

在临床研究中快速分析血浆中的氯氮平和去甲氯氮平

Heather A. Brown, Stephen Balloch, Samantha Roberts, Gareth Hammond

Waters Corporation

仅供研究使用，不适用于诊断。

摘要

对于大规模药代动力学和群体研究，稳健且高通量的分析方法会有很大帮助。本文将介绍一种适用于临床研究的方法，此方法采用简单、经济的制备技术，所需样品相对较少。完成制备之后采用液相色谱-串联质谱法定量分析氯氮平和去甲氯氮平。

优势

- 分析运行时间短（每个样品72秒）且通量高
 - 利用色谱和质谱检测提高分析选择性
 - 制备过程简单、经济，仅使用少量的样品
-

简介

对于大规模药代动力学和群体研究，稳健且高通量的分析方法很可能会产生很大帮助。

本文将介绍一种适用于临床研究的方法，使用含内标的乙腈溶液沉淀人血浆蛋白质，然后使用液相色谱-串联质谱法定量分析分析氯氮平和去甲氯氮平。

使用Waters™ XBridge™ Premier BEH™ C₁₈色谱柱和ACQUITY UPLC™ I-Class流通针式系统，在42秒内完成色谱洗脱，进样间的间隔为72秒。利用Xevo™ TQ-S micro质谱仪上的多重反应监测(MRM)检测分析物（图1）。



图1.ACQUITY UPLC I-Class系统和Xevo TQ-S micro质谱仪。

实验

样品前处理

使用BioIVT（英国西萨塞克斯郡）提供的合并人血浆制备血浆校准品和质控物质。使用由Toronto Research Chemicals（加拿大安大略省）提供的氯氮平、去甲氯氮平和氘标记氯氮平的认证粉末作为内标制备浓缩储备液。所有分析物的校准浓度范围为50~2000 ng/mL。

样品提取

向微量离心管中的50 μ L样品加入3倍体积的过量内标（²H₄-氯氮平的乙腈溶液）。使用多管涡旋混合器以2000 r.p.m.速度搅动试管1 min，然后在室温下以16200 \times g的离心力离心5 min。取20 μ L上清液转移至2 mL 96孔板中，加入450 μ L 30% (v/v)甲醇水溶液。

UPLC条件

系统:	ACQUITY UPLC I-Class流通针式(FTN)
进样针:	30 μ L
UPLC色谱柱:	XBridge Premier BEH C ₁₈ UPLC, 2.5 μ m颗粒, 2.1 \times 50 mm内径 (P/N: 186009827)
在线色谱柱过滤器:	XBridge Premier BEH C ₁₈ UPLC, 2.5 μ m颗粒, 2.1 \times 5 mm VanGuard™ FIT小柱 (P/N: 186009842)
流动相(A):	5 mM甲酸铵溶于0.1% (v/v)甲酸 (水溶液) 中
流动相(B):	5 mM甲酸铵溶于0.1% (v/v)甲酸的80/20 (v/v)甲醇/异丙醇溶液中
洗针液溶剂:	0.1% (v/v)甲酸的1/1/1/1 (v/v)甲醇/乙腈/异丙醇/水溶液
清除溶剂:	30% (v/v) 甲醇 (水溶液)
密封清洗液:	灌注溶剂
柱温:	45 °C
进样体积:	2 μ L

时间 (min)	流动相A%	流动相B%	曲线
0.0	50	50	初始
0.1	50	50	1
0.2	2	98	6
0.7	50	50	11

表1.二元溶剂管理器梯度表。

流速： 0.6 mL/min

运行时间： 0.7 min（进样间隔1.2 min）

MS条件

系统： Xevo TQ-S micro

四极杆分辨率： MS1和MS2为0.7半峰全宽（0.6~0.8为可接受）

采集模式： 多重反应监测(MRM)（参见下表）

方法事件： 转移至MS废液<0.2 min且>0.5 min

极性： 电喷雾正电离

毛细管电压： 3.00 kV

离子源温度： 150 °C

脱溶剂气温度： 600 °C

脱溶剂气流速： 1000 L/h

锥孔气流速： 25 L/h

通道间、扫描间和极性开关延迟时间： 自动

通道 (窗口min)	分析物	母离子 (<i>m/z</i>)	子离子 (<i>m/z</i>)	锥孔电压 (V)	碰撞能量 (eV)	驻留时间 (ms)
1 (0.0-0.7)	去甲氯氮平 (定量离子)	313.1	192.1	46	38	20
	去甲氯氮平 (定性离子)	313.1	270.1	46	24	20
	² H ₆ -去甲氯氮平 (可选)	321.1	193.1	46	38	20
2 (0.0-0.7)	氯氮平 (定量离子)	327.1	270.1	38	20	20
	氯氮平 (定性离子)	327.1	192.1	38	44	20
	² H ₄ -氯氮平	331.1	273.1	38	20	20

表2.多重反应监测离子通道。

数据管理： 带TargetLynx™定量应用软件的MassLynx™ 4.2版

结果与讨论

表3.所开发方法的性能特征总结，显示出优异的不精密度和偏差性能。

	氯氮平	去甲氯氮平
测量区间下限 [†]	12 ng/mL	4.5 ng/mL
线性 [‡]	<4964 ng/mL	<3765 ng/mL
总不精密度 (% CV, n=25)		
低QC (150 ng/mL)	1.8	3.2
中QC (500 ng/mL)	1.5	1.6
中II QC (750 ng/mL)	1.3	1.6
高QC (2000 ng/mL)	1.6	2.1
平均偏差 (偏差%, n=25)		
低QC (150 ng/mL)	4.8	4.0
中QC (500 ng/mL)	1.6	0.3
中II QC (750 ng/mL)	0.7	-0.6
高QC (2000 ng/mL)	-4.2	-3.8

表3.性能汇总。

[†] 可测量最低标准浓度的不精密度 $\leq 20\%$ (相对标准偏差(RSD))，与标准浓度的偏差 $\leq 15\%$ 。

[‡] 在2或3阶多项式中不存在显著项($p < 0.05$)，且 $r^2 \geq 0.997$ 。

在清洗溶剂和流动相中使用高浓度有机溶剂能够确保残留可忽略不计 (<LLMI的25%)，这在按顺序分析空白样品与高浓度样品 (约2倍于最高校准物浓度，每种条件n=10，未显示数据) 时得以证实。

样品稀释、低进样体积和将LC洗脱液导入废液相结合，使氯氮平和去甲氯氮平实现了稳定的色谱分离和定量分析，保留时间与预期保留时间的差异不超过0.36秒，实测浓度差异不超过小于1.2% (RSD) (图2)。

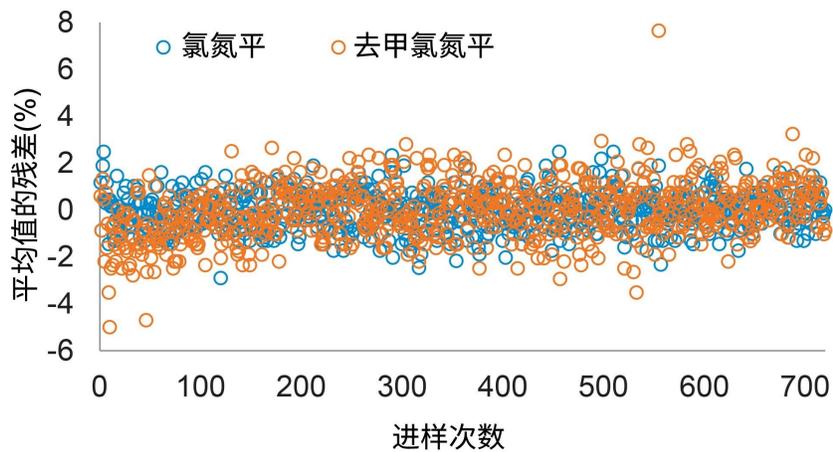
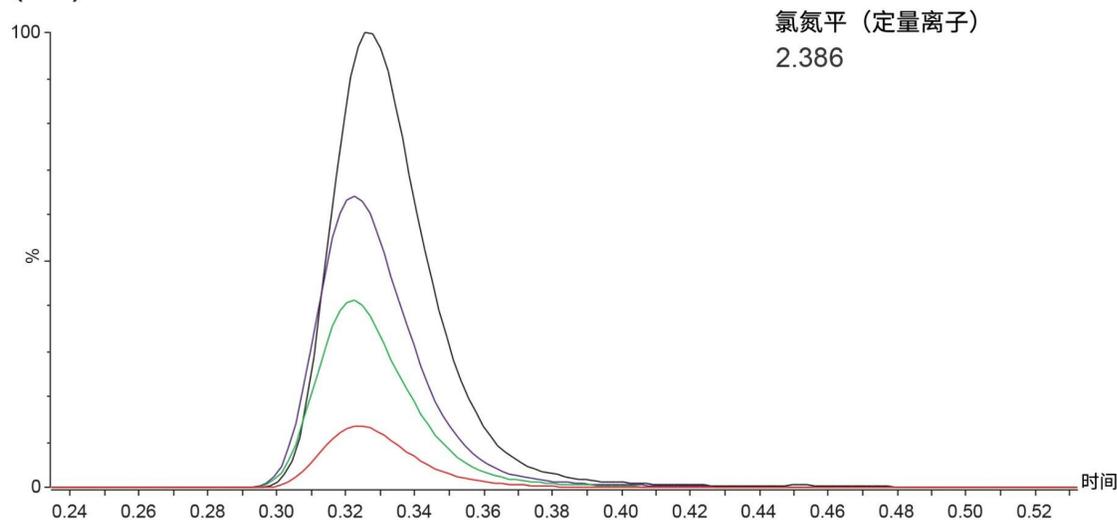


图2.氯氮平和去甲氯氮平连续运行14 h的定量结果表明，检测器可在长时间分析中保持稳定。混合样品中氯氮平的平均浓度和测量不精密度(%RSD)为688 ng/mL (0.8%)，去甲氯氮平为680 ng/mL (1.2%)，n=720。

氯氮平和去甲氯氮平以分级梯度共洗脱（图3），流动溶剂的有机溶剂含量在6 s内增加48%。共洗脱技术为评估使用单一内标物定量分析两种化合物提供了可能性。

(3a)



(3b)

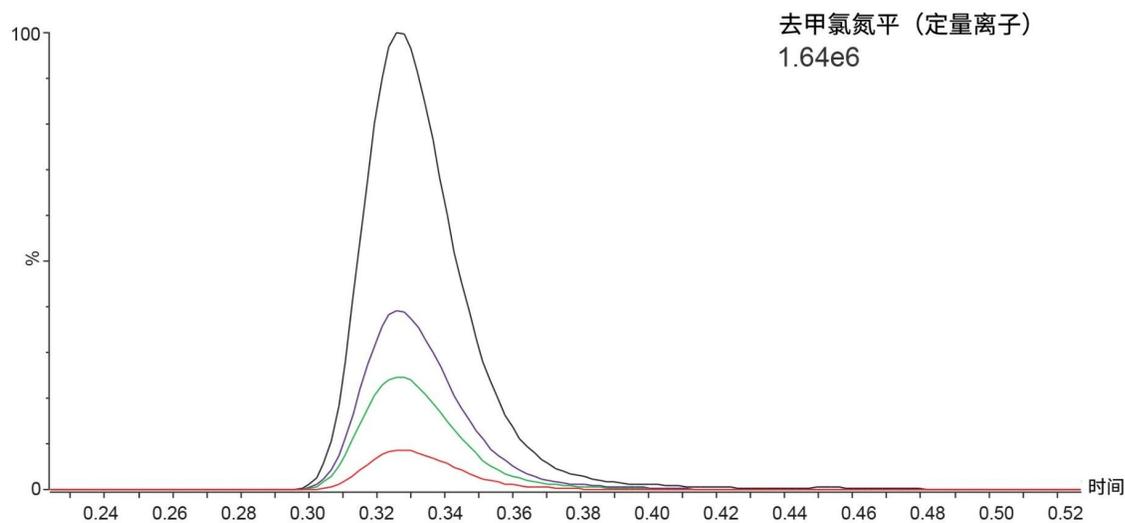


图3.内标质控样品中氯氮平(a)和去甲氯氮平(b)的代表性平滑MRM定量离子对色谱图。目标/标准对照浓度: 150 ng/mL (红色)、500 ng/mL (绿色)、750 ng/mL (紫色)和2000 ng/mL (黑色)。

分析物:从血浆中提取的氯氮平的内标峰面积响应比率为同等浓度溶剂标准品的98.2~101.7% (平均100.3%, n=6), 去甲氯氮平为101.9~105.5% (平均104.1%, n=6)。残留样品基质对响应比率的改变不超过5.5%, 且小于最大容许误差 ($\leq 10\%$ 偏差), 表明 $^2\text{H}_4$ -氯氮平不仅可以用作氯氮平的内标, 也可用作去甲氯氮平定量分析

的替代内标。

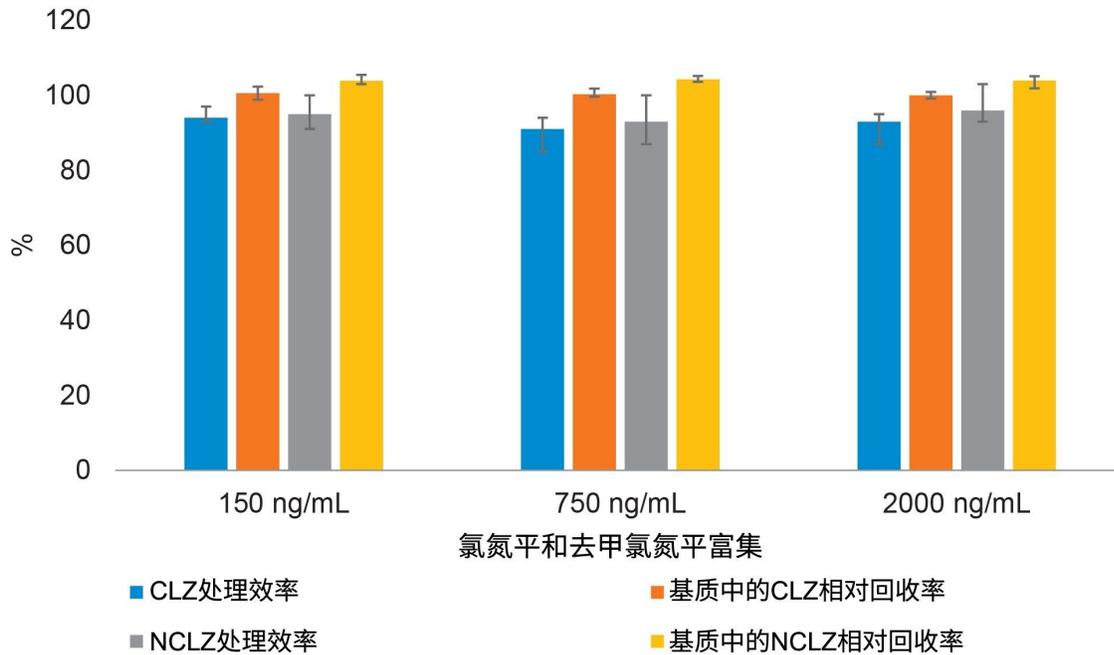


图4.使用来自六名健康成人献血者的血浆样品分析氯氮平和去甲氯氮平的平均处理效率和基质效应，每个浓度重复测定三次。处理效率为萃取前加标样品分析物:内标的峰面积响应，相对于萃取后加标的响应进行归一化。基质中的相对回收率是萃取后加标的样品响应值相对于不含基质的相同浓度溶剂标准品进行归一化得到的结果（误差线表示结果范围）。

LGC Axio EQA样品TM230至TM240（含，n = 11）的分析（氯氮平的浓度范围为118~2210 ng/mL，去甲氯氮平的浓度范围为94~2300 ng/mL）均表现出良好的分析性能。氯氮平和去甲氯氮平的平均（范围）z得分分别为0.48（-0.35~0.97）和0.33（-0.21~0.67），令人满意的方案性能标准为z得分 ≤ 2.00 。Bland-Altman分析显示，对于两种药物，开发的方法与指定值之间的平均差异 $<5\%$ 。

所开发（测试）方法与对比LC-MS方法之间的关系为：测试氯氮平(ng/mL) = $-10.0 + 0.996 \times$ 对比氯氮平(ng/mL)，测试去甲氯氮平(ng/mL) = $-8.5 + 0.996 \times$ 对比去甲氯氮平(ng/mL)，n = 76个样品，氯氮平范围为0~1003 ng/mL，去甲氯氮平范围为0~539 ng/mL。结果未提示两种分析物存在比例偏差，通过Passing-Bablok分析描述氯氮平的斜率（95%置信区间）为0.996（0.977~1.016），去甲氯氮平的斜率为0.996（0.972~1.018）。结果表明，该测试方法测得的氯氮平10 ng/mL（5~18）、去甲氯氮平9 ng/mL（5~13 ng/mL）存在恒定负偏差

(95%置信区间)。此结果可能是由于方法校准和样品不稳定性的差异所致。

MRM离子通道的分析选择性通过检查进样的候选干扰物溶剂标准品的色谱图得以确证。在氯氮平或去甲氯氮平保留时间(0.32 min)附近,使用介绍的LC和MS/MS方法,将以下标准溶液(溶于30% (v/v)甲醇水溶液)进样分析时,未观察到峰或色谱图基线干扰:20 ng/mL阿米替林、氯丙咪嗪、多虑平、丙咪嗪、马普替林、去甲氯丙咪嗪、地昔帕明、去甲多虑平、去甲马普替林、去甲曲米帕明、去甲替林、普罗替林、曲米帕明;25 ng/mL羟基安定、三唑仑、咪达唑仑、奥沙西洋、氯硝西洋、氟西洋、氯氮卓、氯巴占、地西洋和劳拉西洋;100 ng/mL西酞普兰、去甲基氟西汀、度洛西汀、氟西汀、O-去甲基文拉法辛、舍曲林和文拉法辛;50 ng/mL米氮平和300 ng/mL曲唑酮。对去甲氯氮平和氯氮平通道分别使用最大可接受峰面积35和205计数(在测量区间下限的25%处的预期近似峰面积),未观察到干扰峰(数据未显示),表明测试化合物不太可能干扰目标分析物的积分和随后的定量分析。

此外,本文还选择将内源性化合物添加到氯氮平和去甲氯氮平对照样品中,用以评价它们对氯氮平和去甲氯氮平总体回收率的潜在干扰。氯氮平/去甲氯氮平的标准浓度分别为150 ng/mL(低浓度)和2000 ng/mL(高浓度)。存在候选干扰物时,回收率降低不超过5.4%(每组对照n=3)。氯氮平和去甲氯氮平的定量分析不太可能受到所测试内源性化合物(白蛋白、胆固醇、甘油三酯、胆红素、尿酸或肌酐)浓度变化的影响。

结论

本实验开发出一种简单的临床研究方法,能够快速定量分析血浆样品中的氯氮平和去甲氯氮平,并具有优异的分析性能特征。

特色产品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

Xevo TQ-S micro三重四极杆质谱仪 <<https://www.waters.com/134798856>>

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513164>>

MassLynx定量应用程序 <<https://www.waters.com/513791>>

720008286ZH, 2024年3月



© 2024 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私策略](#) [商标](#) [招聘](#) [法律和隐私声明](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie 设置](#)

[沪ICP备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)