中图分类号：R917；R927　　文献标志码：A　　文章编号：1006－4931(2025)10－0075－05
doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2025.10.015

高效液相色谱串联质谱法同时检测人血清中 5 种选择性 5－羟色胺再摄取抑制剂质量浓度*

梁国朝，沈玉双，邓顺顺，高永双△

（广东省中山市第三人民医院，广东 中山 528400）

摘要：目的 建立同时检测人血清中 5 种选择性 5－羟色胺再摄取抑制剂(SSRI)质量浓度的高效液相色谱串联质谱(HPLC－MS/MS)法。**方法** 样本以乙腈蛋白沉淀法处理。色谱柱为 Phenomenex Kinetex XB－C_{18}柱(50 mm×3.0 mm，2.6 μm)，流动相为 0.1% 甲酸水溶液－甲醇(梯度洗脱)，流速为 0.4 mL/min，柱温为 45 ℃，进样量为 5 μL；采用多反应监测模式进行正离子扫描。内标为帕罗西汀－D4、氟西汀－D5、去甲氟西汀－D5、舍曲林－D3、西酞普兰－D6。**结果** 帕罗西汀质量浓度在 15.0～640.0 ng/mL、氟西汀、去甲氟西汀均在 10.0～1 280.0 ng/mL、舍曲林、艾司西酞普兰均在 2.5～320.0 ng/mL 范围内与峰面积线性关系良好(R^2>0.99)，定量下限分别为 5.0，10.0，10.0，2.5，2.5 ng/mL；日内与日间精密度试验结果的 *RSD* 均<15%(n=18)；提取回收率为 95.59%～103.99%(n=18)，*RSD* 均<5%(n=18)；质控样本在室温放置 24 h、反复冻融 5 次、－80 ℃保存 30 d 条件下，含量均为 85%～115%，基质效应的 *RSD* 均<15%(n=9)。**结论** 建立的方法操作简便快捷、灵敏度高、专属性好，可用于上述 5 种 SSRI 的血药浓度监测。

关键词：高效液相色谱串联质谱法；帕罗西汀；氟西汀；去甲氟西汀；舍曲林；艾司西酞普兰；治疗药物监测

Simultaneous Determination of Mass Concentrations of Five Selective Serotonin Reuptake Inhibitors in Human Serum by HPLC－MS/MS

LIANG Guochao, SHEN Yushuang, DENG Shunshun, GAO Yongshuang

(Zhongshan Third People's Hospital, Zhongshan, Guangdong, China 528400)

Abstract: Objective To establish a high－performance liquid chromatography－tandem mass spectrometry(HPLC－MS/MS) method for five selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) in human serum. **Methods** Human serum samples were treated by acetonitrile protein－precipitation method. The chromatographic column was Phenomenex KinetexXB－C_{18} column (50 mm×3.0 mm, 2.6 μm), the mobile phase was 0.1 % formic acid aqueous solution－methanol (gradient elution), the flow rate was 0.4 mL/min, the column temperature was 45 ℃, and the injection volume was 5 μL. The positive－mode ion scanning was performed by using a multiple reaction monitoring mode. The paroxetine－D4, fluoxetine－D5, norfluoxetine－D5, sertraline－D3 and citalopram－D6 were used as internal standards. **Results** The mass concentration range of paroxetine was 15.0－640.0 ng/mL, fluoxetine and norfluoxetine were both within 10.0－1 280.0 ng/mL, sertraline and escitalopram were were both within 2.5－32.0 ng/mL, respectively showed a good linear relationship between the range and peak area (R^2>0.99). The lower limits of quantification were 5.0, 10.0, 10.0, 2.5, 2.5 ng/mL, respectively. The *RSDs* of intra－day and inter－day precision tests were lower than 15 % (n=18). The extraction recovery was in the range of 95.59 %－103.99% (n=18), and *RSDs* was lower than 5 % (n=18). The quality control samples were stored at room temperature for 24 hours, repeated freezing and thawing for five times, and stored at －80 ℃ for 30 days. The content was in the range of 85 %－115 %, and the *RSDs* of matrix effect were lower than 15 % (n=9). **Conclusion** The established method is simple, rapid, highly sensitive and good specific, and can be used for the blood drug concentration monitoring of the above five SSRIs.

Key words: HPLC－MS/MS; paroxetine; fluoxetine; norfluoxetine; sertraline; citalopram; therapeutic drug monitoring

抑郁症是一种高发和高复发率的精神障碍，会导致持续性的情绪低落和兴趣丧失，病情严重的患者可能存在自伤、自杀行为[1]，给患者及其家庭带来沉重的负担。长期规范的药物应用是治疗抑郁症的重要手段[2]。帕罗西汀、氟西汀、舍曲林及艾司西酞普兰等选择性 5－羟色胺再摄取抑制剂(SSRI)是临床治疗抑郁症的一线药物[3]。去甲氟西汀是氟西汀在体内的活性代谢产物，可发挥抗抑郁作用。研究表明，与三环类抗抑郁药物和单胺氧化酶抑制剂相比，SSRI 在临床疗效、药物耐受性及安全性方面具有明显优势[4]。在患者服药依从

*基金项目：广东省中山市医学科研项目[2022A020286]。

第一作者：梁国朝，男，大学本科，主管技师，研究方向为治疗药物监测，(电子信箱)lgc0309047@126.com。

△通信作者：高永双，男，硕士研究生，主任药师，研究方向为精神药理学，(电子信箱)409632800@qq.com。

性难以判断、药物耐受性欠佳、常规治疗剂量下疗效欠佳或存在药物间相互作用情况下，以及对于儿童、青少年、妊娠期女性、老年人、精神疾病患者等特殊人群，治疗药物监测（TDM）对制订给药方案、降低用药成本和药品不良反应发生率有重要意义[5-8]。但目前鲜见同时检测人血清中多种SSRI质量浓度的方法。为此，本研究中建立了一种可同时检测人血清中帕罗西汀、氟西汀、去甲氟西汀、舍曲林及艾司西酞普兰质量浓度的高效液相色谱串联质谱（HPLC-MS/MS）法。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

HPLC-MS/MS-8040型岛津液相色谱三重四极杆质谱联用仪，包括DGU-20A3R型自动脱气机，LC-20AD型二元高压泵，SIL-20AHT-UFLC型自动进样器，CTO-20A型可调柱温箱（日本Shimadzu公司）；BT25S型电子天平（德国Sartorius公司，精度为0.01 mg）；XYB-H型普通分析级纯水机（北京湘顺源科技有限公司）；DW-HL 340型超低温冰箱（合肥中科美菱低温科技有限公司）；5424R型低温高速离心机、ThermoMixer F1.5型恒温混匀仪、Xplorer型电动连续分液器、Researchplus型移液器，均购自德国Eppendorf公司。

1.2 试药

盐酸帕罗西汀对照品（批号为201804，含量97.5%），盐酸氟西汀对照品（批号为201602，含量99.3%），盐酸舍曲林对照品（批号为201602，含量99.8%），草酸艾司西酞普兰（西酞普兰左旋体）对照品（批号为201802，含量99.4%），均购自中国食品药品检定研究院；去甲氟西汀对照品（批号为1-SGP-164-1，含量99.1%），帕罗西汀-D4（批号为9-RJH-142-1，含量99.5%），氟西汀-D5（批号为21-ABY-42-1，含量99.4%），去甲氟西汀-D5（批号为7-TAH-178-1，含量99.2%），舍曲林-D3（批号为8-MJC-182-1，含量99.6%），西酞普兰-D6（批号为1-FLI-6-1，含量99.5%），均购自加拿大Toronto Research Chemicals公司；甲醇、乙腈均为色谱纯，水为纯化水。

1.3 空白血清

来源于本课题组成员的血液，离心，得血清，于-20 ℃贮藏。

2 方法与结果

2.1 试验条件

2.1.1 色谱条件

色谱柱：Phenomenex Kinetex XB-C_{18}柱（50 mm×3.0 mm，2.6 μm）；流动相：0.1%甲酸水溶液（A）-甲醇（B），梯度洗脱（0~1 min时25%B，1~1.1 min时25%B→60%B，1.1~2.0 min时60%B→90%B，2.0~3.2 min时90%B，3.2~3.25 min时90%B→25%B，3.25~4.5 min时25%B）；流速：0.4 mL/min；柱温：45 ℃；进样量：5 μL。

2.1.2 质谱条件

采用多反应监测模式（MRM）扫描，电喷雾电离（ESI）正离子模式；接口电压：4.0 kV；DL管温度：200 ℃；加热模块温度：450 ℃；雾化气流速：3 L/min；干燥气流速：20 L/min；碰撞气：氩气。待测药物及其同位素内标质谱参数见表1（CE为碰撞电压）。

表1 待测药物及其同位素内标质谱参数

Tab. 1 MS parameters of the analytes and its corresponding isotopic internal standard

待测成分	前体离子（m/z）	产物离子（m/z）	Q1pre偏差（V）	CE	Q3pre偏差（V）
帕罗西汀	330.10	192.10	-23.0	-15.0	-28.0
帕罗西汀-D4	334.23	196.12	-24.0	-15.0	-30.0
氟西汀	310.10	148.10	-22.0	-14.0	-16.0
氟西汀-D5	314.90	153.18	-22.0	-13.0	-16.0
去甲氟西汀	296.20	134.12	-15.0	-7.0	-13.0
去甲氟西汀-D5	300.80	139.10	-16.0	-7.0	-13.0
舍曲林	305.97	158.97	-15.0	-20.0	-15.0
舍曲林-D3	309.00	158.86	-15.0	-20.0	-15.0
艾司西酞普兰	325.10	109.03	-15.0	-30.0	-20.0
西酞普兰-D6	330.97	108.96	-15.0	-30.0	-20.0

2.2 溶液制备及样本前处理

对照品溶液：取5种对照品各适量，根据对照品的组分及含量进行质量校正，用50%甲醇溶解，分别制成质量浓度为1 mg/mL的单一对照品溶液。

系列对照品溶液与质控样品溶液：按预设质量浓度分别取单一对照品溶液适量，用空白血清逐级稀释，混匀，分装成每管100 μL，制成系列对照品溶液，其中帕罗西汀质量浓度分别为5，10，20，40，80，160，320，640 ng/mL，氟西汀及去甲氟西汀均分别为10，20，40，80，160，320，640，1 280 ng/mL，舍曲林及艾司西酞普兰均分别为2.5，5，10，20，40，80，160，320 ng/mL。同法制备低、中、高质量浓度的质控样品溶液，其中帕罗西汀质量浓度分别为25，50，500 ng/mL，氟西汀及去甲氟西汀均分别为50，200，1000 ng/mL，舍曲林分别为10，80，250 ng/mL，艾司西酞普兰分别为15，65，250 ng/mL。

混合内标溶液：取5种内标各适量，用50%甲醇分别制成质量浓度均为1 mg/mL单一内标贮备液；取适量，用50%甲醇制成帕罗西汀-D4、氟西汀-D5、去甲氟西汀-D5、舍曲林-D3、西酞普兰-D6质量浓度分别为200，500，500，200，200 ng/mL的混合内标溶液。

样品前处理：采用乙腈蛋白沉淀法。取待处理溶液各100 μL，置1.5 mL离心管中，加混合内标溶液20 μL，混匀，加乙腈500 μL，振荡混匀1 min，涡旋5 min，4 ℃下15 000 r/min离心10 min，即得。

2.3 方法学考察

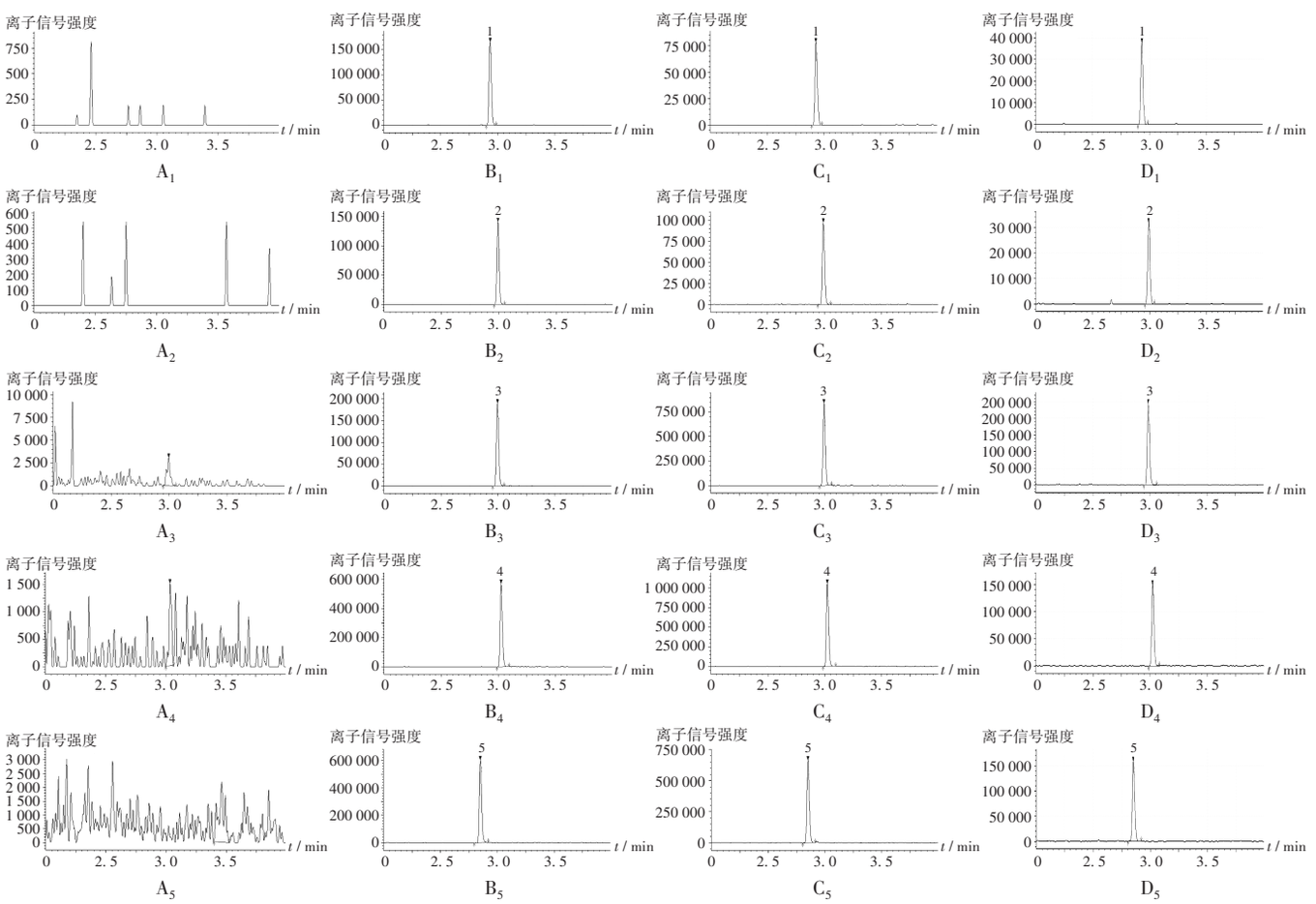
专属性试验：取空白血清 100 μL，共 4 份，分别取空白血清、加对照品、加内标、用药后血清各适量，按 2.2 项下方法处理，按 2.1 项下试验条件进样测定，记录色谱图。结果帕罗西汀、氟西汀、去甲氟西汀、舍曲林及艾司西酞普兰保留时间分别为 2.93，2.99，3.00，3.02，2.85 min；帕罗西汀 - D4、氟西汀 - D5、去甲氟西汀 - D5、舍曲林 - D3、西酞普兰 - D6 保留时间分别为 2.93，2.99，3.02，3.02，2.85 min。离子色谱图见图 1。可见各样品单峰明确，峰面积能有效计算，出峰时间差异显著；血清中基质对分析物和内标干扰不明显，目标专属性测定信号清晰稳定，信噪比高。

线性关系考察与定量下限确定：取 2.2 项下系列对照品溶液，按 2.1 项下试验条件测定。以待测成分质量浓度（X，ng / mL）为横坐标、峰面积与内标峰面积的比值（Y）为纵坐标，采用加权（$1 / X^2$）最小二乘法进行回归拟合，以线性范围的最低点为定量下限。结果见表 2。

表 2 线性关系与定量下限考察结果

Tab. 2 Linear relationship investigation and lower limit of quantitation determination results

待测成分	回归方程	R^2	线性范围（ng / mL）	定量下限（ng / mL）
帕罗西汀	$Y_1 = 0.010\,3X_1 + 0.014\,1$	0.995 1	5.0 ~ 640.0	5.0
氟西汀	$Y_2 = 0.004\,8X_2 - 0.013\,5$	0.995 3	10.0 ~ 1 280.0	10.0
去甲氟西汀	$Y_3 = 0.007\,1X_3 + 0.008\,5$	0.994 7	10.0 ~ 1 280.0	10.0
舍曲林	$Y_4 = 0.006\,7X_4 + 3.160\,9$	0.995 0	2.5 ~ 320.0	2.5
艾司西酞普兰	$Y_5 = 0.011\,5X_5 + 0.005\,9$	0.994 3	2.5 ~ 320.0	2.5



1. 帕罗西汀　2. 氟西汀　3. 去甲氟西汀　4. 舍曲林　5. 艾司西酞普兰

A_1 - A_5. 空白血清　B_1 - B_5. 空白血清 + 对照品（帕罗西汀、氟西汀、去甲氟西汀、舍曲林、艾司西酞普兰）　C_1 - C_5. 空白血清 + 内标（帕罗西汀 - D4、氟西汀 - D5、去甲氟西汀 - D5、舍曲林 - D3、西酞普兰 - D6）　D_1 - D_5. 用药后血清（帕罗西汀、氟西汀、去甲氟西汀、舍曲林、艾司西酞普兰）+ 内标（帕罗西汀 - D4、氟西汀 - D5、去甲氟西汀 - D5、舍曲林 - D3、西酞普兰 - D6）

图 1 离子色谱图

1. Paroxetine　2. Fluoxetine　3. Norfluoxetine　4. Sertraline　5. Escitalopram

A_1 - A_4. Blank serum　B_1 - B_4. Blank serum + reference serum (paroxetine, fluoxetine, norfluoxetine, sertraline, escitalopram, respectively)　C_1 - C_4. Blank serum + internal standard (paroxetine - D4, fluoxetine - D5, norfluoxetine - D5, sertraline - D3 and citalopram - D6, respectively)　D_1 - D_4. Serum after medication (paroxetine, fluoxetine, norfluoxetine, sertraline, escitalopram, respectively) + internal standard (paroxetine - D4, fluoxetine - D5, norfluoxetine - D5, sertraline - D3 and citalopram - D6, respectively)

Fig. 1 Ion chromatography

精密试验与回收试验：按2.2项下方法分别制备低、中、高质量浓度的质控样品溶液，按2.1项下试验条件进样测定，记录峰面积并计算含量，每天1批，连续测定3 d，共获得270个测定数据，计算批内与批间精密度。取空白血清适量，加入不同质量浓度的单一对照品溶液，制备低、中、高质量浓度的供试品溶液各6份，按2.1项下试验条件进样测定，记录峰面积，计算提取回收率。详见表3。

表3 精密度试验与回收试验结果（n = 18）

Tab. 3 Results of precision test and recovery test（n = 18）

待测成分	质量浓度	批内精密度		批间精密度		提取回收率(%)	
	(ng/mL)	$\bar{X}$(ng/mL)	RSD(%)	$\bar{X}$(ng/mL)	RSD(%)	$\bar{X}$	RSD(%)
帕罗西汀	25	24.81	7.68	24.49	8.88	101.12	3.47
	40	40.70	5.55	40.80	8.03	101.50	2.92
	500	484.39	8.67	516.73	9.22	98.99	2.15
氟西汀	50	48.82	9.73	45.19	10.00	103.99	4.21
	200	194.59	6.06	190.26	8.58	102.65	2.83
	1 000	971.19	3.80	927.69	7.14	98.83	2.36
去甲氟西汀	50	52.54	4.12	49.19	8.67	97.05	3.91
	200	202.42	2.16	195.83	4.54	97.86	1.63
	1 000	1 016.82	2.27	972.15	4.15	95.59	2.74
舍曲林	10	9.99	6.47	9.54	7.61	100.52	2.38
	80	71.86	3.53	72.00	3.75	97.93	1.91
	250	250.27	1.50	243.70	2.91	102.03	3.73
艾司西酞普兰	15	15.04	4.17	14.54	4.80	97.44	1.67
	60	54.97	4.04	54.65	4.42	96.14	2.63
	250	242.23	2.61	244.10	3.40	96.35	2.64

稳定性试验：按2.2项下方法分别制备低、中、高质量浓度的质控样品溶液，于室温放置24 h、反复冻融5次、－80 ℃保存30 d条件下按2.1项下试验条件进样测定，记录峰面积，并计算含量。结果5种成分含量均为85%～115%，RSD均小于15%（n = 9），表明血清质控样品溶液放置稳定性和反复冻融稳定性良好。

2.4 基质效应

取6份不同来源的空白血清，按2.2项下方法处理，各制备6个空白血清样品，共两组，每组3份，分别加入低、高质量浓度的混合对照品溶液5 μL和混合内标溶液20 μL，涡旋振荡10 s，15 000 r/min离心5 min，取上清液100 μL，进样，获得MA。另取95 μL甲醇2份，各加入低、高质量浓度的对照品溶液5 μL、混合内标溶液20 μL和乙腈0.5 mL，涡旋振荡10 s，取混合液100 μL，进样，获得MB。基质效应(%) = MA/MB × 100%。5种成分结果的RSD均小于15%（n = 6），表明在使用同位素内标的条件下，存在的基质效应对测定结果无明显影响，不影响目标成分的准确定量，方法稳定性良好。

3 讨论

精神科TDM常用方法包括免疫化学法、光谱法、色谱法等，因操作烦琐、检测性能欠佳等原因逐渐不能满足临床需求[9]。随着液相色谱－质谱联用技术的普及，LC－MS/MS法因结合了色谱技术的高分离能力及质谱技术的高灵敏度、高特异性、高通量等优势，近年来广泛应用于精神科TDM领域[10]。但目前可供选择的商品化试剂较少，LC－MS/MS法难以标准化，实验室需根据临床需求自建LC－MS/MS法。自建的LC－MS/MS法需通过严格系统的性能评估后才能应用于临床检测。目前，已有自建LC－MS/MS法性能评估的指导文件可供参考[11－15]。

本研究中建立了一种可以同时检测人血清中5种选择性5－羟色胺再摄取抑制剂的HPLC－MS/MS法，具有较高的特异性和灵敏度，检测速度快，可用于服用相关药物患者的血药浓度检测。与使用有机溶剂进行液－液萃取的样本处理方法相比，乙腈蛋白沉淀法操作简单、步骤少，具有更高的处理效率，可实现大量样品的快速处理。本研究中帕罗西汀、氟西汀、去甲氟西汀、舍曲林及艾司西酞普兰的定量限分别为5.0，10.0，10.0，2.5，2.5 ng/mL，可满足临床低浓度样本的检测要求。同位素内标因与待测物具有相似的色谱特征和离子化特征，降低了因基质效应对测定结果的影响，提高了测定的准确性。各药物测定的精密度、回收率及稳定性试验结果均符合验证要求，表明该方法准确、稳定性较好。利用HPLC－MS/MS法的高特异性及高通量特点，通过制备混合定标样品及质控样品，一次进样即可同时对多种药物进行定量分析，达到多种药物快速定量的目的。未来可根据临床需求，开发出更多的精神科药物TDM方案，以提高效率和检测质量，满足血药浓度监测的要求。

参考文献

[1] LAMERS F, MILANESCHI Y, SMIT JH, et al. Longitudinal Association Between Depression and Inflammatory Markers: Results From the Netherlands Study of Depression and Anxiety[J]. Biol Psychiatry, 2019, 85(10): 829－837.

[2] 李凌江，马 辛. 中国抑郁障碍防治指南(第二版)解读：概述[J]. 中华精神科杂志，2017，50(3)：167－168.

[3] 武小玲，王森岩，赵思俊，等. 选择性5－羟色胺再摄取抑制剂联合用药治疗难治性抑郁症研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志，2022，36(10)：776－782.

[4] 黄善情，肖 桃，谢焕山，等. 基于治疗药物监测选择性5－羟色胺再摄取抑制剂超警戒浓度原因分析[J]. 广东药科大学学报，2020，36(6)：854－857.

[5] 路守靖，羊志勇，焦华丹. 比较艾司西酞普兰和帕罗西汀对抑郁症患者的效果和不良反应[J]. 国际精神病学杂志，2022，49(5)：822－825.

[6] 张 侠. 氟西汀、阿米替林治疗抑郁症的疗效和不良反应的分析[J]. 临床医药文献电子杂志，2019，95(6)：144.