

# LC-MS/MS 法测定人尿液中氯吡格雷酸的浓度

LCMSMS-842

**摘要：**使用岛津三重四极杆液质联用仪，建立了尿液中氯吡格雷酸的测定方法。使用内标、校准品及质控品进行了方法的线性、准确度及精密度的考察。结果显示该方法线性良好，校准曲线相关系数大于 0.999，质控品测定结果与理论值接近，回收率在 90.6%~101.3% 之间，精密度 RSD 在 0.4%~1.7% 之间。该方法前处理简便，分析速度快，灵敏度高，专属性强，可用于氯吡格雷酸尿液浓度的评估与研究。

**关键词：**三重四极杆液质联用仪 氯吡格雷酸 治疗药物监测

## 技术特点：

- ❖ 采用蛋白沉淀法进行尿液前处理，提高了检测效率。
- ❖ 分析时间仅需 5 min，增大了检测通量。

氯吡格雷是一种血小板聚集抑制剂。氯吡格雷选择性抑制二磷酸腺苷（ADP）与它的小血小板受体的结合及继发的 ADP 介导的糖蛋白 GPIIb/IIIa 复合物的活化，从而抑制血小板聚集。目前临床上主要用于预防和治疗因血小板高聚集引起的心、脑及其他动脉循环障碍疾病，如近期发作的脑卒中、心肌梗死和确诊的外周动脉疾病。

氯吡格雷是一种前体药物，广泛地在肝脏中代谢。一方面经氧化生成 2- 氧基 - 氯吡格雷，继而水解形成活性代谢物，即一种硫醇衍生物，该活性代谢物极不稳定，难以对其进行检测。另一方面，氯吡

格雷代谢为无活性的羧酸盐衍生物，即氯吡格雷酸，在血浆中约占到药物所有相关化合物含量的 85%，因此常被用来阐明氯吡格雷的药动学特征。研究标明，人体口服 <sup>14</sup>C 标记的氯吡格雷后的 120 h 内约 50% 由尿液排出，约 46% 由粪便排出。

目前已有少量关于血浆中氯吡格雷酸检测方法的报道，但缺少尿液中的检测方法。本文使用液相色谱串联质谱仪 LCMS-8045 CL，建立了尿液中氯吡格雷酸的测定方法，该方法前处理简便，分析速度快，专属性强，可用于氯吡格雷酸尿液浓度的精准测定，为相关研究提供参考。

## 实验部分

### 1.1 仪器

本实验使用串联质谱 LCMS-8045 CL 联用系统。具体配置为：

系统控制器：	CBM-40 CL	在线脱气机：	DGU-405 CL
输液泵：	LC-40D XR CL×2	柱温箱：	CTO-40C CL
自动进样器：	SIL-40C XR CL	质谱仪：	LCMS-8045 CL
色谱工作站：	Labsolutions CL Ver.1.30		

### 1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：	Shim-pack GISS C18 (50 mm x 2.1 mm I.D., 1.9 μm); 岛津（上海）实验器材有限公司，P/N: 227-30048-01;		
流动相：	A-0.1% 甲酸水溶液；B-0.1% 甲酸甲醇溶液		
进样体积：	5 μL	柱温：	40℃
流速：	0.3 mL/min	洗针液：	甲醇 / 水 =1:1 (v:v)
洗脱方式：	梯度洗脱，B 相起始浓度为 30%，时间程序如表 1 所示。		

表 1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.30	泵	B.Conc	30
1.00	柱温箱	Oven Valve 2	0
1.00	泵	B.Conc	95
2.00	泵	B.Conc	95
2.10	泵	B.Conc	30
2.5	柱温箱	Oven Valve 2	1
5.00	控制器	Stop	

注：切换阀 Oven Valve 2 的“0”位进质谱，“1”位进废液。

质谱条件：

离子化模式：	ESI+	雾化气流速：	2.9 L/min
接口电压：	4 kV	干燥气流速：	5.0 L/min
接口温度：	300 °C	加热气流速：	15.0 L/min
D L 温度：	250 °C	碰撞气：	氦气
加热模块温度：	400 °C	扫描模式：	多反应监测 (MRM)
MRM 参数：	见表 2		

表 2 MRM 参数

名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
氯吡格雷酸	308.1	198.1*	-14	-17	-20
		169.1	-22	-26	-30
多奈哌齐 (IS)	380.2	91.2	-14	-40	-18

注：\* 为定量离子

### 1.3 校准品及样品制备

基质匹配校准曲线制备：精密称取氯吡格雷酸 10 mg，加甲醇稀释并定容至 10 mL，得 1 mg/mL 校准品母液。将校准品母液用水逐级稀释并定容，得系列校准品溶液。取系列校准品溶液 10 μL，加入 90 μL 空白尿液，涡旋混匀 1 min，得基质校准溶液，基质校准曲线浓度见表 3。

基质匹配质控品溶液制备：取低中高浓度质控品溶液 LQC，MQC，HQC 各 10 μL，加入 90 μL 空白尿液，涡旋混匀 1 min，得基质匹配质控品溶液，浓度分别为 10 ng/mL，200 ng/mL，800 ng/mL。

内标工作液配制：精密称取多奈哌齐 10 mg，加甲醇稀释并定容至 10 mL，得 1 mg/mL 内标准品母液。使用蛋白沉淀剂（甲醇：乙腈 = 1:1，v/v）将内标准品母液稀释至 50 ng/mL，即得内标工作液。

校准品、质控品及样品溶液制备：取 100 μL 基质匹配校准品、基质匹配质控品或临床尿液样品，加 400 μL 内标工作液，涡旋混匀 5 min，12000 rpm 离心 10 min。取上清液，用水稀释一倍后上机分析。

表 3 校准曲线浓度表 (ng/L)

名称	STD1	STD2	STD3	STD4	STD5	STD6
氯吡格雷酸	5	20	100	400	600	1000

## ■ 结果讨论

### 2.1 MRM 色谱图

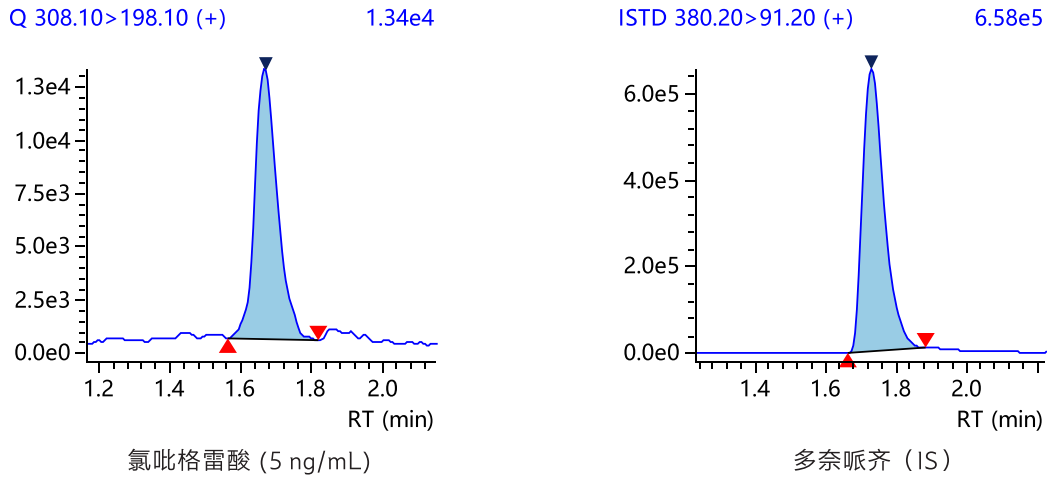


图1 校准曲线最低点 MRM 色谱图

### 2.2 线性测定结果

按上述前处理方法和分析条件对校准品进行分析，内标法制作校准曲线。校准曲线见图 2，结果见表 4。

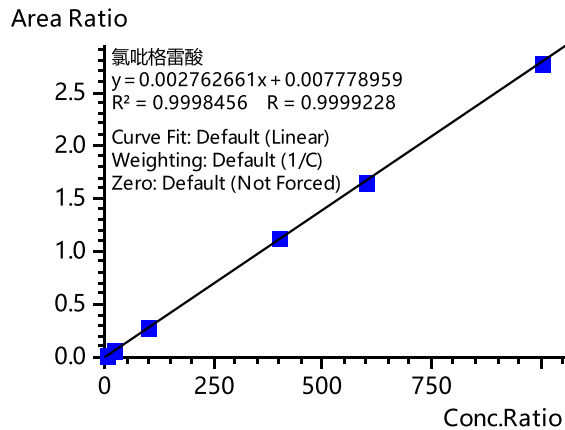


图2 氯吡格雷酸校准曲线

表4 校准曲线结果

名称	线性范围 (ng/mL)	相关系数	准确度 (%)
氯吡格雷酸	5~1000	0.9999	92.2%~105.8%

### 2.3 准确度及精密度测定结果

按 1.3 中前处理方法对低中高浓度质控品进行前处理，每个浓度质控品重复制备 6 份，按 1.2 中的分析条件对质控品进行分析，质控品的准确度及精密度结果如表 5 所示。

表 5 质控准确度考察结果 (n=6, 浓度单位 ng/mL)

质控	项目	数值
LQC	理论浓度	10
	测定浓度	10.13
	质控准确度 %	101.3
	RSD%	1.7
MQC	理论浓度	200
	测定浓度	181.25
	质控准确度 %	90.6
	RSD%	0.4
HQC	理论浓度	800
	测定浓度	751.48
	质控准确度 %	93.9
	RSD%	0.4

#### 2.4 样品测定结果

使用三批次服药后 24 h 内采集的临床尿液样品,按 1.3 中前处理条件进行处理,按 1.2 中的分析条件进行分析。结果如图 3 和表 6 所示。

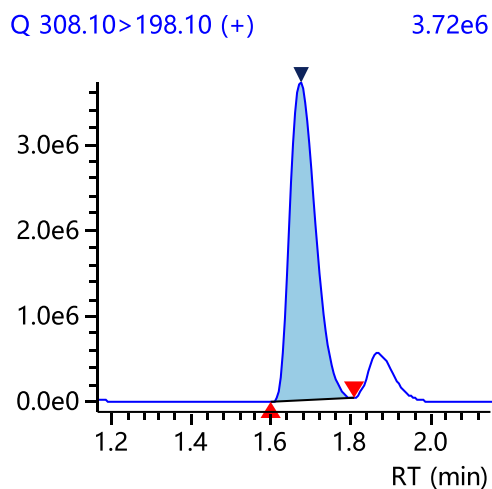


图 3 临床样品 Sample-01 谱图

表 6 临床样品检测结果 (ng/mL)

名称	Sample-01	Sample-02	Sample-03
氯吡格雷酸	850.2	82.6	42.9

## ■ 结论

使用液相色谱串联质谱仪 LCMS-8045 CL，建立了尿液中氯吡格雷酸测定方法。使用内标、校准品进行了线性的考察，结果显示该方法线性良好；使用质控品进行了方法的准确度及精密度考察，结果显示准确度及精密度均符合临床检测要求。临床样品检测结果显示，方法适用性较好。该方法操作简便，性能可靠，可用于尿液中氯吡格雷酸浓度的评估和相关药动力学研究。

岛津应用云

