

UPLC-MS/MS 快速测定人体血清中的 2 种精神病药物

LCMSMS-066

摘要： 本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用快速测定人体血清中 2 种精神病药物的分析方法。空白血浆经处理后，用超高效液相色谱 LC-30A 分离，三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 进行定性定量分析。2 种药物在 4 分钟内得到快速分离和检测，利培酮和奋乃静分别在 1~100 μg/L、2~200 μg/L 的标准溶液浓度范围内具有良好的线性相关性，相关系数在 0.9998~0.9999 之间。对不同浓度的混合标准溶液连续 6 次进样进行精密度实验，利培酮的保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.783% 和 3.13% 以下；奋乃静的保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.189% 和 2.93% 以下，仪器精密度良好，定量限范围为 0.44~0.92 μg/L。采取空白血清加标低中高三个不同浓度的方法计算回收率进行方法验证，2 种药物的回收率范围为 70.1%~116.8%。

关键词： 精神病药物 血清 超高效液相色谱仪 三重四极杆质谱

利培酮和奋乃静均属于临床上常用的抗精神病药物，临床应用广泛，且疗效显著。但由于其可引起药源性锥体外系反应如帕金森综合症、静坐不能、急性肌张力障碍等，特别是服用利培酮可引起致命性副作用：中性粒细胞和血小板缺乏症，从而使其在临床上的应用受到一定的限制。关于利培酮和奋乃静的药代动力学、血药浓度测定，血药浓度与临床疗效、不良反应的关系等，国内外已有不少文献报道。有关这些药物的血浓度测定，国外大多采用 GC、HPLC 检测法，而采用串联质谱检

测法测定利培酮和奋乃静的方法较少。

为了解患者服用利培酮和奋乃静后体内药物吸收、分布及代谢情况，进一步观察临床剂量与疗效的关系，本文在参考《司法鉴定技术规范——血液、尿液中 154 种毒(药)物检测》(SF/Z JD0107005-2010)的基础上，建立了 UPLC-MS/MS 快速测定人体血清中利培酮和奋乃静的分析方法，该方法简便、快速、灵敏度高，可用于利培酮和奋乃静药物动力学研究及临床血药质量浓度监测。

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-8030 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A5 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-30AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8030 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.53 色谱工作站。

1.2 分析条件

液相色谱条件

分析仪器：LC-30A 系统
 色谱柱：Shimadzu Shim-pack XR-ODS III
 2.0 mm I.D. × 50 mm L., 1.6 μm
 流动相：A - 0.1% 甲酸水溶液，B - 乙腈，
 初始时 B 为 10% (v/v)
 流速：0.3 mL/min
 洗脱方式：梯度洗脱 (见表 1)
 进样体积：10 μL
 柱温：40°C

表 1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
2.5	Pumps	Pump B Conc.	50%
3.0	Pumps	Pump B Conc.	50%
3.01	Pumps	Pump B Conc.	10%
5	Controller	Stop	

质谱条件

分析仪器：LCMS-8030
 离子源：ESI，正离子扫描
 离子源接口电压：4.5 kV
 雾化气：氮气 3.0 L/min
 干燥气：氮气 15 L/min
 碰撞气：氩气
 脱溶剂管温度：250°C
 加热模块温度：400°C
 扫描模式：多反应监测 (MRM)
 驻留时间：50 ms
 延迟时间：3 ms
 MRM 参数：见表 2

表 2 MRM 参数

化合物名称	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
利培酮	411.20	191.10*	-30.0	-29.0	-21.0
	411.20	110.10	-30.0	-53.0	-23.0
奋乃静	404.10	171.10*	-25.0	-25.0	-19.0
	404.10	143.15	-25.0	-31.0	-15.0

*表示定量离子

1.3 样品制备

1.3.1 标准溶液配制

将浓度分别为 20 mg/L 和 80 mg/L 的利培酮和奋乃静,用超纯水和乙腈(v/v, 9:1)依次稀释至 1000 μg/L 的混合标样。

将 1000 μg/L 的 2 种药物,用乙腈和 0.1% 甲酸水溶液(v/v, 1:9)逐级稀释成一系列浓度的标准工作液用于建立标准曲线(见表 3)。

1.3.2 样品前处理方法

正常人血清由深圳康宁医院提供,取上层清液过 0.22 μm 微孔滤膜,加标 2 种药物混合标样,用乙腈和 0.1% 甲酸水溶液(v/v, 1:9)稀释 10 倍后直接用于液质分析。空白基质采取不加标的方式,其余处理步骤相同。

表 3 利培酮和奋乃静的线性浓度点(μg/L)

化合物名称	浓度 1	浓度 2	浓度 3	浓度 4	浓度 5	浓度 6	浓度 7
利培酮	1	2	5	10	20	50	100
奋乃静	2	4	10	20	40	100	200

结果讨论

2.1 标准样品一级质谱图和产物离子扫描质谱图

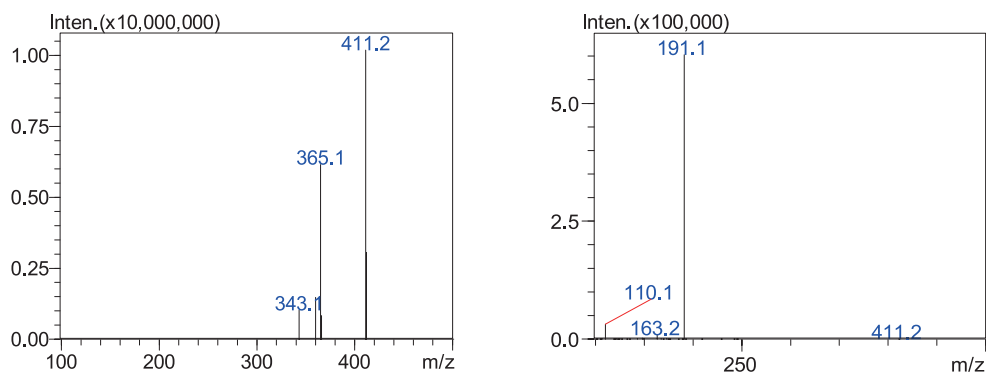


图 1 利培酮的一级质谱图(左图)和产物离子扫描质谱图(CE 值为 -40V)(右图)

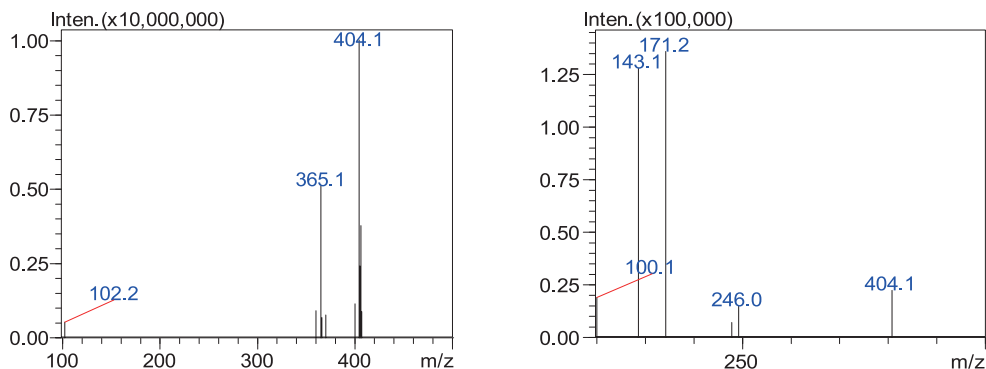


图 2 奋乃静的一级质谱图(左图)和产物离子扫描质谱图(CE 值为 -28V)(右图)

2.2 标准样品的 MRM 色谱图

2 种药物标样的 MRM 色谱图如图 3 所示。

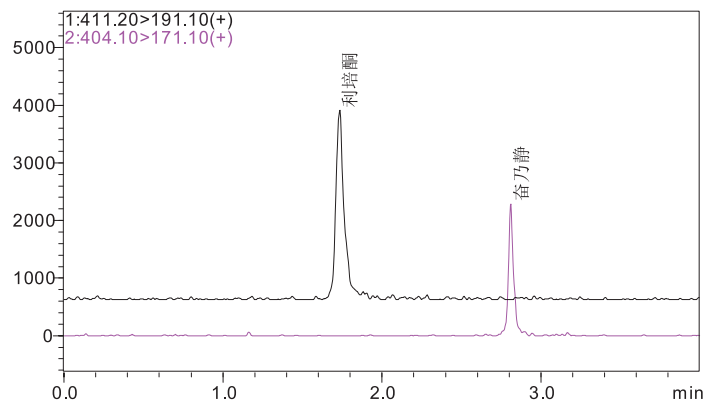


图 3 利培酮(1 μg/L) 和奋乃静(2 μg/L) 标样的 MRM 色谱图

2.3 线性关系

将一系列不同浓度点的 2 种药物混合标准工作液（见表 3），按 1.2 中的分析条件进行测定，以浓度为横坐标，峰面积为纵坐标，七点外标法建立校准曲线，如图 4 所示。利培酮和奋乃静在各自的浓度范围内具有良好的线性相关性，相关系数在 0.9998–0.9999 之间（见表 4）。

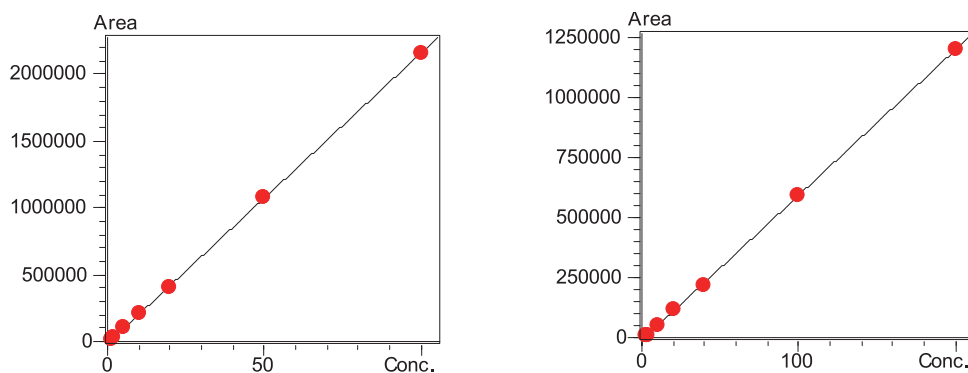


图 4 利培酮(左图)和奋乃静(右图)的标准工作曲线

表 4 利培酮和奋乃静的标准曲线

编号	名称	校准曲线	线性范围(μg/L)	相关系数(R)
1	利培酮	$Y = (21761.9)X + (-14917.9)$	1~100	0.9999
2	奋乃静	$Y = (6046.84)X + (-13008.9)$	2~200	0.9998

2.4 检出限和定量限

为了考察仪器灵敏度，配制如下浓度的标准样品 1 份（见表 5），平行进样 7 次。由 7 次进样测定峰面积的标准偏差(S)计算出检出限和定量限，此时检出限 $MDL = 3.14 \times S$ ，定量限 $LOQ = 4 \times MDL$ 。测定结果如表 5 所示。

表 5 利培酮和奋乃静的灵敏度实验结果

No.	名称	加标浓度(μg/L)	相对标准偏差(RSD%)	检出限(μg/L)	定量限(μg/L)
1	利培酮	1.0	3.35	0.11	0.44
2	奋乃静	2.0	3.66	0.23	0.92

2.5 精密度实验

配制浓度为低中高的混合标样，依次进样，平行测定 6 次，利培酮在不同浓度下的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.216%~0.783% 和 0.93%~3.13% 之间；奋乃静在不同浓度下的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.054%~0.189% 和 1.13%~2.93% 之间，仪器具有良好的精密度（见表 6）。

表 6 利培酮和奋乃静的保留时间和峰面积重复性结果 (n=6)

样品名称	RSD%(低浓度- $\mu\text{g/L}$)		RSD%(中浓度- $\mu\text{g/L}$)		RSD%(高浓度- $\mu\text{g/L}$)	
	R.T.	Area	R.T.	Area	R.T.	Area
利培酮	0.783	3.13	0.251	2.09	0.216	0.93
奋乃静	0.189	2.93	0.082	2.36	0.054	1.13

低浓度 利培酮 (2 $\mu\text{g/L}$), 奋乃静 (4 $\mu\text{g/L}$); 中浓度 利培酮 (10 $\mu\text{g/L}$), 奋乃静 (20 $\mu\text{g/L}$); 高浓度 利培酮 (50 $\mu\text{g/L}$), 奋乃静 (100 $\mu\text{g/L}$)

2.6 基质加标实验

图 5 为空白血清按照 1.3 中样品制备方法所得 MRM 色谱图，往空白血清中添加 2 种药物，空白基质加标所得 MRM 色谱图如图 6 所示，由图 6 可知 2 种目标物具有良好的响应。在不同浓度下利培酮的加标回收率在 70.1~106.0% 之间；奋乃静的加标回收率在 101.0~116.8% 之间（见表 7）。

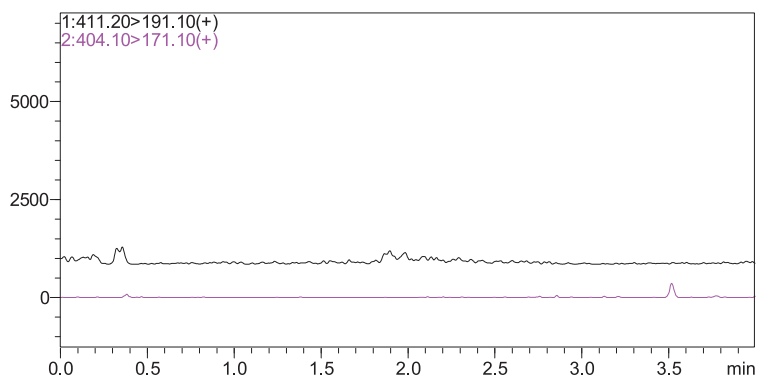


图 5 空白血清的 MRM 色谱图

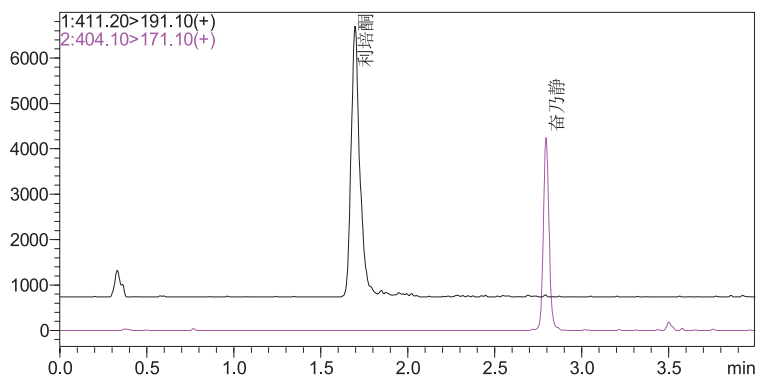


图 6 空白血清加标利培酮 (1 $\mu\text{g/L}$) 和奋乃静 (2 $\mu\text{g/L}$) 标样 MRM 图

表 7 空白血清加标回收率

化合物名称	低浓度 ($\mu\text{g/L}$)		中浓度 ($\mu\text{g/L}$)		高浓度 ($\mu\text{g/L}$)	
	检出浓度	回收率 (%)	检出浓度	回收率 (%)	检出浓度	回收率 (%)
利培酮	0.701	70.1	10.6	106.0	91.2	91.2
奋乃静	2.16	108.0	23.36	116.8	202.0	101.0

低浓度 利培酮 ($1\mu\text{g/L}$), 奋乃静 ($2\mu\text{g/L}$); 中浓度 利培酮 ($10\mu\text{g/L}$), 奋乃静 ($20\mu\text{g/L}$); 高浓度 利培酮 ($100\mu\text{g/L}$), 奋乃静 ($200\mu\text{g/L}$)

■ 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8030 联用快速测定人体血清中 2 种精神病药物的分析方法。利培酮和奋乃静在各自浓度范围内线性良好, 相关系数在 0.9998~0.9999 之间, 空白基质加标回收率范围为 70.1%~116.8%, 利培酮的定量限为 $0.44\mu\text{g/L}$, 奋乃静定量限为 $0.92\mu\text{g/L}$, 满足《司法鉴定技术规范》(SF/Z JD0107005-2010) 中《血液、尿液中 154 种毒(药)物检测》对利培酮和奋乃静的检出要求。实验结果表明该方法简便、高效、快速、高灵敏度, 可用于利培酮和奋乃静药物动力学研究及临床血药质量浓度监测, 为精神病患者体内药物临床代谢和快速筛查提供参考依据。