

LC-MS/MS 检测人血清中 24 种抗抑郁药物含量

LCMSMS-621

摘要： 本文建立了一种使用岛津液相色谱质谱联用仪测定人血清中 24 种抗抑郁药物的定量分析方法。利用蛋白沉淀的前处理方法，以内标法建立标准曲线，线性范围涵盖临床参考区间，分别考察了方法的线性、准确度和精密度性能。结果显示各分析物线性范围内标准曲线相关系数均大于 0.9958，方法准确度偏差在 -9.43%~11.13% 之间，精密度 RSD 均小于 10.59%，可满足临床日常检验需求。该方法分析速度快，灵敏度高，专属性强，前处理简单，可为相关从业人员提供参考。

关键词： 临床检测 L-CMS/MS 抗抑郁药物

抑郁症是一种独立的情绪障碍性精神疾病，主要表现为情绪低落，对周围事物缺乏兴趣，自我评价呈负面性，长期产生一些不良情绪，甚至轻生行为。

据不完全统计，目前我国抑郁症发病率高达 5%~6%，近年来呈上升趋势，随着抗抑郁症新品种的日益增多，临床治疗的用药难度和复杂性也随之增加，为完善抑郁症规范化治疗，实现用药剂量个体化，神经精神药理学与药物精神病学协会 (AGNP) 的专家强烈推荐在抗抑郁药使用过程中开展血药浓度监测，了解患者的服药依从性以及药物间的相互作用，有助于确定合并用药原则。

目前临床上常用的抗抑郁药物有阿米替林、帕罗西汀、舍曲林、西酞普兰、文拉法辛、度洛西汀、米氮平等，这些药物大多治疗窗较窄，个体差异较大，不同的抑郁病患者对各种抗抑郁药物的敏感度不同，通过开展血药浓度监测，可以帮助医生制订个体化给

药方案，实现精准治疗，降低用药风险。关于抗抑郁药物浓度监测的方法有免疫检测法、原子吸收法、色谱法，但上述方法在抗干扰能力、灵敏度和检测通量方面有一定局限性。

本文参考中国医师协会检验医师分会临床质谱检验医学专业委员会的《液相色谱串联质谱临床检测方法的开发与验证》，基于岛津 LCMS-8045 平台建立了一种简单高效的液相色谱质谱法同时测定人血清中多种抗抑郁药物的含量。

血清样本经蛋白沉淀和引入同位素内标后加水适当稀释后直接进样分析，内标法定量人血清中药物含量。该方法前处理过程方便快捷，1 针进样，6.5 分钟内完成分析，实现 24 种常见抗抑郁药物的含量测定，大大提高了分析效率和检测通量，能满足临床样本的联合检测需求，供相关人员参考。

■ 实验部分

1.1 仪器

本实验使用岛津临床质谱 LCMS-8045，具体配置如下：

输液泵：LC-40B X3

检测器：LCMS-8045

自动进样器：SIL-40C X3

柱温箱：CTO-40S

系统控制器：SCL-40

工作站软件：LabSolutions Version 5.99

1.2 分析条件

液相色谱条件

色谱柱：Shim-pack Velox SP-C18(50 mm × 2.1 mm × 1.8 μm)，
货号：227-32001-02

流动相：A 相 - 水，B 相 -50% 甲醇 / 乙腈

洗脱方式：梯度洗脱，时间程序见表 1

流速：0.3 mL/min

柱温：40°C

进样器温度：15°C

进样量：4 μL

表 1 梯度洗脱程序

时间 (min)	A (%)	B (%)
0.01	70	30
0.60	70	30
2.80	35	65
4.50	5	95
5.50	5	95
5.60	70	30
6.50	70	30

质谱条件

离子化模式: ESI(+)	离子源温度: 300°C
加热气: 空气 10.0 L/min	DL 管温度: 200°C
雾化气: 氮气 3.0 L/min	加热模块温度: 400°C
干燥气: 氮气 10.0 L/min	扫描模式: 多反应监测 (MRM)
驻留时间: 8~10 ms	MRM 参数: 见表 2

表 2 MRM 参数

#	名称	前体离子 > 产物离子	Q1 Pre	CE	Q3 Pre
1	文拉法辛	278.3000>58.1500	-20	-20	-20
2	O- 去甲文拉法辛	264.3000>58.1500	-20	-20	-20
3	米氮平	266.2000>195.1500	-20	-20	-20
4	帕罗西汀	330.2000>192.2000	-20	-20	-20
5	米那普仑	247.2500>230.1500	-20	-10	-20
6	安非他酮	240.2000>184.1500	-20	-5	-20
7	羟安非他酮	256.2000>238.1500	-20	-10	-20
8	舍曲林	306.1500>275.1000	-20	-14	-20
9	去甲舍曲林	292.1500>159.1500	-11	-25	-30
10	艾司西酞普兰	325.3000>109.1000	-20	-28	-20
11	去甲艾司西酞普兰	311.2000>109.1000	-12	-25	-21
12	西酞普兰	325.2000>109.1000	-18	-26	-22
13	米安色林	265.2000>208.1500	-15	-20	-22
14	度洛西汀	298.2000>44.2000	-11	-11	-17
15	氟伏沙明	319.2000>71.1500	-20	-20	-20
16	氯米帕明	316.2000>86.2000	-12	-19	-16
17	去甲氯米帕明	301.2000>72.1000	-20	-16	-20
18	阿米替林	278.3000>233.2000	-20	-17	-20
19	去甲阿米替林	264.2000>233.1000	-20	-15	-20
20	氟西汀	310.2000>148.2000	-17	-8	-26
21	去甲氟西汀	296.2000>134.1500	-10	-6	-24
22	曲唑酮	372.2000>148.1000	-20	-39	-20
23	多塞平	280.2000>107.1500	-11	-22	-22
24	去甲多塞平	266.2000>107.1000	-20	-10	-20
25	文拉法辛 -D ₆	284.3000>58.2500	-11	-22	-20
26	O- 去甲文拉法辛 -D ₆	270.3000>64.2000	-19	-28	-20
27	米氮平 -D ₃	269.3000>195.1500	-11	-25	-21
28	帕罗西汀 -D ₄	334.2000>196.2500	-13	-21	-21
29	米那普仑 -D ₁₀	257.3000>240.2500	-18	-12	-21
30	安非他酮 -D ₉	249.2000>185.0500	-20	-15	-20
31	羟基安非他酮 -D ₆	262.3000>244.2000	-20	-15	-20
32	舍曲林 - ¹³ C ₆	312.2000>281.0500	-20	-12	-22
33	去甲舍曲林 - ¹³ C ₆	298.2000>159.1000	-10	-25	-30
34	艾司西酞普兰 -D ₆	331.3000>109.1000	-13	-30	-19

35	去甲艾司西肽普兰 -D ₄	315.3000>113.1000	-13	-26	-20
36	西酞普兰 -D ₄	329.3000>113.1500	-13	-29	-20
37	米安色林 -D ₃	268.3000>208.1500	-11	-21	-22
38	度洛西汀 -D ₇	305.2000>44.2500	-12	-11	-18
39	氟伏沙明 -D ₃	322.3000>74.2000	-13	-17	-13
40	氯米帕明 -D ₆	321.3000>92.3000	-13	-19	-17
41	去甲氯米帕明 -D ₃	304.2000>75.2500	-17	-17	-21
42	阿米替林 -D ₃	281.3000>233.2500	-11	-17	-25
43	去甲替林 -D ₃	267.3000>233.2000	-18	-14	-22
44	氟西汀 -D ₆	316.3000>44.1500	-20	-13	-20
45	去甲氟西汀 -D ₆	302.3000>140.2000	-24	-7	-26
46	曲唑酮 -D ₆	378.3000>182.1500	-15	-25	-19
47	多塞平 -D ₃	283.3000>107.1500	-11	-24	-19
48	N- 去甲盐酸多塞平 -D ₃	269.3000>107.1000	-11	-22	-19

1.3 样品制备和前处理

1.3.1 标准品 & 内标信息

表 3 标准品信息

#	中文名	英文名	CAS/EC 号
1	文拉法辛盐酸盐	Venlafaxine HCl	9300-78-4
2	O- 去甲文拉法辛	O-Desmethylvenlafaxine	93413-62-8
3	米氮平	Mirtazapine	85650-52-8
4	帕罗西汀马来酸盐	Paroxetine maleate	64006-44-6
5	盐酸米那普仑	Milnacipran hydrochloride	101152-94-7
6	盐酸安非他酮	Bupropion hydrochloride	31677-93-7
7	羟基安非他酮	Hydroxy Bupropion	357399-43-0
8	盐酸舍曲林	Sertraline hydrochloride	79559-97-0
9	去甲盐酸舍曲林	(±)-Norsertraline hydrochloride	91797-57-8
10	草酸艾司西酞普兰	Escitalopram Oxalate	219861-08-2
11	西酞普兰 EP 杂质 D	Citalopram Related Compound D	1188264-72-3
12	氢溴酸西酞普兰	Citalopram hydrobromide	59729-32-7
13	盐酸米安色林	Mianserin hydrochloride	21535-47-7
14	盐酸度洛西汀	Duloxetine hydrochloride	136434-34-9
15	马来酸氟伏沙明	Fluvoxamine maleate	61718-82-9
16	盐酸氯米帕明	Clomipramine hydrochloride	17321-77-6
17	去甲氯米帕明盐酸盐	Norclomipramine hydrochloride	303-48-0
18	盐酸阿米替林	Amitriptyline hydrochloride	549-18-8
19	去甲替林盐酸盐	Nortriptyline hydrochloride	894-71-3
20	氟西汀	Fluoxetine	54910-89-3
21	去甲氟西汀草酸盐	Norfluoxetine oxalate	107674-50-0
22	盐酸曲唑酮	Trazodone hydrochloride	25332-39-2
23	多塞平盐酸盐	Doxepin hydrochloride	1229-29-4
24	N- 去甲多塞平	Nor-Doxepin	1225-56-5

表 4 内标信息

#	中文名	英文名	CAS/EC 号
1	文拉法辛 -D ₆	Venlafaxine-D ₆	1020720-02-8
2	O- 去甲文拉法辛 -D ₆	(±)-O-Desmethylvenlafaxine-D ₆	1062605-69-9
3	米氮平 -D ₃	Mirtazapine-D ₃	1216678-68-0
4	rac- 帕罗西汀 -D ₄ 盐酸盐	rac-Paroxetine-D ₄ Hydrochloride	1217683-35-6
5	米那普仑 -D ₁₀ 盐酸盐	rac-Milnacipran-D ₁₀ Hydrochloride	1217977-03-1
6	安非他酮 -D ₉ 盐酸盐	(±)-Bupropion-D ₉ Hydrochloride	1189725-26-5
7	羟基安非他酮 -D ₆	Hydroxy Bupropion-D ₆	1216893-18-3
8	舍曲林 - ¹³ C ₆ HCl	(±)-Sertraline- ¹³ C ₆ Hydrochloride	NA
9	去甲舍曲林 - ¹³ C ₆ 盐酸盐	Norsertaline- ¹³ C ₆ Hydrochloride	NA
10	艾司西酞普兰 -D ₆ 乙酸盐	(S)-Citalopram-D ₆ Oxalate	1217733-09-9
11	去甲艾司西酞普兰 -D ₄	rac Desmethyl Citalopram-D ₄ Oxalate	NA
12	西酞普兰草酸盐 -D ₄	Citalopram -D ₄ Oxalate	219861-08-2
13	米安色林 -D ₃	Mianserin-D ₃	81957-76-8
14	度洛西汀 -D ₇	Duloxetine-D ₇	919514-01-5
15	马来酸氟伏沙明 -D ₃	Fluvoxamine-D ₃ maleate	1185245-56-0
16	氯米帕明 -D ₆ 盐酸盐	Clomipramine-D ₆ Hydrochloride	1190043-04-9
17	去甲氯米帕明 -D ₃ 盐酸盐	N-Desmethylclomipramine-D ₃ Hydrochloride	1189971-04-7
18	阿米替林 -D ₃ 盐酸盐	Amitriptyline-D ₃ Hydrochloride	342611-00-1
19	去甲替林 -D ₃ 盐酸盐	Nortriptyline-D ₃ Hydrochloride	136765-48-5
20	氟西汀 -D ₆	Fluoxetine-D ₆	200-659-6
21	草酸去甲氟西汀 -D ₆	Norfluoxetine-D ₆ oxalate	NA
22	曲唑酮 -D ₆ 盐酸盐	Trazodone-D ₆ Hydrochloride solution	1181578-71-1
23	多塞平 -D ₃ 盐酸盐	Doxepin-D ₃ Hydrochloride	347840-07-7
24	N- 去甲盐酸多塞平 -D ₃	Nor-Doxepin-D ₃ Hydrochloride	1331665-54-3

1.3.2 样本制备

(1) 内标萃取液：分别移取内标储备液于 50 mL 容量瓶中，加入乙腈溶液定容得到内标萃取液（各化合物浓度为 4~40 ng/mL）；

(2) 校准品：分别移取标准品储备液于 2 mL 容量瓶中，加入正常人血清定容得到 7 个浓度的人血清基质校准品（各化合物浓度如表 5 所示）；

(3) 质控品：分别移取标准品储备液于 2 mL 容量瓶中，加入正常人血清定容得到 2 个浓度的人血清基质质控品（各化合物浓度如表 5 所示）。

表 5 校准品 & 质控品浓度信息

#	名称	校准品 (ng/mL)							质控品 (ng/mL)	
		STD1	STD2	STD3	STD4	STD5	STD6	STD7	LQC	HQC
1	文拉法辛	20	50	80	100	250	500	1000	40	800
2	O- 去甲文拉法辛	20	50	80	100	250	500	1000	40	800
3	米氮平	4	10	16	20	50	100	200	8	160
4	帕罗西汀	4	10	16	20	50	100	200	8	160
5	米那普仑	8	20	32	40	100	200	400	16	320
6	安非他酮	50	125	200	250	625	1250	2500	100	2000
7	羟安非他酮	50	125	200	250	625	1250	2500	100	2000
8	舍曲林	8	20	32	40	100	200	400	16	320
9	去甲舍曲林	8	20	32	40	100	200	400	16	320
10	艾司西酞普兰	4	10	16	20	50	100	200	8	160
11	去甲艾司西酞普兰	4	10	16	20	50	100	200	8	160
12	西酞普兰	6	15	24	30	75	150	300	12	240
13	米安色林	4	10	16	20	50	100	200	8	160
14	度洛西汀	6	15	24	30	75	150	300	12	240
15	氟伏沙明	14	35	56	70	175	350	700	28	560
16	氯米帕明	12	30	48	60	150	300	600	24	480
17	去甲氯米帕明	12	30	48	60	150	300	600	24	480
18	阿米替林	8	20	32	40	100	200	400	16	320
19	去甲阿米替林	8	20	32	40	100	200	400	16	320
20	氟西汀	30	75	120	150	375	750	1500	60	1200
21	去甲氟西汀	30	75	120	150	375	750	1500	60	1200
22	曲唑酮	30	75	120	150	375	750	1500	60	1200
23	多塞平	8	20	32	40	100	200	400	16	320
24	去甲多塞平	8	20	32	40	100	200	400	16	320

1.3.3 样本前处理

- (1) 移取 30 μ L 校准品 / 质控品 / 待测血清样本于 1.5 mL 离心管；
- (2) 加入 120 μ L 内标萃取液于 2000 rpm 涡旋混合 1 min；
- (3) 10000 rpm 4 $^{\circ}$ C 离心 5 min；
- (4) 取 100 μ L 上清于进样小瓶并加入 300 μ L 纯水混匀；
- (5) 上机后自动进样器以 4 μ L 进样分析。

■ 实验结果

2.1 临床参考区间

表 6 临床参考区间

#	名称	有效浓度 (ng/mL)	警戒浓度 (ng/mL)
1	文拉法辛	100-400	800
2	O- 去甲文拉法辛 *	100-400	800
3	米氮平	30-80	160
4	帕罗西汀	20-65	120
5	米那普仑	100-150	300
6	安非他酮	850-1500	2000
7	羟安非他酮 *	850-1500	2000
8	舍曲林	10-150	300
9	去甲舍曲林	10-150	300
10	艾司西肽普兰	15-80	160
11	去甲艾司西肽普兰 *	15-80	160
12	西酞普兰	50-110	220
13	米安色林	15-70	140
14	度洛西汀	30-120	240
15	氟伏沙明	60-230	500
16	氯米帕明	230-450	450
17	去甲氯米帕明 *	230-450	450
18	阿米替林	80-200	300
19	去甲阿米替林 *	80-200	300
20	氟西汀	120-500	1000
21	去甲氟西汀 *	120-500	1000
22	曲唑酮	700-1000	1200
23	多塞平	50-150	300
24	去甲多塞平 *	50-150	300

注：数据来源于 AGNP 指南 (2017) 和 RECIPER 试剂盒，* 代谢物参考区间同原药。

2.2 线性关系

将 6 个标准浓度的校准品按 1.3.3 中前处理条件进行分析测定，以浓度比为横坐标，面积比为纵坐标，内标法制作校准曲线得到相关系数、线性范围和校准品准确度见表 7。

 表 7 标准曲线参数 (1/C² 加权)

#	名称	相关系数	线性范围 (ng/mL)	准确度 (%)
1	文拉法辛	0.9995	20~1000	97.2~104.9
2	O- 去甲文拉法辛	0.9997	20~1000	98.4~104.7
3	米氮平	0.9992	4~200	90.0~107.8
4	帕罗西汀	0.9958	4~200	88.1~110.9
5	米那普仑	0.9992	8~400	96.0~105.7
6	安非他酮	0.9986	50~2500	96.0~109.6
7	羟安非他酮	0.9992	50~2500	97.9~109.0
8	舍曲林	0.9995	8~400	93.9~103.2
9	去甲舍曲林	0.9958	8~400	90.7~114.1

10	艾司西肽普兰	0.9989	4~200	95.2~107.4
11	去甲艾司西肽普兰	0.9998	4~200	95.4~104.2
12	西酞普兰	0.9996	6~300	97.0~104.3
13	米安色林	0.9993	4~200	92.8~110.9
14	度洛西汀	0.9985	6~300	91.8~112.9
15	氟伏沙明	0.9992	14~700	93.7~105.2
16	氯米帕明	0.9983	12~600	93.4~108.6
17	去甲氯米帕明	0.9997	12~600	96.6~103.9
18	阿米替林	0.9994	8~400	93.7~105.8
19	去甲阿米替林	0.9996	8~400	89.5~106.1
20	氟西汀	0.9994	30~1500	87.5~110.7
21	去甲氟西汀	0.9972	30~1500	88.6~110.5
22	曲唑酮	0.9998	30~1500	97.2~102.7
23	多塞平	0.9995	8~400	93.9~107.3
24	去甲多塞平	0.9978	8~400	90.6~108.9

2.3 精密度 & 准确度实验

本实验分别对低浓度和高浓度的正常人血清基质加标样（质控品）进行5次重复测定，精密度相对标准偏差范围分别在1.52%~8.84%（LQC）和0.72%~10.59%（HQC）之间，准确度度相对标准偏差范围分别在-4.33%~11.13%（LQC）和-9.43%~4.93%（HQC）之间，满足临床检测要求，数据结果见附录表8和表9。

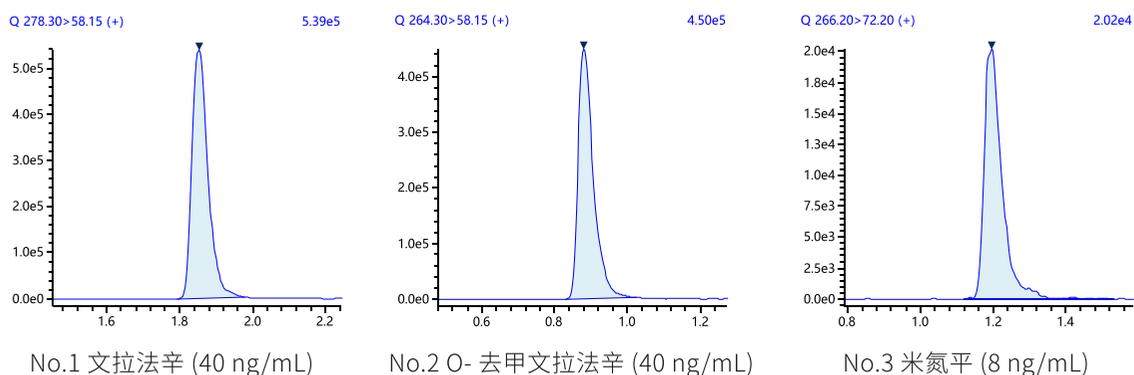
表8 LQC 精密度 & 准确度结果 (n=5)

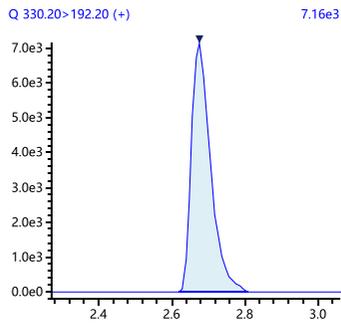
#	名称	均值 (ng/mL)	%CV	理论值 (ng/mL)	% 偏倚
1	文拉法辛	40.55	2.12	40	1.37
2	O- 去甲文拉法辛	40.31	1.52	40	0.78
3	米氮平	7.89	3.16	8	-1.38
4	帕罗西汀	8.10	7.59	8	1.25
5	米那普仑	16.08	2.02	16	0.50
6	安非他酮	102.10	1.76	100	2.10
7	羟安非他酮	102.97	2.12	100	2.97
8	舍曲林	16.07	6.97	16	0.44
9	去甲舍曲林	16.93	8.21	16	5.81
10	艾司西肽普兰	7.95	2.28	8	-0.62
11	去甲艾司西肽普兰	8.22	4.62	8	2.75
12	西酞普兰	11.48	3.58	12	-4.33
13	米安色林	8.89	3.26	8	11.13
14	度洛西汀	12.17	8.84	12	1.42
15	氟伏沙明	28.51	2.02	28	1.82
16	氯米帕明	24.17	5.03	24	0.71
17	去甲氯米帕明	24.91	2.98	24	3.79
18	阿米替林	15.84	6.68	16	-1.00
19	去甲阿米替林	16.46	2.74	16	2.88
20	氟西汀	59.67	7.75	60	-0.55
21	去甲氟西汀	60.32	5.76	60	0.53
22	曲唑酮	58.26	2.68	60	-2.90
23	多塞平	16.27	2.52	16	1.69
24	去甲多塞平	15.76	6.57	16	-1.50

表 9 HQC 精密密度 & 准确度结果 (n=5)

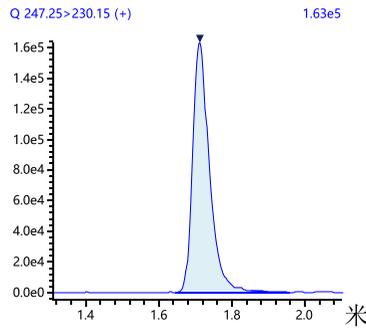
#	名称	均值 (ng/mL)	%CV	理论值 (ng/mL)	% 偏倚
1	文拉法辛	749.69	1.56	800	-6.29
2	O- 去甲文拉法辛	763.68	1.61	800	-4.54
3	米氮平	156.56	2.77	160	-2.15
4	帕罗西汀	167.89	10.59	160	4.93
5	米那普仑	309.90	1.36	320	-3.16
6	安非他酮	1885.09	2.23	2000	-5.75
7	羟安非他酮	1966.08	0.72	2000	-1.70
8	舍曲林	313.34	3.47	320	-2.08
9	去甲舍曲林	329.82	9.55	320	3.07
10	艾司西肽普兰	154.09	1.73	160	-3.69
11	去甲艾司西肽普兰	161.30	2.04	160	0.81
12	西酞普兰	238.78	1.57	240	-0.51
13	米安色林	157.90	4.76	160	-1.31
14	度洛西汀	217.36	5.19	240	-9.43
15	氟伏沙明	560.71	1.38	560	0.13
16	氯米帕明	452.84	1.38	480	-5.66
17	去甲氯米帕明	462.23	2.02	480	-3.70
18	阿米替林	310.48	2.75	320	-2.97
19	去甲阿米替林	321.73	2.06	320	0.54
20	氟西汀	1143.83	1.50	1200	-4.68
21	去甲氟西汀	1182.31	1.54	1200	-1.47
22	曲唑酮	1145.83	1.85	1200	-4.51
23	多塞平	312.10	2.37	320	-2.47
24	去甲多塞平	306.82	2.77	320	-4.12

2.4 低浓度质控品色谱图

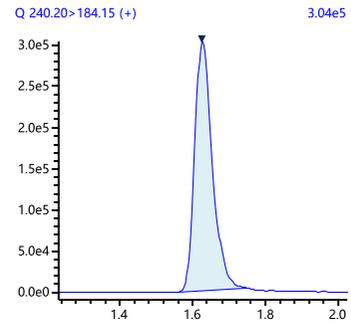




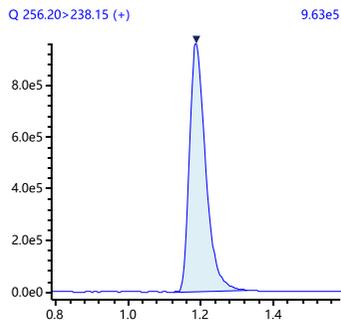
No.4 帕罗西汀 (8 ng/mL)



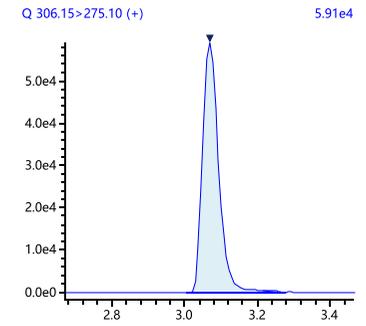
No.5 那普仑 (16 ng/mL)



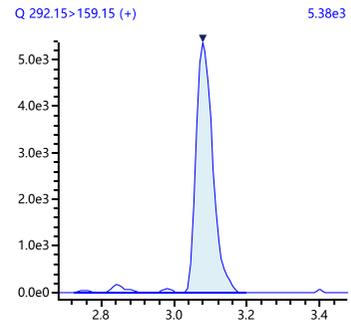
No.6 安非他酮 (100 ng/mL)



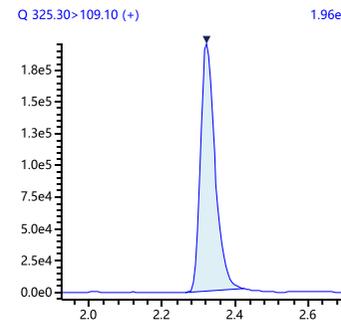
No.7 羟安非他酮 (100 ng/mL)



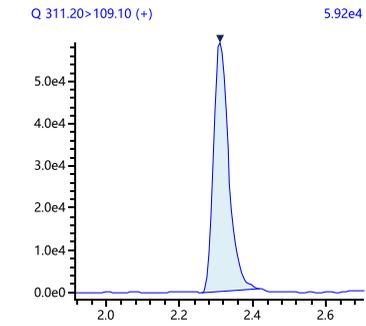
No.8 舍曲林 (16 ng/mL)



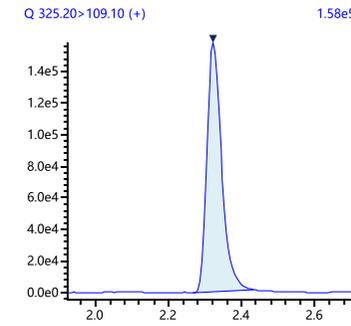
No.9 去甲舍曲林 (16 ng/mL)



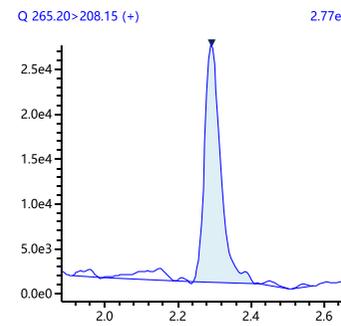
No.10 艾司西酞普兰 (8 ng/mL)



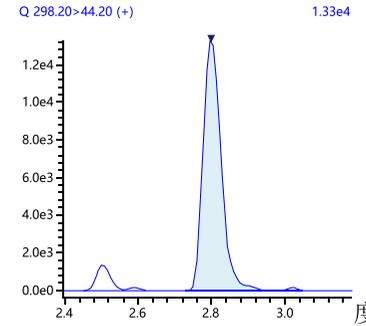
No.11 去甲艾司西酞普兰 (8 ng/mL)



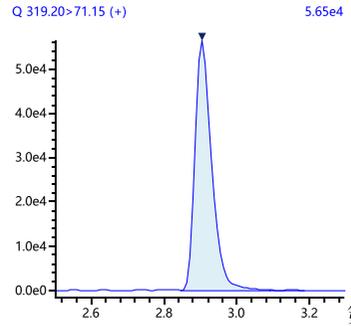
No.12 西酞普兰 (12 ng/mL)



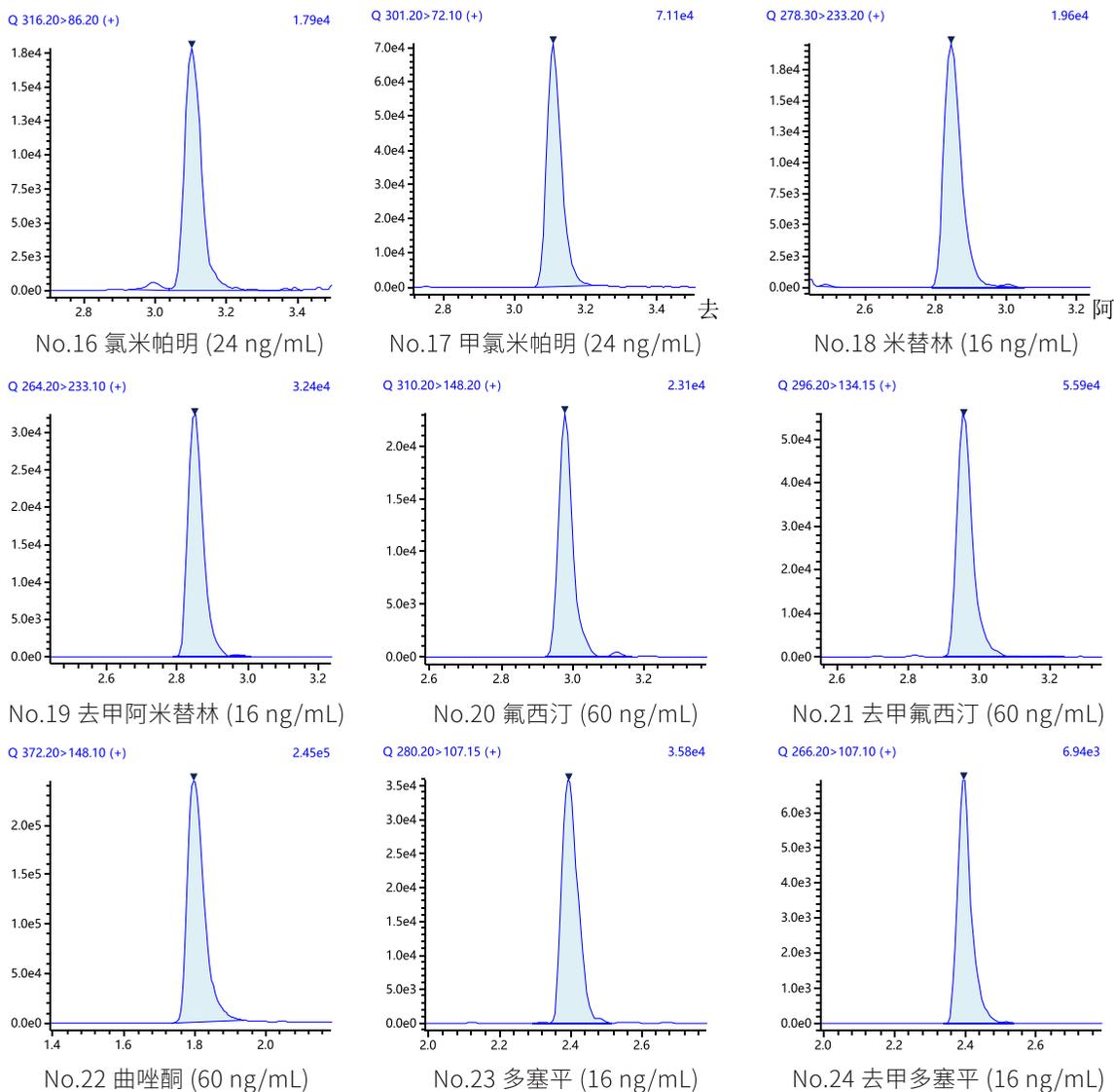
No.13 米安色林 (8 ng/mL)



No.14 洛西汀 (12 ng/mL)



No.15 伏沙明 (28 ng/mL)



结论

建立了一种使用岛津质谱 LCMS-8045 测定人血清中 24 种抗抑郁药物的定量分析方法。利用蛋白沉淀的前处理方法，以内标法建立标准曲线，线性范围涵盖临床参考区间，分别考察了方法的线性、准确度和精密度性能。结果显示各分析物线性范围内标准曲线相关系数均大于 0.9958，精密度相对标准偏差范围分别在 1.52%~8.84% (LQC) 和 0.72%~10.59%(HQC) 之间，准确度相对标准偏差范围分别在 -4.33%~11.13% (LQC) 和 -9.43%~4.93%(HQC) 之间，可满足临床日常检验需求。

岛津应用云

