

使用 Xevo TQD、ACQUITY UPLC H-Class 系统和 UNIFI 科学信息系统建立人体血浆中 2.5 pg/mL 浓度的氯吡格雷定量方法

Jennifer L. Simeone 和 Paul D. Rainville
沃特世公司（美国马萨诸塞州米尔福德市）

应用优势

使用高灵敏度方法完成了人体血浆中氯吡格雷的分析。

沃特世解决方案

ACQUITY UPLC® H-Class系统

Xevo® TQD质谱仪

Oasis® MCX µElution固相萃取（SPE）板

UNIFI® 科学信息系统

关键词

氯吡格雷、动脉粥样硬化、硫醇代谢物、石炭酸代谢物、血浆

简介

氯吡格雷是一种噻吩并吡啶衍生物——抗血小板的前体药物，可以预防动脉粥样硬化。口服后，服用的化合物经肝代谢生成活性硫醇代谢物和非活性羧酸代谢物。人体中与循环氯吡格雷相关的物质大多是非活性代谢物，而活性代谢物和未发生变化的前体药物含量非常低。反应的机制源自活性硫醇代谢物与细胞受体P2Y12的结合，从而不可逆转地抑制血小板的活化过程。¹

由于活性硫醇代谢物存在的反应性以及未发生变化的前体药物浓度偏低，大部分定量研究都建立在非活性代谢物的循环水平上。本应用纪要描述了一种新开发的高灵敏度固相萃取和LC/MS/MS分析方法，可以对人体血浆中的前体药物氯吡格雷进行分析。

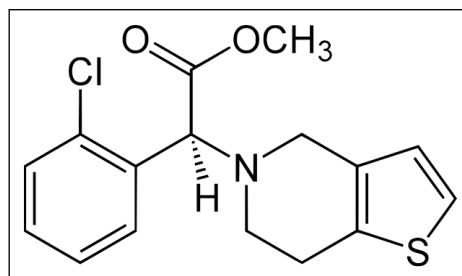


图1. 氯吡格雷的结构。

实验

样品描述

样品通过Oasis MCX μ Elution固相萃取（SPE）板进行制备。将350 μ L的血浆样品与20 μ L内标物（氘代氯吡格雷）溶液和350 μ L的含水缓冲溶液混合。使用甲醇和含水缓冲溶液对固相萃取板进行预平衡。将样品加到固相萃取板，使用水-甲醇溶液冲洗，并用2 \times 25 μ L含5%NH₄OH的IPA/ACN（60:40）溶液洗脱，用25 μ L水稀释后进样。分析采用ACQUITY UPLC H-Class色谱系统，进样10 μ L。用ACQUITY UPLC C₁₈ 2.1 \times 50 mm, 1.7 μ m色谱柱进行分离，分析时间为3 min，流速为600 μ L/min。使用Xevo TQD质谱正离子模式检测，其中氯吡格雷MRM为322 \rightarrow 212，d4内标物MRM为326 \rightarrow 216。

结果和讨论

如图2所示，氯吡格雷的保留时间为2.10 min，其色谱峰非常对称，基线峰宽仅为3s，有利于色谱峰的处理和峰积分。分析时间仅需3min，因此每天至少可以分析两个SPE板。图2中所示为500 pg/mL标准品的分析后的的血浆空白样品的结果。数据表明ACQUITY UPLC H-Class系统的残留非常低，从而使Xevo TQD质谱仪的检测灵敏度能够得到充分的体现。

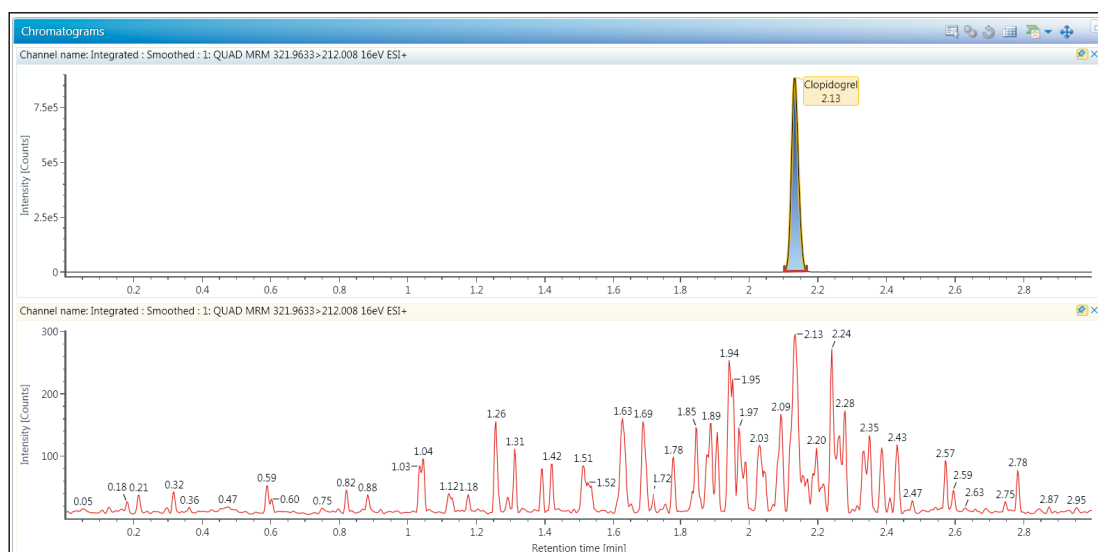


图2. 萃取的空白样和500 pg/mL氯吡格雷标准品的LC/MS/MS色谱图。

本分析方法的定量下限（LLOQ）为2.5 pg/mL。连续三天采用独立的96孔板进行批量分析，对分析方法进行方法学验证，线性浓度范围为2.5到500.0 pg/mL，分析典型标准曲线如图3所示，相关系数介于0.9988到0.9995之间（1/x）。日内的精密度和准确度验证数据列于表1、2和3中。数据表明：对于2.5pg/mL的LLOQ，变异系数的范围为5.8%到12.2%，偏差范围为-6.9%到-13.6%。对于高浓度QC（300 pg/mL），变异系数的范围为1.2%到2.9%，偏差范围为1.4%到1.6%。日间的精密度和准确度数据列于表4。对于2.5 pg/mL的LLOQ，变异系数为8.5%，偏差为-9.4%。对于高浓度QC（300 pg/mL），变异系数为2.3%，偏差为 1.5%。

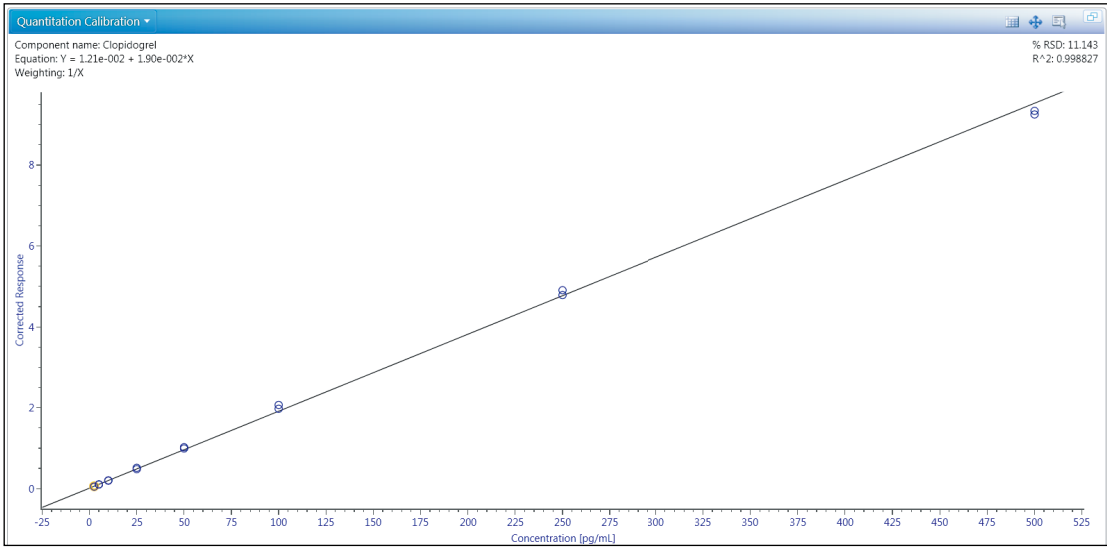


图3. 采用LC/MS/MS定量血浆中氯吡格雷的典型标准曲线

	QC LLOQ 2.5 pg/mL	QC低浓度 7.5 pg/mL	QC中等浓度	QC高浓度 300 pg/mL
	2.30	7.57	80.5	314
	2.07	6.64	79.7	307
	2.30	7.38	80.6	302
	2.39	7.29	84.4	300
	1.74	7.52	81.7	292
	*	7.10	77.7	313
平均值	2.16	7.25	80.8	305
标准差	0.263	0.343	2.223	8.38
变异系数	12.2	4.7	2.8	2.8
% 偏差	-13.6	-3.3	7.7	1.6

表1. 日内的QC准确度/精密度的统计数据：第1天。
*QC LLOQ条件下第6次重复时使用的SPE孔堵塞，未进样。

	QC LLOQ	QC 低浓度 7.5 pg/mL	QC 中等浓度	QC 高浓度 300 pg/mL
	2.15	7.13	73.1	290
	2.08	7.28	76.4	316
	2.32	7.19	71.5	303
	2.56	6.60	74.6	309
	2.36	7.97	76.0	302
	2.27	7.24	82.9	309
平均值	2.29	7.24	75.8	305
标准差	0.169	0.438	3.950	8.84
变异系数	7.4	6.1	5.2	2.9
% 偏差	-8.4	-3.5	1.0	1.6

表2. 日内的QC准确度/精密度统计数据：第2天。

	QC LLOQ 2.5 pg/mL	QC 低浓度 7.5 pg/mL	QC 中等浓度	QC 高浓度 300 pg/mL
	2.28	7.28	77.6	304
	2.23	8.04	77.0	304
	2.36	7.50	77.3	299
	2.16	7.00	76.5	306
	2.54	7.02	78.2	310
	2.39	7.55	77.8	303
平均值	2.33	7.40	77.4	304
标准差	0.134	0.390	0.603	3.61
变异系数	5.8	5.3	0.8	1.2
% 偏差	-6.9	-1.4	3.2	1.4

表3. 日内的QC准确度/精密度统计数据：第3天。

	QC LLOQ 2.5 pg/mL	QC 低浓度 7.5 pg/mL	QC 中等浓度	QC 高浓度 300 pg/mL
	2.3	7.57	80.5	314
	2.07	6.64	79.7	307
	2.30	7.38	80.6	302
	2.39	7.29	84.4	300
	1.74	7.52	81.7	292
	*	7.10	77.7	313
	2.15	7.13	73.1	290
	2.08	7.28	76.4	316
	2.32	7.19	71.5	303
	2.56	6.60	74.6	309
	2.36	7.97	76.0	302
	2.27	7.24	82.9	309
	2.28	7.28	77.6	304
	2.23	8.04	77.0	304
	2.36	7.50	77.3	299
	2.16	7.00	76.5	306
	2.54	7.02	78.2	310
	2.39	7.55	77.8	303
平均值	2.26	7.29	78.0	305
标准差	0.192	0.376	3.28	6.90
变异系数	8.5	5.2	4.2	2.3
% 偏差	-9.4	-2.7	4.0	1.5

表4. 日间的QC准确度/精密度统计数据
*QC LLOQ条件下第6次重复时使用的SPE孔堵塞，未进样。

结论

- 本实验开发了一种高灵敏度分析方法，可以用于分析人体血浆中的氯吡格雷。
- 在3天的方法学验证实验中，日内和日间的精密度和准确度均非常好。
- 定量限确定为2.5 pg/mL，变异系数和偏差都远远低于 $\pm 20\%$ 的标准。
- 该方法残留小，完成高浓度的标准品分析后，萃取的空白样品中残留浓度远低于LLOQ的20%。

参考文献

1. Pereillo JM, Maftouh M, Andrieu A, Uzabiaga MF, Fedeli O, Savi P, Pascal M, Herbert JM, Maffrand JP, Picard C. Structure and stereochemistry of the active metabolite of clopidogrel. *Drug Metabolism and Disposition*. 2002; 30: 1288-1295.

Waters

THE SCIENCE OF WHAT'S POSSIBLE.™

Waters, ACQUITY UPLC, Xevo, Oasis和UNIFI是沃特世公司的注册商标。The Science of What's Possible是沃特世公司的商标。其他所有商标均归各自的拥有者所有。

©2013年 沃特世公司。印制于中国 2013年1月
720004566ZH AG-PDF

沃特世中国有限公司
沃特世科技（上海）有限公司

北京：010 - 5209 3866
上海：021 - 6156 2666
广州：020 - 2829 6555
成都：028 - 6554 5999
香港：852 - 2964 1800

免费售后服务热线：800 (400) 820 2676
www.waters.com

