

利用 CLAM-2000+LCMS-8060 构建抗精神病药治疗药物监测定量分析方法

LCMSMS-377

摘要： 本文使用岛津全自动在线前处理系统 CLAM-2000 和 LC-MS/MS 在线联用系统建立了血浆中 11 种抗精神病药的全自动定量分析方法，整个实验流程不涉及手动前处理操作，减少了人为误差，提高分析的准确度。基质标曲不同浓度点准确度在 93.5 ~ 105.6% 之间，质控样本实测浓度在试剂盒说明书列出的允许波动范围内。

关键词： CLAM-2000 抗精神病药 治疗药物监测 前处理

治疗药物监测(Therapeutic drug monitoring, TDM)是临床药理学的重要研究内容之一，主要通过采用灵敏的现代分析测试手段来定量分析患者血液样本中的药物及其代谢产物的浓度，探讨血药浓度与药物疗效、毒性之间的关系，以确定药物有效浓度及毒性浓度之间的范围，并可根据药物动力学公式来计算最佳的治疗剂量，做到用药个体化，指导临床合理用药。

由于抗精神病药能产生十分严重的不良反应，在体内吸收不规则，个体差异大，易产生药物蓄积性中毒等。因此 TDM 在抗精神病类药物的临床使用中发挥了重要作用，通过对抗精神病药的监测，可以及时调整患者的用药方案，避免药物并发症等其他不良反应。

目前抗精神病药的 TDM 方法有薄层色谱法 (TLC)、高效液相色谱法 (HPLC)、液相色谱 - 串联质谱法 (LC-MS/MS) 等。但是 TLC 检测结果的假阳性高，HPLC 缺点是灵敏度低，在生物样本的定量分析过程中

有一定的局限性，LC-MS/MS 因具有高灵敏度、检出限低的特点，可以进行多组分定性、定量检测。

为了提高临床检验工作效率，减少人力成本，目前医院和第三方医学检验单位都在寻求一种样本全自动在线前处理设备。岛津中国今年推出的 CLAM-2000 自动化生物样本前处理系统可以极大地提高了工作效率和自动化程度，减少了人为误差；减少分析人员接触生物样本机会，降低生物感染的风险；与 LC-MS/MS 自动连接，提高效率。

本文基于抗精神病药商品化试剂盒，使用岛津全自动在线前处理设备 CLAM-2000 和 LC-MS/MS 联用系统建立了 11 种抗精神病药的定量分析方法，整个实验流程不涉及手动前处理操作，减少了人为误差，提高分析的准确度。该方法方便、快捷，实现了 11 种抗精神病药的同时快速分析，供相关人员参考。

实验部分

1.1 仪器

本实验使用全自动在线前处理系统 CLAM-2000、岛津超高效液相色谱仪 LC-30A、三重四极杆质谱仪 LCMS-8060 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A_{SR} 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-20AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8060 三重四极杆质谱仪，CLAM-2000 软件 CLAM-2000_PC_V1_13，LabSolutions Ver. 5.91 SP1 色谱工作站。

1.2 试剂盒信息

名称：TDM series A PARAMETER

Set Neuroleptics 1 in Serum/Plasma (以下简称 Neuroleptics 1)

品牌：德国 Chromsystems

组成：血浆基质标品、血浆基质质控、内标、稀释剂、提取试剂、蛋白沉淀剂、色谱柱

1.3 分析条件

液相条件

色谱柱: 试剂盒 Neuroleptics 1 提供

柱温: 30°C

流动相: A 相 -0.1% 甲酸水溶液

进样量: 0.5 µL

B 相 -0.1% 甲酸乙腈

洗脱方式: 梯度洗脱, B 相初始浓度为 20%,

流速: 0.6 mL/min

时间程序见表 1

表1 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
0.20	泵	B.Conc	20
0.21	泵	B.Conc	50
0.70	泵	B.Conc	50
0.71	泵	B.Conc	70
2.30	泵	B.Conc	70
2.31	泵	B.Conc	20
3.00	控制器	Stop	

表2 MRM参数

化合物名	Name	CAS号	m/z	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
阿立哌唑	Aripiprazole	129722-12-9	448.10>285.15*	-30	-26	-14
			448.10>176.15	-15	-32	-18
氯氮平	Clozapine	5786-21-0	327.10>270.10*	-24	-21	-29
			327.10>192.15	-11	-43	-13
脱氢阿立哌唑	Dehydroaripiprazole	129722-25-4	446.10>285.15*	-20	-23	-29
			446.10>98.15	-11	-41	-10
去甲氯氮平	Desmethylclozapine	6104-71-8	313.10>192.10*	-21	-39	-30
			313.10>270.10	-14	-23	-13
氟哌啶醇	Haloperidol	52-86-8	376.10>165.15*	-26	-23	-30
			376.10>165.15	-28	-40	-22
去甲奥氮平	N-Desmethyloanzapine	161696-76-0	299.10>256.15*	-21	-23	-27
			299.10>198.10	-30	-37	-21
11-(1-哌嗪基)二苯并[B,F][1,4]硫氮杂卓	Norquetiapine	5747-48-8	296.10>210.10*	-21	-29	-22
			296.10>183.10	-10	-41	-19
奥氮平	Olanzapine	132539-06-1	313.10>256.15*	-22	-23	-27
			313.10>198.05	-23	-42	-20
喹硫平	Quetiapine	111974-69-7	384.10>253.10*	-29	-23	-26
			384.10>221.15	-10	-38	-15
利培酮	Risperidone	106266-06-2	411.20>191.15*	-14	-29	-20
			411.20>110.30	-19	-48	-20
9-羟基利培酮	9-OH-Risperidone	144598-75-4	427.20>207.15*	-30	-27	-22
			427.20>110.15	-11	-42	-11
奥氮平	Olanzapine IS	--	316.10>256.15*	-25	-21	-28
			316.10>198.10	-22	-41	-20

氟哌啶醇内标	Haloperidol IS	--	382.10>123.00*	-13	-40	-12
			382.10>123.00	-30	-26	-28
氯氮平内标	Clozapine IS	--	335.10>275.10*	-25	-23	-29
			335.10>192.10	-11	-46	-12
阿立哌唑内标	Aripiprazole IS	--	456.10>293.15*	-22	-27	-25
			456.10>177.90	-30	-29	-22
去甲奥氮平内标	N-Desmethyloanzapine IS	--	307.10>198.10*	-21	-35	-21
			307.10>261.15	-22	-25	-17
9-羟基利培酮内标	9-OH-Risperidone IS	--	431.10>211.20*	-30	-29	-22
			431.10>114.15	-11	-44	-12
利培酮内标	Risperidone IS	--	415.20>195.20*	-30	-28	-20
			415.20>114.20	-14	-50	-22
喹硫平内标	Quetiapine IS	--	388.10>255.15*	-28	-23	-27
			388.10>223.20	-28	-40	-23
去甲氯氮平内标	Desmethylozapine IS	--	321.10>192.15*	-23	-41	-30
			321.10>275.10	-24	-24	-29
11-(1-哌嗪基)二苯并[B,F][1,4]硫氮杂卓内标	Norquetiapine IS	--	304.10>210.10*	-22	-30	-22
			304.10>183.10	-21	-41	-12
脱氢阿立哌唑内标	Dehydroaripiprazole IS	--	454.10>293.10*	-15	-25	-20
			454.10>102.20	-30	-42	-20

注：*表示定量离子

1.4 CLAM-2000 前处理程序

在 CLAM-2000 控制软件界面 KIT.Cond 菜单的子菜单 protocol 项下，编辑样品自动前处理程序，具体步骤为 (1)、在过滤管中加入 20 μL 甲醇活化过滤管，准备上样；(2)、吸取血浆样品 25 μL 上样；(3)、加入提取盐溶液 12.5 μL ；(5)、转速 2000 rpm 振荡 60 秒；(4)、试剂针吸取 125 μL 蛋白沉淀剂（含内标）；(5)、转速 1000 rpm 震荡 90 秒；(6)、使用 -50~-60 kPa 的负压抽滤过滤管 120 秒，转移至液相自动进样器进样 0.5 μL （详见图 1）。

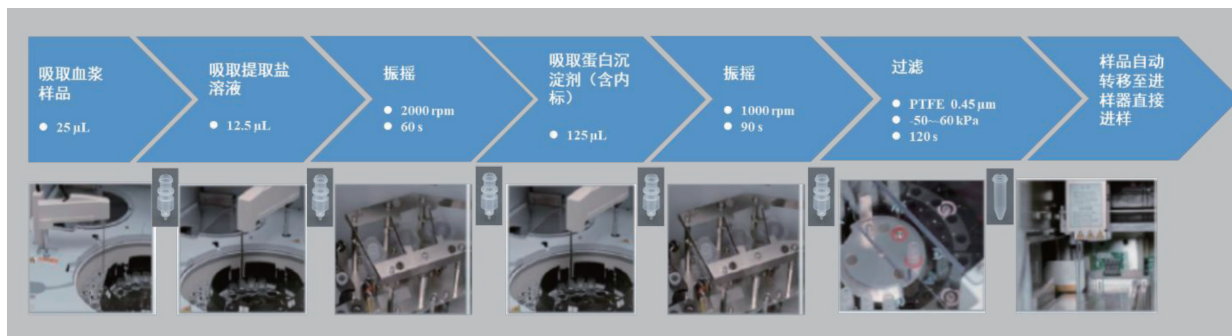


图1 CLAM-2000自动前处理流程

结果与讨论

本实验采用岛津生物样本全自动在线前处理系统 CLAM-2000 进行血浆样品的前处理，样品处理结束后会自动将样品输送到 LC-MS/MS 的自动进样器单元进行进样分析。参照试剂盒 Neuroleptics 1 中手动前处理流程，本文中样品自动前处理程序包括吸取样品、吸取提取盐溶液、振摇、吸取蛋白沉淀剂（包含内标）、振摇和过滤，总时间约 6 min，在 LC-MS/MS 进行分析的同时，自动前处理程序也在同时进行，并且 CLAM-2000 会根据前处理流程同时处理 2-3 个样品，即有的样品在进行样品吸取，有的样品在进行振摇，有的样品在进行抽滤等。这种交叉处理样本的行为使得每个样品的 LC-MS/MS 分析时间间隔为 5 min（小于整个样本处理时间，如图 2 所示）。

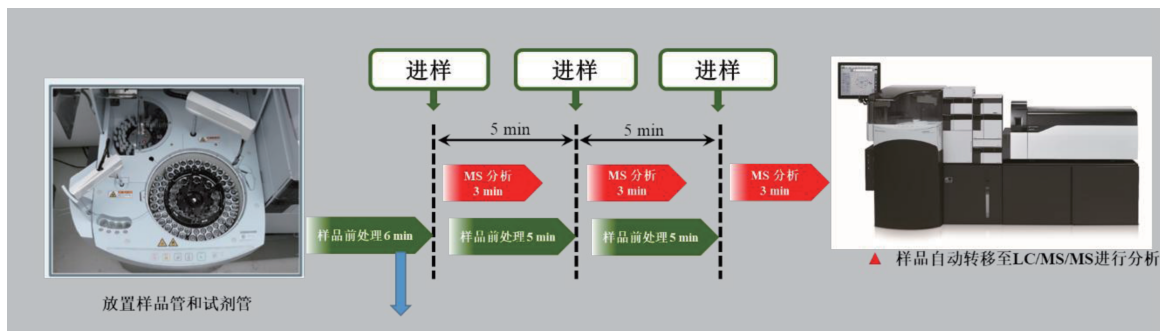
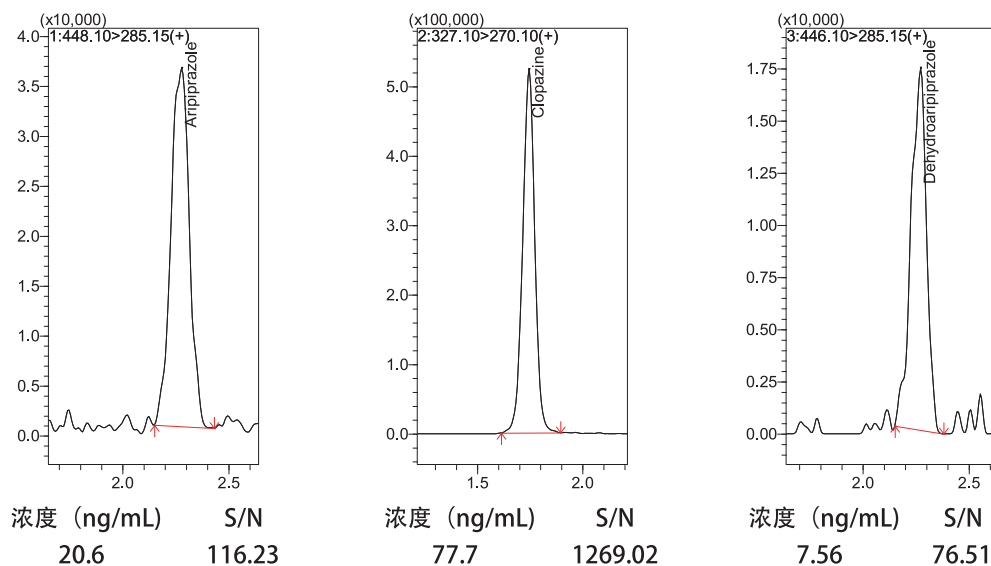
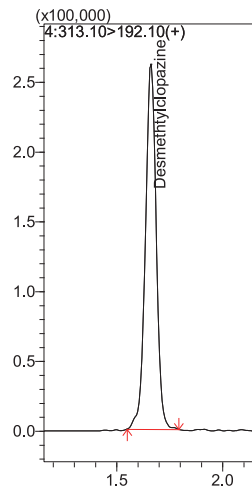


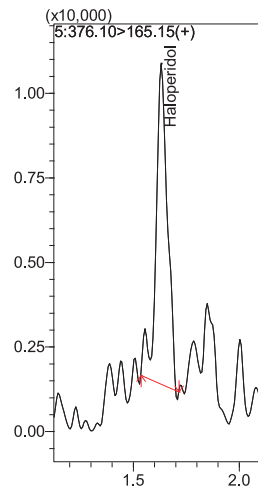
图2 CLAM-2000和LCMS-8060联用工作模式

2.1 基质标准品色谱图

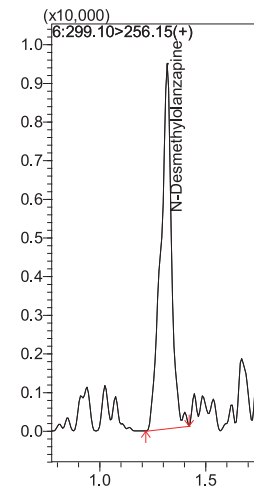




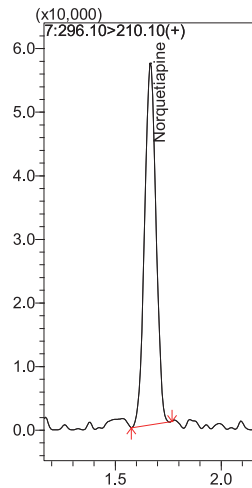
浓度 (ng/mL) S/N
75.1 749.8



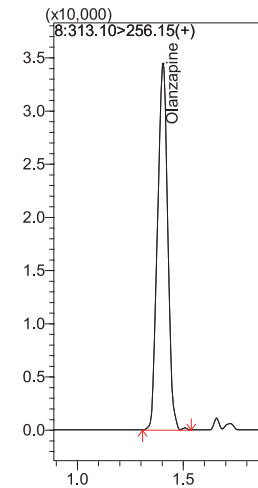
浓度 (ng/mL) S/N
2.03 18.83



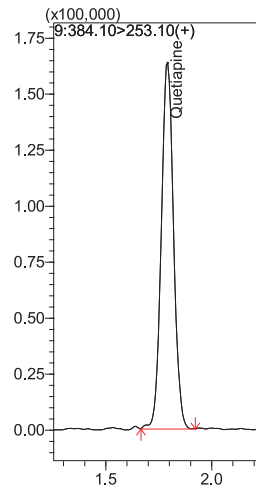
浓度 (ng/mL) S/N
3.92 33.19



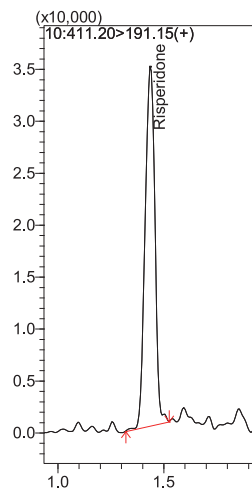
浓度 (ng/mL) S/N
10.4 108.21



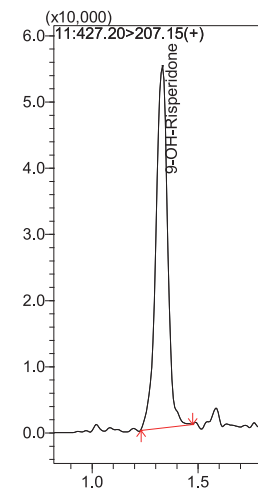
浓度 (ng/mL) S/N
3.85 103.89



浓度 (ng/mL) S/N
27.3 64.33



浓度 (ng/mL) S/N
2.04 40.75



浓度 (ng/mL) S/N
3.68 48.56

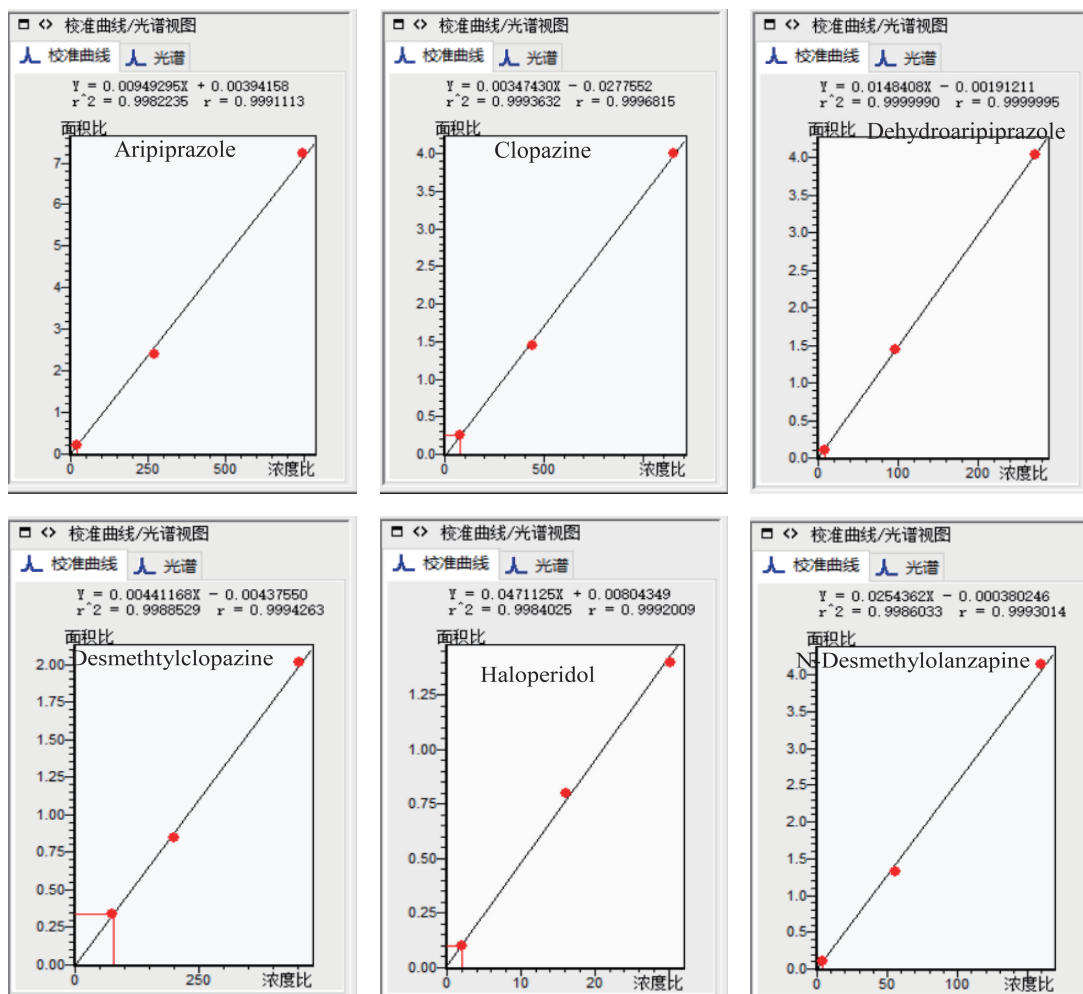
图2 11种抗精神病药定量下限色谱图

2.2 线性范围

Neuroleptics 1 试剂盒中各级别基质标品浓度和线性回归各浓度的准确度如表 3 所示，按 1.4 的自动前处理程序和 1.3 中的分析条件进行分析检测，利用内标法制作校准曲线，线性良好，线性方程、相关系数见图 3。

表3 11种抗精神病药基质标曲浓度范围和标线准确度

Compounds	基质标曲浓度 (ng/mL)			准确度 (%)
	Calibrator1	Calibrator2	Calibrator3	
Aripiprazole	20.6	269	746	93.5~104.3
Clozapine	77.7	440	1149	96.6~102.3
Dehydroaripiprazole	7.56	97	273	99.9~100.2
Desmethyloclozapine	75.1	200	453	96.6~102.3
Haloperidol	2.03	16.1	30.3	97.6~104.7
N-Desmethyloanzapine	3.92	55.4	160	94.1~104.0
Norquetiapine	10.4	80.7	221	96.2~102.5
Olanzapine	3.85	54.1	153	91.6~105.6
Quetiapine	27.3	201	525	95.2~103.1
Risperidone	2.04	12.1	30.7	97.9~101.3
9-OH-Risperidone	3.68	49.5	138	97.4~101.7



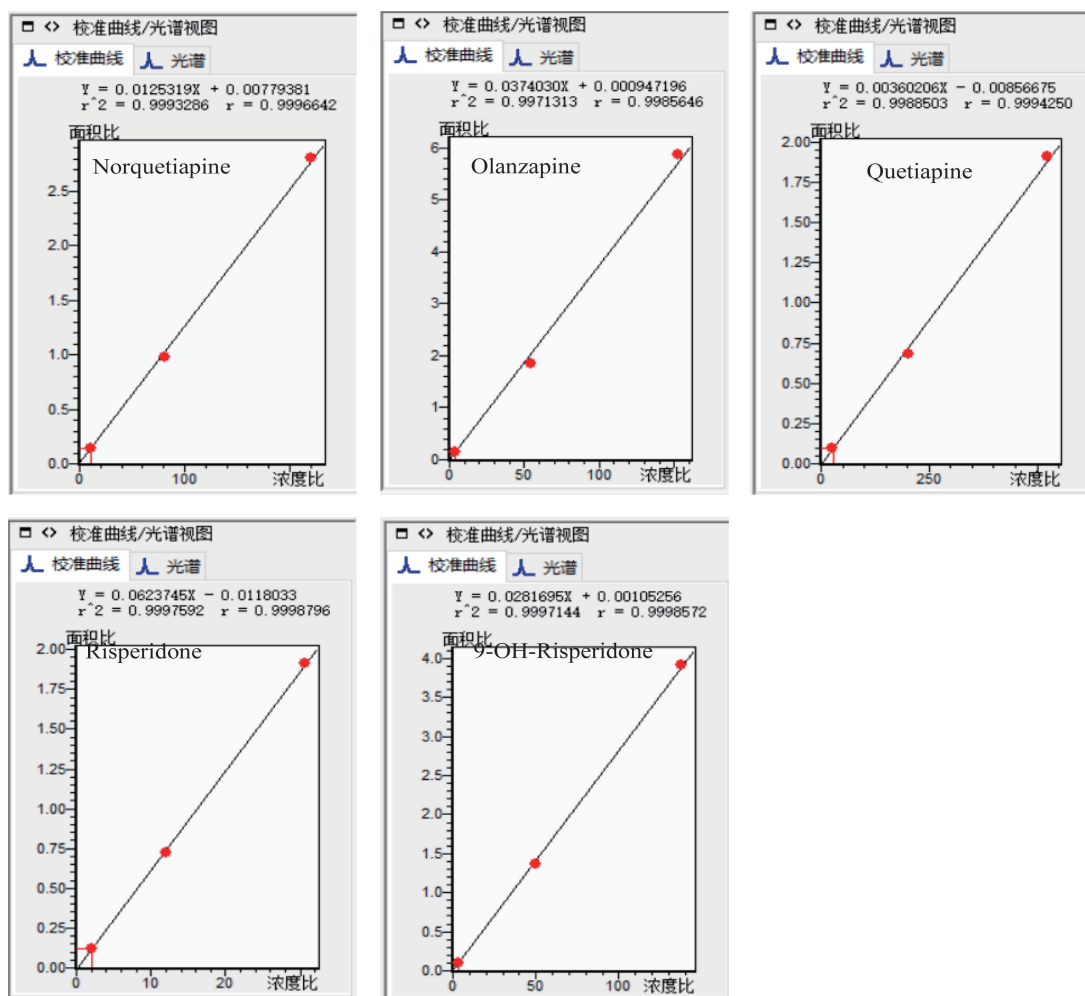


图3 11种抗精神病药基质标曲相关信息

2.3 质控样品检测结果

试剂盒 Neuroleptics 1 提供 2 个不同浓度质控样品 QC1 和 QC2，标示浓度和允许波动范围如表 4 所示，实际检测浓度在允许波动范围内（表 4）。

表4 质控样品检测结果

化合物	标示浓度 (ng/mL)		允许波动范围 (ng/mL)		实测浓度 (ng/mL)	
	QC1	QC2	QC1	QC2	QC1	QC2
Aripiprazole	185	336	148-222	269-403	203.15	360.24
Clozapine	325	544	260-390	435-653	368.61	497.44
Dehydroaripiprazole	67.1	125	53.6-80.5	100-150	75.46	132.28
Desmethylclozapine	166	234	133-199	187-280	183.27	257.22
Haloperidol	4.03	17.9	3.22-4.83	14.3-21.4	4.62	17.75
N-Desmethylolanzapine	39.8	72.3	31.8-47.7	57.8-86.7	42.55	77.50
Norquetiapine	58.2	101	46.5-69.8	80.6-121	62.30	101.06
Olanzapine	37.9	68.6	30.3-45.4	54.9-82.4	41.88	68.37
Quetiapine	148	244	118-177	195-292	166.12	234.21
Risperidone	9.1	14.3	7.28-10.9	11.5-17.2	9.93	14.14
9-OH-Risperidone	33.6	61	26.9-40.3	48.8-73.3	35.78	66.37

■ 结论

本文使用岛津全自动在线前处理设备 CLAM-2000 和 LC-MS/MS 在线联用系统，建立了人血浆种 11 种抗精神病药的定量分析方法，整个实验流程不涉及手动前处理操作，从吸取样品、提取试剂、沉淀剂，到样品混匀、过滤，以及将处理完的样品输送到 LC-MS/MS 自动进样器均靠仪器自动完成，减少了人为误差，提高分析的准确度，适合临床样本抗精神病药的快速定量检测。本实验中基质标曲不同浓度点准确度在 93.5 ~ 105.6% 之间，质控样本实测浓度在试剂盒说明书列出的允许波动范围内。