

LC-MS/MS法和EMIT法测定人血清中丙戊酸浓度的对比研究

时海浪^{1*},王海东²,宋兴发^{2#}(1.新疆生产建设兵团第二师焉耆医院药剂科,新疆库尔勒 841100;2.连云港市第一人民医院药学部,江苏连云港 222002)

中图分类号 R969.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)08-1049-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.08.11

摘要 目的:比较液相色谱-串联质谱(LC-MS/MS)法与酶放大免疫(EMIT)法测定人血清中丙戊酸(VPA)浓度的差异,为临床治疗药物监测提供参考。方法:分别采用LC-MS/MS法和EMIT法对144份住院或门诊患者血清样品中的VPA浓度进行检测,采用配对 t 检验、Pearson相关性分析和Bland-Altman偏差图等方法对其检测结果的差异进行评价。结果:LC-MS/MS法和EMIT法的检测结果呈正相关($r=0.924, P<0.05$);两者的回归方程为 $c_{EMIT}=0.9207c_{LC-MS/MS}-1.1144$ ($r=0.924$);LC-MS/MS法和EMIT法测得的VPA平均血药浓度分别为 (49.9 ± 21.2) 、 $(54.9\pm 21.3)\mu\text{g/mL}$,组间比较差异有统计学意义($P<0.05$);EMIT法检测结果比LC-MS/MS法偏高 $8.3\mu\text{g/mL}$,95%置信区间为 $(-13.6, 18.7)$ 。结论:LC-MS/MS法和EMIT法测定人血清中VPA的浓度相关性良好,但检测结果有一定的差异,建议同一患者长期监测应选用同一种方法。

关键词 丙戊酸;血药浓度;液相色谱-串联质谱法;酶放大免疫法;差异

Comparative Study on Concentration Determination of Valproic Acid in Human Serum by LC-MS/MS and EMIT

SHI Hailang¹, WANG Haidong², SONG Xingfa² (1. Dept of Pharmacy, Yanqi Hospital, the Second Division of Xinjiang Production and Construction Corps, Xinjiang Korla 841100, China; 2. Dept. of Pharmacy, Lianyungang First People's Hospital, Jiangsu Lianyungang 222002, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To compare the difference in the concentration determination of valproic acid (VPA) in human serum by LC-MS/MS and EMIT. METHODS: Both LC-MS/MS and EMIT methods were applied to determine the serum concentration of VPA in 144 inpatients or outpatients. The paired t -test, Pearson correlation analysis, Bland-Altman deviation chart and other methods were used to evaluate the difference in the results of concentration determination. RESULTS: The results of LC-MS/MS method was positively correlated with that of EMIT method ($r=0.924, P<0.05$); the regression equation of them was $c_{EMIT}=0.9207c_{LC-MS/MS}-1.1144$ ($r=0.924$). Average serum concentrations of VPA determined by LC-MS/MS and EMIT were (49.9 ± 21.2) and $(54.9\pm 21.3)\mu\text{g/mL}$, with statistical significance ($P<0.05$). The serum concentration of VPA determined by EMIT was higher than that by LC-MS/MS $8.3\mu\text{g/mL}$, 95% confidence interval was $(-13.6, 18.7)$. CONCLUSIONS: The serum concentration of VPA determined by LC-MS/MS and EMIT have high correlation. But the determination results still have certain difference, it is suggested to use same method for long-term monitoring.

KEYWORDS Valproic acid; Serum concentration; LC-MS/MS; EMIT; Difference

丙戊酸(Valproic acid, VPA)为临床上应用最广泛的广谱抗癫痫药物,最初主要用于治疗失神性发作,现广泛应用于治疗各种类型的癫痫发作,包括全身强直阵挛性发作、肌阵挛性发作和小发作等^[1-2]。VPA是癫痫大发作合并小发作的首选药物,还可用于多种精神和神经系统疾病,如双极神经元障碍、精神分裂症、抑郁症、神经痛、偏头痛、阿尔茨海默病及其他神经性病变^[3]。其在临床上使用频率很高,但由于该药治疗窗较窄,服用后药动学及药效学个体差异大,抗癫痫作用和毒性与血药浓度密切相关^[4],故临床使用需对其进行血药浓度监测。目前,测定VPA血药浓度的方法主要有高效液相色谱(HPLC)法、酶放大免疫(EMIT)法、荧光偏振免疫分析(PFIA)法、气相色谱法、高效液相色谱-串联质谱

(LC-MS/MS)法等。其中,EMIT法自动化程度高、样品用量少,仅需简单处理即可完成测定,适合于急诊和样本量较大的分析;但因其试剂盒稳定性较差、专属性较差、价格昂贵、对环境要求较高等缺点限制了该方法在临床上的应用;LC-MS/MS法测定血药浓度具有准确度高、灵敏度高、专属性强、分析快速等优点,现逐步在临床中得以推广^[4-7]。不同方法在药物血药浓度监测应用方面各有优劣,故本研究考察了上述2种方法测定人血清中VPA浓度的差异,以期对不同患者选择合适的监测方法、优化个体化给药方案提供参考。

1 材料

1.1 仪器

Eksigent Skyspert Ultra LC 110XL型液相系统(包括四元泵、进样器和柱温箱)、API 4500 Qtrap型质谱仪[配备电喷雾电离源(ESI),美国Applied Biosystems公司];AE-240型电子天平(美国梅特勒-托利多仪器有限公

*主管药师。研究方向:临床药理学和治疗药物监测。电话:0996-6031820。E-mail: shihailang131@126.com

#副主任药师。研究方向:临床药理学和治疗药物监测。电话:0518-85605283。E-mail: sxf_198@163.com

司);VIVA-E型全自动药物浓度分析仪(德国西门子公司);Lab Dancer型涡旋仪(德国IKA公司);Milli-Q型超纯水仪(美国Millipore公司)。

1.2 药品与试剂

VPA对照品(美国Sigma公司,批号:47H3481,纯度:98%);苯甲酸对照品(内标,镇江前进化工有限公司,批号:131104,纯度:99%);Emit 2000 VPA定标液(批号:4G109UL-1)和Emit 2000 VPA检测试剂(批号:4F019UL-G1)均购自德国西门子公司;VPA Emit检测质控品(美国BIO-RAD公司,批号:57321、57322、57323);甲醇为分析纯,水为去离子水。

2 方法与结果

2.1 LC-MS/MS方法

2.1.1 色谱与质谱条件 色谱柱:Atlantis dC₁₈(150 mm×3.9 mm, 3 μm);流动相:甲醇-水(82:18, V/V);流速:1.0 mL/min;进样量:3 μL。

ESI;以多反应监测(MRM)模式扫描,负离子方式检测;离子化电压:-4 500 V;温度:600 ℃;喷雾气(氮气)压力:60 psi;辅助加热气(氮气)压力:60 psi;碰撞气模式:Medium;扫描时间:200 ms。用于定量分析的离子分别为 m/z 143.4[VPA,碰撞能量(CE):-10 eV,去簇电压(DP):-76 V]、 m/z 121.0(内标,CE:-37 eV,DP:-8 V)。

2.1.2 溶液的制备 精密称取VPA对照品适量,用甲醇溶解并稀释,得VPA质量浓度为990 μg/mL的贮备液,再用50%甲醇稀释,得相应质量浓度的标准溶液,备用。

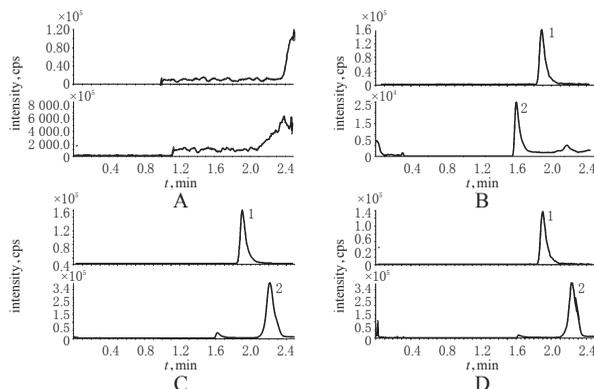
精密称取内标对照品适量,用甲醇溶解并稀释,得质量浓度为1.0 mg/mL的内标贮备液,再用甲醇稀释,得质量浓度为1.0 μg/mL的内标溶液,备用。

2.1.3 血清样品处理 取血清样品25 μL,加入50%甲醇25 μL、内标溶液25 μL和甲醇100 μL,涡旋混匀1 min,离心5 min(13 000×g),精密吸取上清液3 μL进样分析。

2.1.4 专属性考察 分别取6份不同来源的空白血清各25 μL,除不加内标外,其余按“2.1.3”项下方法操作,进样分析,得色谱图1A;将相应质量浓度的标准溶液加至空白血清中,按“2.1.3”项下方法操作,进样分析,得色谱图1B和1C;取患者血清样品适量,按“2.1.3”项下方法操作,进样分析,得色谱图1D。结果显示,VPA和内标的保留时间分别为2.23和1.89 min,空白血清中的内源性物质不干扰其血药浓度的测定。

2.1.5 标准曲线的绘制与定量下限的考察 取空白血清和VPA对照品贮备液各适量,配制成VPA质量浓度为0.50、1.00、5.00、10.0、50.0、100、200 μg/mL的血清样品,按“2.1.3”项下方法处理后,进样测定,记录色谱图。以待测物质量浓度(x)为横坐标、待测物与内标的峰面积比值(y)为纵坐标,采用加权最小二乘法(加权系数 $w=1/x^2$)进行线性回归,得VPA的回归方程为 $y=0.001 2x+0.011 5$ ($r=0.998 7$)。结果显示,VPA的血药浓度在

0.50~200 μg/mL范围内线性关系良好,定量下限为0.50 μg/mL。



A. 空白血清;B. 空白血清+VPA(0.50 μg/mL)+内标;C. 空白血清+VPA(50.0 μg/mL)+内标;D. 患者血清样品+内标;1. 内标;2. VPA
A. blank serum; B. blank serum+VPA(0.50 μg/mL)+ internal standard; C. blank serum+VPA(50.0 μg/mL)+internal standard; D. serum sample of patients+ internal standard; 1. internal standard; 2. VPA

图1 典型色谱图

Fig 1 Typical chromatograms

2.1.6 精密度与准确度试验 取空白血清适量,配制VPA低、中、高质量浓度(0.80、40.0、160 μg/mL,下同)的质控样品,每质量浓度取6样本分析,连续测定3 d,根据当日标准曲线计算各样品的测得质量浓度,考察方法的精密度与准确度。结果显示,该方法的日内、日间RSD和相对偏差(RE)均<15%,符合相关规范的要求^[8]。LC-MS/MS法的精密度与准确度试验结果见表1。

表1 LC-MS/MS法的精密度与准确度试验结果($\bar{x} \pm s$)
Tab 1 Results of precision and accuracy tests for LC-MS/MS method($\bar{x} \pm s$)

理论质量浓度, μg/mL	日内精密度($n=6$)		日间精密度($n=3$)		RE, %
	测得质量浓度, μg/mL	RSD, %	测得质量浓度, μg/mL	RSD, %	
0.80	0.8±0.1	11.9	0.8±0.1	7.9	2.5
40.0	44.4±3.2	2.5	42.5±2.9	6.1	11.1
160	149.0±7.5	12.2	152.0±10.5	8.5	6.9

2.1.7 提取回收率与基质效应试验 分别取6份不同来源的空白血清各25 μL,经甲醇100 μL沉淀,涡旋混匀1 min,离心5 min(13 000×g),取上清液,加入相应质量浓度的VPA标准溶液(使最终质量浓度分别与低、中、高质量浓度质控样品相同)和内标溶液25 μL,涡旋混匀后,进样分析,得各组分峰面积(B)。以水代替空白血清进行上述操作,得各组分峰面积(A)。取当日质控样品,按“2.1.3”项下方法处理后,进样分析,得各组分峰面积(C)。基质效应= $B/A \times 100\%$,提取回收率= $C/B \times 100\%$ [基质效应考察低、高质量浓度血清样品,提取回收率考察低、中、高质量浓度血清样品]。结果表明,VPA低、高质量浓度血清样品的基质效应分别为91.0%和92.5%,内标基质效应为95.6%,基本可忽略基质效应的影响^[9];VPA低、中、高质量浓度血清样品的提取回收率分别为95.9%、105.0%和96.3%,内标的提取回收率为96.5%。

2.1.8 稳定性试验 取空白血清适量,配制VPA低、高

质量浓度质控样品,考察其在不同条件下的稳定性。结果显示,各样品室温放置6 h 稳定(RE 为-3.9%~7.8%),各样品经历3次冷冻-解冻循环(-20℃~室温)稳定(RE 为2.9%~7.1%),各样品于-20℃冷冻放置31 d 稳定(RE 为-6.3%~5.5%)。

2.2 EMIT 法

2.2.1 样品测定 按VIVA-E全自动药物浓度分析仪的标准操作规范,以Emit 2000 VPA定标液进行定标,线性范围为0~150 μg/mL,患者样品采用Emit 2000 VPA检测试剂进行测定,每批次测定样品时需对质控品进行平行测定。

2.2.2 精密度与回收率试验 分别取低、中、高质量浓度(36.4、66.2、135 μg/mL)的VPA质控品,1 d内平行操作6次,连续测定3 d,计算精密度和方法回收率。结果显示,日内、日间RSD<15%,低、中、高质量浓度质控品的方法回收率分别为93.7%、95.2%、105.4%,详见表2。

表2 EMIT法的精密度与回收率试验结果($\bar{x} \pm s$)

Tab 2 Results of precision and accuracy tests for EMIT method($\bar{x} \pm s$)

理论质量浓度, μg/mL	日内精密度(n=6)		日间精密度(n=3)		方法回收率,%
	测得质量浓度, μg/mL	RSD,%	测得质量浓度, μg/mL	RSD,%	
36.4	35.2±6.8	2.3	34.8±5.2	5.8	93.7
66.2	61.5±8.0	6.6	64.7±4.4	10.1	95.2
135	142.0±12.4	11.2	137.0±10.5	5.6	105.4

2.3 LC-MS/MS法与MEIA法患者血清样品检测结果比较

选择我院住院或门诊患者常规VPA血药浓度监测样品,共144份。将分离的血清分为2份,1份于当日采用EMIT法测定,另1份样品于-20℃冰箱内保存,1周内采用LC-MS/MS法测定,比较2种方法检测结果的差异。应用SPSS 17.0软件对数据进行统计分析。正态性检验采用Kolmogorov-Smirnov法,检测结果的差异采用配对t检验,其相关性评价采用Pearson相关性分析;同时,绘制LC-MS/MS法和EMIT法检测结果的散点图和Bland-Altman偏差图,评价检测结果的一致性^[10]。

Kolmogorov-Smirnov法分析结果显示,LC-MS/MS法和EMIT法检测结果均符合正态分布;Pearson相关性分析结果显示,2种方法的检测结果呈正相关($r=0.924, P<0.05$);以LC-MS/MS法检测结果($c_{LC-MS/MS}$)为横坐标、EMIT法检测结果(c_{EMIT})为纵坐标进行线性回归,得回归方程为 $c_{EMIT}=0.9207c_{LC-MS/MS}-1.1144$ ($r=0.924$),详见图2。

LC-MS/MS法测得的平均血药浓度为(49.9±21.2) μg/mL,EMIT法测得的平均血药浓度为(54.9±21.3) μg/mL,两者比较差异有统计学意义($P<0.05$)。

LC-MS/MS法和EMIT法测定患者血清中VPA浓度的Bland-Altman偏差图(图3)可见,EMIT法检测血清中VPA的浓度比LC-MS/MS法偏高8.28 μg/mL,95%置信区间为(-13.6,18.7)。

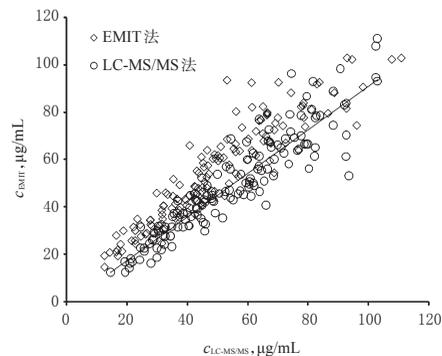


图2 LC-MS/MS法和EMIT法检测结果的散点图

Fig 2 Scatter diagram of determination results of LC-MS/MS and EMIT methods

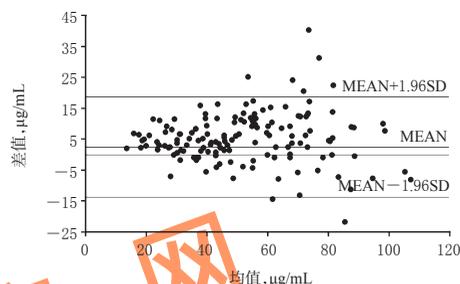


图3 LC-MS/MS法和EMIT法测定患者血清中VPA浓度的Bland-Altman偏差图

Fig 3 Bland-Altman deviation graph of VPA serum concentration determined by LC-MS/MS and EMIT

3 讨论

近几年,LC-MS/MS法不断发展,由于其具有高效的色谱分离和专属特异的质谱检测等优势而被广泛应用于生物样品的分析。本试验建立了测定血清中VPA浓度的LC-MS/MS法,以VPA类似物苯甲酸为内标,具有快速、灵敏、专属性较高、干扰少、稳定性好等优点,适用于VPA血清浓度的常规监测,现已逐步在实际应用中推广^[6]。

EMIT法是基于样品中药物与试剂中葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)标识的药物竞争抗体结合位点,活性酶与抗体结合后活性降低,根据酶活性变化来确定样品中待测物质量浓度的方法。该方法自动化程度高、样品用量少,仅需简单处理即可完成,适合于急诊和样本量较大的分析。但其商品化的试剂盒稳定性较差、对环境要求高、价格昂贵、专属性较差等缺点也限制了其临床应用^[5]。

本研究对比了EMIT法和LC-MS/MS法测定血清中VPA浓度的差别。结果显示,2种检测方法的相关性良好($r=0.924, P<0.05$),但EMIT法的测定结果比LC-MS/MS法高,且组间比较差异有统计学意义($P<0.05$)。通过Bland-Altman偏差图法可直观地反映2种方法检测结果的差异性,提示两者可能存在系统偏差。造成这种差异的原因可能为:一方面,EMIT法利用酶标半抗原与抗体相互识别并结合而产生不同的检测信号,

我院21例利培酮致白细胞减少的不良反应报告分析^Δ

庄红艳^{1*}, 刘珊珊¹, 果伟¹, 马辛^{2#}, 郝红兵¹, 梁海霞¹, 王秋艳¹ (1.首都医科大学附属北京安定医院药事部, 北京 100088; 2.首都医科大学附属北京安定医院院部办公室, 北京 100088)

中图分类号 R969.3 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)08-1052-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.08.12

摘要 目的:分析利培酮导致白细胞减少的不良反应特点。方法:收集并分析2004—2015年我院上报的21例利培酮致白细胞减少的不良反应病例并进行分析,探讨利培酮导致白细胞减少的特点。结果:21例患者中,男性10例,女性11例。年龄15~72岁,其中31~40岁有9例,占42.9%。原患疾病以精神分裂症为主,患者均为口服用药,用药剂量为正常剂量,用药至发生白细胞减少的潜伏期为(28.6±21.4)d。发生不良反应时,患者均无不适的主诉,白细胞计数均值为(3.1±0.5)×10⁹ L⁻¹,经减量、停药及对症处理均好转。结论:利培酮致白细胞减少时,患者通常无躯体不适的主诉,临床需定期监测、尽早识别、谨慎处理。

关键词 利培酮;白细胞减少;不良反应;合理用药

进而转换成浓度单位来测定待测药物浓度,若待测样品中含有与待测药物结构相近的代谢产物、内源性物质时,易产生交叉反应,可干扰检测结果。VPA在人体内可代谢为2-丙基-4-戊烯酸,此代谢物与VPA的药理作用及毒副作用均相似,结构母核也相近,故EMIT法测定血清中VPA药物浓度可能是VPA及其代谢物药物浓度的总和^[1]。另一方面,基于EMIT法是以活性酶与抗体竞争结合为原理,而酶活性会受外界环境温度的影响,因此工作环境的温度也可显著影响EMIT法的检测结果^[2]。

LC-MS/MS法和EMIT法检测VPA血药浓度,其检测结果呈正相关,但后者检测结果较前者高。因此,在临床监测VPA血药浓度时应予以关注,并作相应调整。VPA血药浓度受患者基因多态性、并发症、肝肾功能改变、药物剂型、药物相互作用以及高蛋白饮食等众多因素的影响,从而使得常规用药可能导致不同患者出现不同的临床疗效^[3]。建议同一患者长期监测应选用同一种方法,并结合其他检验指标及患者实际症状,为临床提供准确可靠的个性化用药依据,更好地指导临床剂量调整,优化药物治疗方案。

参考文献

[1] 刘克辛. 临床药理学[M]. 3版. 北京:清华大学出版社, 2012:270-271.
[2] Ghodke-Puranik Y, Thorn CF, Lamba JK, et al. Valproic acid pathway: pharmacokinetics and pharmacodynamics

[J]. *Pharmacogenet Genom*, 2013, 23(4): 236-241.
[3] Nanau RM, Neuman MG. Adverse drug reactions induced by valproic acid[J]. *Clin Biochem*, 2013, 46(15): 1323-1338.
[4] 周金玉, 王奎兴, 孙增先. 影响丙戊酸钠血药浓度波动的因素及应对措施[J]. *中国药房*, 2003, 14(6): 353-354.
[5] 李坤艳, 罗正葵. 抗癫痫药物血药浓度监测研究进展[J]. *中外健康文摘*, 2012, 9(32): 74-75.
[6] 李慧, 林哲绚, 张源, 等. LC-MS/MS法测定血浆中3种常用药物的浓度[J]. *汕头大学医学院学报*, 2005, 18(4): 231-233.
[7] 陈凯云, 骆利平, 谢文毅, 等. 高效液相色谱-质谱串联法同时测定人血清中拉莫三嗪及丙戊酸的含量[J]. *中国医院用药评价与分析*, 2012, 12(12): 1108-1110.
[8] European Medications Agency. Guideline on bioanalytical method validation: 2011[EB/OL]. [2016-08-11]. http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf.
[9] Viswanathan CT, Bansal S, Booth B, et al. Quantitative bioanalytical methods validation and implementation: best practices for chromatographic and ligand binding assays[J]. *Pharm Res*, 2007, 24(10): 1962-1973.
[10] 陈卉. Bland-Altman分析在临床测量方法一致性评价中的应用[J]. *中国卫生统计*, 2007, 24(3): 308-309.
[11] Chen ZJ, Wang XD, Wang HS, et al. Simultaneous determination of valproic acid and 2-propyl-4-pentenoic acid for the prediction of clinical adverse effects in Chinese patients with epilepsy[J]. *Seizure*, 2012, 21(2): 110-117.
[12] 乔小云, 陈冲, 蒋俊毅. 用酶增强免疫分析法监测他克莫司血药浓度的质控评估[J]. *药学服务与研究*, 2010, 10(1): 40-43.

^Δ 基金项目:北京市科技计划项目(No.Z151100004015180);北京市医院管理局重点医学专业发展专项经费资助项目(No.ZYLX201403);北京安定医院人才培养项目(No.YR-G201508)

* 主管药师。研究方向:临床药学。电话:010-58303152。E-mail: zhuanghongyan8@163.com

通信作者:主任医师。研究方向:精神专科医院管理。电话:010-58303035。E-mail:bjadyylcyxz@126.com

(收稿日期:2016-03-25 修回日期:2017-01-09)

(编辑:张元媛)