4-6]</sup>, 进而经 II 相结合反应代谢生成葡萄糖醛酸基结合物 (clopidogrel acyl glucuronide, CLP-G), 而只有 15% 的原药经细胞色素 P450 酶两步氧化代谢为活性产物 (clopidogrel active metabolite, CAM)。CAM 与血小板膜表面 P2Y<sub>12</sub> 受体结合, 阻断其与二磷酸腺苷结合, 最终发挥 CLP 的抗血小板作用<sup>[7-8]</sup>。

因 CLP 活性代谢产物 CAM 与药效直接相关, 非活性代谢产物 CLP-C 又是主要代谢产物, 在血浆中浓度较高, 可用来间接评价 CLP 的代谢特征<sup>[9]</sup>, 其葡萄糖醛酸基结合物 CLP-G 在甲醇中可以生物转化为 CLP, CLP-G 对血 CLP 浓度可能产生潜在影响<sup>[10]</sup>, 因此全面监测 CLP 及其代谢产物的血药浓度显得尤为必要。目前文献报道多集中在人血浆中 CLP、CAM 和 CLP-C 血药浓度监测<sup>[9-11]</sup>; 国外仅有一项关于 CLP-G 的报道<sup>[11]</sup>, 而国内尚未见报道。此外, 国内外仍未见有同时分析监测 CLP、CAM、CLP-C 和 CLP-G 的方法学报道。

本研究建立了高效液相色谱联用三重四极杆串联质谱 (LC-MS/MS) 的检测方法, 同时测定小鼠血浆中 CLP、CAM、CLP-C 和 CLP-G 浓度, 并将其应用于 CLP 在小鼠体内的药代动力学研究, 全面评价 CLP 及其 3 种主要代谢产物在小鼠体内的代谢特征, 为临床研究提供参考依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

高效液相色谱-质谱联用仪 (包括日本 Shimadzu LC-30A 超高效液相色谱和美国 AB SCIEX Triple Quad™ 4500 三重四极杆质谱仪); Vortex-Genie 2 旋涡混合器 (Scientific Industries 公司, 美国); Mikro 200R 冷冻离心机 (Hettich 公司, 德国); Concentrator plus 真空离心浓缩仪 (Eppendorf 公司, 德国); Milli-Q 超纯水器 (Millipore 公司, 美国)。

硫酸氢 CLP 原料药 (批号: NDS1601012, 北京诺德恒信化工技术有限公司); 硫酸氢 CLP 标准品 (批号: 100819-201405, 纯度 95%) 和吡罗昔康标准品 (批号: 100177-201303, 纯度 99.8%) (中国药品生物制品检定所); 2-溴-3'-甲氧基苯乙酮 (2-bro-

mo-3'-methoxyacetophenone, MPB, 批号: 101522615, 纯度 98%, Sigma-Aldrich 公司, 美国); 外消旋 CLP 活性产物衍生物 (racemic CAM derivative, CAMD) 标准品 (批号: 5-MNZ-188-22, 纯度 98%)、CLP-G 标准品 (批号: 6-JHX-28-16, 纯度 95%) 和 CLP-C 标准品 (批号: 3-JHY-32-3, 纯度 98%) (Toronto Research Chemicals 公司, 加拿大); 乙腈 (色谱纯) 和甲醇 (色谱纯) (Merck 公司, 德国); 其他试剂均为分析纯; 超纯水由 Milli-Q 纯水系统制备。

SPF 级健康雄性 C57BL/6 小鼠, 6~8 周龄 [许可证编号为 SCXK (苏) 2015-0001, 南京大学模式动物研究所], 饲养于南京医科大学附属南京医院动物实验中心, 标准温度和湿度下保持 12 h 交替的昼夜节律, 提供实验室标准食物, 自由饮水。实验前 1 d 禁食但不禁水。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 色谱条件

色谱柱: Poroshell 120 SB-C18 (100×2.1 mm, 2.7 μm, Agilent Technologies, 美国); 流动相: 水 (A, 含 0.1% 甲酸)-乙腈 (B, 含 0.1% 甲酸) 梯度洗脱; 流动相洗脱梯度: 0.01 min, A:B=70:30; 1.5 min, A:B=70:30; 4.5 min, A:B=10:90; 5.5 min, A:B=10:90; 5.51 min, A:B=70:30; 7.5 min, A:B=70:30。流速: 0.5 mL/min; 进样量: 5 μL; 自动进样器: 4 °C; 柱温: 40 °C。

#### 1.2.2 质谱条件

采用电喷雾离子源 (ESI) 正离子扫描模式多反应监测 (MRM) 方式进行检测, 检测离子对及条件设置见表 1; 离子喷雾电压为 5 500 V, 离子源温度为 550 °C, 气帘气 (CUR) 压力为 35 Psi, 喷雾气 (GS1, N<sub>2</sub>) 和辅助加热气 (GS2, N<sub>2</sub>) 压力分别为 40 Psi 和 45 Psi (1 Psi=6.895 kPa)。

表 1 CLP 及其代谢产物的质谱条件

Table 1 Mass spectrometric settings for simultaneous determination of CLP and its metabolites

化合物	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	去簇电 压 (V)	碰撞电 压 (V)	碰撞池出 口电压 (V)	入口 电压 (V)
CLP	322.06	212.1	78	23	6	10
CAMD	504.10	155.0	100	63	10	10
CLP-C	308.00	198.1	70	23	6	10
CLP-G	484.30	307.9	76	22	11	10
IS	332.02	95.0	76	47	10	10

### 1.2.3 血浆样品处理

10 μL 血浆样品中加入 50 μL 含 10 ng/mL IS 的乙腈, 涡旋 3 min, 4 °C, 4 000 r/min 离心 10 min (沉淀蛋白), 取 40 μL 上清, 加入 60 μL 纯水, 调节水-乙腈比例, 涡旋 1 min, 4 °C, 15 000 r/min 离心 20 min, 取 50 μL 上清于进样瓶。进样 5 μL, 使用 LC-MS/MS 定量测定血浆中 CLP 及其代谢产物的浓度。

### 1.2.4 动物实验方案

小鼠单次灌胃给予 CLP (10 mg/kg), 分别于给药后 5、15、30、45、75、120、180 和 300 min 眼眶后静脉丛取血约 30 μL 于肝素化试管 (每支试管均提前加入 2 μL 500 mmol/L MPB) 中, 立即混匀。4 000 r/min 离心 10 min, 分离血浆置于 -80 °C 冰箱中保存待测。

### 1.3 统计学方法

所得数据以均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用 DAS 2.0 软件作非房室模型分析, 计算药动学参数, 并绘

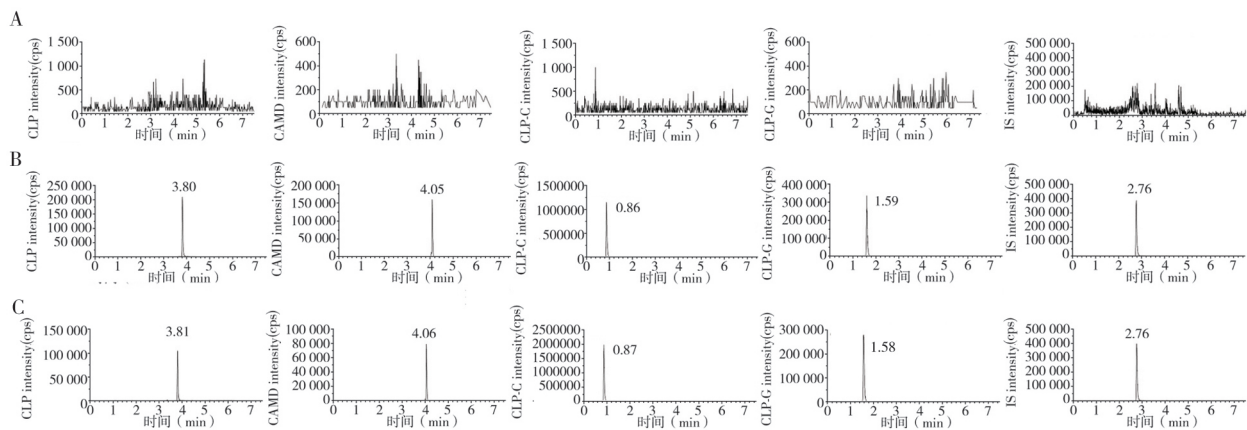
制平均血药浓度-时间曲线。

## 2 结 果

### 2.1 方法学验证结果

#### 2.1.1 方法专属性

取小鼠空白血浆 10 μL, 按 1.2.3 操作, 得空白血浆色谱图; 取小鼠空白血浆 10 μL, 分别加入一定量的 CLP、CAMD、CLP-C、CLP-G 和 IS 标准品, 按 1.2.3 操作, 得血浆对照品色谱图; 取 CLP 灌胃给药后 15 min 小鼠血浆 10 μL, 按 1.2.3 操作, 得血浆样品色谱图。空白血浆、空白血浆加标准品、小鼠给药后血浆样品的色谱图见图 1, 血浆样品中 CLP、CAMD、CLP-C、CLP-G 和 IS 的保留时间分别为 3.81、4.06、0.87、1.59 和 2.76 min。从图中可见, 各待测化合物的峰形和分离效果较好, 血浆中内源性物质无干扰, 具有较高专属性。



A: 空白血浆; B: 空白血浆加入内标、CLP 及其代谢产物标准品; C: CLP 灌胃给药后 15 min 的血浆样品。

图 1 CLP 及其代谢产物的血浆样品色谱图

Figure 1 Chromatograms of CLP and its metabolites in mouse plasma

#### 2.1.2 线性范围

取离心管数支, 精密加入系列混合标准品溶液后用真空浓缩仪挥干, 加入小鼠空白血浆 10 μL, 分别配制成 CLP 浓度为 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0、20.0、30.0 ng/mL, CAMD 浓度为 0.5、1.0、2.5、5.0、10.0、25.0、50.0、100.0、150.0 ng/mL, CLP-C 浓度为 50、100、200、500、1 000、2 000、5 000、10 000、15 000 ng/mL 和 CLP-G 浓度为 5、10、20、50、100、200、500、1 000、1 500 ng/mL 的标准含药血浆, 按 1.2.3 操作, 进样分析, 记录色谱图。采用最小二乘法对标准品浓度作线性回归分析, 计算样品与内标峰面积的比值在其浓度范围内是否呈线性。血浆中各化合物的标准曲线回归方程及其相关系数见表 2。

结果显示, CLP、CAMD、CLP-C 和 CLP-G 分别在 0.1~30.0、0.5~150.0、50~15 000 和 5~1 500 ng/mL 浓度范围内线性良好 ( $r > 0.99$ ), 定量下限分别为 0.1、0.5、50.0 和 5.0 ng/mL。

表 2 CLP 及其代谢产物在小鼠血浆中的标准曲线

Table 2 Standard curves of CLP and its metabolites in mouse plasma

化合物	标准曲线	r 值	定量下限 (ng/mL)
CLP	$Y=0.057\ 2000\ X-0.054\ 0000$	0.997 8	0.1
CAMD	$Y=0.005\ 9900\ X-0.005\ 6400$	0.996 8	0.5
CLP-C	$Y=0.000\ 2560\ X+0.003\ 1000$	0.992 0	50.0
CLP-G	$Y=0.000\ 0206\ X-0.000\ 0278$	0.997 1	5.0

2.1.3 提取回收率和基质效应

取低、中、高 3 个浓度的 CLP(0.2、2.0、20.0 ng/mL)、CAMD (1、10、100 ng/mL)、CLP-C (100、1 000、10 000 ng/mL)和 CLP-G(10、100、1 000 ng/mL)血浆质控样品各 5 份,按 1.2.3 操作(在蛋白沉淀后加入内标),进样分析得回收率样品中被分析物与内标的峰面积比值( $R_x$ );另取小鼠空白血浆 10  $\mu$ L,不加入内标,按 1.2.3 操作,蛋白沉淀后的上清加入上述相应浓度的标准品溶液及内标,进样分析得回收率对照品中被分析物与内标的峰面积比值( $R_s$ ),提取回收率  $R(\%)=R_x/R_s \times 100\%$ 。

基质效应样品按回收率对照品的制备方法进行制备,进样分析得峰面积为  $A_1$ ;另取低、中、高 3 个浓度的 CLP、CAMD、CLP-C、CLP-G 混合标准溶液及内标溶液,用真空浓缩仪挥干,加入到按 1.2.3 操作的非基质样品(以纯水代替血浆)中,浓度相当于上

述样品,进样分析得峰面积为  $A_2$ ,基质效应  $M(\%)=A_1/A_2 \times 100\%$ 。

各化合物在低、中、高 3 个浓度水平的提取回收率均  $>80\%$ (84.3%~96.6%),且未见明显的基质效应(98.6%~112.3%),表明该样品处理方法对 4 个待测成分均适用。

2.1.4 精密度和准确度

取低、中、高 3 个浓度(同 2.1.3)的血浆质控样品各 5 份,按照 1.2.3 操作,进样分析,根据当日标准曲线算得质控样品中各目标化合物的浓度,考察该方法日内、连续 3 d 的变异情况。表 3 结果显示,日内及日间精密度的相对标准偏差(RSD)均  $<15\%$ ,准确度相对误差(RE)为  $-2.40\% \sim 5.00\%$ ,提示本方法的日内、日间精密度和准确度均符合生物样品的检测要求,该检测方法稳定可行。

表 3 CLP 及其代谢产物在小鼠血浆中 LC-MS/MS 方法的精密度和准确度

Table 3 Precision and accuracy of LC-MS/MS method of CLP and its metabolites in mouse plasma

( $n=5, \bar{x} \pm s$ )

化合物(浓度,ng/mL)	日内			日间		
	测得浓度 (ng/mL)	精密度 (RSD, %)	准确度 (RE, %)	测得浓度 (ng/mL)	精密度 (RSD, %)	准确度 (RE, %)
CLP(0.2)	0.20±0.01	6.76	0.43	0.20±0.01	5.32	-0.72
CLP(2.0)	2.06±0.12	5.95	3.13	2.06±0.14	6.59	2.88
CLP(20.0)	19.55±1.53	7.83	-2.23	19.94±2.04	10.22	-0.30
CAMD(1)	1.04±0.08	7.87	1.40	1.02±0.07	7.25	1.66
CAMD(10)	9.88±0.55	5.53	-1.23	9.76±0.62	6.30	-2.40
CAMD(100)	104.93±5.73	5.46	4.93	103.84±4.52	4.35	3.84
CLP-C(100)	103.40±3.85	3.72	3.40	104.07±5.09	4.89	4.07
CLP-C(1 000)	1 050.00±85.40	8.14	5.00	1 036.00±65.20	6.30	3.60
CLP-C(10 000)	10 300.00±187.10	1.82	3.00	10 253.30±427.40	4.17	2.53
CLP-G(10)	10.43±1.33	12.74	4.30	10.20±0.80	7.80	2.01
CLP-G(100)	101.80±5.40	5.31	1.80	98.87±4.21	4.25	-1.13
CLP-G(1 000)	1 022.00±38.30	3.75	2.20	1 021.30±49.40	4.83	2.13

2.1.5 稳定性

取低、中、高 3 个浓度(同 2.1.3)的血浆质控样品各 20 份,平均分为 4 组,分别于室温放置 4 h 后处理,样品处理后于 4  $^{\circ}$ C 进样器放置 24 h,样品反复冻融 3 次后处理,样品于  $-80^{\circ}$ C 冰箱放置 45 d 后处理,进样分析。结果显示,稳定性试验中测定值与理论值的相对误差(RE)均在  $\pm 15\%$  以内( $-6.82 \sim 5.49$ ),表明 CLP、CAMD、CLP-C 和 CLP-G 在上述各处理条件下稳定性均良好。

2.2 CLP 在小鼠体内药代动力学研究

根据标准校正曲线计算血药浓度,药动学参数由 DAS 2.0 软件分析计算。CLP 及其代谢产物的平均血药浓度-时间曲线见图 2,主要药代动力学参数见表 4。结果显示,小鼠灌胃给予 10 mg/kg 单剂量 CLP 后,血浆中 CLP 和 CAM 的达峰时间  $T_{max}$  均在 30 min 之内,表明 CAM 的达峰时间较早,因而能在相对较短的时间内发挥其抗血小板作用。相比之下,CLP-C 峰浓度是 CAM 的约 100 倍,达峰时间延后约



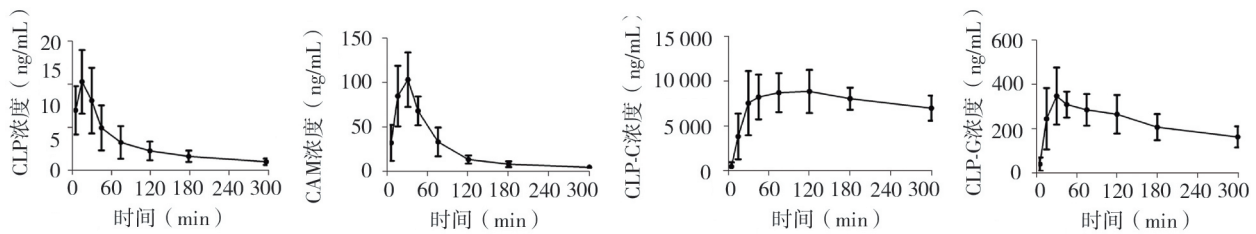


图 2 小鼠单剂量灌胃给药(10 mg/kg)后 CLP 及其代谢产物的平均血药浓度-时间曲线(n=10)

Figure 2 The mean plasma concentration-time curves of CLP and its metabolites in mice after receiving a single oral dose of 10 mg/kg clopidogrel (n=10)

表 4 小鼠单剂量灌胃给药 10 mg/kg CLP 后的主要药代动力学参数

Table 4 Pharmacokinetic parameters of CLP and its metabolites in mice after receiving a single oral dose of 10 mg/kg clopidogrel

参数	CLP	CAM	CLP-C	CLP-G
AUC <sub>0-∞</sub> (h · ng/mL)	24.4±9.0	131.2±30.8	139 817.0±72153.8	3 681.0±2209.6
AUC <sub>0-300</sub> (h · ng/mL)	19.3±7.3	121.4±29.0	38 144.5±6777.1	1 143.8±239.3
C <sub>max</sub> (ng/mL)	15.0±4.1	106.8±30.2	10130.9±2578.7	397.1±82.0
T <sub>max</sub> (min)	16.0±8.5	26.6±6.6	98.3±56.2	52.5±42.4
T <sub>1/2</sub> (min)	156.1±94.0	90.2±61.7	543.1±265.8	554.3±437.2
CL/F [L/(h·kg)]	473.1±198.7	N/A	N/A	N/A
V/F (L/kg)	1 649.4±799.3	N/A	N/A	N/A

4 倍; 半衰期长约 5 倍, 说明 CLP-C 的消除速度较慢, 在体内驻留时间更长, 暴露量更大。CLP-G 的系统暴露(AUC、C<sub>max</sub>)和达峰时间介于 CAM 与 CLP-C 之间, 但消除相半衰期与 CLP-C 近似。

### 3 讨论

CLP 是全球应用最为广泛的抗血小板药物之一<sup>[12]</sup>, 掌握其在人体内的药代动力学特征对临床用药具有重要意义。目前仅有少量文献报道了人血浆中 CLP、CAM、CLP-C 和 CLP-G 血药浓度的监测<sup>[9-11, 13-21]</sup>, 采用乙醚-正己烷液液萃取两次提取法, 处理过程较为繁琐, 提取回收率不高<sup>[13]</sup>。本研究血浆样品处理采用乙腈沉淀蛋白的方式<sup>[14]</sup>, 提取回收率高于液液萃取法, 既满足血浆样品的测定要求, 又避免了繁琐的实验步骤, 且所建立的检测方法具有比以往更低的定量下限<sup>[13, 15, 20]</sup>, CLP 和 CAM 的定量下限分别达到 0.1 和 0.5 ng/mL, 灵敏度更高。研究表明, CLP-G 在甲醇中会转化为 CLP<sup>[10]</sup>, 采用甲醇作为流动相会影响两者血药浓度检测的准确度。本研究采用乙腈作为流动相, 避免待测物的生物转化影响其测定结果。有研究只检测了 CLP 和 CLP-C, 未对

CAM 进行检测, 不能直接评价 CLP 的临床药效<sup>[13, 21]</sup>; 或在同时监测 CLP、CLP-C 和 CAM 时, 进样分析的洗脱时间均较短, 色谱峰的分度不高, 未能达到良好的分离效果<sup>[14-15]</sup>(在本色谱分离方法中, 流动相梯度洗脱时间为 7.5 min, 血浆中各待测物的色谱峰达到基线分离, 互不干扰); 或仅对活性代谢物 CAM 的 LC-MS/MS 检测方法进行了研究<sup>[16-19]</sup>; 或同时监测了 CLP、CLP-C 和 CLP-G 的血药浓度, 但未监测活性代谢物 CAM 的血药浓度<sup>[11]</sup>。且以往的研究多集中在人血浆, 本研究将 CLP 及其各种主要代谢物的 LC-MS/MS 检测方法应用于小鼠血浆中, 并研究其小鼠体内的药代动力学特征。

此外, 因含有巯基, CAM 在血浆中稳定性差<sup>[19]</sup>。本研究采用的是 CAM 衍生物(CAMD), 可减缓其降解。对于 CLP-C 和 CLP-G 的检测, 本研究采用的处理方法与以往不同, 因 CLP-C 和 CLP-G 水溶性较高, 遂采用纯乙腈沉淀蛋白后, 再加水调节水-乙腈比例, 使进样样品的的水-乙腈比例与初始流动相一致, 保证峰形尖锐对称, 避免溶剂效应造成峰展宽。

本研究从动物实验的角度出发, 建立并验证了同时测定小鼠血浆中 CLP、CAM、CLP-C 和 CLP-G 的

LC-MS/MS方法,研究CLP在小鼠体内的药代动力学特征,比以往的检测方法更全面系统且灵敏准确,可为该药的临床研究提供参考依据。

## [参考文献]

- [1] Mega JL, Close SL, Wiviott SD, et al. Cytochrome P450 polymorphisms and response to clopidogrel[J]. *N Engl J Med*, 2009, 360(4):354-362
- [2] Simon T, Verstuyft C, Mary-Krause M, et al. Genetic determinants of response to clopidogrel and cardiovascular events[J]. *N Engl J Med*, 2009, 360(4):363-375
- [3] Xie HG, Zou JJ, Hu ZY, et al. Individual variability in the disposition of and response to clopidogrel: pharmacogenomics and beyond[J]. *Pharmacol Ther*, 2011, 129(3):267-289
- [4] Zhu Y, Zhou J. Identification of the significant involvement and mechanistic role of CYP3A4/5 in clopidogrel bioactivation[J]. *ACS Med Chem Lett*, 2012, 3(10):844-849
- [5] Farid NA, Kurihara A, Wrighton SA. Metabolism and disposition of the thienopyridine antiplatelet drugs ticlopidine, clopidogrel, and prasugrel in humans[J]. *J Clin Pharmacol*, 2010, 50(2):126-142
- [6] Zhu HJ, Wang X, Gawronski BE, et al. Carboxylesterase 1 as a determinant of clopidogrel metabolism and activation[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2013, 344(3):665-672
- [7] Savi P, Zacharyus JL, Delesque-Touchard N, et al. The active metabolite of clopidogrel disrupts P2Y<sub>12</sub> receptor oligomers and partitions them out of lipid rafts[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(29):11069-11074
- [8] Wang ZY, Chen M, Zhu LL, et al. Pharmacokinetic drug interactions with clopidogrel: updated review and risk management in combination therapy[J]. *Ther Clin Risk Manag*, 2015, 11(3):449-467
- [9] Hua WY, 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 in human plasma[J]. *Bioanalysis*, 2015, 7(12):1471-1482
- [10] Simona NS, Luigi S, Mariana S, et al. Evaluation of clopidogrel conjugation metabolism: PK studies in man and mice of clopidogrel acyl glucuronide[J]. *Drug Metab Dispos*, 2016, 44(9):1490-1497
- [11] Silvestro L, Gheorghe M, Iordachescu A, et al. Development and validation of an HPLC-MS/MS method to quantify clopidogrel acyl glucuronide, clopidogrel acid metabolite, and clopidogrel in plasma samples avoiding analyte back-conversion[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2011, 401(3):1023-1034
- [12] Lemesle G, Delhay C, Sudre A, et al. Impact of high loading and maintenance dose of clopidogrel within the first 15 days after percutaneous coronary intervention on patient outcome[J]. *Am Heart J*, 2009, 157(2):375-382
- [13] 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
- [14] 孙增先,王海东,倪善红,等. UPLC-MS/MS法同时测定人血浆中氯吡格雷及其代谢物的浓度[J]. *中国药房*, 2015, 26(35):4942-4945
- [15] 刘帅兵,王子腾,丁肖良,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
- [16] 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):132-139
- [17] Park JB, Bae SH, Jang SM, et al. Direct measurement of active thiol metabolite levels of clopidogrel in human plasma using tris (2-carboxyethyl) phosphine as a reducing agent by LC-MS/MS[J]. *J Sep Sci*, 2013, 36(14):2306-2314
- [18] Tuffal G, Roy S, Lavis 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
- [19] Takahashia 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
- [20] 田溪,杨秀岭,张志清,等. 人血浆中氯吡格雷及其活性代谢物的LC-MS/MS法测定[J]. *中国医药工业杂志*, 2016, 47(2):202-206
- [21] 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):433-439

[收稿日期] 2017-02-03