

自动前处理 – 超高效液相色谱 / 质谱在线分析系统用于血清中十种抗精神病药的直接检测

LCMSMS-171

摘要： 本文建立了自动前处理 – 超高效液相色谱 / 质谱在线分析系统用于血清中十种抗精神病药的直接检测方法。在最优条件下不同浓度的精密度实验得到的保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.01~0.06 % 和 1.12 ~ 4.54 % 之间；方法检出限和方法定量限分别介于 0.000801~0.688 $\mu\text{g/L}$ 和 0.00321~2.75 $\mu\text{g/L}$ 之间。对两种浓度级别加标血清样品进行检测，回收率介于 58.75~136.75 % 之间，RSD 介于 0.87~7.69 % 之间。本法无需前处理，全程自动化运行，对比离线方法，在线方法 10 min 内完成自动前处理和色谱分离检测，允许强溶剂的大体积进样，灵敏度高、精密度好。

关键词： 抗精神病药自动前处理在线分析三重四极杆质谱仪

利培酮、奋乃静等抗精神病药，可以改善精神分裂症，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、急性肌张力障碍等副作用，服用过量将伴有失眠、焦虑、激越、头痛、口干等副作用，严重者可能导致心源性猝死，因此建立血液中抗精神病药的检测在临床检验、法医学鉴定等领域有重要意义。

一般血液样品处理成血清或血浆后，需用蛋白沉淀的方式提取上清液进样分析。对于样品量多、人手紧张、要求快速出数据的用户，如此手工前处理存在诸多不便且数据误差大。本文使用岛津自动前处理 – 超高效液相色谱 / 质谱在线分析系统（流路设计见图 1），只需进行过滤处理，即可对血清中十种抗精神病药进行自动分析。

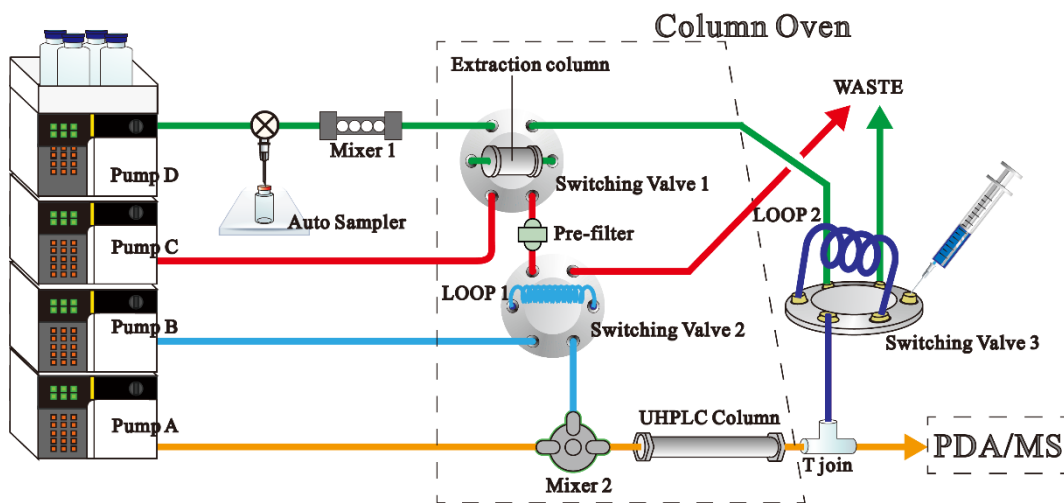


图1 自动前处理 – 超高效液相色谱质谱在线分析系统的流路设计

实验部分

1.1 仪器配置

表1 仪器配置

硬件	配置
控制器	CBM-20A
泵 C&D	LC-20AD
泵 D 溶剂切换阀	FCV-11AL, 初始状态为 A: 泵 D1(上样液) , 泵 C1(解吸液)送液; B 状态为 泵 D2(平衡液) , 泵 C1 送液
泵 A&B	LC-30AD
自动进样器	SIL-30AC
柱温箱	CTO-20AC, 内置切换阀 1 和切换阀 2
切换阀 1	FCV-20AH ₂ , 初始状态 =1: 2-3 口、6-1-4-5 口分别联通
切换阀 2	FCV-32AH, 初始状态 =1: 2-3 口、6-1-4-5 口分别联通
脱气机	DGU-20A ₅ ×2
切换阀 3	无
混合器 1	LC2010 柱前混合器, SN 228-37112-91
混合器 2	LC-30A 混合器 MiRC 20μL
过滤器	0.5 μm 虑孔, 零死体积在线过滤器 SN 290-46042-06
定量环 1	500 μL 不锈钢定量环
定量环 2	无
PDA	SPD-M20A
MS	LCMS-8040
工作站	LabSolutions Ver. 5.60

1.2 分析条件

萃取、解吸条件

萃取柱: Shim-pack MAYI-C8(G) 10 L×4.6

萃取溶液: 甲酸 / 水 / 乙腈 (0.2/95/5, v/v)

流速: 2 mL/min

柱温: 40℃

进样体积: 50 μL

萃取时间: 2 min

解吸溶液: 乙腈 / 甲醇 (80/20, v/v)

解吸流速: 0.2 mL/min

平衡溶剂: 甲醇

平衡流速: 2 mL/min

切阀时间、清洗程序: 将时间程序表 2

液相色谱条件

色谱柱: Shim-pack XR-ODS III, 2.0 mm×50 mm L,

1.6 μm 粒径

流动相: A 相 -0.1 % 甲酸 +5 mM 乙酸铵水溶液;

B 相 - 乙腈

流速: 0.5 mL/min

柱温: 40℃

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 8 %, 时间程序见表 2。

质谱条件

分析仪器: LCMS-8040

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℃

加热模块温度: 400℃

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

驻留时间: 12 ms

延迟时间: 3 ms

喷针位置: +3 mm

MRM 参数: 见表 3

表2 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
2.00	Column Oven	CTO.RVL	0
3.40	Pumps	SV(Pump C)	B
3.50	Column Oven	CTO.RVR	0
3.60	Column Oven	CTO.RVL	1
4.50	Pumps	Pump B Conc.	8
8.50	Column Oven	CTO.RVR	1
8.50	Pumps	Pump B Conc.	60
8.50	Pumps	SV(Pump C)	A
8.60	Pumps	Pump B Conc.	100
9.98	Pumps	Pump B Conc.	100
9.99	Pumps	Pump B Conc.	8
10.00	Controller	Stop	

表3 MRM 参数

名称	CAS	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias(V)	CE(V)	Q3 Pre Bias(V)
利培酮	106266-06-2	411.20	191.15 [*]	-30.0	-34.0	-20.0
			110.15	-30.0	-51.0	-20.0
齐拉西酮	146939-27-7	413.10	194.05 [*]	-15.0	-28.0	-20.0
			159.10	-15.0	-43.0	-30.0
喹硫平	111974-69-7	384.15	253.20 [*]	-30.0	-23.0	-27.0
			221.20	-30.0	-39.0	-23.0
氟哌啶醇	52-86-8	376.15	165.20 [*]	-30.0	-25.0	-17.0
			123.20	-30.0	-41.0	-22.0
阿立哌唑	129722-12-9	448.15	285.20 [*]	-22.0	-27.0	-20.0
			176.20	-22.0	-34.0	-18.0
氯丙嗪	50-53-3	319.10	86.20 [*]	-22.0	-22.0	-16.0
			58.20	-22.0	-38.0	-23.0
舍曲林	79617-96-2	306.05	159.10 [*]	-30.0	-26.0	-30.0
			275.10	-30.0	-12.0	-19.0
奋乃静	58-38-8	404.10	171.15 [*]	-20.0	-24.0	-18.0
			143.10	-20.0	-30.0	-26.0
氯硝安定	1622-61-3	316.00	270.05 [*]	-23.0	-25.0	-28.0
			214.05	-23.0	-39.0	-21.0
阿普唑仑	28981-97-7	309.20	281.10 [*]	-24.0	-27.0	-29.0
			205.10	-24.0	-42.0	-20.0

*表示定量离子

1.3 样品制备

标准样品配制：分别用乙腈和水配制如表 4 种 8 个浓度级别的混合标准溶液（表 4）。

表4 标样配制浓度

化合物	浓度级别 (μg/L)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
利培酮	0.00800	0.0200	0.0400	0.0800	0.200	0.400	0.800	2.00
齐拉西酮	0.0400	0.100	0.200	0.400	1.00	2.00	4.00	10.0
喹硫平	0.0200	0.0500	0.100	0.200	0.500	1.00	2.00	5.00
氟哌啶醇	0.0200	0.0500	0.100	0.200	0.500	1.00	2.00	5.00
阿立哌唑	0.0800	0.200	0.400	0.800	2.00	4.00	8.00	20.0
氯丙嗪	0.00800	0.0200	0.0400	0.0800	0.200	0.400	0.800	2.00
舍曲林	0.400	1.00	2.00	4.00	10.0	20.0	40.0	100
奋乃静	0.400	1.00	2.00	4.00	10.0	20.0	40.0	100
氯硝安定	5.00	12.5	25.0	50.0	125	250	500	1.25E+03
阿普唑仑	4.00	10.0	20.0	40.0	100	200	400	1.00E+03

在线方法样品前处理：血清过滤后进样。

离线方法样品前处理：取 50μL 血清加入 150μL 乙腈，涡旋 3 min 后于 12000 rpm 高速离心 5 min，取上清液用乙腈定容至 200μL 待测。

结果讨论

2.1 优化萃取条件和解吸条件

对萃取溶剂进行优化，选取 5mM 乙酸铵水溶液 / 乙腈 (95/5, v/v)，乙酸 / 水 / 乙腈 (0.2/95/5)，水 / 乙腈进行优化，最终选取乙酸 / 水 / 乙腈 (0.2/95/5) 作为最优萃取溶剂。

对萃取流速进行优化，选择 2 mL/min, 3 mL/min, 4 mL/min 进行优化，最终选取 2 mL/min 作为最优萃取流速。

对萃取时间进行优化，设置 1 min, 2 min, 3 min 作为萃取时间，最终选取 2 min 作为萃取时间。

对解吸溶剂进行优化，选取甲酸 / 甲醇 (0.1/99.5, v/v)，甲酸 / 乙腈 (0.1/99.5, v/v)，100% 甲醇, 100% 乙腈, 甲醇 / 乙腈 (20/80, v/v)，甲醇 / 乙腈 (50/50, v/v)，甲醇 / 乙腈 (80/20, v/v)，作为解吸溶剂，终选取甲醇 / 乙腈 (20/80, v/v) 作为最优萃取溶剂。

对解吸速度进行优化，选取 0.2 mL/min, 0.3 mL/min 和 0.4 mL/min 进行优化，最终选取 0.2 mL/min 作为最优流速。

对切换阀 2 的切阀时间进行优化，选取 3.0~4.0 min (间隔 0.1 min) 进行优化，最终选取 3.5 min 作为最优切阀时间。

对泵 C 平衡溶液进行优化，选取 100% 水, 100% 甲醇, 100% 乙腈, 甲醇 / 水 (50/50, v/v)，乙腈 / 水 (50/50, v/v) 进行优化，最终选取 100% 甲醇作为泵 C 平衡溶液。

2.2 标准样品的 MRM 色谱图

混合标准样品的 MRM 色谱图如图 2 所示。

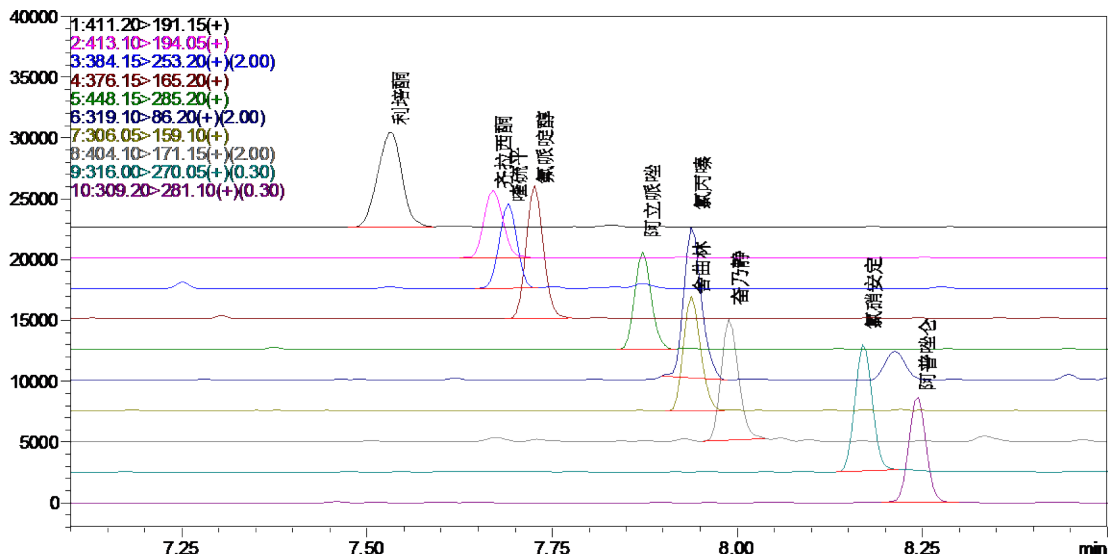


图2 十种生长素标准样品的MRM 色谱图 (浓度级别1:0.00800~5.00 μg/L)

2.3 标准曲线和检出限

按 1.2 中的分析条件进行测定，外标法制作校准曲线，如图 3 所示线性良好。线性方程、相关系数、线性范围、检出限和定量限见表 5：十种抗精神病药的线性相关系数均大于 0.9972，检出限介于 0.000801~0.688 μg/L，定量限介于 0.00321~2.75 μg/L 之间。

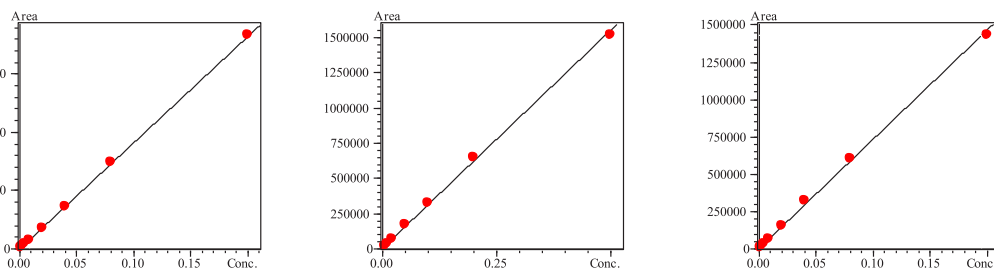


图3 利培酮、喹硫平和氯丙嗪的标准工作曲线

表 5 10 种物质的校准曲线参数

名称	校准曲线	相关系数 r	线性范围	检出限* (μg/L)	定量限** (μg/L)
利培酮	$Y = (1.82282e+007)X + (2499.88)$	0.9999	0.00800~2.00	0.000801	0.00321
齐拉西酮	$Y = (1.70074e+006)X + (4452.61)$	0.9988	0.0400~4.00	0.00891	0.0356
喹硫平	$Y = (3.09441e+006)X + (5194.65)$	0.9992	0.0500~0.500	0.00572	0.0229
氟哌啶醇	$Y = (4.31181e+006)X + (9916.14)$	0.9972	0.0200~2.00	0.00412	0.0165
阿立哌唑	$Y = (553682)X + (6811.70)$	0.9984	0.0800~20.0	0.0254	0.102
氯丙嗪	$Y = (7.32360e+006)X + (4106.56)$	0.9993	0.00800~2.00	0.00185	0.00740
舍曲林	$Y = (218658)X + (5283.00)$	0.9986	0.400~100	0.142	0.569
奋乃静	$Y = (88445.5)X + (2474.88)$	0.9984	1.00~100	0.0722	0.289
氯硝安定	$Y = (101919)X + (6994.22)$	0.9994	5.00~125E+03	0.688	2.75
阿普唑仑	$Y = (92225.7)X + (21083.5)$	0.9982	4.00~100E+03	0.573	2.29

* 级别2浓度标样重复进样7次，计算浓度标准偏差SD，计算方法检出限 MDL=3.14 × S；
方法定量限MQL=4×MDL。

2.4 精密度实验

对表 6 中三个浓度级别的标样进行分析，平行进样 6 次。十种抗精神病药的保留时间和峰面积的相对标准偏差分别在 0.01~0.06 % 和 1.12~ 4.54 % 之间，仪器精密度良好。

表 6 保留时间和峰面积重复性结果(n=6)

目标物	RSD% (级别 2)		RSD% (级别 5)		RSD% (级别 8)	
	R.T	Area	R.T	Area	R.T	Area
利培酮	0.06	1.39	0.02	3.12	0.04	2.39
齐拉西酮	0.05	2.76	0.02	3.18	0.04	2.61
喹硫平	0.06	3.60	0.01	2.97	0.04	2.19
氟哌啶醇	0.06	2.47	0.02	1.12	0.05	2.78
阿立哌唑	0.06	3.83	0.02	3.73	0.04	2.69
氯丙嗪	0.06	2.96	0.01	3.01	0.04	2.66
舍曲林	0.05	4.54	0.01	3.07	0.04	2.12
奋乃静	0.05	2.21	0.01	1.53	0.03	3.49
氯硝安定	0.05	1.66	0.01	1.42	0.04	2.06
阿普唑仑	0.04	1.80	0.02	2.29	0.04	2.21

2.5 与离线方法的比较

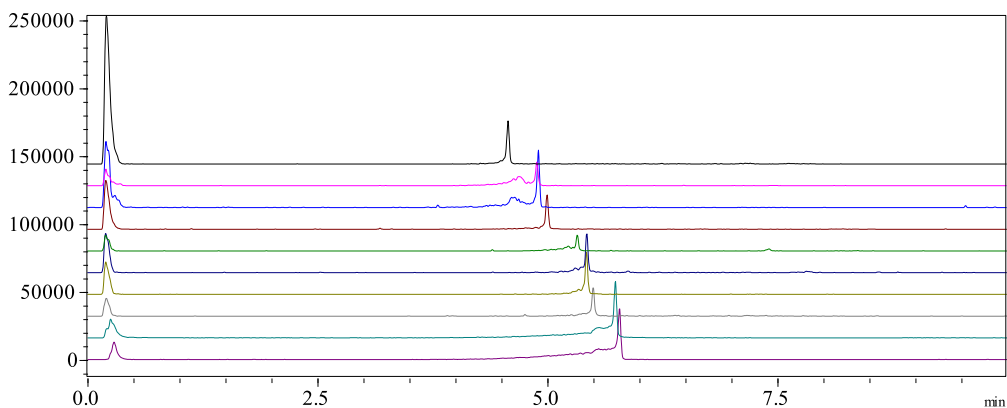


图4 离线方法进样50 μ L 乙腈提取液得到MRM色谱图 (级别3加标浓度)

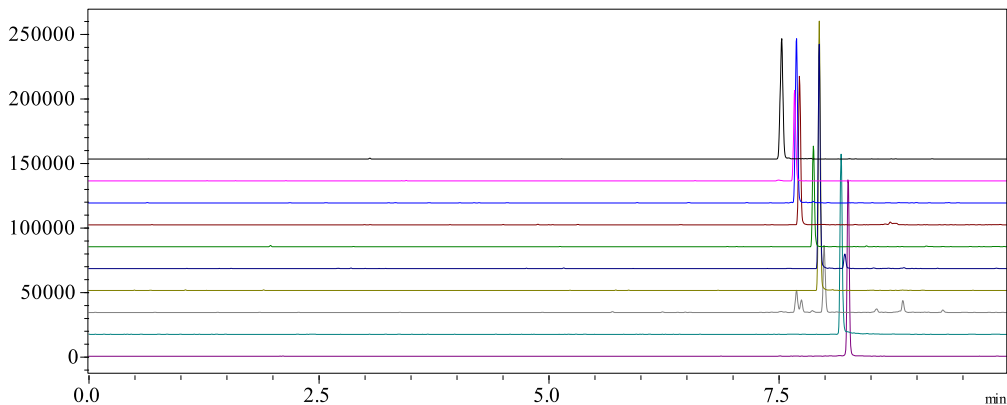


图5 在线方法进样50 μ L 乙腈提取液得到MRM色谱图 (级别3加标浓度)

离线方法前处理使用乙腈作为沉淀剂去除蛋白，高速离心后得到的上清液主要成分为乙腈。图4为离线方法进样 50 μ L 乙腈提取液得到 MRM 色谱图，由图可知，大体积的强洗脱剂乙腈进入 ODS 色谱柱后产生显著的溶剂效应，十种抗精神病药都被分成两个峰，前一个随乙腈在死时间出峰，后一个产生严重的前拖尾；图5为在线方法进样 50 μ L 乙腈提取液得到 MRM 色谱图，由于系统具有大体积进样二步稀释的功能，得到的色谱峰尖锐、对称，峰宽均少于 6 s。

2.6 基质加标实验

在血清样品中添加浓度级别 3 和级别 7 的混合标样，分析结果如图 7 所示，图 6 为空白血清。对两种浓度级别加标血清样品进行检测，回收率介于 58.75~136.75 % 之间，RSD 介于 0.87~7.69 % 之间，具体检测值和回收率见表 7。从表 7 中可以看出，齐拉西酮在两个加标浓度下回收率都是最低的，分析可能是其与血清中蛋白有较强的结合能力，导致其萃取、解吸比例较小，最终得到较低的回收率。

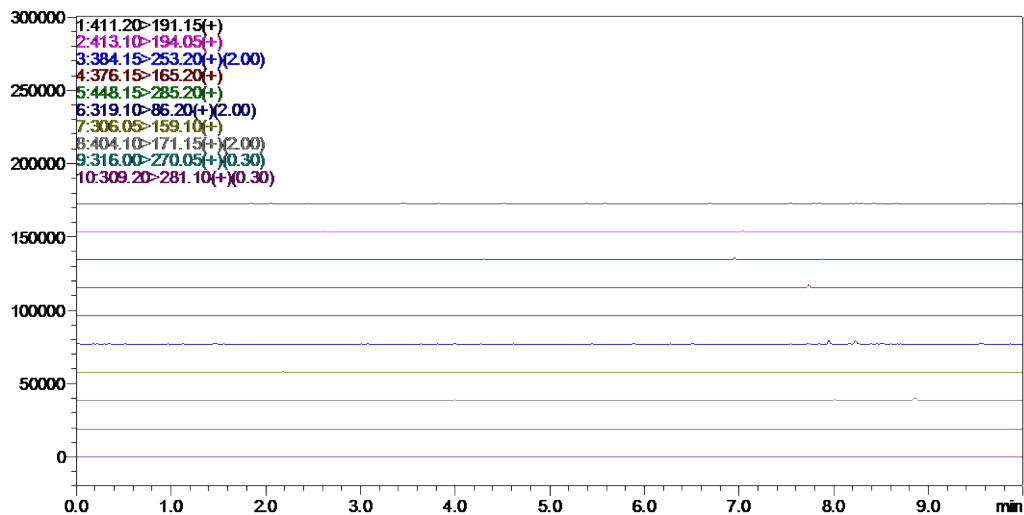


图6 空白血清

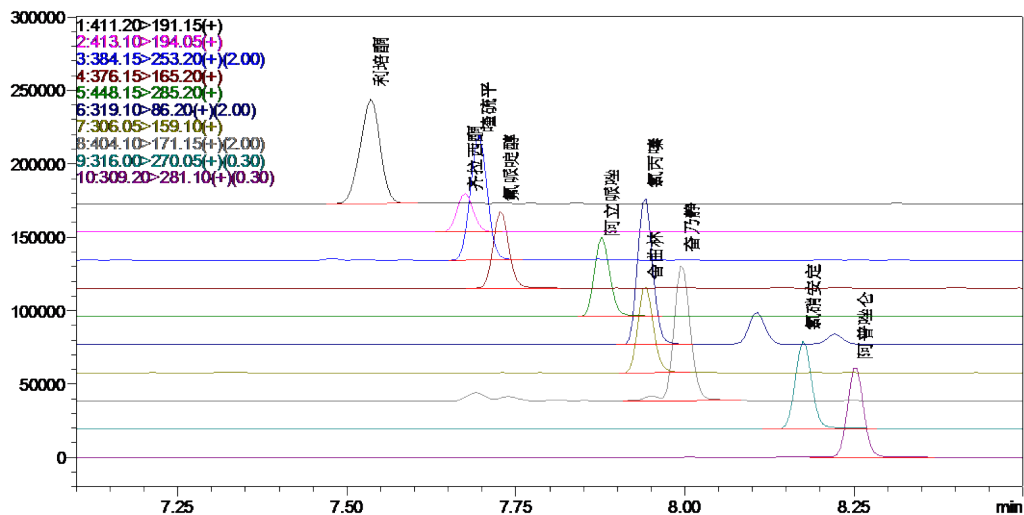


图7 级别3浓度加标样品MRM色谱图

表7 血清样品检测量和回收率(n=3)

目标物	空白	加标回收率 (级别3)		加标回收率 (级别7)	
	检出量 ($\mu\text{g/L}$)	RSD (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)	平均回收率 (%)
利培酮	ND	4.04	103.04	1.56	136.75
齐拉西酮	ND	3.78	58.75	1.56	83.17
喹硫平	ND	7.45	108.00	1.17	128.00
氟哌啶醇	ND	1.93	93.50	0.87	132.67
阿立哌唑	ND	3.33	98.00	3.85	112.50
氯丙嗪	ND	7.48	125.04	6.39	110.42
舍曲林	ND	2.64	101.33	1.24	116.83
奋乃静	ND	3.14	112.25	7.69	109.67
氯硝安定	ND	1.78	75.93	1.24	98.67
阿普唑仑	ND	6.54	82.00	1.43	112.33

*ND 为未检出

结论

建立了自动前处理 – 超高效液相色谱 / 质谱在线分析系统直接测定血清中十种抗精神病药的方法。对萃取条件、解吸条件、自动化控制时间程序进行优化，在最优条件下不同浓度的精密度实验得到的保留时间和峰面积 RSD 分别在 0.01~0.06 % 和 1.12 ~ 4.54 % 之间；十种抗精神病药的线性相关系数均大于 0.9972，方法检出限和方法定量限分别介于 0.000801~0.688 $\mu\text{g/L}$ 和 0.00321~2.75 $\mu\text{g/L}$ 之间。对两种浓度级别加标血清样品进行检测，回收率介于 58.75~136.75 % 之间，RSD 介于 0.87~7.69 % 之间。结果表明本在线方法无需对血清样品做任何处理，即可对分析物进行直接检测。对比离线方法，在线方法 10 min 内完成整个分析，允许强溶剂的大体积进样，全程全自动分析，灵敏度高、精密度好。