

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.09.017

高效液相色谱-串联质谱法同时检测人血清中帕利哌酮、齐拉西酮、喹硫平和氨磺必利质量浓度*

高永双¹, 梁国朝¹, 梁灵君¹, 邓顺顺¹, 刘锐锋^{2△}

(1. 广东省中山市第三人民医院, 广东 中山 528400; 2. 广东省中山市人民医院, 广东 中山 528400)

摘要:目的 建立同时测定人血清中帕利哌酮、齐拉西酮、喹硫平和氨磺必利质量浓度的高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)法。方法 采用乙腈蛋白沉淀法对人血清样本进行前处理。采用HPLC-MS/MS法测定, 色谱柱为 Kinetex XB-C₁₈柱(50 mm×3.0 mm, 2.6 μm), 流动相为 0.01% 甲酸-水-乙腈(50:37.5:12.5, V/V/V), 流速为 0.4 mL/min, 柱温为 45℃, 进样量为 5 μL; 电喷雾电离正离子模式, 多反应监测模式进行定量分析, 以帕利哌酮-D4、齐拉西酮-D8、喹硫平-D8 和氨磺必利-D5 为质控内标。结果 帕利哌酮的进样质量浓度线性范围为 5.00~1 000.00 ng/mL($R^2=0.9973$)、齐拉西酮、喹硫平、氨磺必利均为 10.00~2 000.00 ng/mL($R^2=0.9956, 0.9971, 0.9945$), 定量下限分别为 5, 10, 10, 10 ng/mL; 日内和日间精密度试验结果的 RSD 均小于 15%($n=15$); 平均提取回收率为 92.06%~108.14%, RSD 均低于 5.00%($n=15$); 血清质控样品于常温避光放置 1 h 和 24 h, 以及 -20℃冻存 1 d 和 14 d 后, 含量均在 85%~115%, RSD 均小于 15%($n=15$)。基质效应的 RSD 均小于 15%($n=9$)。结论 所建立的方法可同时测定人血清样本中帕利哌酮、齐拉西酮、喹硫平和氨磺必利的质量浓度, 操作简便快捷, 灵敏度高, 专属性好, 可用于治疗药物的血药浓度监测。

关键词: 高效液相色谱-串联质谱法; 帕利哌酮; 齐拉西酮; 喹硫平; 氨磺必利; 乙腈蛋白沉淀法; 血药浓度; 治疗药物监测

中图分类号: R917

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2022)09-0074-04

Simultaneous Determination of Paliperidone, Ziprasidone, Quetiapine and Amisulpride in Human Serum by HPLC-MS/MS

GAO Yongshuang¹, LIANG Guochao¹, LIANG Lingjun¹, DENG Shunshun¹, LIU Ruifeng²

(1. Zhongshan Third People's Hospital, Zhongshan, Guangdong, China 528400; 2. Zhongshan City People's Hospital, Zhongshan, Guangdong, China 528400)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) method for the simultaneous determination of paliperidone, ziprasidone, quetiapine and amisulpride in human serum. **Methods** Human serum samples were pretreated by acetonitrile protein-precipitation method. The mass concentration of paliperidone, ziprasidone, quetiapine and amisulpride in the serum was determined by the HPLC-MS/MS method. The chromatographic column was Kinetex XB-C₁₈ column (50 mm×3.0 mm, 2.6 μm), the mobile phase was 0.01% formic acid-water-acetonitrile (50:37.5:12.5, V/V/V), the flow rate was 0.4 mL/min, the column temperature was 45℃ and the injection volume was 5 μL. The positive-mode electrospray ionization (ESI) and the multiple reaction monitoring (MRM) mode were used for quantitative analysis. Paliperidone-D4, ziprasidone-D8, quetiapine-D8, and amisulpride-D5 were used as internal standards for quality control. **Results** The linear range of paliperidone was 5.00-1 000.00 ng/mL ($R^2=0.9973$), and the linear range of ziprasidone, quetiapine and amisulpride was 10.00-2 000.00 ng/mL ($R^2=0.9956, 0.9971, 0.9945$). The lower limits of quantification (LLOQ) were 5, 10, 10, 10 ng/mL, respectively. The RSDs of the intra-day and inter-day precision tests were both less than 15% ($n=15$). The average extraction

*基金项目: 2019年度广东省中山市社会公益科技研究项目[2019B1081]。

第一作者: 高永双, 硕士研究生, 主任药师, 研究方向为精神药理学, (电子信箱)409632800@qq.com。

△通信作者: 刘锐锋, 大学本科, 主任药师, 研究方向为医院药学, (电子信箱)RFL2005@126.com。

- [18] LIANG HC, XIAO J, ZHOU ZM, et al. Hypoxia induces miR-153 through the IRE1α-XBP1 pathway to fine tune the HIF1α/VEGFA axis in breast cancer angiogenesis[J]. *Oncogene*, 2018, 37(15):1961-1975.
- [19] 汤桂丽. 4种肿瘤标志物联合检测对原发性肝癌的早期诊断价值[J]. *中国药业*, 2015, 24(7):127-129.
- [20] 王凤杰, 梁海英. 血清肿瘤标志物 CEA, CA19-9 及 CA72-4 在原发性肝癌早期诊断中的应用价值[J]. *中国药业*, 2016, 25(15):91-93.

- [21] LI CI, MALONE KE, WEISS NS, et al. Relation between use of antihypertensive medications and risk of breast carcinoma among women ages 65-79 years[J]. *Cancer*, 2003, 98(7):1504-1513.
- [22] SIPAHI I, DEBANNE SM, ROWLAND DY, et al. Angiotensin-receptor blockade and risk of cancer: meta-analysis of randomised controlled trials [J]. *The Lancet Oncology*, 2010, 11(7):627-636.

(收稿日期: 2021-11-23; 修回日期: 2022-01-29)

recovery rate was in the range of 92.06% – 108.14%, and the *RSD* was lower than 5.00% ($n = 15$). After the serum quality control samples were placed in the dark at room temperature for 1 h and 24 h and frozen at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 1 d and 14 d, the content of paliperidone, ziprasidone, quetiapine and amisulpride was in the range of 85% – 115%, and the *RSDs* were all less than 15% ($n = 15$). The *RSDs* of matrix effects were all less than 15% ($n = 9$). **Conclusion** The established method can simultaneously determine the mass concentration of paliperidone, ziprasidone, quetiapine and amisulpride in human serum samples, which is simple, fast, sensitive and specific and can be used for the therapeutic drug monitoring of blood concentration.

Key words: HPLC – MS / MS; paliperidone; ziprasidone; quetiapine; amisulpride; acetonitrile protein – precipitation method; blood concentration; therapeutic drug monitoring

精神科常用治疗药物的疗效和药品不良反应与其血药浓度相关,治疗药物监测(TDM)是精神科药物治疗学的重要参考^[1]。帕利哌酮、齐拉西酮、喹硫平和氨磺必利若使用不当会产生毒副作用^[1-2],神经精神药理学与药物精神病学协会(AGNP)推荐临床使用上述4种药物时应进行TDM。目前,血药浓度的一般监测方法包括高效液相色谱法、气相色谱法、微生物法,但主要用于抗菌药物^[3]。参考文献[4-5],本研究中建立了同时检测人血清中帕利哌酮、齐拉西酮、喹硫平和氨磺必利质量浓度的高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)法。现报道如下。

1 仪器、试药与空白血清

1.1 仪器

HPLC-MS/MS-8040型岛津液相色谱三重四极杆质谱联用仪(日本Shimadzu公司),包括DGU-20A3R型自动脱气机,LC-20AD型二元高压泵,SIL-20AHT-UFLC型自动进样器,CTO-20A型可调柱温箱;XW-80 A型旋涡混合器(上海医大仪器有限公司);B2T5S型分析天平(德国Sartorius公司,精度为十万分之一);帕恩特XYB-H型普通分析级纯水机(北京湘顺源科技有限公司);5424R型低温高速离心机(德国Eppendorf公司)。

1.2 试药

齐拉西酮对照品(批号为200601,纯度为100%),喹硫平对照品(批号为201904,纯度为99.6%),氨磺必利对照品(批号为200701,纯度为99.9%),均购自中国食品药品检定研究院;帕利哌酮对照品(批号为14-XJZ102-1,纯度为99%),内标帕利哌酮-D4(批号为4-LHQ-44-1,纯度为96%),内标齐拉西酮-D8(批号为3-PSB-24-1,纯度为99%),内标喹硫平-D8(批号为1-AMA-53-2,纯度为99.7%),内标氨磺必利-D5(批号为2-AMC-124-4,纯度为99%),均购自加拿大Toronto Research Chemicals公司;甲醇(色谱纯,德国Sigma Aldrich公司,批号为11164207131)。

1.3 空白血清

来源于本院职工的体检血液,离心,获得血清,于

$-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

2 方法与结果

2.1 色谱与质谱条件

2.1.1 色谱条件

色谱柱:Kinetex XB-C₁₈柱(50 mm×3.0 mm,2.6 μm);流动相:0.01%甲酸-水-乙腈(50:37.5:12.5,V/V/V);流速:0.4 mL/min;柱温:45℃;进样量:5 μL;运行时间:4.5 min。

2.1.2 质谱条件

电离源:电喷雾电离(ESI)正离子模式;加热模块温度:450℃;脱溶剂管温度:200℃;喷气压力:230 kPa;流速:20.0 L/min;使用多反应监测模式扫描,帕利哌酮质荷比(m/z)427.20→207.15、内标帕利哌酮-D4 m/z 431.20→211.15,齐拉西酮 m/z 413.10→194.00、内标齐拉西酮-D8 m/z 421.20→159.10,喹硫平 m/z 384.20→253.00、内标喹硫平-D8 m/z 392.20→258.05,氨磺必利 m/z 370.2→242、内标氨磺必利-D5 m/z 375.20→242.05,碰撞能量分别为40,26,31,50,40,22,45,24 eV;裂解电压:135 eV。

2.2 溶液制备

对照品工作液:取帕利哌酮、齐拉西酮、喹硫平和氨磺必利对照品各适量,用20%甲醇溶解,分别配成质量浓度为1.00 mg/L的对照品贮备液,于2~8℃冰箱保存,备用。临用时,按需求照比例用20%甲醇稀释各对照品贮备液,按对应质量浓度混合,制成对照品工作液。

内标工作液:取帕利哌酮-D4、齐拉西酮-D8、喹硫平-D8和氨磺必利-D5各适量,用20%甲醇溶解,分别配成质量浓度为1.00 mg/L的内标贮备液。临用时,用20%甲醇稀释至所需质量浓度,混合成内标工作液。

标准曲线溶液与质控样品溶液:制备标准曲线溶液时,取空白血清95 μL,加入对照品工作液5 μL,涡旋混匀30 s,分装成每管100 μL,加入对应量的对照品工作液,制成含药血清标准曲线溶液,其中帕利哌酮质量浓度分别为5,10,25,50,100,250,500,1 000 ng/mL,齐拉西酮分别为10,20,50,100,200,500,1 000,2 000 ng/mL,喹硫平

分别为10,20,50,100,200,500,1 000,2 000 ng / mL,氨磺必利分别为10,20,50,100,200,500,1 000,2 000 ng / mL。低、中、高3个水平的血清质控样品溶液中,帕利哌酮质量浓度分别为100,500,800 ng / mL,齐拉西酮分别为200,1 000,1 600 ng / mL,喹硫平分别为200,1 000,1 600 ng / mL,氨磺必利分别为200,1 000,1 600 ng / mL。

2.3 乙腈蛋白沉淀法处理目标检测样本

取空白血清50 μ L,置1.5 mL离心管中,加入内标工作液50 μ L(利培酮-D4、帕利哌酮-D4、齐拉西酮-D8、氨磺必利-D5质量浓度分别为200,200,500,500 ng / mL),充分混匀,加入乙腈450 μ L,涡旋混匀5 min,4 $^{\circ}$ C条件下离心(转速为15 000 r / min)5 min,取100 μ L上清液,置专用带内插管的进样瓶中分析。

2.4 方法学考察

专属性试验:取空白血清100 μ L,共4份,分别不加分析物和内标、加内标、加分析物、加分析物和内标,按普通样本试验流程操作。结果帕利哌酮和帕利哌酮-D4、齐拉西酮和齐拉西酮-D8、喹硫平和喹硫平-D8、氨磺必利和氨磺必利-D5的保留时间分别为2.416,2.407,2.435,2.395 min。离子色谱图见图1。可见,各样品单峰明确,峰面积能进行有效计算,出峰时间差异显著;血清中基质对分析物和内标干扰不明显,目标专属

性测定信号清晰稳健,信噪比高。

线性关系考察与定量下限确定:按2.2项下方法制备含有4种药物的血清标准曲线溶液,按2.1项下测定条件测定。以质量浓度(X)为横坐标、峰面积与内标峰面积的比值(Y)为纵坐标,采用加权($1/X^2$)最小二乘法进行回归拟合。结果见表1。结果表明,该方法可有效检测目标药物的血药浓度,且可准确定量。

表1 线性关系考察与定量下限确定结果

Tab.1 Results of the linear relation test and LLOQ				
待测成分	回归方程	R^2	线性范围(ng / mL)	定量下限(ng / mL)
帕利哌酮	$Y=0.0273X-0.078$	0.9973	5.00~1 000.00	5.00
齐拉西酮	$Y=0.0600X-0.0625$	0.9956	10.00~2 000.00	10.00
喹硫平	$Y=0.0322X-0.4729$	0.9971	10.00~2 000.00	10.00
氨磺必利	$Y=0.0128X-0.0145$	0.9945	10.00~2 000.00	10.00

精密度试验与回收试验:按2.2项下方法分别制备各分析物覆盖线性范围的低、中、高水平的血清质控样品溶液,按2.1项下测定条件进样检测,同一批、同一天内低、中、高水平样本连续分别独立测试5次,检测3 d后共获得60个测试数据;空白血清中加入不同质量浓度的对照品工作液后,制备低、中、高水平的样本,每组每个水平5份样品,计算提取回收率(计算方法为质控样品中待测物或内标的响应信号与空白样品提取液中

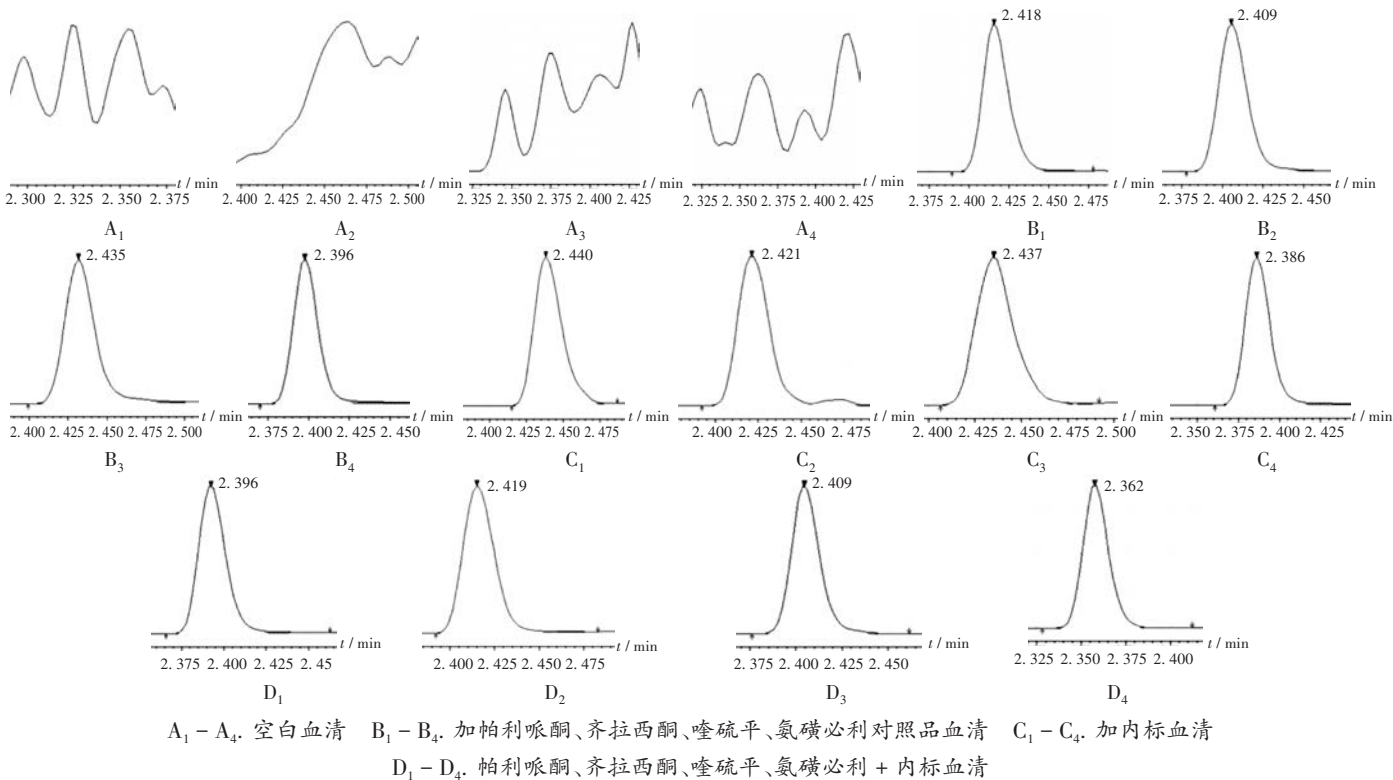


图1 人血清中4种精神科药物多反应监测模式下离子色谱图

A₁ - A₄. Blank serum B₁ - B₄. Reference serum supplemented with paliperidone, ziprasidone, quetiapine and amisulpride C₁ - C₄. Serum supplemented with internal standards D₁ - D₄. Paliperidone, ziprasidone, quetiapine, amisulpride + internal standard serum

Fig.1 Ion chromatograms of four kinds of psychiatric drugs in human serum under MRM mode

待测物或内标的响应信号的比值)。结果各待测物的回收率为92.06%~108.14%,日内及日间精密度试验的RSD均低于15%。详见表2。

表2 精密度试验与回收试验结果($n = 15$)

Tab. 2 Results of the precision test and the recovery test($n = 15$)

待测成分	质量浓度 (ng/mL)	批内精密度		批间精密度		提取回收率(%)	
		$\bar{X}$ (ng/mL)	RSD(%)	$\bar{X}$ (ng/mL)	RSD(%)	$\bar{X}$	RSD
帕利哌酮	100	97.68	2.16	94.25	4.11	92.06	3.77
	500	467.05	3.33	474.24	4.42	95.17	3.16
	800	856.23	2.75	828.90	4.21	102.29	3.54
齐拉西酮	200	188.48	4.92	197.66	9.90	104.19	3.20
	1 000	1 070.25	9.30	1 015.70	7.87	99.75	4.27
	1 600	1 652.33	4.57	1 635.37	3.64	101.43	2.74
喹硫平	200	188.41	10.04	202.13	7.11	101.59	4.34
	1 000	979.48	2.87	1 010.39	4.22	102.37	4.04
	1 600	1 696.19	2.17	1 725.14	2.34	108.14	2.63
氨磺必利	200	195.36	1.78	195.43	2.07	97.92	1.93
	1 000	997.52	1.98	969.04	6.17	100.20	3.71
	1 600	1 752.31	1.72	1 720.01	3.36	104.88	1.65

稳定性试验:取2.2项下对照品贮备液及精密试验项下低水平的各待测物血清质控样品溶液,各3份,分别于常温避光条件下放置1 h和24 h,以及-20℃条件下保存1 d和14 d,同时考察质控样品溶液分别于-20℃、-70℃条件下放置1次、3次和5次反复冻融的稳定性。结果上述条件下的含量均在85%~115%,RSD均小于15%($n = 15$),表明血清质控样品溶液放置稳定性和反复冻融稳定性均良好。

2.5 基质效应

取6份不同来源的空白血清,按2.3项下方法处理,各制备9个空白血清样品,共3组,每组3个,分别加入低、中、高水平对照品工作液5 μL和内标工作液20 μL,涡旋振荡5 s,离心(转速为14 650 r/min)5 min。取上清液100 μL,进样,获得MA。另取95 μL去离子水3份,各加入低、中、高水平对照品工作液5 μL、内标工作液20 μL和乙腈0.5 mL,涡旋5 s,取混合液100 μL进样,获得MB。基质效应(%) = $MA / MB \times 100\%$ 。按色谱峰峰面积计算帕利哌酮、齐拉西酮、喹硫平和氨磺必利的含量,其RSD均小于15%($n = 9$),目标待测物在对照品溶液中的质谱响应无差异,不影响目标待测物的准确定量,表明方法稳健性良好。

3 讨论

本研究中建立了测定帕利哌酮、齐拉西酮、喹硫平和氨磺必利血清质量浓度的HPLC-MS/MS法,可完全满足精神类药物血药浓度监测的效率^[6-7]。采用乙腈

蛋白沉淀法对人血清样本进行前处理,浓度梯度试验及标准曲线拟合分析进行定量测定,并参考2015年版《中国药典(四部)》通则中“生物样品定量分析方法验证指导原则”^[6]对该方法进行验证。结果基质因子的变异系数小于15%,说明空白基质的干扰小。处理后的样品在常温避光条件下放置1 h和24 h、-20℃条件下保存1 d及14 d分析测试结果稳定;帕利哌酮在5.00~1 000.00 ng/mL,齐拉西酮、喹硫平、氨磺必利在10.00~2 000.00 ng/mL范围内均有良好的线性关系, R^2 均大于0.990 0,说明该方法的准确度高、精密度好。

样本经过有机溶剂沉淀蛋白后即可进行分析,前处理方法简单,可实现大量临床样本的快速分析^[7]。相较于液液萃取法和固相萃取法,不但提高了灵敏度,且有利于改善结果可视化的峰形特征。以同位素化合物为内标,可简化色谱行为,确保质谱行为一致,有效降低溶血、高脂血及高胆红素血样等特殊血样对检测结果的影响^[8]。目前,国内市场仍无可用来检测这些药物血药浓度的试剂盒,故需通过实验室自建方法来完成。未来可设计出快速对帕利哌酮、齐拉西酮、喹硫平和氨磺必利进行高通量定量分析的试剂盒,以提高临床检测效率和检测质量,满足血药浓度监测的要求。

参考文献

[1] HIEMKE C, BAUMANN P, BERGEMANN N, 等. AGNP 精神科治疗药物监测共识指南:2011[J]. 实用药物与临床, 2016,19(10):1193-1218.

[2] 徐琛,唐磊,蒋惠娣. LC-MS/MS法快速测定全血中25种精神药物的研究[J]. 中国法医学杂志,2017,32(1):16-20.

[3] 倪晓佳,王占璋,卢浩扬,等. HPLC-MS/MS法同时测定人血清中利培酮与帕利哌酮及奥氮平和喹硫平的浓度[J]. 中国临床药理学杂志,2018,34(1):53-56.

[4] 李琰,瞿发林,陈颖,等. HPLC法测定人血清中甲磺酸齐拉西酮浓度[J]. 中国临床药理学杂志,2019,28,(1):44-46.

[5] PATTEET L, MAUDENS KE, SABBE B, et al. High throughput identification and quantification of 16 antipsychotics and 8 major metabolites in serum using ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. Clinica Chimica Acta,2014,429:51-58.

[6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:363-367.

[7] 魏刚. 蛋白沉淀-高效液相色谱法用于15种常见精神类用药的血浆浓度分析[J]. 中国医院药学杂志,2011,31(15):1254-1257.

[8] 黄文灿,倪晓佳,卢浩扬,等. LC-MS/MS法同时检测人血浆中奥氮平与拉莫三嗪浓度[J]. 中国临床药理学杂志,2016,25(5):278-282.

(收稿日期:2021-07-12;修回日期:2021-11-19)