

# LC-MS/MS 法测定人血浆中硫酸羟氯喹的含量

## LCMSMS-453

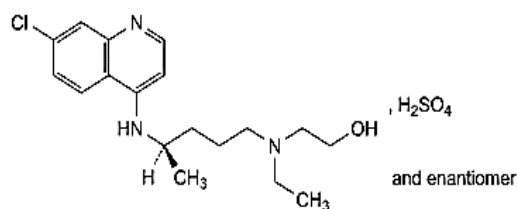
**摘要:** 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱和三重四极杆质谱联用技术测定人血浆中硫酸羟氯喹的方法。人血浆样品经乙腈沉淀蛋白后可在 10 min 内快速、准确地测定其中的硫酸羟氯喹含量。本文考察了方法的专属性、线性、定量限、重复性、基质效应；结果表明：硫酸羟氯喹在 0.5~500 ng/mL 范围内线性良好，相关系数大于 0.998；方法定量限为 0.5 ng/mL；硫酸羟氯喹低、中、高浓度样品日内精密度在 1.57~8.33 % 之间；准确度在 97.91~106.02 % 之间；硫酸羟氯喹低、中、高浓度样品及内标的基质效应在 98.31~108.17 % 之间。使用 LCMS-8050 系统，可快速、灵敏、稳定的对人血浆中硫酸羟氯喹含量进行测定。

**关键词:** 三重四极杆液相色谱质谱联用仪 人血浆 硫酸羟氯喹

新型冠状病毒爆发后，抗疟药物硫酸羟氯喹（中文别称：羟氯喹）被世界各国推荐用于临床治疗。此前，武汉大学人民医院的研究团队在预印本平台 medRxiv 上公布了一项针对羟氯喹对新冠肺炎患者治疗疗效的临床试验结果。结果显示，有 31 名患者在接受标准治疗（氧疗、抗病毒药物、抗菌药物和免疫球蛋白以及使用或不使用糖皮质激素）的同时，额外接受 5 天口服羟氯喹治疗后，临床恢复时间方面的体温恢复时间和咳嗽缓解时间，都比只接受标准治疗对照组的患者显著缩短。此外，羟氯喹治疗组中有改善的肺炎患者比例更大。法国马赛大学医院研究所传染病学教授迪迪埃·拉乌尔特，在《国际抗菌剂杂志》上发表了其领导团队应用羟氯喹治疗新

冠病毒的临床测试结果。结果显示，在这项针对 36 位新冠肺炎患者的临床试验中，有 6 例在接受羟氯喹和阿奇霉素联合治疗后获得了 100% 的病毒学治愈，12 例仅接受了羟氯喹治疗的患者也表现出了明显改善。据报道，羟氯喹已经于 4 月 20 日获批在美国投入临床试验，以检验它对新型冠状病毒是否有效。

本文采用岛津 LCMS-8050 三重四极杆液相色谱质谱联用仪，建立了人血浆中硫酸羟氯喹测定的方法。该方法简便、灵敏度高、重复性好、线性范围广、无残留；可用于人血浆中硫酸羟氯喹浓度的评估，为临床施治提供参考。



硫酸羟氯喹 (Hydroxychloroquine sulfate)  
C<sub>18</sub>H<sub>26</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S MW 433.95  
CAS#: 747-36-4

## ■ 实验部分

### 1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为 LC-30AD（输液泵）×2，DGU-20A5（在线脱气机），SIL-30AC（自动进样器），CTO-20AC（柱温箱），CBM-20A（系统控制器），LCMS-8050 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver 5.97（色谱工作站）。

## 1.2 分析条件

### 液相色谱条件

色谱柱: Shimpack GIST C18-AQ, 100 mm × 2.1 mm I.D., 1.9 μm  
 (SGLC, P/N: 227-30807-02)

流动相: A相 -0.1% 甲酸 -50mM 乙酸铵水溶液; B相 - 甲醇:乙腈 (1:1)

流速: 0.50 mL/min

柱温: 40°C

洗脱方式: 等度洗脱, B相浓度为 20%。

### 质谱条件

离子化模式: ESI, 正离子模式分析

加热模块温度: 400°C

离子源接口电压: 4.5 kV

接口温度: 300°C

雾化气: 氮气 3.0 L/min

干燥气: 氮气 10.0 L/min

加热气: 干燥空气 10.0 L/min

MRM 参数: 见表 1

DL 温度: 250°C

表 1 MRM 参数

名称	CAS No.	前体离子 [M+H] <sup>+</sup>	产物离子 (m/z)	Q1 Pre Bias (V)	碰撞能量 CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
硫酸羟氯喹 Hydroxychlorquine Sulfate	747-36-4	336.20	247.10* 158.15	-12.0 -12.0	-22.0 -36.0	-28.0 -18.0
磷酸氯喹 Chloroquine diphosphate	50-63-5	320.20	247.10	-12.0	-22.0	-28.0

\* 代表定量离子对

## 1.3 标准品与试剂

甲醇: Merck 公司, 色谱级, 室温保存。

乙腈: Merck 公司, 色谱级, 室温保存。

乙酸铵: Merck 公司, 色谱级, 室温保存。

DMSO: 成都科龙化工有限公司, 分析纯, 室温保存。

实验用水: 由 Milli-Q Plus 水净化系统经去离子与二次净化制得。

甲酸: 购自安谱公司, 色谱级, 纯度 98%, 室温保存。

## 1.4 对照品溶液及内标溶液的配制

硫酸羟氯喹标准储备液: 精密称定硫酸羟氯喹标准对照品, 用甲醇水溶液 (体积比 1:1) 溶解并稀释至 10.0 μg/mL, 于 -20°C 冰箱避光保存, 备用。

硫酸羟氯喹工作溶液: 吸取适量硫酸羟氯喹储备液用甲醇水溶液 (体积比 1:1) 配制成浓度为 5、10、20、50、100、200、500、1000、2000、5000 ng/mL 工作液; 至适宜容器中于 -20°C 冰箱避光保存, 备用。

磷酸氯喹 (内标) 标准储备液: 精密称定磷酸氯喹标准对照品, 用甲醇水溶液 (体积比 1:1) 溶解, 至适宜容器中于 4°C 冰箱保存备用。

磷酸氯喹 (内标) 标准工作溶液: 用甲醇水溶液 (体积比 1:1) 配制浓度为 1000 ng/mL 工作液, 至适宜容器中于 4°C 冰箱保存, 备用。

## 1.5 样品制备

标准曲线样品: 取人血浆 95 μL, 加入 5 μL 标准混合对照工作液, 10 μL 内标工作液, 涡旋混合 30 s 后加入 400 μL 乙腈, 涡旋混合 1 min 后于 14000 rpm 离心 10 min; 取上层清液 300 μL, 以 2 μL 进样 LC-MS/MS 分析。

质控样品：取人血浆 95 μL，加入 5 μL 硫酸羟氯喹质控工作液（浓度为 5、200、4000 ng/mL）、其余处理过程同标准曲线样品。

基质样品：人血浆 95 μL，400 μL 乙腈涡旋混合 1 min，加入 5 μL 质控工作液（浓度为 5、200、4000 ng/mL）、10 μL 内标工作液，其余处理过程同标准曲线样品。

工作液样品：取纯水 95 μL，加入 5 μL 质控工作液（浓度为 5、200、4000 ng/mL）、其余处理过程同标准曲线样品。

$$\text{基质效应}(\%) = \frac{\text{基质样品峰面积}}{\text{工作液样品峰面积}} \times 100\%$$

## ■ 结果讨论

### 2.1 选择性

取空白人血浆 100 μL，按照样品处理方法制备，结果如图 1~2 所示。结果显示，人空白血浆中目标化合物硫酸羟氯喹及内标磷酸氯喹保留时间处监测通道无显著性干扰。

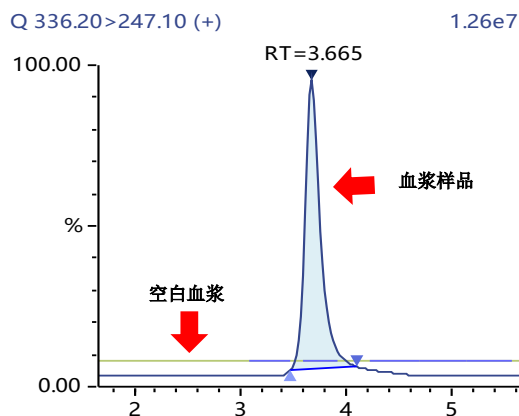


图 1 空白血浆及含硫酸羟氯喹血浆样品（200 ng/mL）

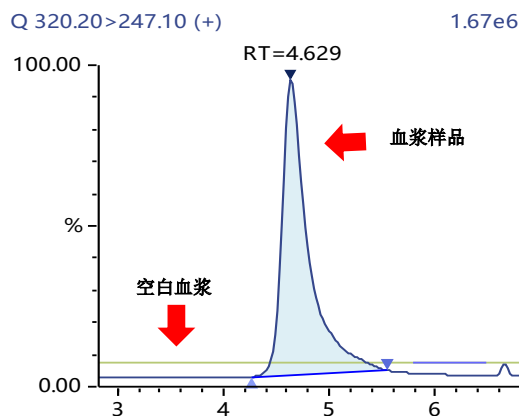


图 2 空白血浆及含磷酸氯喹血浆样品（100 ng/mL）

### 2.2 线性范围

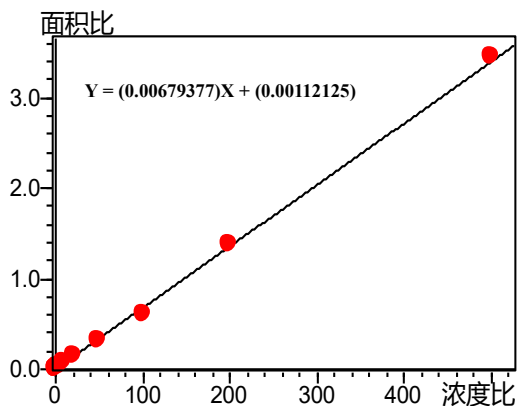


图 3 硫酸羟氯喹血浆校准曲线

人血浆配制校准曲线样品浓度分别为 0.5 ng/mL、1 ng/mL、2 ng/mL、5 ng/mL、10 ng/mL、20 ng/mL、50 ng/mL、100 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL。标准曲线如图 3 所示，线性方程及相关系数见表 2，其中 y 值代表待测物质与内标物质峰面积的比值，x 值代表血浆中待测物质浓度比。

表 2 硫酸羟氯喹校准曲线参数 (线性回归, 权重为 1/C)

名称	校准曲线	线性范围 (ng/mL)	准确度 (%)	相关系数 r
硫酸羟氯喹	$Y = (0.00140144)X + (0.000398161)$	0.5~500	90.6~110.0	0.9988

### 2.3 基质效应

基质效应考察结果如表 3 所示。

表 3 基质效应 (n=3)

浓度水平	基质效应 (%)	
	理论浓度 (ng/mL)	硫酸羟氯喹
LOQ	0.5	108.17
MQC	20	105.52
HQC	400	98.31
内标		105.72

结果表明, 硫酸羟氯喹及内标的基质效应在 98.31~108.17 % 之间。

### 2.4 精密度与准确度

考察三个浓度水平质控样品的日内精密度, 结果如表 4 所示。

表 4 方法精密度与准确度 (n=6)

待测物质 / 样品浓度 (ng/mL)	精密度 RSD%	准确度 Accuracy%
硫酸羟氯喹	0.5	8.33
	20	5.19
	400	1.57

结果表明, 硫酸羟氯喹日内精密度在 1.57~8.33 % 之间; 准确度在 97.91~106.02 % 之间。

### 2.5 进样盘稳定性

考察三个浓度水平质控样品处理后进样盘中放置稳定性 (6°C、10h), 结果如表 5 所示。

表 5 进样盘稳定性 (n=6)

待测物质 / 样品浓度 (ng/mL)	精密度 RSD%	准确度 Accuracy%
硫酸羟氯喹	0.5	7.33
	20	4.56
	400	1.76

结果表明, 硫酸羟氯喹于进样盘 6°C 放置 10 h 内稳定。

## ■ 结论

硫酸羟氯喹在 0.5~500 ng/mL 范围内线性良好, 相关系数大于 0.998; 方法定量限为 0.5 ng/mL; 硫酸羟氯喹低、中、高浓度样品日内精密度在 1.57~8.33% 之间; 准确度在 97.91~106.02% 之间; 硫酸羟氯喹低、中、高浓度样品及内标的基质效应在 98.31~108.17% 之间。使用 LCMS-8050 系统, 可快速、灵敏、稳定的对入血浆中硫酸羟氯喹含量进行测定。

岛津应用云

