

LC-MS/MS 法测定人血浆中氯吡格雷的浓度

LCMSMS-841

摘要：使用岛津三重四极杆液质联用仪，建立了血浆中氯吡格雷的测定方法。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 0.997，质控品测定结果与理论值接近，回收率在 105.8%~110.8% 之间，精密度 RSD 在 4.2%~4.8% 之间。该方法前处理简便，分析速度快，灵敏度高，专属性强，可用于氯吡格雷血浆浓度的评估与研究。

关键词：三重四极杆液质联用仪 血浆 氯吡格雷

技术特点：

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

氯吡格雷为噻吩并吡啶类抗血小板药，它选择性抑制二磷酸腺苷（ADP）与它的血小板受体的结合及继发的 ADP 介导的血小板聚集反应而发挥作用。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。

氯吡格雷口服后吸收快速但不完全，吸收率 > 50%。它是一种前体药物，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，氯吡格雷的血药浓度很低，一般的检测方法难以实现精准定量。

本文使用液相色谱串联质谱仪 LCMS-8045 CL，建立了血浆中氯吡格雷的测定方法，该方法前处理简便，分析速度快，专属性强，可用于氯吡格雷血浆浓度的精准测定，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- 甲醇		
进样体积：	20 μL	柱温：	40℃
流速：	0.4 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
0.00	泵	B.Conc	30
0.70	柱温箱	Oven Valve 2	0
2.00	泵	B.Conc	95
3.00	泵	B.Conc	95
3.10	泵	B.Conc	30
3.00	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：	8.0 L/min
接口温度：	300 °C	加热气流速：	12.0 L/min
D L 温度：	150 °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	322.2	212.0*	-25	-17	-22
		184.0	-16	-22	-19
噻氯匹定 (IS)	264.0	125.0	-20	-30	-20

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：精密称取硫酸氢氯吡格雷 13.12 mg（含氯吡格雷 10 mg），加甲醇稀释并定容至 10 mL，得 1 mg/mL 校准品母液。将校准品母液用甲醇逐级稀释并定容，得系列校准品溶液。取系列校准品溶液 10 μ L，加入 90 μ L 空白血浆，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 μ L，加入 90 μ L 空白血浆，涡旋混匀 1 min，得基质匹配质控品溶液，浓度分别为 20 ng/L，500 ng/L，4000 ng/L。

内标工作液配制：精密称取噻氯匹定 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）将内标准品母液稀释至 2.5 ng/mL，即得内标工作液。

校准品、质控品及样品溶液制备：取 100 μ L 基质匹配校准品、基质匹配质控品或临床血浆样品，加 300 μ L 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	STD7
氯吡格雷	10	40	100	400	1000	2000	5000

■ 结果讨论

2.1 MRM 色谱图

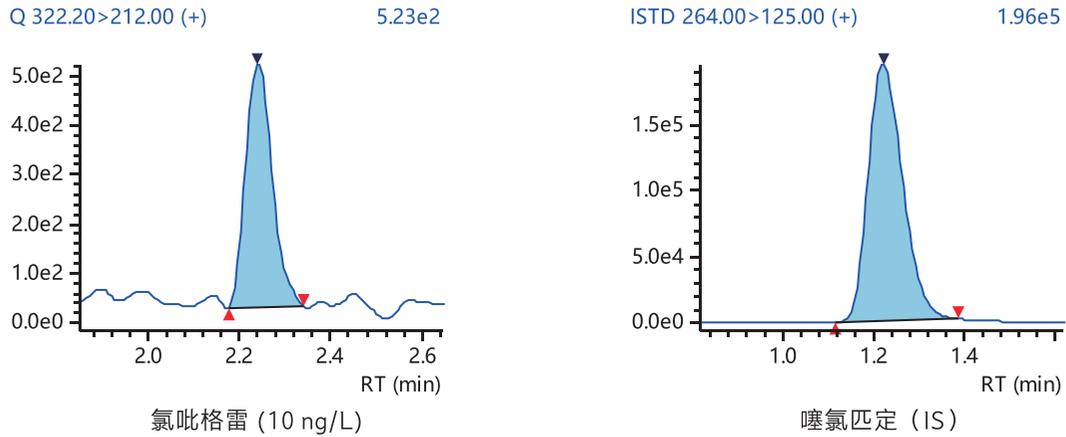


图 1 校准曲线最低点 MRM 色谱图

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。

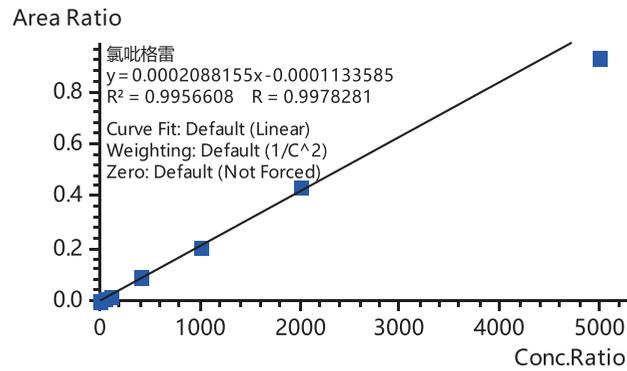


图 2 氯吡格雷校准曲线

表 4 校准曲线结果

名称	线性范围 (ng/L)	相关系数	准确度 (%)
氯吡格雷	10~5000	0.9978	89.1%~107.6%

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/L)

质控	项目	数值
LQC	理论浓度	20
	测定浓度	21.94
	质控准确度 %	109.7%
	RSD%	4.8

MQC	理论浓度	500
	测定浓度	554.34
	质控准确度 %	110.8%
	RSD%	4.2
HQC	理论浓度	4000
	测定浓度	4231.51
	质控准确度 %	105.8%
	RSD%	4.5

2.3 样品测定结果

使用五批次服药后 12 h 内采集的临床血浆样品,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。

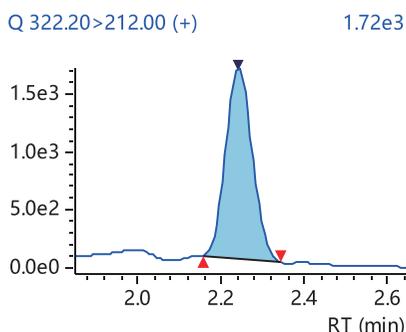


图 3 临床样品 Sample-01 谱图

表 6 临床样品检测结果 (ng/L)

样品	氯吡格雷浓度
Sample-01	73.62
Sample-02	27.83
Sample-03	297.93
Sample-04	1069.10
Sample-05	14.37

■ 结论

使用液相色谱串联质谱仪 LCMS-8045 CL,建立了血浆中氯吡格雷测定方法。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,可用于血浆中氯吡格雷浓度的评估和相关药动学研究。

岛津应用云

