

分析血浆样品中三环类抗抑郁药的临床研究方法

Vallerie Muckoya, Stephen Balloch, Gareth Hammond, Lisa J. Calton

Waters Corporation

仅供研究使用，不适用于诊断。

摘要

色谱和质谱检测可提供出色的分析选择性，能够对各种极性的15种TCA进行定量分析。此外，该方法的样品前处理快速、经济有效，仅使用少量样品。

优势

- 利用色谱和质谱检测提高分析选择性
 - 定量分析15种不同极性的TCA
 - 样品前处理快速、经济，仅使用少量样品
-

简介

血浆中三环类抗抑郁药的定量分析对于药代动力学研究和监测治疗有效性至关重要¹。

本文介绍了一种利用蛋白质沉淀法从血浆中提取15种三环类抗抑郁药的临床研究方法。使用配备XSelect™

Premier HSS C₁₈色谱柱(2.1 x 100 mm, 2.5 μm)的ACQUITY™ UPLC I-Class FL 系统进行色谱分离。检测器为Xevo™ TQ-S micro质谱仪，以正离子电喷雾电离模式运行（图1）。



图1.ACQUITY UPLC I-Class FL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内部血浆校准品和质控物质。使用Cambridge Bioscience（英国剑桥）、Sigma-Aldrich（英国多塞特）和Toronto Research Chemicals（加拿大安大略）提供的认证粉末和溶液制备浓缩储备液。稳定同位素标记的内标由ALSACHIM（法国斯伊尔基什-格拉芬什塔登）、Sigma-Aldrich（英国多塞特）和Toronto Research Chemicals（加拿大安大略）提供。分析物的校准范围和内部质控浓度如表1所示。

分析物	校准范围 (ng/mL)	QC浓度 (ng/mL)
阿米替林、氯丙咪嗪、氯氮平、地昔帕明、多虑平、 丙咪嗪、马普替林、去甲氯丙咪嗪、去甲氯氮平、 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	10-500	25、75和400
去甲马普替林和曲米帕明	20-1000	50、150和800
氯氮平和去甲氯氮平	50-2500	125、375和2000

表1.校准范围和内部QC浓度范围。

样品提取

向盛装有50 μL 样品的微量离心管中加入150 μL 的内标乙腈溶液。内标的浓度详见表2。

内标	浓度 (ng/mL)
去甲替林- ² H ₃	70
普罗替林- ² H ₃	87
去甲马普替林- ² H ₄	237
去甲多虑平- ² H ₃	115
地昔帕明- ² H ₃	80
去甲氯氮平- ² H ₈	3059
阿米替林- ² H ₃	100
马普替林- ² H ₅	77
多虑平- ² H ₃	107
去甲曲米帕明- ¹³ C ₂ ² H ₃	83
丙咪嗪- ² H ₆	107
曲米帕明- ² H ₃	182
去甲氯丙咪嗪- ² H ₃	175
氯丙咪嗪- ² H ₃	88
氯氮平- ² H ₄	686

表2.内标浓度。

将试管置于多管涡旋混合器上，以1500 rpm速度涡旋混合3 min，然后以16,100 g离心2 min。取25 μL上清液转移到1 mL 96孔板中，并加入475 μL水。临分析前，将样品板加盖以1500 rpm速度涡旋2分钟。

UPLC条件

系统：ACQUITY UPLC I-Class FL 系统

进样针：30 μL

色谱柱:	XSelect Premier HSS T3色谱柱; 2.5 μm, 2.1 x 100 mm (P/N: 186009831)
流动相A:	水 + 5 mM甲酸铵 + 0.1%甲酸
流动相B:	甲醇 + 5 mM甲酸铵 + 0.1%甲酸
洗针液溶剂:	80%甲醇水溶液+0.1%甲酸
清除溶剂:	水:甲醇40:60 (v:v)
密封清洗液:	20%甲醇水溶液
柱温:	45 °C (主动预柱加热器)
进样体积:	20 μL

梯度表

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
0	0.50	40	60	初始
1.50	0.50	40	60	6
3.00	0.50	0	100	6
3.14	0.50	0	100	11
3.15	0.50	40	60	11

表3. 色谱洗脱时间表。

运行时间: 4.0 min (进样间隔4.5 min)

MS条件

系统:	Xevo TQ-S micro
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3)
极性:	ESI+ 电离模式
毛细管电压:	0.5 kV
离子源温度:	150 °C
脱溶剂气温度:	600 °C
锥孔气流速:	150 L/h
脱溶剂气流速:	1000 L/h
扫描间延迟时间:	自动
极性/模式切换扫描间延迟时间:	0.020 s
通道间延迟时间:	自动

数据管理

色谱软件:	带TargetLynx™定量应用程序的MassLynx™ 4.2版。 。
-------	---

分析物	极性	母离子 (m/z)	子离子 (m/z)	锥孔电压 (V)	碰撞电压 (V)	驻留时间 (s)
去甲替林 (定量离子)	ESI+	264.1	105.1	30	20	0.012
去甲替林 (定性离子)	ESI+	264.1	233.1	30	14	0.012
去甲替林- ² H ₃ (ISTD)	ESI+	267.2	105.1	30	20	0.012
普罗替林 (定量离子)	ESI+	264.1	155.1	36	22	0.012
普罗替林 (定性离子)	ESI+	264.1	233.2	36	18	0.012
普罗替林- ² H ₃ (ISTD)	ESI+	267.1	155.1	36	22	0.012
去甲马普替林 (定量离子)	ESI+	264.1	169.1	32	18	0.012
去甲马普替林 (定性离子)	ESI+	264.1	131.1	32	22	0.012
去甲马普替林- ² H ₄ (ISTD)	ESI+	268.1	173.1	32	18	0.012
去甲多虑平 (定量离子)	ESI+	266.1	107.1	32	22	0.012
去甲多虑平 (定性离子)	ESI+	266.1	44.1	32	20	0.012
去甲多虑平- ² H ₃ (ISTD)	ESI+	269.1	107.1	32	22	0.012
地昔帕明 (定量离子)	ESI+	267.1	72.1	26	18	0.012
地昔帕明 (定性离子)	ESI+	267.1	208.1	26	24	0.012
地昔帕明- ² H ₃ (ISTD)	ESI+	270.1	75.1	26	18	0.012
去甲氯氮平 (定量离子)	ESI+	313.1	192.1	46	38	0.012
去甲氯氮平 (定性离子)	ESI+	313.1	270.1	46	24	0.012
去甲氯氮平- ² H ₈ (ISTD)	ESI+	321.2	193.1	46	38	0.012
阿米替林 (定量离子)	ESI+	278.1	105.1	32	22	0.012
阿米替林 (定性离子)	ESI+	278.1	84.1	32	22	0.012
阿米替林- ² H ₃ (ISTD)	ESI+	281.1	105.1	32	22	0.012
马普替林 (定量离子)	ESI+	278.1	250.1	36	18	0.012
马普替林 (定性离子)	ESI+	278.1	219.1	36	24	0.012
马普替林-2H5 (ISTD)	ESI+	283.2	255.1	36	18	0.012
多虑平 (定量离子)	ESI+	280.1	107.1	38	26	0.012
多虑平 (定性离子)	ESI+	280.1	84.1	38	26	0.012
多虑平- ² H ₃ (ISTD)	ESI+	283.1	107.1	38	26	0.012
去甲曲米帕明 (定量离子)	ESI+	281.1	44.1	28	28	0.012
去甲曲米帕明 (定性离子)	ESI+	281.1	86.1	28	16	0.012
去甲曲米帕明 ¹³ C ² H ₃ (ISTD)	ESI+	285.3	48.1	28	28	0.012
丙咪嗪 (定量离子)	ESI+	281.2	58.1	24	28	0.012
丙咪嗪 (定性离子)	ESI+	281.2	86.1	24	16	0.012
丙咪嗪- ² H ₆ (ISTD)	ESI+	287.2	64.1	24	28	0.012
曲米帕明 (定量离子)	ESI+	295.1	100.1	30	18	0.012
曲米帕明 (定性离子)	ESI+	295.1	58.1	30	26	0.012
曲米帕明- ² H ₃ (ISTD)	ESI+	298.1	103.1	30	18	0.012
去甲氯丙咪嗪 (定量离子)	ESI+	301.1	72.1	28	16	0.012
去甲氯丙咪嗪 (定性离子)	ESI+	301.1	44.1	28	32	0.012
去甲氯丙咪嗪- ² H ₃ (ISTD)	ESI+	304	75.1	28	16	0.012
氯丙咪嗪 (定量离子)	ESI+	315.1	86.1	30	18	0.012
氯丙咪嗪 (定性离子)	ESI+	315.1	58.1	30	34	0.012
氯丙咪嗪- ² H ₃ (ISTD)	ESI+	318.2	89.1	30	18	0.012
氯氮平 (定量离子)	ESI+	327.1	270.1	38	20	0.012
氯氮平 (定性离子)	ESI+	327.1	192.1	38	44	0.012
氯氮平- ² H ₄ (ISTD)	ESI+	331.1	273.1	38	20	0.012

表4.本研究的分析物及内标的MRM参数。

结果与讨论

本文针对同分异构体化合物（去甲替林和普罗替林）以及丙咪嗪和去甲曲米帕明的干扰定性离子通道 (281.2>86.1) 实现了色谱分离，确保可对这些分析物进行选择性的定量分析。图2所示为混合血浆中等浓度校准物样品的示例色谱图。

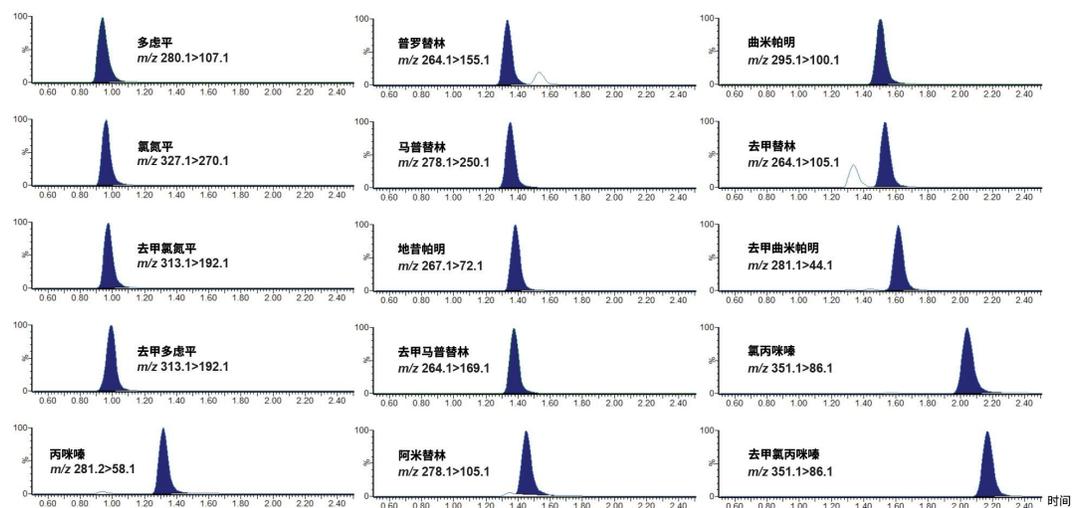


图2.使用XSelect Premier HSS T3色谱柱分析三环类抗抑郁药得到的血浆样品色谱图。

对于高浓度血浆样品，未在后续的空白进样中观察到明显的残留。高浓度样品中包含500 ng/mL的阿米替林、氯丙咪嗪、地昔帕明、多虑平、丙咪嗪、马普替林、去甲氯丙咪嗪、去甲多虑平、去甲曲米帕明、去甲替林和普罗替林，1000 ng/mL的去甲马普替林和曲米帕明，以及2500 ng/mL的氯氮平和去甲氯氮平。按1:5比例稀释高浓度样品，使所有分析物的平均%偏差均< 10%。

分析加标低浓度和高浓度内源性化合物（白蛋白、胆红素、胆固醇、肌酸酐、甘油三酯和尿酸）的TCA时，未观察到明显干扰。为评估此结果，实验测定了低浓度(QC₁)和高浓度(QC₃)下低/高浓度混合血浆样品的回收率(n=3)。低/高浓度混合样品的回收率均在15%以内，但阿米替林、氯丙咪嗪、氯氮平、丙咪嗪、去甲氯丙咪嗪、去甲替林、普罗替林和曲米帕明除外，它们受到了低浓度样品中甘油三酯的一些干扰(17%)。

在5天内对用血浆制备的样品重复样（4种浓度，各10个样品）进行萃取和定量，执行分析灵敏度研究(n = 40)。所得结果表明，该方法能够在下表5所示的浓度下实现精确定量（CV≤20%，偏差≤15%）。

分析物	LLMI (ng/mL)	精密度 (% CV)	偏差 (%)
去甲替林	5	9.6	-0.1
普罗替林	5	10	4
去甲马普替林	10	10	2.5
去甲多虑平	5	5.8	4.1
地昔帕明	5	5	2.4
去甲氯氮平	25	5.1	3.1
阿米替林	5	7	6.3
马普替林	5	8	3.2
多虑平	5	7.4	6.9
去甲曲米帕明	5	6.9	1.2
丙咪嗪	5	6.8	1.7
曲米帕明	10	4.7	2.2
去甲氯丙咪嗪	5	6.7	6.4
氯丙咪嗪	5	6.1	0.6
氯氮平	25	7.2	1.8

表5.分析灵敏度汇总 (LLMI是测量区间下限)。

我们在五天内每天提取和定量分析三个浓度水平的血浆混合样品（每个浓度五个重复样，n = 25），以此确定该方法的总精密度。研究中分析了各QC水平的五个重复样，以此评估方法的重复性。图3所示的结果展示了在三个浓度水平（25、75和400 ng/mL）下评估的所有分析物的总精密度和重复性（以下浓度不同：去甲马普替林和曲米帕明浓度为50、150和800 ng/mL，氯氮平、去甲氯氮平为125、375和2000 ng/mL）的CV ≤ 8.0%。

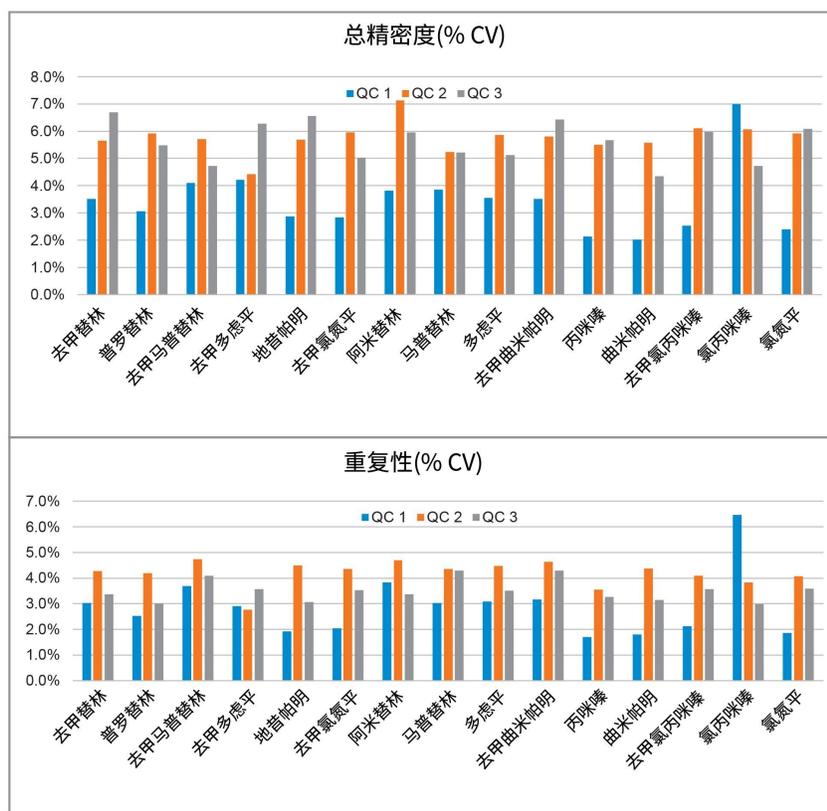


图3.总精密度和重复性汇总。

使用低浓度 (QC₁) 和高浓度 (QC₃) 供体人血浆样品(n = 6)进行基质效应研究, 并以加标至同等浓度的提取溶剂样品的百分比进行评估。如表6所示, 使用分析物:内标响应比率计算的基质因子表明内标可以补偿观察到的任何信号增强或抑制。

分析物	加标浓度 (ng/mL)	基于峰面积平均值的基质因子 (范围)	基于响应平均值的基质因子 (范围)
去甲替林	25	0.93 (0.90-0.95)	0.99 (0.96-1.05)
	400	0.99 (0.97-1.00)	0.99 (0.97-1.03)
普罗替林	25	0.93 (0.91-0.95)	1.00 (0.96-1.07)
	400	0.97(0.96-0.97)	0.98(0.95-1.01)
去甲马普替林	50	0.90 (0.89-0.92)	1.01 (0.95-1.07)
	800	0.97 (0.95-0.98)	0.97 (0.95-0.99)
去甲多虑平	25	0.92 (0.90-0.94)	0.99 (0.96-1.04)
	400	0.95 (0.94-0.96)	0.97 (0.94-0.99)
地昔帕明	25	0.93 (0.90-0.95)	1.00 (0.97-1.06)
	400	0.98 (0.97-0.98)	0.99 (0.95-1.01)
去甲氯氮平	125	0.91 (0.89-0.92)	0.99 (0.94-1.03)
	2000	0.95 (0.94-0.96)	0.97 (0.92-1.01)
阿米替林	25	0.92 (0.88-0.95)	0.99 (0.96-1.04)
	400	0.96 (0.93-0.97)	0.97 (0.94-0.99)
马普替林	25	0.92 (0.89-0.94)	0.98 (0.94-1.03)
	400	0.97 (0.96-0.97)	0.97 (0.94-1.01)
多虑平	25	0.91 (0.88-0.93)	0.99 (0.95-1.03)
	400	0.94 (0.92-0.95)	0.97 (0.94-1.00)
去甲曲米帕明	25	0.92 (0.90-0.95)	0.98 (0.95-1.03)
	400	0.96 (0.94-0.97)	0.98 (0.95-1.00)
丙咪嗪	25	0.93 (0.90-0.95)	1.00 (0.97-1.04)
	400	0.96 (0.94-0.97)	0.99 (0.95-1.01)
曲米帕明	50	0.92 (0.90-0.95)	1.00 (0.96-1.04)
	800	0.98 (0.97-0.99)	0.99 (0.96-1.02)
去甲氯丙咪嗪	25	0.93 (0.92-0.95)	1.00 (0.97-1.05)
	400	0.96 (0.94-0.98)	0.99 (0.96-1.00)
氯丙咪嗪	25	0.94 (0.91-0.97)	0.99 (0.96-1.06)
	400	0.96 (0.94-0.98)	0.98 (0.94-1.00)
氯氮平	125	0.91 (0.89-0.93)	0.99 (0.95-1.03)
	2000	0.95 (0.94-0.96)	0.97 (0.95-0.99)

表6.基于峰面积和分析物:内标响应比率的定量基质因子平均值
(范围)。

如下表7所示，该方法对所有分析物均表现出良好的线性。方法将不同比率的低浓度和高浓度分析物混合样品混合并进行分析，以此评估上述结果。此外，所有分析物的校准曲线决定系数(r^2)均>0.995。

分析物	线性范围 (ng/mL)
去甲替林	10-576
普罗替林	10-576
去甲马普替林	10-1300
去甲多虑平	10-650
地昔帕明	5-650
去甲氯氮平	25-2881
阿米替林	5-650
马普替林	5-576
多虑平	5-650
去甲曲米帕明	5-576
丙咪嗪	5-650
曲米帕明	10-1300
去甲氯丙咪嗪	5-650
氯丙咪嗪	10-500
氯氮平	25-2497

表7. TCA的线性范围汇总。

使用LGC（英国大伦敦）提供的外部质量保证(EQA)血清样品评估所有分析物的准确度，但未包括在本方案中的普罗替林除外。将所得结果与样品的LC-MS方法平均值进行比较。采用Bland-Altman一致性分析（图4）得出的平均方法偏差<14.75%，表明除去甲氯丙咪嗪外，其余所有分析物的结果均与EQA LC-MS方法得出的平均值非常一致。结果汇总见表8。

分析物	计划范围 (ng/mL)	分析样品数量	与方案LC-MS的平均偏差百分比
去甲替林	28-670	13	2.4
去甲马普替林	9.8-294.83	8	12.5
去甲多虑平	7-470.9	6	0.7
地昔帕明	34-648	12	2.4
去甲氯氮平	122-3500	11	14.7
阿米替林	26-522	13	7.7
马普替林	22.19-545.13	8	7.6
多虑平	15-565	6	1.4
去甲曲米帕明	8-560	6	6.8
丙咪嗪	29-550.2	12	4.5
曲米帕明	13-570	6	9.5
氯丙咪嗪	23-631	14	3.7
氯氮平	104-3000	11	11.8

表8.准确度汇总。

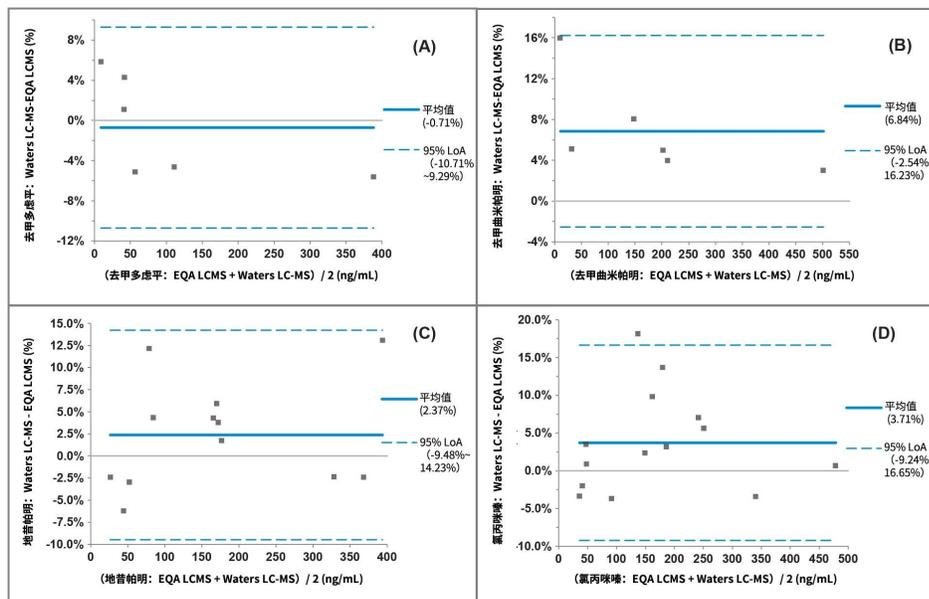


图4. Waters LC-MS/MS方法与EQA方案MS方法平均值比较, 使用Bland-Altman方法分析a)去甲多虑平, b)去甲曲米帕明, c)地昔帕明, d)氯丙咪嗪拟合得到的数据。

结论

- 我们通过一种兼具选择性和稳健性的UHPLC-MS/MS临床研究方法，使用XSelect Premier HSS技术分离同分异构体化合物，成功分析了15种不同极性的三环类抗抑郁药
- 样品前处理和分析非常简单且经济，仅需50 μ L血浆，每次进样用时不到4.5 min
- 该方法的精密度非常出色，无明显的残留或基质效应，并且通过分析EQA样品确认了准确度

参考资料

1. Gillman PK, Tricyclic antidepressant pharmacology and therapeutic drug interactions updated, *British Journal of Pharmacology* (2007) 151, 737–748.

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/513662>>

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

720008285ZH, 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](#)