

LC-MS/MS法和MEIA法测定人血浆中地高辛浓度的差异比较[△]

白万军^{1*},宋浩静¹,孙晓利²,安静¹,赫立恩¹,邱志宏¹,马杰¹,郭彩会¹,董占军^{1#}(1.河北省人民医院,石家庄050051;2.河北医科大学第四医院,石家庄050051)

中图分类号 R969.1;R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)05-0604-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.05.09

摘要 目的:比较液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法与微粒子酶联免疫(MEIA)法测定人血浆中地高辛浓度的差异。方法:分别采用LC-MS/MS法与MEIA法对质控样品及50例患者血浆样品中的地高辛浓度进行检测,采用配对 t 检验比较分析两种方法的检测结果。结果:质控样品检测结果显示,两种方法检测结果间的差异无统计学意义($P>0.05$);50例患者血浆样品检测结果显示,MEIA法检测结果明显高于LC-MS/MS法,两者差异有统计学意义($P<0.01$)。结论:MEIA法检测结果与临床实际情况相比存在一定的差异,LC-MS/MS法更适于临床地高辛血药浓度的检测。

关键词 地高辛;微粒子酶联免疫法;液相色谱-串联质谱法;血药浓度

Comparison of LC-MS/MS and MEIA for the Determination of Digoxin Concentration in Human Plasma

BAI Wanjun¹, SONG Haojing¹, SUN Xiaoli², AN Jing¹, HE Lien¹, QIU Zhihong¹, MA Jie¹, GUO Caihui¹, DONG Zhanjun¹ (1.Hebei Provincial People's Hospital, Shijiazhuang 050051, China; 2.Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050051, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To compare the methods of LC-MS/MS and MEIA for the determination of digoxin concentrations in human plasma. METHODS: The concentration of digoxin in standard controls and samples from 50 patients were respectively determined by LC-MS/MS and MEIA methods, and the results obtained by the two methods were analyzed using paired t test. RESULTS: There was no statistical difference between the data of standard controls by LC-MS/MS and MEIA methods ($P>0.05$). However, the results of 50 samples from patients showed that MEIA data were significantly higher than LC-MS/MS data, there was statistically significant difference ($P<0.01$). CONCLUSIONS: There is considerable variation between MEIA data and practical data. Compared with the MEIA, LC-MS/MS is more suitable for clinical determination of digoxin plasma concentration.

KEYWORDS Digoxin; MEIA; LC-MS/MS; Plasma concentration

地高辛为洋地黄类强心苷,临床上广泛应用于慢性心力衰竭及心律失常等心脏疾病的一线治疗。其有效血药浓度范围为0.50~2.00 ng/ml, $t_{1/2}$ 约为32~48 h,具有治疗指数低、治疗窗窄、个体差异大、体内代谢缓慢、长期应用易发生蓄积等特点,其疗效易受患者年龄、肝/肾功能、疾病类型、药物相互作用等因素的影响^[1-3]。因此,对地高辛血药浓度进行临床监测有利于维持其有效治疗浓度、预防药物中毒、提高治疗效果、降低药品不良反应发生率,是目前临床医师及患者普遍认可的有效手段。地高辛血药浓度的常用测定方法有微粒子酶联免疫(MEIA)法、液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法等^[4]。然而,有研究发现,同一份样品采用不同的测定方法,其结果存在一定差异,给临床监测的结果解读和个体化治疗带来了极大的困难^[5]。目前,对于LC-MS/MS法和MEIA法的差异性比较尚无相关报道,故本研究考察了这两种血药浓度检测方法

的差异性,以为临床治疗药物监测和地高辛的合理使用提供依据。

1 材料

1.1 仪器

Abbott AxSYM System全自动生化分析仪(美国雅培制药有限公司);AB Sciex Triple QuadTM 5500型高效液相色谱-质谱联用仪(美国应用生物系统公司);Toled AB204-S型电子分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);Universal 16R型低温高速离心机(德国Hettich公司);XW-80A型旋涡混合器(上海精科实业有限公司);KQ3200E型医用超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

地高辛对照品(北纳创联生物技术研究院,批号:130629,纯度 $\geq 98\%$);洋地黄毒苷对照品(内标,德国Dr.Ehrenstorfer公司,批号:00118,纯度:99.0%);地高辛标准曲线试剂盒(批号:25548M500)、地高辛质控试剂盒(批号:18467M500)、地高辛检测试剂盒(批号:23406M500)均购自美国雅培制药有限公司;甲醇、甲酸铵为色谱纯,水为纯净水;空白血浆由河北省人民医院体检中心提供。

2 方法与结果

[△] 基金项目:河北省2013年医学科学研究重点课题计划项目(No.20130409)

* 主管药师,硕士。研究方向:临床药学。电话:0311-85988640。E-mail:baiwanjun0311@163.com

通信作者:主任药师,硕士生导师。研究方向:临床药学。电话:0311-85988604。E-mail:13313213656@126.com

2.1 LC-MS/MS法

2.1.1 色谱与质谱条件 色谱柱: Waters Symmetry C₁₈(150 mm×2.1 mm, 5 μm); 流动相: 5 mmol/L 甲酸铵水溶液(A)-5 mmol/L 甲酸铵甲醇溶液(B), 梯度洗脱(洗脱程序见表1); 流速: 0.3 ml/min; 柱温: 40 °C; 进样量: 10 μl。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution progress

t, min	A, %	B, %
0.1	40	60
1.0	25	75
3.0	5	95
4.0	5	95
4.1	40	60
6.0	Stop	Stop

离子源: 电喷雾离子源(ESI); 离子极性: 正离子(Positive); 离子检测方式: 多离子反应监测(MRM); 气帘气(CUR)压力: 30 psi; 碰撞气(CAD)压力: 6 psi; 离子源喷射电压(IS): 5 500 V; 离子源温度: 350 °C; 源内气体1(Gas 1, N₂)压力: 50 psi; 气体2(Gas 2, N₂)压力: 50 psi。用于定量分析的离子对分别为 *m/z* 798.4→651.4[地高辛, 解簇电压(DP): 100 V, 碰撞能量(CE): 20 eV]、*m/z* 782.4→635.4(内标, DP: 100 V, CE: 16 eV)。地高辛及内标的一级、二级质谱图见图1。

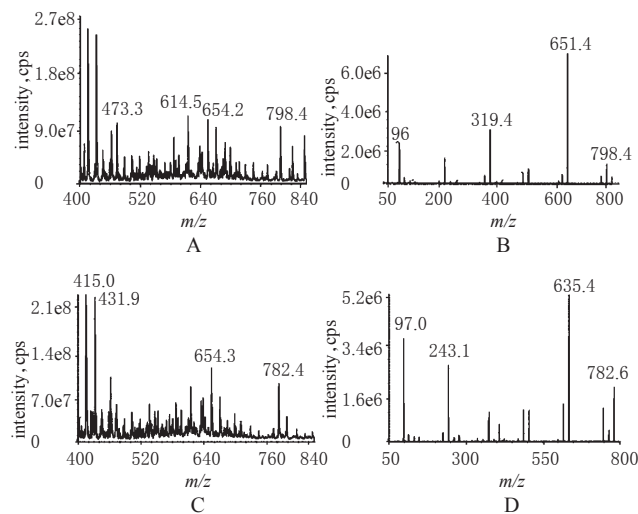


图1 一级、二级质谱图

A. 地高辛的一级质谱图; B. 地高辛母离子的二级质谱图; C. 内标的一级质谱图; D. 内标母离子的二级质谱图

Fig 1 Precursor ion and product ion mass spectra

A. precursor ion mass spectra of digoxin; B. product ion mass spectra of digoxin; C. precursor ion mass spectra of internal standard; D. product ion mass spectra of internal standard

2.1.2 溶液的配制 精密称取地高辛对照品 11.2 mg, 置于 100 ml 量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 摇匀, 得质量浓度为 0.11 mg/ml 的地高辛标准溶液, 置冰箱 4 °C 保存, 备用。

精密称取内标对照品 19.0 mg, 置于 100 ml 量瓶中, 加甲醇溶解并定容, 得质量浓度为 0.19 mg/ml 的内标贮备液, 再用甲醇稀释得所需质量浓度的内标溶液, 置冰箱 4 °C 保存, 备用。

2.1.3 血浆样品的处理 精密吸取血浆 500 μl, 置于 10 ml 试管中, 分别加入内标溶液(质量浓度为 9.50 ng/ml)和 0.1% 氢氧化钠溶液各 50 μl, 涡旋 1 min, 加入提取液[乙酸乙酯-正己烷-二氯甲烷(3:1:1, V/V/V)] 4 ml, 涡旋 3 min, 以 1.37×10³×g、3 500

r/min 离心 5 min, 取上清液, 于 40 °C 恒温水浴中以氮气流吹干, 用流动相 200 μl 复溶, 以 1.61×10⁴×g、12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液 10 μl 进样测定。

2.1.4 专属性考察 在“2.1.1”条件下, 地高辛与内标均具有较好的离子响应度及分离度, 其保留时间分别约为 2.55、3.62 min, 血浆中内源性物质不干扰样品峰的测定, 表明该方法专属性良好。LC-MS/MS 图谱见图 2。

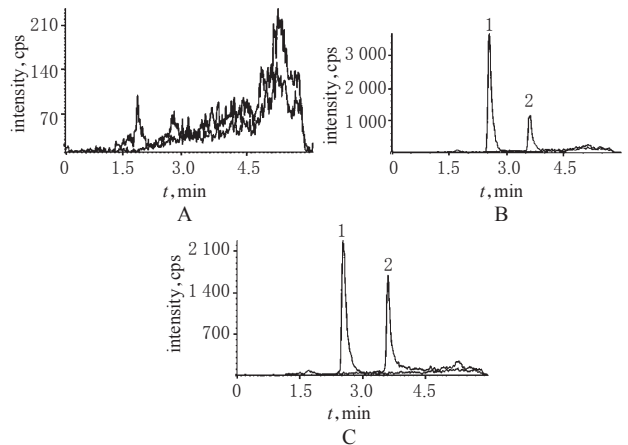


图2 LC-MS/MS 图谱

A. 空白血浆; B. 空白血浆+地高辛标准溶液(1.10 ng/ml)+内标溶液; C. 患者血浆+内标溶液; 1. 地高辛; 2. 内标

Fig 2 LC-MS/MS chromatograms

A. blank plasma; B. blank plasma + digoxin (1.10 ng/ml) + internal standard; C. patient plasma sample + internal standard; 1. digoxin; 2. internal standard

2.1.5 标准曲线的绘制与定量下限的考察 精密吸取地高辛标准溶液适量, 置于 10 ml 试管中, 分别加入空白血浆 450 μl, 涡旋 3 min, 配制成地高辛质量浓度分别为 0.05、0.22、0.55、1.10、2.20、5.50、10.10 ng/ml 的血浆样品, 按“2.1.3”项下方法处理后, 进样测定, 记录色谱峰面积。以地高辛峰面积与内标峰面积比值(*y*)为纵坐标、地高辛质量浓度(*x*)为横坐标进行线性回归(权重因子 1/*x*²), 得回归方程为 $y = 2.39x + 0.0842$ ($R^2 = 0.9974, n = 5$)。结果表明, 地高辛血药浓度在 0.05~10.10 ng/ml 范围内线性关系良好。

取空白血浆适量, 加入地高辛标准溶液适量, 配制成地高辛质量浓度为 0.05 ng/ml 的血浆样品, 按“2.1.3”项下方法处理后, 进样分析, 据当日标准曲线计算测得浓度。结果表明, 在定量下限浓度下, 该方法的准确度在真实浓度的 80%~120% 范围内, RSD 为 10.40%, 可满足地高辛血药浓度临床监测的需求。

2.1.6 精密度与准确度试验 分别配制地高辛低、中、高质量浓度(0.11、1.10、8.80 ng/ml)的血浆样品, 按“2.1.3”项下方法操作, 每浓度取 5 样本分析, 连续测定 3 d, 据当日标准曲线计算各样品的测得浓度, 考察方法的精密度和准确度。结果显示, 该方法的日内、日间 RSD 和相对偏差(RE)绝对值均 < 15%, 表明该方法精密度良好。精密度和准确度试验结果见表 2。

2.1.7 基质效应与提取回收率考察 取 6 批空白血浆适量, 分别配制低、中、高质量浓度(0.11、1.10、8.80 ng/ml)的血浆样品, 按“2.1.3”项下方法操作, 每浓度取 3 样本分析, 得相应峰面积(A); 同时, 按“2.1.3”项下方法处理空白血浆后, 加入相应浓度的地高辛标准溶液, 使终浓度与前者浓度相对应, 每质量浓度

表2 精密度和准确度试验结果($\bar{x} \pm s, n=5$)

批次	加入质量浓度,ng/ml	测得质量浓度,ng/ml	RSD, %	RE, %
日内	0.11	0.10 ± 0.01	6.98	-2.76
	1.10	1.01 ± 0.11	10.58	0.68
	8.80	8.13 ± 0.34	4.13	1.68
日间	0.11	0.10 ± 0.01	7.18	-9.09
	1.10	1.01 ± 0.08	7.61	-8.18
	8.80	8.08 ± 0.35	4.38	-8.18

取3样本分析,得相应峰面积(B)。取低、中、高质量浓度(0.11、1.10、8.80 ng/ml)地高辛标准溶液,每质量浓度取3样本分析,得相应峰面积(C)。按公式:基质因子(MF%)=B/C×100%、归一化基质因子(%)=MF_{地高辛}/MF_{内标}×100%、提取回收率(%)=A/B×100%计算。结果显示,各质量浓度样品及内标的基质因子分别为68.25%、67.47%、64.16%、67.05%,RSD<10%;各质量浓度样品的归一化基质因子分别为101.93%、100.64%、95.84%,RSD<10%;各质量浓度样品及内标的提取回收率分别为67.07%、72.31%、69.41%、67.20%,RSD<10%。

2.1.8 稳定性试验 分别配制低、中、高质量浓度(0.11、1.10、8.80 ng/ml)的血浆样品,考察其在室温放置8 h、冷冻-解冻循环3次、-20℃放置7 d的稳定性。结果显示,各质量浓度样品的RE为-6.24~-1.55,RSD<10%,表明地高辛血浆样品在上述条件下稳定。

2.2 MEIA法

2.2.1 MEIA法标准曲线的建立 按Abbott Axsym System全自动生化分析仪的标准操作规范及试剂使用说明书操作,用地高辛标准曲线试剂盒建立标准曲线。分别取0、0.50、1.00、2.00、3.00、4.00 ng/ml的标准溶液适量,进样测定。结果显示,标准曲线符合Axsym System生化分析仪接受标准。

2.2.2 MEIA法的质量控制 对低、中、高质量浓度(0.90、1.90、3.20 ng/ml)室内质控样品进行考察。结果显示,所有实测质量浓度均在其说明书规定的范围之内,RE为5.31%~12.22%。室内质控样品测定结果见表3。

表3 室内质控样品测定结果

Tab 3 Determination results of the assay internal quality control samples

加入质量浓度,ng/ml	实测质量浓度,ng/ml	规定范围,ng/ml	RE, %
0.90	1.01	0.60~1.20	12.22
1.90	2.08	1.43~2.38	9.47
3.20	3.37	2.50~3.90	5.31

通过测定卫生部临床检验中心全国血清治疗药物监测室间质评样品,对方法进行实验室室间质评。结果显示,所有实测质量浓度均在允许范围内,室间质评结果符合卫生部临床检验要求^[6],RE为-10.94%~14.29%。室间质评样品测定结果见表4。

2.3 LC-MS/MS法与MEIA法质控样品检测结果比较

取已知质量浓度(分别为0.50、0.90、1.00、1.27、1.90、2.00、2.78、3.00、3.20、3.94 ng/ml,样品编号1~10)的地高辛质控样品各适量,分别采用MEIA法与LC-MS/MS法测定,检测结果见图3。采用SPSS 13.0软件对已知质量浓度、MEIA法检测结果、LC-MS/MS法检测结果三组数据分别进行配对t检验,P<0.05为差异有统计学意义。

由图3可见,LC-MS/MS法和MEIA法的实测质量浓度分

表4 室间质评样品测定结果^[6]

Tab 4 Determination results of the assay external quality control samples

样品	靶值,ng/ml	实测质量浓度,ng/ml	RE, %	允许范围,ng/ml	评价结果
1	1.10	1.07	-2.73	0.88~1.32	通过
2	2.83	2.52	-10.94	2.26~3.40	通过
3	1.73	1.56	-9.83	1.38~2.08	通过
4	0.63	0.72	14.29	0.43~0.83	通过
5	2.17	2.03	-6.45	1.74~2.60	通过

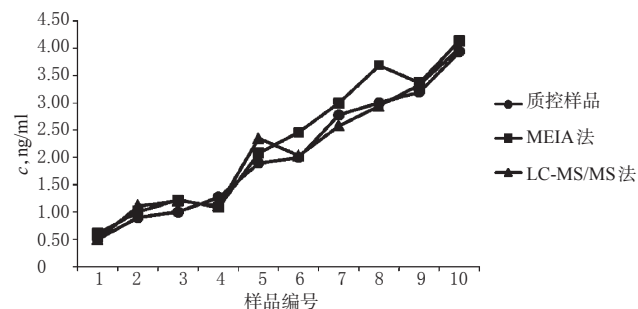


图3 LC-MS/MS法与MEIA法测定地高辛质控样品的结果
Fig 3 The results of digoxin control samples determined by LC-MS/MS and MEIA

别为0.50~4.01、0.61~4.14 ng/ml。与质控样品已知质量浓度相比,MEIA法检测结果略高于已知质量浓度,差异有统计学意义(P=0.01),LC-MS/MS法检测结果与已知质量浓度间的差异无统计学意义(P=0.30);MEIA法与LC-MS/MS法检测结果相比,两者间的差异无统计学意义(P=0.15)。

2.4 LC-MS/MS法与MEIA法患者血清样品检测结果比较

选择我院2013年接受地高辛治疗患者的稳态谷浓度血浆样品50例(样品编号1~50),分别采用LC-MS/MS法和MEIA法测定,检测结果见图4。采用SPSS 13.0软件对两组数据进行配对t检验,P<0.05为差异有统计学意义。

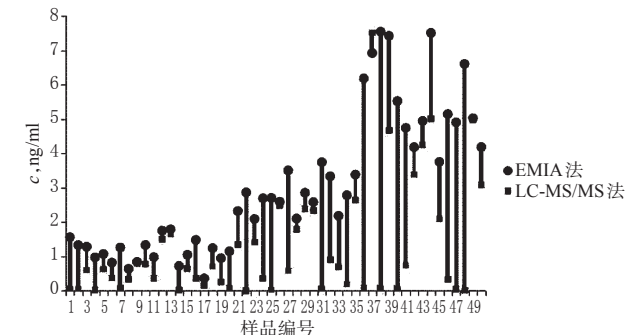


图4 LC-MS/MS法与MEIA法测定患者地高辛血浆样品的结果
Fig 4 The results of patient plasma samples determined by LC-MS/MS and MEIA

由图4可见,LC-MS/MS法和MEIA法的实测质量浓度分别为:0~7.51、0.36~7.54 ng/ml,平均值分别为0.06、2.98 ng/ml。配对t检验结果显示,MEIA法的测定结果显著高于LC-MS/MS法,差异有统计学意义(P<0.01)。其中,MEIA法检测结果显示,超过地高辛中毒浓度(>2.0 ng/ml)的患者血浆样品共计30例,这30例样品经LC-MS/MS法测定显示,有14例样品(编号22、24、25、27、31、33、34、36、38、40、41、46、47、48)的实测浓度<0.8 ng/ml。通过调查该14例患者的临床状况,发现其均未出现地高辛中毒反应,这与LC-MS/MS法检测结果一

致,而与MEIA法的检测结果相反。说明MEIA法在测定地高辛血药浓度时可能存在较大误差,而LC-MS/MS法检测结果更符合临床实际情况,较前者更适用于地高辛血药浓度的测定。

3 讨论

地高辛稳态谷浓度与该药临床疗效密切相关,是公认的血药浓度监测指标^[7]。然而,由于地高辛有效血药浓度极低(0.50~2.00 ng/ml)^[8],常规色谱方法难以检测,因此笔者参照文献[9]建立了临床地高辛血药浓度测定的LC-MS/MS法。虽然本法地高辛低、中、高质量浓度血浆样品的基质因子<70%,但参照2015年版《中国药典》指导原则^[10],基质效应主要要求不同来源血浆样品之间归一化基质因子的变异在15%以内即可。本法地高辛低、中、高质量浓度血浆样品归一化的基质因子分别为101.93%、100.64%、95.84%,RSD<10%,符合药典要求;且本试验建立的LC-MS/MS法在0.05~10.10 ng/ml血药浓度范围内线性关系良好,定量下限浓度血浆样品(0.05 ng/ml)的RSD为10.40%;日内、日间RSD<15%;提取回收率为67.07%~72.31%,RSD<10%,均符合药典规定^[10],可用于临床检测地高辛的血药浓度。MEIA法是利用地高辛与包被微粒的第一抗体和第二抗体形成夹心体后,加入基质液,在激发光照射下检测其光信号,从而计算地高辛的质量浓度。MEIA法所需样品量小,测定速度快,自动化程度高,可以批量取样,是目前临床普遍采用的测定方法。

分别采用LC-MS/MS法和MEIA法对已知浓度的地高辛质控样品进行测定。结果显示,LC-MS/MS法的测定结果比MEIA法更接近于真实浓度,但两种方法检测结果之间的差异无统计学意义($P>0.05$)。然而,50例患者血浆样品检测结果显示,MEIA法的检测结果高于LC-MS/MS法检测结果,两者间的差异有统计学意义($P<0.01$),尤其对于MEIA法检测为中毒浓度(>2.0 ng/ml)的30例患者血浆样品,LC-MS/MS法检测结果却显示其中14例为非中毒浓度(<0.8 ng/ml),临床观察显示,这14例患者也并未出现心律失常、恶心、呕吐、视力模糊等中毒症状,说明LC-MS/MS法检测结果与患者实际情况更为相符。

据文献报道,地高辛样免疫活性物质(Digoxin-like immunoreactive substances, DLIS)可与免疫分析法中的地高辛抗体交叉反应,使地高辛测定结果出现数十倍的误差^[11],这给地高辛血药浓度监测及其剂量调整带来极大困难。DLIS包括外源性和内源性,外源性DLIS来自于某些合并治疗药物如丹参、人参、螺内酯及其代谢物等,由于本身物质结构与地高辛类似,所以易与地高辛抗体发生交叉反应而干扰检测;内源性DLIS是由体内产生和分泌的一种具有洋地黄样生物活性的小分子物质,是洋地黄受体的内源性递质,可与地高辛抗体结合,显著抑制细胞膜Na⁺-K⁺-ATP酶活性,具有强心、利尿、缩血管等作用^[12-13]。MEIA方法利用免疫分析法原理,极有可能存在DLIS等物质的干扰,使地高辛难以实现准确定量,导致检测结果明显偏高。然而,LC-MS/MS法利用色谱质谱技术独特的分离定量能力,能排除DLIS的干扰,实现地高辛的准确定量,这也许是两种方法测定地高辛血药浓度存在明显差异的原因之一。此外,本研究采用LC-MS/MS法和MEIA法测定质

控样品的检测结果显示,两者间差异并无统计学意义($P>0.05$),这可能是因为质控样品与患者血浆样品存在根本区别(如质控样品中无DLIS干扰等),使得两种方法在测定质控样品时结果无明显差异。

综上所述,MEIA法等免疫分析法测定地高辛血药浓度时存在一定缺陷,导致误差的主要原因还有待进一步确证。本研究所建立的LC-MS/MS法具有专属性强、稳定性良好、检测快速、准确、抽血量小、可批量检测、不易产生交叉反应等优点,可应用于临床地高辛血药浓度监测及药动学的研究。

参考文献

- [1] 白玉国,魏国义,赵强.地高辛血清浓度影响因素及我院合理应用情况分析[J].中国药房,2010,21(16):1514.
- [2] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:临床用药须知[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:205.
- [3] 廖婧,胡丽玲,于丽秀,等.血清地高辛浓度的影响因素分析[J].医药导报,2012,31(1):96.
- [4] 李优鑫,毛静远,李惠芬.地高辛血药浓度检测方法的分析[J].中国中药杂志,2007,32(4):285.
- [5] Rogers NM, Jones T, Morris RG. Frequently discordant results from therapeutic drug monitoring for digoxin: clinical confusion for the prescriber[J]. *Intern Med J*, 2010, 40(1):52.
- [6] 卫生部临床检验中心.2013年卫生部临床检验中心临床检验室间质量评价成绩[S].2013-11-03.
- [7] 李倩,王雪明,西娜.我院101例地高辛中毒临床相关因素分析[J].中国药房,2015,26(2):209.
- [8] 朱春香,罗万慰,夏军,等.我院2011-2012年164例次地高辛血药监测浓度回顾性分析[J].中国药房,2014,25(2):136.
- [9] Xue X, Huang M, Xiao H, et al. Rapid and simultaneous measurement of midazolam, 1'-hydroxymidazolam and digoxin by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: application to an in vivo study to simultaneously measure P-glycoprotein and cytochrome P450 3A activity [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2011,55(1):187.
- [10] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:363-368.
- [11] Suppa M, Giancaspro G, Coppola A, et al. High digoxin serum levels in an elderly patient for the endogenous digoxin-like immunoreactive substances: a case report[J]. *Clin Ter*, 2011,162(3):245.
- [12] Dasgupta A. Endogenous and exogenous digoxin-like immunoreactive substances: impact on therapeutic drug monitoring of digoxin[J]. *Am J Clin Pathol*, 2002, 118(1): 132.
- [13] 肖晨,傅善基.内源性物质地高辛样物质的临床意义及检测方法[J].生物医学工程研究,2010,29(3):206.

(收稿日期:2015-06-05 修回日期:2015-12-17)

(编辑:张元媛)