

分析血浆样品中抗抑郁药的临床研究方法

Stephen Balloch, Gareth Hammond, Lisa J. Calton

Waters Corporation

仅供研究使用，不适用于诊断。

摘要

抗抑郁药与其他神经药理学类药物的药代动力学和药物相互作用早有记载¹。因此，临床研究中可能需要可靠的分析方法。

本文介绍了一种使用蛋白沉淀法分析含内标血浆样品中抗抑郁药的临床研究方法。该方法使用配备Waters XSelect™ Premier HSS T3色谱柱的Waters ACQUITY™ UPLC™ I-Class系统，在5分钟内就完成了色谱分离，随后使用Xevo™ TQD质谱仪（图1）进行检测。



图1. Waters ACQUITY UPLC I-Class系统和Xevo TQD质谱仪

优势

- 利用色谱和质谱检测提高分析选择性
- 样品前处理过程简单、经济，仅使用极少量的样品
- 分析运行时间短

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内部血浆校准品和质控物质。使用Cambridge Bioscience（英国剑桥郡）、Merck Life Science（英国多塞特）和Toronto Research Chemicals（加拿大安大

略) 提供的认证粉末制备浓缩储备液。稳定同位素标记的内标由Cambridge Bioscience (英国剑桥郡)、Merck Life Science (英国多塞特) 和Toronto Research Chemicals (加拿大安大略) 提供。所有分析物的校准范围为10–1000 ng/mL, 米氮平(5–500 ng/mL)和曲唑酮(30–3000 ng/mL)除外。

样品萃取

向盛装有50 µL样品的微量离心管中加入150 µL内标的乙腈溶液, 内标浓度详见表1。

将试管置于多管涡旋混合器上, 以2500 rpm涡旋混合30 s, 然后以16,100 g离心2 min。取50 µL上清液转移到1 mL 96孔板中, 并加入450 µL水。

选择与其他药物组合兼容的流动相和色谱柱, 例如抗癫痫药、三环类抗抑郁药和抗精神病药。

UPLC条件

系统:	配备FTN的ACQUITY UPLC I-Class
进样针:	30 µL
色谱柱:	XSelect HSS T3色谱柱; 2.5 µm, 2.1 x 100 mm (P/N: 186009831)
流动相A:	水+ 2 mM醋酸铵
流动相B:	甲醇 + 2 mM醋酸铵
洗针溶剂:	80%甲醇水溶液+0.1%甲酸
清除溶剂:	水:甲醇40:60 (v:v)
密封件清洗液:	20%甲醇水溶液
柱温:	45 °C (主动预加热器)

进样体积：	20 μ L
运行时间：	5.0 min（进样间隔5.7 min）

质谱条件

系统：	Xevo TQD
分辨率：	MS1 (0.7 FWHM) MS2 (0.7 FWHM)
采集模式：	多重反应监测(MRM)（详见表2）
极性：	ESI正离子模式电离
毛细管电压：	0.5 kV
离子源温度：	150 $^{\circ}$ C
脱溶剂气温度：	400 $^{\circ}$ C
锥孔气流速：	50 L/h
脱溶剂气流速：	1000 L/h
扫描间延迟时间：	0.003 s
极性/模式切换间扫描延迟时间：	0.020 s
通道间延迟时间：	0.020 s

数据管理

结果与讨论

示例色谱图见图2。

分析含有1000 ng/mL西酞普兰、去甲基氟西汀、度洛西汀、氟西汀、氟伏沙明、O-去甲基文拉法辛、舍曲林和文拉法辛、500 ng/mL米氮平和3000 ng/mL曲唑酮的血浆样品后未观察到系统残留。

在5天内对用血浆制备的10个低浓度重复样进行萃取和定量，评估分析灵敏度。考察结果表明，该方法能够在表4所示的浓度下实现精确定量（ $CV \leq 20\%$ ，偏差 $\leq 15\%$ ）。

唯一例外是氟伏沙明，其偏差略高于15%，为17.6%，仍 $\leq 20\%$ ，这是校准品1 (10 ng/mL)的允许偏差百分比。

我们在五天内每天提取和定量分析三个浓度的血浆混合样品（每个浓度五个重复样， $n = 25$ ），以此确定该方法的总精密度。每个QC水平设置五个重复样，以评估方法的重现性。实验结果见图3，评估了三个浓度的总精密度和重现性， $CV \leq 10.0\%$ 。所有分析物的三个浓度为25、75和800 ng/mL，米氮平和曲唑酮除外，分别为12.5、37.5和400 ng/mL以及75、225和2400 ng/mL。

将低浓度和高浓度混合样品在下述范围内按已知比例混合后，在O-去甲基文拉法辛和度洛西汀浓度为7.7–1300 ng/mL的范围内测得该方法呈线性。西酞普兰、去甲基氟西汀、氟西汀、氟伏沙明、舍曲林和文拉法辛确定在7.7–1300 ng/mL范围内进行了二次拟合，类似地，米氮平在3.8–650 ng/mL范围内，曲唑酮在23–3900 ng/mL范围内进行了二次拟合。

在低(QC1)和高(QC3)浓度($n = 6$)血浆样品中评估基质效应，计算为等量加标浓度提取溶剂样品的百分比。计算基于分析物:内标响应比，以补偿内标造成的信号增强或抑制效应（表5）。

通过测定低浓度和高浓度混合血浆样品（QC1和QC3浓度）的回收率(n = 3)，评估高浓度加标内源性化合物（白蛋白、胆红素、胆固醇、肌酐、甘油三酯和尿酸）的潜在干扰。所得回收率范围为86.9~112.9%。导致回收率超出85%~115%范围的物质被视为干扰物。此外，还实现了O-去甲基文拉法辛与曲马多同分异构体之间的完全色谱分离。

结论

该分析方法的样品前处理快速、经济，仅使用50 µL样品，分析十种抗抑郁药和代谢物的运行时间仅五分钟，覆盖三个数量级，总精密度和重现性≤10.0% CV。

此外，该方法在测试范围内未表现出系统残留，并且使用稳定同位素标记的内标非常有效地补偿了基质效应（如果有）。

特色产品

MassTrak ACQUITY UPLC I-Class PLUS/Xevo TQD IVD系统 </nextgen/cn/zh/products/mass-spectrometry-systems/masstrak-acquity-uplc-i-class-plus-xevo-tqd-ivd-system.html>

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

TargetLynx <<https://www.waters.com/513791>>

720007859ZH，2023年2月

© 2023 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

沪ICP备06003546号-2 京公网安备 31011502007476号