

# LC-MS/MS测定人血浆中阿米替林的含量

王贤亲<sup>1</sup>, 吴建章<sup>2</sup>, 李艳霞<sup>1</sup>, 张园<sup>1</sup>, 王学宝<sup>1</sup>, 林丹<sup>1</sup>, 叶发青<sup>1\*</sup>

(1. 温州医学院分析测试中心, 温州 325035; 2. 温州医学院药学院, 温州 325035)

**摘要** 目的: 建立检测一种人血浆中阿米替林液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)的方法。方法: 加入地西洋为内标, 血浆中的药物用乙醚液-液萃取去蛋白。采用 Agilent Zorbax SB-C<sub>18</sub> (2.1 mm × 150 mm, 5 μm) 柱, 流动相为甲醇-0.1% 甲酸溶液 (70:30 v/v)。采用电喷雾离子源 (ESI), 正离子检测, 多反应监测 (multiple reaction monitoring MRM) 方式进行定量分析阿米替林, 监测碎片离子峰分别为  $m/z$  233.91 (阿米替林) 和  $m/z$  257.222 (内标)。结果: 血浆中阿米替林检测方法的线性范围为 2.08~1040 ng·mL<sup>-1</sup>, 最低检测限为 0.52 ng·mL<sup>-1</sup>, 平均萃取回收率在 67.5%~75.5% 之间, 日内和日间精密度 RSD 都小于 7%。结论: 本方法简单、灵敏, 可用于临床毒物分析和药物动力学研究。

**关键词:** 液相色谱-串联质谱; 血浆; 阿米替林

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编码: 0254-1793(2009)11-1846-04

## LC-MS/MS determination of amitriptyline in human plasma

WANG Xian-qin<sup>1</sup>, WU Jian-zhang<sup>2</sup>, LI Yan-xia<sup>1</sup>, ZHANG Yuan<sup>1</sup>,  
WANG Xue-bao<sup>1</sup>, LIN Dan<sup>1</sup>, YE Fa-qing<sup>1\*</sup>

(1. Analytical and Testing Center of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China

2. School of Pharmacy of Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China)

**Abstract Objective** To develop an LC-MS/MS method for determination of amitriptyline in human plasma. **Methods** After addition of diazepam as internal standard, liquid-liquid extraction was used to produce a protein-free extract by using ethyl ether. Chromatographic separation was achieved on a Zorbax SB-C<sub>18</sub> (2.1 mm × 150 mm, 5 μm) column with methanol-water containing 0.1% formic acid (70:30 v/v) as mobile phase. Electrospray ionization (ESI) source was applied and operated in positive ion mode. Multiple reaction monitoring (MRM) mode was used to quantify amitriptyline using target fragment ions  $m/z$  233.91 for amitriptyline and  $m/z$  257.222 for the IS. **Results** Calibration plots were linear over the range of 2.08~1040 ng·mL<sup>-1</sup> for amitriptyline in plasma. Limit of detection (LOD) for amitriptyline was 0.52 ng·mL<sup>-1</sup>. Mean extractive recovery of amitriptyline from plasma was in the range of 67.5%~75.5%. RSDs of intra-day and inter-day precision were less than 7%, respectively. **Conclusion** This method is simple and sensitive enough to be used in clinic toxicological analysis and pharmacokinetic research for determination of amitriptyline in human plasma.

**Key words** LC-MS/MS; human plasma; amitriptyline

阿米替林, 为临床最常用的三环类抗抑郁药, 能选择性地抑制中枢突触部位对去甲肾上腺素的再摄取, 其抗抑郁作用相似于丙米嗪, 可使抑郁症患者情绪提高, 对思缓慢、行为迟缓及食欲不振等症状能有所改善。药物过量, 会烦躁不安、谵妄、昏迷, 可出现

严重的抗胆碱能反应或癫痫发作等中毒症状。

测定血中阿米替林含量可采用高效液相色谱法 (HPLC)<sup>[1,2]</sup>、气相色谱/质谱联用色谱法 (GC-MS)<sup>[3]</sup> 和高效液相色谱-串联质谱联用法 (LC-MS/LC-MS/MS)<sup>[4-6]</sup>, 但作者未见国内 LC-MS/MS 测

\* 通讯作者 Tel: (0577) 86689793 E-mail: yf@wzmc.net

定的文献报道。本研究所建立的 LC-MS/MS 法测定血浆中阿米替林浓度,具有灵敏度高、样品前处理简单、准确度高、快速等特点,可用于人血浆中阿米替林的低浓度测定,为阿米替林的临床毒物分析与药代动力学研究提供研究方法。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 德国 Bruker 公司 Esquire HCT 质谱仪,配 ESI(电喷雾离子源),美国 Agilent 1200 HPLC, MWD 检测器。甲醇(德国 Merck 公司),甲酸(色谱纯,美国 Tedia 公司),水(法国 Millipore 超纯水系统),对照品盐酸阿米替林(批号 100518-200401)和地西洋(批号 171225-200302)均来源于中国药品生物制品检定所。空白血浆来自无用药史的健康志愿者(温州医学院附属第一医院), -20℃ 条件下保存。

1.2 分析条件

质谱条件: ESI(电喷雾离子源), 正离子检测,雾化气压力设为 206.85 kPa, 干燥气(N<sub>2</sub>)流速设为 7 L·min<sup>-1</sup>, 干燥气温度设为 350℃。多反应监测(MRM)方式定量,阿米替林 278<sup>+</sup>→233 和 91, 裂解振幅电压设为 0.30 V; 地西洋 285<sup>+</sup>→257 和 222, 裂解振幅电压设为 0.40 V。

色谱条件: 柱温 30℃, 流速 0.3 mL·min<sup>-1</sup>, 色

谱柱为 Zorbax SB-C<sub>18</sub>(2.1 mm × 150 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.1% 甲酸(70:30, v/v), 检测波长 254 nm, 进样量 10 μL。

1.3 溶液的配制 精密称取阿米替林对照品 10.4 mg 甲醇溶解并定容于 10 mL 量瓶中, 得阿米替林的浓度为 1.04 mg·mL<sup>-1</sup> 的对照品储备液, 于 4℃ 冰箱中保存待用, 临用前用甲醇稀释。精密称取地西洋对照品 10.2 mg 用甲醇稀释配制浓度为 1.02 mg·mL<sup>-1</sup> 的地西洋储备液, 置 4℃ 冰箱中保存待用, 临用前用甲醇稀释。

1.4 样品前处理 取含药血浆 0.5 mL, 置 10 mL 具塞刻度离心试管中, 加 1 μg·mL<sup>-1</sup> 的内标地西洋溶液 50 μL, 涡旋振荡 30 s, 加入 1 mol·L<sup>-1</sup> 氢氧化钠溶液 100 μL, 涡旋振荡 30 s, 加乙醚 3 mL, 涡旋振荡 1 min, 3000 r·min<sup>-1</sup> 离心 3 min, 取上清液, 置刻度试管中, 50℃ 空气流吹干。用 200 μL 流动相溶解残渣, 进样 10 μL 进行 LC-MS/MS 分析。

2 实验结果

2.1 方法专属性 本文色谱条件下测得的典型色谱图见图 1, 阿米替林保留时间为 2.1 min, 内标地西洋保留时间为 3.3 min, 考察了 5 份健康人的空白血浆, 血浆中的杂质均不干扰样品峰和内标峰, 且峰形良好。

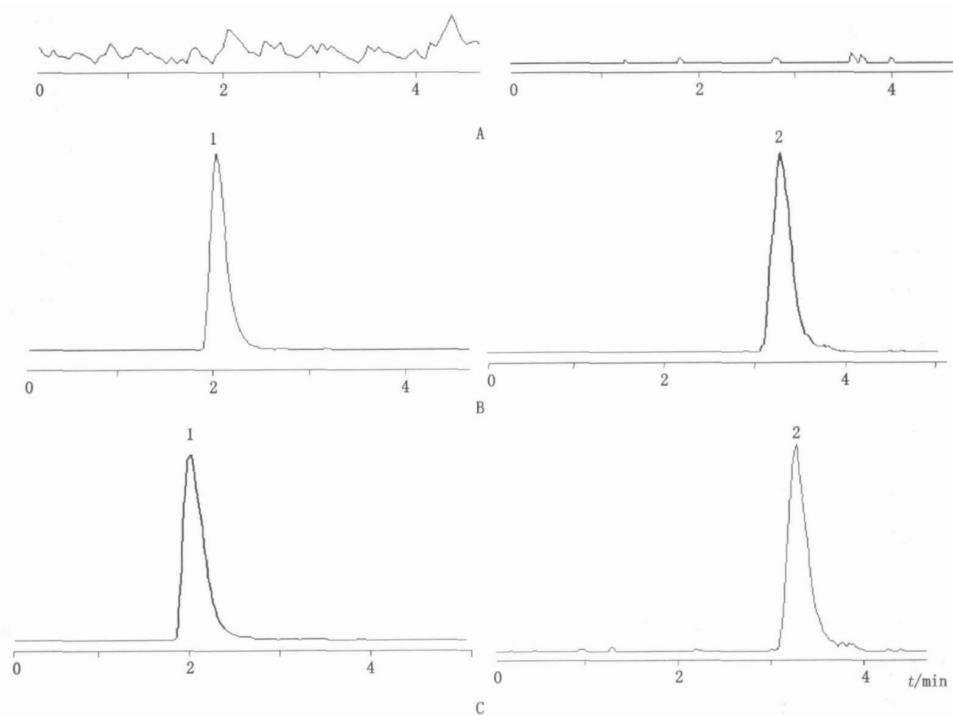


图 1 阿米替林(1)和地西洋(2) LC-MS/MS 色谱图

Fig 1 LC-MS/MS chromatograms of amitriptyline (1) and internal standard diazepam (2)

A. 空白血浆 (blank plasma) B 阿米替林对照品 (104 ng·mL) 和内标血浆 [blank plasma spiked with amitriptyline (104 ng·mL) and internal standard] C. 中毒者血浆 (human plasma after poisoning)

**2.2 监测离子的选择** 图 2显示的是阿米替林和内标地西洋在范围  $m/z$  50~ 400下得到的二级质谱图。阿米替林母离子  $[M + H]^+$   $m/z$  278的主要碎片峰有 233, 191, 155, 91, 由于  $m/z$  233, 91的灵敏度最高, 且样品中没有干扰, 故选用 233和 91作为阿米替林的监测离子。地西洋母离子  $[M + H]^+$   $m/z$  285的主要碎片峰有  $m/z$  257, 222, 193, 154, 105, 因  $m/z$  257, 222灵敏度合适, 故选作地西洋的监测离子。

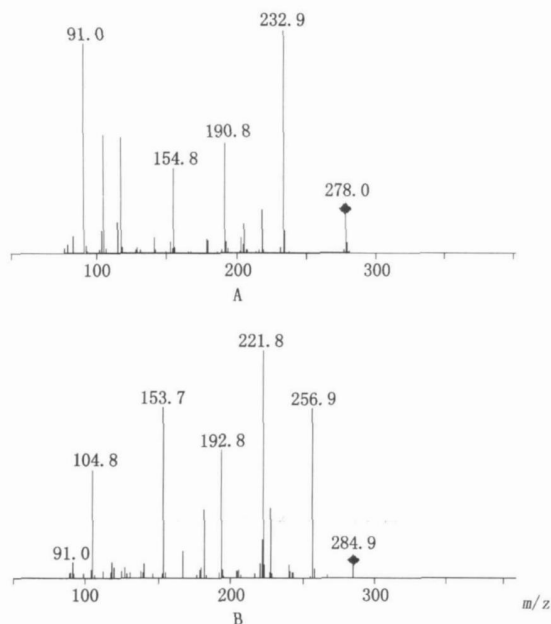


图 2 阿米替林 (A) 和内标地西洋 (B) 的二级质谱图  
Fig 2 The second grade mass spectra of amitriptyline (A) and internal standard diazepam (B)

**2.3 线性关系与检测限** 取空白血浆 0.5 mL 置 10 mL 离心管中, 精密加入不同量的对照品溶液, 配制成含阿米替林浓度分别为 2.08, 10.4, 52, 104, 208, 520, 1040  $ng \cdot mL^{-1}$ , 得 7 个点系列浓度对照品血浆。按照“1.4”项下方法处理后进样 10  $\mu L$ 。记录阿米替林和内标峰面积, 以两者比值  $Y$  对浓度  $C$  进行线性回归, 得线性方程为:

$$Y = 1.523 C + 0.6912 \quad r = 0.9965 (n = 7)$$

血浆中阿米替林浓度在 2.08~ 1040  $ng \cdot mL^{-1}$  范围内线性关系良好。在信噪比  $S/N = 3$  的条件下, 血浆中阿米替林的最低检测限为 0.52  $ng \cdot mL^{-1}$ 。

**2.4 回收率与精密度试验** 取空白血浆 0.5 mL 置 10 mL 离心管中, 精密加入不同量的对照品溶液, 配制成 1040, 104, 10.4  $ng \cdot mL^{-1}$  高、中、低 3 个浓度的对照品血浆, 按照“1.4”项下方法处理, 平行操作 5 份, 以测得的峰面积与相应的浓度对照品溶液峰面

积对比, 计算萃取回收率; 以血浆标准曲线测得量与阿米替林加入量的比值计算方法回收率。分别于当日和连续 5 d 内测定, 计算日内和日间 RSD。结果见表 1。

表 1 阿米替林回收率与精密度测定 ( $n = 5$ )  
Tab 1 Recovery and intra- day and inter- day precision of amitriptyline

$C$ $/ng \cdot mL^{-1}$	平均方法 回收率 (mean method recovery) %	平均萃取 回收率 (mean extraction recovery) %	精密度 (precision), RSD %	
			日内 (intra- day)	日间 (inter- day)
10.4	99.3	67.5	3.5	6.4
104	98.7	72.3	2.4	3.6
1040	101.4	75.5	2.1	2.4

**2.5 稳定性试验**

**2.5.1 融冻条件下的稳定性** 取空白血浆 0.5 mL 置 10 mL 离心管中, 精密加入不同量的对照品溶液配制成 1040, 104, 10.4  $ng \cdot mL^{-1}$  高、中、低 3 种浓度对照品血浆各 5 份, 在 24 h 内 25~ - 20  $^{\circ}C$  之间反复融冻 3 次, 按“1.4”项下方法进行操作, 分别计算阿米替林浓度, 3 者浓度变异均小于 15%, 说明阿米替林在融冻条件下稳定。

**2.5.2 长期稳定性** 配制 1040, 104, 10.4  $ng \cdot mL^{-1}$  高、中、低 3 种浓度对照品血浆各 5 份, 置于 - 20  $^{\circ}C$  考察 20 d 分别于 0, 10, 20 d 按“1.4”项方法操作, 分别计算阿米替林浓度, 3 者浓度变异均小于 15%, 说明阿米替林在 - 20  $^{\circ}C$  条件下保存 20 d 稳定。

**2.5.3 室温条件下稳定性** 配制 1040, 104, 10.4  $ng \cdot mL^{-1}$  高、中、低浓度对照品血浆各 5 份, 室温放置 2 h 按“1.4”项下方法进行操作, 3 者浓度变异均小于 10%。配制 1040, 104, 10.4  $ng \cdot mL^{-1}$  高、中、低浓度对照品血浆各 5 份, 预处理后的阿米替林血浆室温放置 12 h 再进样分析, 3 者浓度变异均小于 15%。

**2.6 临床应用** 2008 年 10 月 20 日, 陈某, 男, 30 岁, 中午 12:00 时, 自服阿米替林 100 片 ( $25 mg \cdot 片^{-1}$ ), 服后渐由昏睡进入昏迷, 昏迷 1 h 后当天下午 15:30 入住本院, 抽血离心, 取血浆 0.5 mL, 按“1.4”项下方法处理后, 进样 10  $\mu L$  进行分析, 结果血浆阿米替林的浓度为 643  $ng \cdot mL^{-1}$ 。

**3 讨论**

**3.1 HPLC 法检测血浆中阿米替林**<sup>[12]</sup> 虽然成本低, 但是有运行时间久、灵敏度不高的缺点, 不适合

于血浆中低浓度的阿米替林的测定。GC-MS法<sup>[3]</sup>样品需气化,前处理比较复杂,检测时间较长,不适合临床快速分析。文献[5]利用短柱(50 mm × 4.6 mm, 5 μm)分析样品,虽然有利于缩短检测时间,但是 1.0 mL·min<sup>-1</sup>的流速,不利于样品的离子化,ESI离子源,最佳流速是 0.2~0.3 mL·min<sup>-1</sup>,高流速不利于离子化,会影响质谱的灵敏度。文献[4,6]采用固相萃取法,虽然处理完的样品较干净,但操作较复杂、费时。本实验采用MRM二级质谱定量,比文献[6]的一级质谱,更具有专一性、准确性。本文建立的LC-MS/MS方法对阿米替林的响应很好,可以排除血浆杂质干扰,具有灵敏度高、样品前处理简单、快速的特点。

3.2 本实验选择内标时,对艾司唑仑、地西洋、硝西洋、氯氮平、氯丙嗪等分别进行了考察。在相同的提取方法和选定的质谱-色谱条件下,艾司唑仑、硝西洋、氯氮平与阿米替林的保留时间太接近,而氯丙嗪的信号太弱。地西洋与被测物提取方法相同,质谱离子化性质相似,峰形良好,与阿米替林分离较好,所以选择它作为内标。

3.3 试验中发现以甲醇作为流动相中的有机溶剂时,阿米替林质谱响应要高于以乙腈为流动相中的有机溶剂时的响应。同时为了提高待测物离子化效率,向流动相系统中加入少量甲酸,当比例为甲醇-0.1%甲酸溶液(70:30)时,阿米替林及内标与内源性杂质充分分离,有效避免了由于沉淀蛋白带来的离子抑制。

3.4 本实验还考察了ESI和APCI 2种模式检测阿米替林灵敏度的差异。在选定的流动相系统下,采

用ESI或APCI方式监测阿米替林,  $[M+H]^+$   $m/z$  278峰较强,因此选择  $[M+H]^+$  峰为母离子。2种方式下产生的二级碎片离子均以  $m/z$  233和91最强,并且响应强度稳定,经过母离子峰和二级离子峰共同优化后发现,在ESI方式下,二级离子的响应强度是APCI方式的2倍,这正是由于2种离子源所具有的不同离子化机制造成的。

#### 参考文献

- 1 LI Jin-heng(李金恒), XU Jin-qiu(许劲秋), CAO Xiao-mei(曹晓梅), et al. Determination of total and free amitriptyline and nortriptyline in human plasma by RP-HPLC(反相高效液相色谱法测定血浆中阿米替林及其代谢物去甲替林的总浓度和游离浓度). *Chin Pharmacol Bull*(中国药理学通报), 2001, 17(1): 104
- 2 Malin WR, Bertucci C, Eugenia M, et al. Reliable HPLC method for therapeutic drug monitoring of frequently prescribed tricyclic and non-tricyclic antidepressants. *J Pharm Biomed*, 2007, 44(4): 955
- 3 Paterson S, Cordero R, Burlinson S. Screening and semi-quantitative analysis of post mortem blood for basic drugs using gas chromatography/ion trap mass spectrometry. *J Chromatogr B*, 2004, 813(1): 325
- 4 Castro A, Concheiro M, Quintela O. LC-MS/MS method for the determination of nine antidepressants and some of their main metabolites in oral fluid and plasma - Study of correlation between venlafaxine concentrations in both matrices. *J Pharm Biomed*, 2008, 48(1): 184
- 5 Kerschherr H, Khrhveh WN. Quantitative determination of forty-eight antidepressants and antipsychotics in human serum by HPLC tandem mass spectrometry: A multi-level single-sample approach. *J Chromatogr B*, 2006, 843(1): 104
- 6 Shinozuka T, Terada M, Tanaka E. Solid-phase extraction and analysis of 20 antidepressant drugs in human plasma by LC/MS with SSI method. *Forensic Sci Int*, 2006, 162(1): 108

(本文于 2008 年 11 月 14 日收到)