

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2021.21.004

LC-MS/MS 法和 HPLC 法检测人血清中利培酮和九羟利培酮血药浓度的对比研究*

邓顺顺,梁国朝,高永双[△]

广东省中山市第三人民医院检验科,广东中山 528400

摘要:目的 验证液质联用质谱(LC-MS/MS)法和高效液相色谱(HPLC)法检测人血清中利培酮和九羟利培酮血药浓度结果的可靠性,并分析两种方法检测结果的差异性。方法 对实验室目前在用的 LC-MS/MS 法和 HPLC 法检测人血清中利培酮和九羟利培酮血药浓度的方法学进行验证,合格后再分别对该院住院患者的 60 份血清标本进行相关检测。采用配对 *t* 检验、Pearson 相关分析、散点图和 Bland-Altman 偏差图对其检测结果的相关性及差异进行评价。结果 LC-MS/MS 法和 HPLC 法的方法学验证均符合要求,检测结果呈正相关;LC-MS/MS 法和 HPLC 法检测利培酮和九羟利培酮结果比较,差异有统计学意义($P<0.05$);LC-MS/MS 法检测利培酮与九羟利培酮的结果分别比 HPLC 法检测结果高 1.97 和 1.38 ng/mL,95% 置信区间分别为 -5.81~9.74、-10.28~11.66。结论 LC-MS/MS 法和 HPLC 法可同时运用于日常检测人血清中利培酮和九羟利培酮血药浓度,检测结果可靠但存在差异,如果是需要长期监测的患者建议一直选用同一种方法检测。

关键词:利培酮; 九羟利培酮; 液质联用质谱; 高效液相色谱
中图法分类号:R446.11 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2021)21-3086-04

Comparative study on the determination of risperidone and nine hydroxyrisperidone in human serum by LC-MS/MS and HPLC*

DENG Shunshun, LIANG Guochao, GAO Yongshuang[△]

Department of Clinical Laboratory, the Third People's Hospital of
Zhongshan City, Zhongshan, Guangdong, 528400, China

Abstract: **Objective** To verify the reliability of liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) and high performance liquid chromatography (HPLC) for the determination of risperidone and nine hydroxyrisperidone in human serum, and to analyze the difference between the two methods. **Methods** The methods of LC-MS/MS and HPLC for the determination of risperidone and nine hydroxyrisperidone in human serum were verified. After passed the test, 60 serum samples of inpatients in the hospital were tested. Paired *t*-test, Pearson correlation analysis, scatter plot and Bland-Altman deviation plot were used to evaluate the correlation and difference of the test results. **Results** The methodological verification of LC-MS/MS method and HPLC method met the requirements, and the detection results were positively correlated; the difference between the detection results of LC-MS/MS method and HPLC method was statistically significant ($P<0.05$). The results of LC-MS/MS detection of risperidone and nine hydroxyrisperidone were 1.97 and 1.38 ng/mL higher than the HPLC detection results, respectively, and the 95% confidence intervals were -5.81—9.74, -10.28—11.66, respectively. **Conclusion** LC-MS/MS method and HPLC method can be used to detect the plasma concentrations of risperidone and nine hydroxyrisperidone in human serum at the same time. The detection results are reliable, but the results are different. If patients need long-term monitoring, it is recommended to always use the same method.

Key words: risperidone; nine hydroxyrisperidone; liquid chromatography-mass spectrometry; high performance liquid chromatography

* 基金项目: 广东省中山市社会公益科技研究项目(2019B1081)。
作者简介: 邓顺顺, 女, 副主任技师, 主要从事治疗药物监测相关研究。 [△] 通信作者, E-mail: 409632800@qq.com。
本文引用格式: 邓顺顺, 梁国朝, 高永双. LC-MS/MS 法和 HPLC 法检测人血清中利培酮和九羟利培酮血药浓度的对比研究[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(21): 3086-3089.

血药浓度受患者基因多态性、并发疾病、肝肾功能改变、药物剂型、药物相互作用及高蛋白饮食等众多因素的影响,从而使得常规用药可能导致不同患者出现不同的临床疗效^[1]。治疗药物监测是针对不同患者个体,针对性制订给药方案的一种有效方法^[2]。非典型抗精神病药物利培酮是目前临床广泛使用的一线治疗药物,化学结构属于苯并异噁唑类衍生物,是 5-羟色胺的选择性拮抗剂和多巴胺 D2 受体^[3-5]。对于首发精神分裂症患者仍多选择药物治疗,其中氯氮平、利培酮、阿立哌唑均是比较常见的药物^[6]。精神分裂症的患者需要长期使用药物维持治疗,以减轻精神症状,控制疾病发作^[7]。抗精神病药物引起的血糖、血脂代谢紊乱,是心脑血管疾病、糖尿病等多种疾病潜在的生物学危险因素^[8]。利培酮在肝脏经 9-羟基化、N-去甲基化等途径代谢,主要代谢产物为九羟基利培酮,与利培酮具有相同的活性^[9]。九羟基利培酮血浆消除半衰期较长,对服用利培酮的患者进行治疗药物监测时,需要同时检测利培酮和九羟基利培酮。因此,同时检测利培酮与九羟基利培酮能准确反映疗效和不良反应发生率^[10]。

本研究对本实验室同时开展的液质联用质谱(LC-MS/MS)法和高效液相色谱(HPLC)法检测利培酮和九羟基利培酮血药浓度进行性能验证,在验证合格的基础上进一步对比 LC-MS/MS 和 HPLC 两种方法的检测结果,以观察结果的差异性,确定实验室检测方案。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 岛津 LCMS-8040 三重四级杆液质联用质谱仪,Agilent-1200 高效液相色谱分析仪,Eppendorf-5424R 台式低温高速离心机,Eppendorf 移液枪,上海安亭低速离心机,上海医大涡旋混合器,帕恩特-XYB-H 普通分析级纯水机,昆山 KQ-300DV 超声波清洗器,德国塞多利斯 BT25S 十万分之一分析天平,常熟百灵 LP1002 型 1/100 电子天平,中科美菱 DW-HL218 超低温冰箱。LC-MS/MS 法检测试剂:水相、有机相、内标母液、稀释剂 1、标准曲线试剂均购自深圳品生公司。HPLC 法检测试剂:利培酮购自西安杨森制药有限公司,9-羟基利培酮、曲唑酮购自美国 SIGMA 公司,甲醇、乙腈(色谱纯)购自德国默克公司,水为去离子水。

1.2 方法

1.2.1 血液标本处理 静脉血 5 mL 室温凝固后以 4 000 r/min 离心 5 min,分离出的上清液为血清标本,进行第一次检测之后,将剩余的血清标本吸取约 1.5 mL 保存到小型离心管中,-20 ℃ 冰箱保存。将冻存于-20 ℃ 冰箱的标本拿出,放置于室温,复融后开始检测,每个标本只复融一次,避免反复冻融可能影响检测结果。

1.2.2 色谱与质谱条件 LC-MS/MS 法:预柱

(Phenomenex, Security Guard Ultra Cartridges, AJ0-8775),色谱柱(Phenomenex, Kinetex XB-C18, 2.6 μm, 3 mm×50 mm);二元高压梯度洗脱,流速为 0.4 mL/min;柱温 45 ℃;进样量 5 μL,采用电喷雾电离化(ESI),正离子模式,加热模块温度为 450 ℃,脱溶剂管温度 200 ℃,喷气压力为 230 kPa,流速 20.0 L/min;采用多反应监测模式扫描。HPLC 法:色谱柱为 Eclipse Plus C18 柱(150.0 mm×4.6 mm, 3.5 μm, 美国 Agilent),流动相(甲醇:乙腈:水为 1.5:1.7:6.2);每 100 mL 流动相中加入 0.85 mL 正丁胺,0.85 mL 冰乙酸;流速为 1.0 mL/min。

1.2.3 稳定性试验 用质控血清标本(低、中、高 3 个浓度)各 3 份,检测其在-20 ℃ 保存 1、14、31 d 的稳定性。

1.2.4 批内精密度 在同一天内,使用低、中、高 3 个浓度的标本分别进行 5 次独立测试。

1.2.5 批间精密度 使用低、中、高 3 个浓度标本,每天分别进行 5 次独立测试,检测 3 d,共获得 45 个测试数据。

1.2.6 线性范围验证试验 配制 8 个已知浓度的标准品,在 1 个分析批内,对每个浓度点重复检测 2 次,进行线性回归分析,评价峰面积比值与浓度之间的线性关系,并计算检测浓度与已知浓度的偏差。

1.2.7 提取回收率试验 在空白血清标本中加入不同体积标准溶液(标准溶液体积应少于总体积的 10%),制备 3 个浓度的标本(标本终浓度在测量区间内)。每个标本重复检测 3 次计算均值浓度、回收率。

1.2.8 比对试验 用 LC-MS/MS 法和 HPLC 法检测同一例患者血清标本,并对检测结果进行比较分析。分段收取本院住院患者常规检测利培酮和九羟基利培酮血药浓度标本共 60 份。每份标本当天检测一次并发放报告,将剩余血清吸出,置于 1.5 mL 小型离心管中,保存在-20 ℃ 冰箱中,30 d 内用另一种方法检测,对两种方法检测出的相同标本的结果进行比较分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS20.0 统计软件对数据进行统计处理和分析。采用 Shapiro-Wilk 法进行正态性检验,呈正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两种方法检测结果的比较采用配对 *t* 检验;采用 Pearson 相关进行相关性分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。同时,绘制 LC-MS/MS 法和 HPLC 法检测结果的散点图和 Bland-Altman 偏差图^[11]。

2 结果

2.1 性能试验验证结果 质控品在-20 ℃ 保存 1、14、31 d 的条件下,相对标准偏差均 $< 15\%$,结果稳定。

LC-MS/MS 法:利培酮低、中、高浓度(20、100、160 ng/mL)血清标本的提取回收率分别为 105.72%、102.06%、101.27%;九羟基利培酮低、中、高

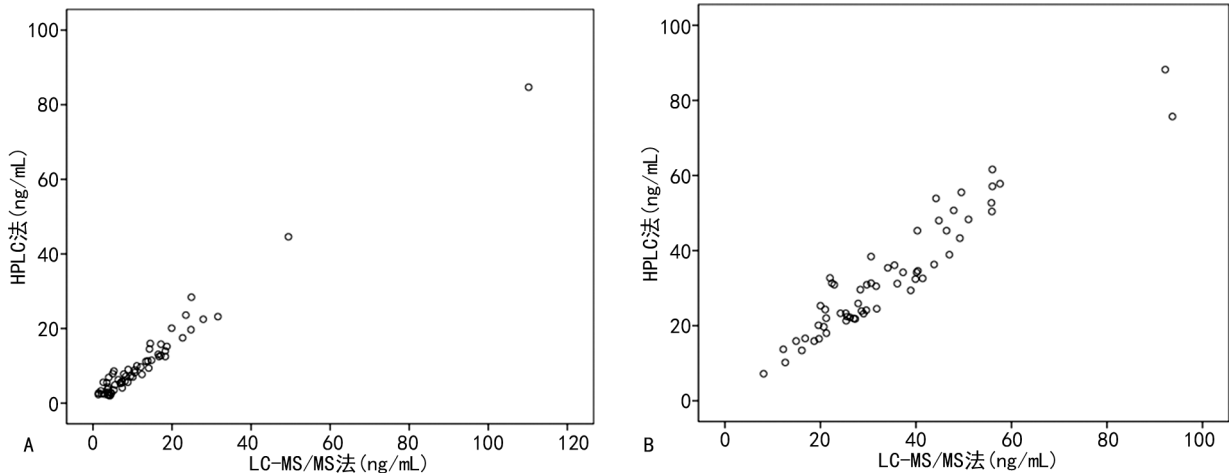
浓度(100、500、800 ng/mL)血清标本的提取回收率分别为 92.06%、95.17%、102.29%。利培酮的线性范围为 1.07~203.23 ng/mL,九羟利培酮的线性范围为 5.60~1 033.34 ng/mL,最大允许偏差均<15%, r^2 均 ≥ 0.99 。

HPLC 法:利培酮低、中、高浓度(4、16、48 ng/mL)血清标本的提取回收率分别为 110.0%、91.9%、107.5%;九羟利培酮低、中、高浓度(10、40、120 ng/mL)血清标本的提取回收率分别为 90.0%、104.0%、110.3%。利培酮的线性范围为 2.52~57.65 ng/mL,九羟利培酮的线性范围为 5.39~141.23 ng/mL, r^2 均 ≥ 0.99 。

两种方法的批内、批间变异系数均<15%,精密 度良好。性能验证试验均通过。

2.2 利培酮/九羟利培酮 HPLC 法与 LC-MS/MS 法 检测结果比较 Shapiro-Wilk 法显示 LC-MS/MS 法 与 HPLC 法检测结果均呈正态分布。Pearson 相 关分析结果显示利培酮 HPLC 法与 LC-MS/MS 法 结果呈正相关($r=0.984, P<0.05$),九羟利培酮 HPLC 法与 LC-MS/MS 法结果也呈正相关($r=0.949, P<0.05$)。检测结果比较见表 1。以 LC-MS/MS 法检测 结果为横坐标,HPLC 法检测结果为纵坐标分别绘 制的散点图见图 1。

表 1 利培酮/九羟利培酮 HPLC 法与 LC-MS/MS 法 检测结果比较($\bar{x}\pm s$, ng/mL)				
项目	HPLC 法	LC-MS/MS 法	<i>t</i>	<i>P</i>
利培酮	10.94 $\pm$ 2.39	12.90 $\pm$ 5.52	-3.837	<0.001
九羟利培酮	33.02 $\pm$ 5.90	34.40 $\pm$ 6.69	-2.036	0.046



注:A 为检测利培酮结果的散点图;B 为检测九羟利培酮结果的散点图。

图 1 检测利培酮与九羟利培酮结果的散点图

2.3 利培酮/九羟利培酮 HPLC 法与 LC-MS/MS 法 检测结果的偏差图 根据 Bland-Altman 偏差图可以 得知,LC-MS/MS 法检测利培酮与九羟利培酮的结果 分别比 HPLC 法检测结果高 1.97 ng/mL 和 1.38 ng/mL,95% 置信区间分别为 -5.81~9.74、 -10.28~11.66,见图 2、3。

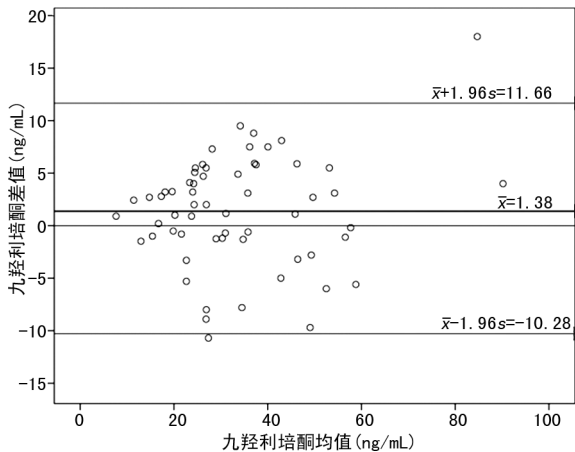


图 2 LC-MS/MS 法和 HPLC 法检测患者九羟利培酮浓度 结果的 Bland-Altman 偏差图

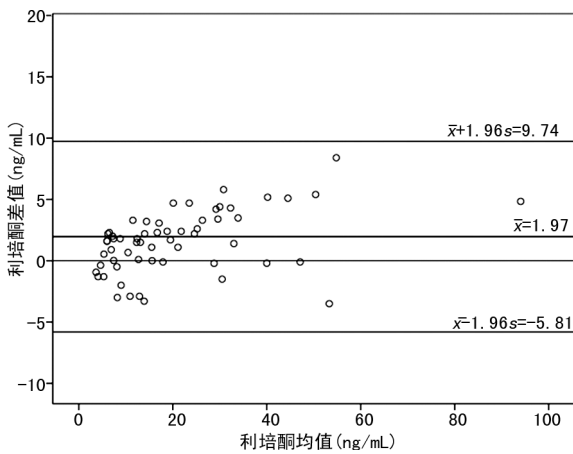


图 3 LC-MS/MS 法和 HPLC 法检测患者利培酮浓度 结果的 Bland-Altman 偏差图

3 讨 论

本研究 LC-MS/MS 法采用的是品生公司提供的 操作方法和试剂,HPLC 法采用的是自配试剂,两种 方法检测利培酮与九羟利培酮均采用同位素内标法, 通过测量内标物及被测组分的峰面积相对值来进行

结果计算,经验证两种方法均能很好地应用于利培酮和九羟利培酮血药浓度的检测中。HPLC 由储液罐、高压输液泵、进样装置、色谱柱、检测器、记录仪和数据处理系统组成^[12]。LC-MS/MS 法是将 HPLC 与质谱分别作为分离系统和检测系统,待测试样在 HPLC 部分经过分离后,进入质谱部分,标本与流动相分离后,经离子源对标本进行离子化,按离子的质荷比分离,然后测量各种离子谱峰的强度,从而实现分析目的的一种分析方法^[13]。所以 LC-MS/MS 法是集 HPLC 法的高分离效能与质谱的高鉴定性能于一体,灵敏度较传统的 HPLC 法高 3~4 个数量级,对研究对象有足够的灵敏度、选择性,能分析更多的物质,分析能力更好。

近几年,LC-MS/MS 法不断发展,由于其具有高效的色谱分离和专属特异的质谱检测等优势而被广泛应用于生物标本的分析^[14]。随着色谱分析技术越来越多地运用于临床检测当中,实验室类似设备越来越多,根据需求会开展不同或者同一项目,比对分析已经成为日常检测质量控制中的重要一环。依据《全国临床检验操作规程》要求实验室内采用不同方法或仪器检验的同一项目,应进行一致性比较,定期实施比对(至少每年一次)及时解决比对试验中出现的问题,并保留记录^[15]。LC-MS/MS 检测设备灵敏度和特异度均高于 HPLC 检测设备,运用前景良好,但设备价格昂贵,对于检测量不高的项目很多还是需要用到价格相对便宜的 HPLC 设备进行检测。实验室制订好规章制度,按要求做好比对试验,做好详细记录,在性能验证和比对验证合格之后,若一台设备出现故障维修或需要维修保养期间,可以及时启用另一台设备开展相关检测,充分提高设备检测利用率,提高检测时效。两种方法均可用于日常检测,但两者检测结果存在差异,如果是需要长期监测的患者建议一直选用同一种方法检测。

参考文献

- [1] 周金玉,王奎兴,孙增先.影响丙戊酸钠血药浓度波动的因素及应对措施[J].中国药房,2003,14(6):353-354.
- [2] 李文标,果伟,阮灿军,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.
- [3] GRUNDMANN M,KACIROVA I,URINOVSKA R. Therapeutic drug monitoring of atypical antipsychotic drugs[J]. Acta Pharm,2014,64(4):387-401.
- [4] BAIMEEVA N V,MIROSHNICHENKO I I. Analytical methods for the determination of atypical neuroleptics[J]. Pharm Chem J,2016,50(6):339-345.
- [5] LOGARINHO F,ROSADO T,LOURENÇO C,et al. Determination of antipsychotic drugs in hospital and waste water treatment plant samples by gas chromatography/tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci,2016,232(16):31112-31116.
- [6] 田明.阿立哌唑与利培酮治疗精神分裂症患者的有效性及安全性比较[J].医疗装备,2018,31(18):126-127.
- [7] 刘群,张琦.氯氮平联合阿立哌唑、利培酮对首发精神分裂症患者疗效、血清心肌酶谱、IL-13 及 TNF- α 的影响[J].检验医学与临床,2019,16(19):2844-2847.
- [8] 张蓓蓓,邓露,陈晋东,等.抗精神病药对精神分裂症患者骨转换生化指标的影响[J].中国骨质疏松杂志,2016,22(8):1026-1030.
- [9] NAGASAKI T,OHKUBO T,SUGAWARA K,et al. Determination of risperidone and 9-hydroxyrisperidone in human plasma by high-performance liquid chromatography: application to therapeutic drug monitoring in Japanese patients with schizophrenia[J]. J Pharm Biomed Anal,1999,19(3/4):595-601.
- [10] 陈秋莹,诸佩超,王豪. HPLC-电化学法在血清利培酮及 9-羟利培酮检测中的应用[J].检验医学,2019,34(9):844-847.
- [11] 闻浩,刘玉秀,于浩.医疗设备 Bland-Altman 一致性分析中文报告的系统评价[J].医学研究生学报,2020,33(11):1191-1197.
- [12] 刘珍.化验员读本[M].北京:化学工业出版社,2016:32-34.
- [13] 张燕,何祥,江海波,等.高效液相色谱与液质联用技术在有机化工生产中的应用[J].2020,46(10):142-143.
- [14] 时海浪,王海东,宋兴发. LC-MS/MS 法和 EMIT 法测定人血清中丙戊酸浓度的对比研究[J].中国药房,2017,28(7):1049-1052.
- [15] 尚红,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[M].4 版.北京:人民卫生出版社,2014:1024-1026.

(收稿日期:2021-01-18 修回日期:2021-06-21)