

血清中 12 种精神类药物分析方法

应用及技术服务部

摘要: 建立同时测定血清中 12 种精神类药物的检测方法。血清样本经 Cleanert PPT 蛋白沉淀板沉淀蛋白后, 采用 Phenomenex Kinetex Biphenyl 色谱柱进行分离, 液相串联质谱在 ESI 模式下采用 MRM 进行定性定量分析。结果显示 12 种精神类药物色谱峰分离度良好, 血药浓度在 1~5000 ng/mL 间, 线性相关系数 $R^2 > 0.99$, 目标物三个加标水平下回收率为 69.5%~115.8%, 相对标准偏差均在 9.1% 内。该方法准确度高, 重复性好, 且具有操作时间短、自动化及高通量处理等优势, 适用于临床精神类药物监测分析。

关键词: 精神类药物; Cleanert PPT; Kinetex Biphenyl; LC-MS/MS; 牛血清

化合物信息

表 1. 精神类药物化合物信息

中文名称	英文名称	CAS 号	分子式
茶碱	Theophylline	58-55-9	C ₇ H ₈ N ₄ O ₂
苯妥英钠	5,5-diphenylhydantoin sodium salt	630-93-3	C ₁₅ H ₁₁ N ₂ NaO ₂
丙戊酸	Valproic acid	99-66-1	C ₈ H ₁₆ O ₂
卡马西平	Carbamazepine	298-46-4	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O
氯氮平	Clozapine	5786-21-0	C ₁₈ H ₁₉ ClN ₄
N-去甲氯氮平	N-Demethylclozapine	6104-71-8	C ₁₇ H ₁₇ ClN ₄
喹硫平	Quetiapine	111974-69-7	C ₂₁ H ₂₅ N ₃ O ₂ S
奥氮平	Olanzapine	132539-06-1	C ₁₇ H ₂₀ N ₄ S
利培酮	Risperidone	106266-06-2	C ₂₃ H ₂₇ FN ₄ O ₂
度洛西汀	Duloxetine hydrochloride	116539-60-7	C ₁₈ H ₂₀ ClNOS
氟哌啶醇	Haloperidol	52-86-8	C ₂₁ H ₂₃ ClFNO ₂
齐拉西酮	Ziprasidone hydrochloride	146939-27-7	C ₂₁ H ₂₁ ClN ₄ OS

实验部分

仪器、试剂与材料

主要仪器设备

液相色谱串联质谱仪 (AB SCIEX API 4500MD), 配有电喷雾离子源 (ESI);
96 孔板正压固相萃取装置 (Agela SPE-M96)。

试剂材料

蛋白沉淀板：Cleanert PPT，2 mL/well；

实验用水、甲醇、甲酸均为色谱级；

样品基质

实验采用的基质为 EDTA 牛血清样本，-18 °C 保存；

溶液配制

0.1% 甲酸溶液：准确吸取 1 mL 甲酸加入至 1000 mL 纯水中，混匀。

茶碱、苯妥英钠、丙戊酸、卡马西平、氯氮平、N-去甲氯氮平、喹硫平、奥氮平、利培酮、氟哌啶醇单标溶液（100 mg/L）外购，避光-18 °C 保存。；度洛西汀 20 mg 纯品、齐拉西酮 100 mg 纯品，外购，避光保存于 4 °C。

12 种精神类药物混合标准溶液；内含卡马西平、氯氮平、N-去甲氯氮平、喹硫平、奥氮平、利培酮、氟哌啶醇、齐拉西酮 1 mg/L，茶碱、苯妥英钠、度洛西汀 10 mg/L，溶于甲醇中。

基质标准工作曲线：分别精确吸取适量的混合标准溶液和丙戊酸单标，用空白基质溶液稀释配制标准工作曲线，卡马西平、氯氮平、N-去甲氯氮平、喹硫平、奥氮平、利培酮、氟哌啶醇、齐拉西酮曲线浓度范围 1~500 ng/mL，茶碱、苯妥英钠、度洛西汀浓度范围 10~5000 ng/mL，丙戊酸浓度范围 0.1~10 µg/mL，供液相色谱-质谱联用仪测定。

分析步骤

样品前处理：

Cleanert PPT 与收集板放置在一起；

加入 4 倍样品体积的沉淀剂（800 µL 甲醇）；

加入 200 µL 牛血清样本（稀释 5 倍）；

使用移液器反复吹打充分混匀样品，沉淀蛋白；

正压收集滤液用于分析。

测定

色谱条件

色谱柱： Phenomenex Kinetex Biphenyl（2.1 × 100 mm, 2.6 µm, 100 Å）；

流动相： A:0.1% 甲酸水溶液 B:乙腈

流 速：0.4 mL/min；

柱 温：40 °C；

进样量：1 µL；

梯 度：

表3. 梯度条件

时间 (min)	流速 (mL/min)	A (%)	B (%)
0	0.4	95	5
1.0	0.4	70	30
6.5	0.4	20	80
7.5	0.4	20	80
7.6	0.4	95	5
9.0	0.4	95	5

质谱条件

离子源类型：电喷雾离子源（ESI）

扫描方式：多反应监测正负离子模式（MRM）

喷雾针电压：±4500 V

离子源温度：500 °C

加热器（GS1）：40 psi

辅助加热气（GS2）：50 psi

气帘气（CUR）：35 psi

碰撞气（CAD）：8 psi

为获得较好的稳定性和灵敏度，各化合物监测离子对的去簇电压（DP）和碰撞电压（CE），目标化合物定量离子对以及内标监测离子对等参数均经过系统优化，优化信息参见表4。

表4. 化合物定性、定量离子和质谱分析参数

化合物	Q1	Q3	DP/V	CE/V
Clozapine	327.1	270.1*	120	34
	327.1	192.1	120	58
Duloxetine	298.2	188.2*	70	7
	298.2	154.2	70	8
Haloperidol	375.9	165*	100	30
	375.9	123.1	100	30
Olanzapine	312.8	256.2*	120	30

	312.8	84.1	120	29
Quetiapine	384.1	253.1*	120	32
	384.1	221	120	54
Risperidone	411.2	191.1*	100	67
	411.2	110.2	100	69
Ziprasidone	413.1	194*	158	40
	413.1	177	158	40
Theophylline	181.1	124.1*	100	26
	181.1	96.1	100	30
N-Demethylclozapine	313.4	270.2*	130	33
	313.4	192.2	130	55
Carbamazepine	237	194*	104	30
	237	220	104	21
5,5-diphenylhydantoin	253	220.9*	180	37
	253	209.9	180	30
Valproic acid	142.9	142.9*	-80	-10

注：表3中标“*”为定量离子。

结果与讨论

根据《AGNP 精神科治疗药物监测共识指南》中药物治疗浓度范围作为参考，向血清中分别添加低、中、高三种浓度的标准溶液，其中卡马西平、氯氮平、N-去甲氯氮平、喹硫平、奥氮平、利培酮、氟哌啶醇、齐拉西酮添加水平分别为 5、50、250 ng/mL，茶碱、苯妥英钠、度洛西汀添加水平分别为 50、500、2500 ng/mL，丙戊酸添加水平为 500、2500、5000 ng/mL，按照 Cleanert PPT 的前处理方式处理样本，每个添加浓度平行测定 6 次，计算回收率与精密度结果。从表 5 可得，12 种精神类药物添加浓度的回收率均在 69.5%~115.8%之内，精密度 RSD 在 9.1%以内，血清中精神类药物浓度测定方法的回收率和精密度良好，且同时测定 20 个样本，前处理耗时仅 15 min。

表 5. 加标回收实验结果

化合物	理论加标浓度 (ng/mL)	检测结果 (ng/mL)	回收率%	RSD%
Clozapine	5	4.39	87.9	4.9
	50	50.76	101.5	2.0
	250	248.31	99.3	3.9
Duloxetine	50	34.75	69.5	8.2
	500	579.07	115.8	6.0
	2500	2444.69	97.8	5.2

Haloperidol	5	3.83	76.6	6.2
	50	50.80	101.6	1.8
	250	250.41	100.2	2.9
Olanzapine	5	3.54	70.7	8.9
	50	49.56	99.1	5.8
	250	235.97	94.4	5.4
Quetiapine	5	3.86	77.2	5.3
	50	54.50	109.0	1.8
	250	261.37	104.5	2.7
Risperidone	5	3.98	79.7	7.2
	50	49.30	98.6	4.5
	250	250.37	100.1	1.4
Ziprasidone	5	3.79	75.7	8.4
	50	56.29	112.6	3.4
	250	260.69	104.3	1.7
Theophylline	50	44.19	88.4	6.9
	500	499.98	100.0	5.8
	2500	2526.26	101.1	0.8
N-Demethylcozapine	5	3.51	70.2	5.3
	50	54.47	108.9	4.5
	25	244.70	97.9	2.5
Carbamazepine	5	4.15	82.9	6.1
	50	54.58	109.2	5.0
	250	265.97	106.4	2.6
5,5-diphenylhydantoin	50	42.45	84.9	9.1
	500	524.55	104.9	2.7
	2500	2803.64	112.1	3.0
Valproic acid	500	459.59	91.9	6.5
	2500	2352.57	94.1	5.4
	5000	4939.57	98.8	5.7

实验谱图

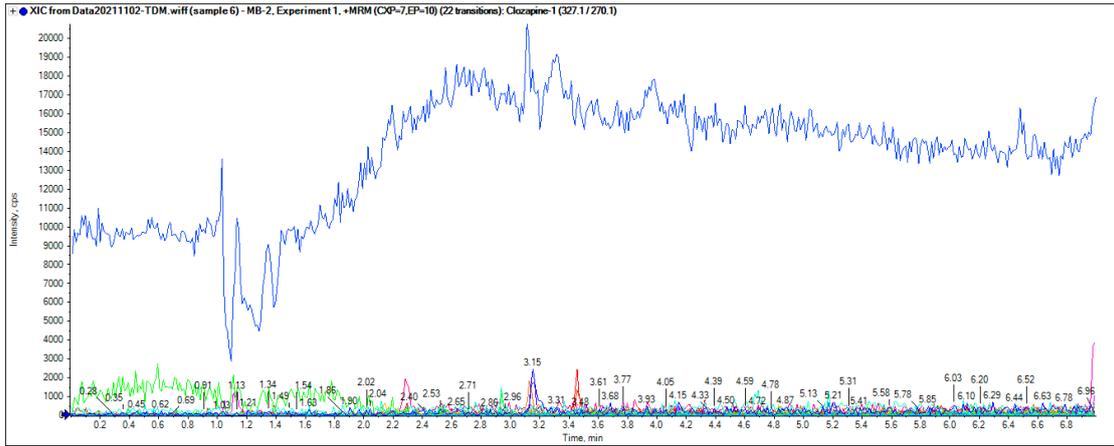


图 1. 空白样品总 XIC 色谱图

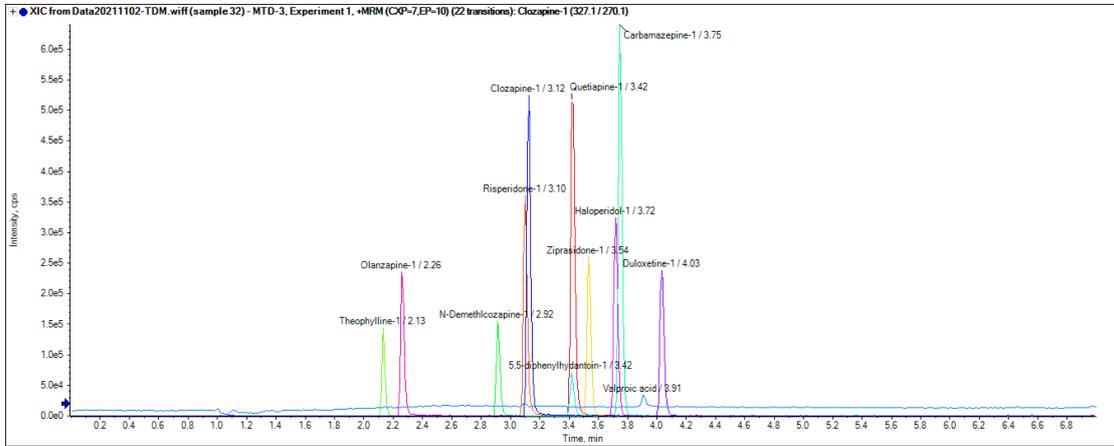
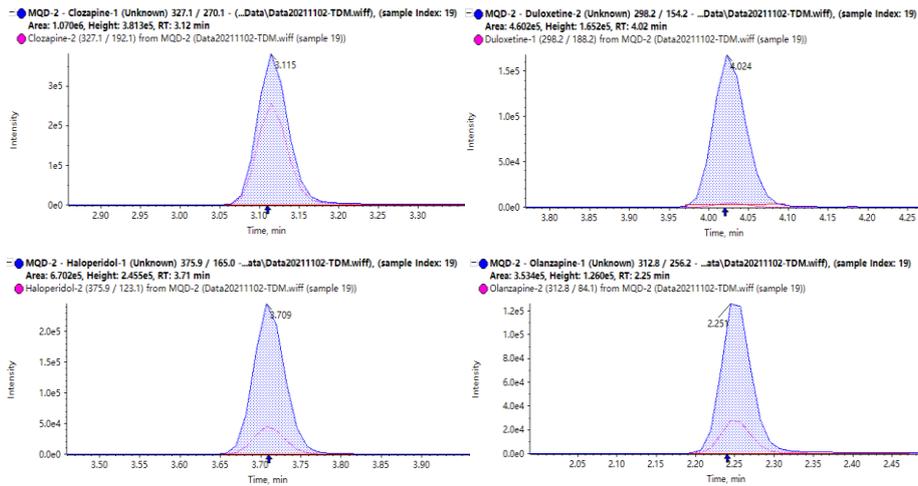


图 2. 牛血清基质加标总 XIC 色谱图



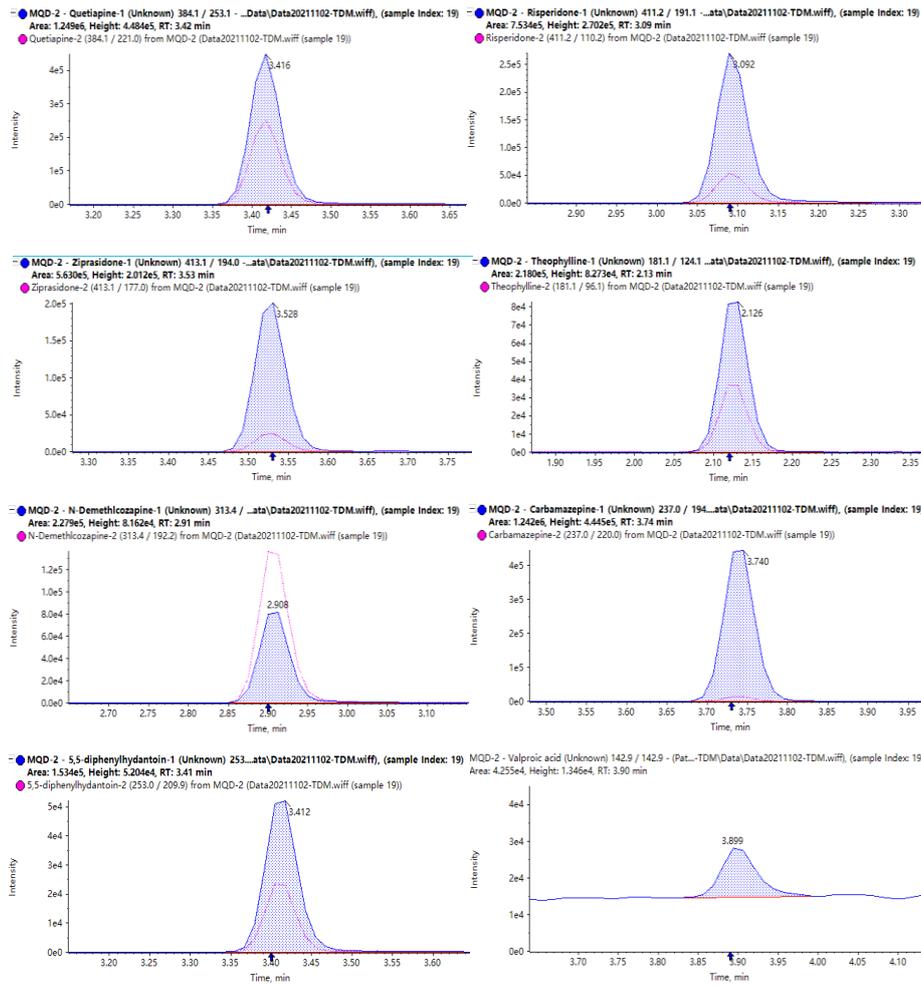


图 3. 氯氮平、度洛西汀、氟哌啶醇、奥氮平、喹硫平、利培酮、齐拉西酮、茶碱、N-去甲氯氮平、卡马西平、苯妥英钠、丙戊酸提取色谱图

结论

建立经 Cleanert PPT 蛋白沉淀专用板沉淀蛋白，溶液直接上机，采用 Phenomenex Kinetex Biphenyl 色谱柱分离，液相串联质谱系统对 12 种精神类药物的血药浓度进行定性定量分析方法。在血药浓度 1~5000 ng/mL 范围内进行的 3 水平添加实验回收率均在 69.5%~115.8%，RSD 值小于 10%，方法灵敏度稳定性良好。实验步骤简单省时，可实现精神类药物 TDM 的自动化和高通量处理。