

LC-MS/MS法测定人血浆中地高辛的浓度

张萌萌*, 唐云彪, 隋 因, 颜 鸣, 崔红霞, 史国兵[#](沈阳军区总医院药剂科, 沈阳 110016)

中图分类号 R969.1;R972 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)30-2835-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.30.17

摘要 目的:建立测定人血浆中地高辛浓度的方法,用于临床地高辛血药浓度监测。方法:血样以乙醚-二氯甲烷(3:2)处理后,采用液-质联用(LC-MS/MS)法进样测定,色谱柱为 Ultimate XB-C₁₈,流动相为5 mmol/L 乙酸铵(0.1%甲酸)水溶液-乙腈(梯度洗脱),流速为0.3 ml/min,内标为尼菲卡兰。结果:地高辛血药浓度在0.1~10 μg/L范围内线性关系良好,最低定量限为0.1 μg/L;日内、日间相对标准偏差(RSD)<15%;提取回收率为75.2%~82.5%。结论:本文所建立的方法操作简单、灵敏、快速,适用于地高辛临床常规血药浓度的监测。

关键词 地高辛;液-质联用法;血药浓度;药动学

Determination of Digoxin Concentration in Human Plasma by LC-MS/MS

ZHANG Meng-meng, TANG Yun-biao, SUI Yin, YAN Ming, CUI Hong-xia, SHI Guo-bing (Dept. of Pharmacy, General Hospital of Shenyang Military Command, Shenyang 110016, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determination of digoxin concentration in human plasma, and to monitor the plasma concentration of digoxin in the clinic. METHODS: After treated with aether-dichloromethane (3:2), blood sample was determined by LC-MS/MS. The separation was achieved on Ultimate XB-C₁₈ column with mobile phase consisted of 5 mmol/L ammonium acetate (0.1% formic acid)-acetonitrile (gradient elution) at the flow rate of 0.3 ml/min. Nifekalant was used as internal standard. RESULTS: The linear ranges of digoxin were 0.1-10 μg/L, and the lowest limit of quantification was 0.1 μg/L. The intra-day and inter-day RSDs were less than 15%, respectively. The extraction recoveries were 75.2%-82.5%. CONCLUSIONS: The method is simple, sensitive, rapid and suitable for plasma concentration monitoring of digoxin.

KEY WORDS Digoxin; LC-MS/MS; Plasma concentration; Pharmacokinetics

目前治疗心力衰竭的药物种类较多,但传统洋地黄类药物至今在临床上仍广泛应用,其中,地高辛是临床上治疗充血性心力衰竭的经典药物。该药价廉,且作用持久,不容易产生耐药现象,广泛用于治疗各种急、慢性心功能不全及室上性心动过速、心房颤动和心房扑动等疾病^[1]。但其作用机制复杂,治疗指数低,有效治疗范围窄,药动学和药效学个体差异大,故在临床治疗过程中,需及时监测地高辛的血药浓度,为制订个体化给药方案提供参考。目前常用于地高辛血药浓度监测的分析方法主要有免疫测定法^[2]、高效液相色谱法^[3]和液-质联用(LC-MS/MS)法^[4-5]。为保证地高辛的临床用药安全,提高合理用药水平,本试验建立了LC-MS/MS法测定血浆中地高辛的浓度,旨在为临床进行血药浓度监测研究提供一种处理简单、操作快速、灵敏而准确的测定方法。

1 材料

1.1 仪器

AB 3200 QTrap 质谱仪,配备电喷雾离子源(ESI)(AB Sciex 质谱系统公司);岛津UFLC-20 A系统,包括LC-20AD二元泵、SIL-20A进样器、CTO-20A柱温箱、CBM-20A控制器、DGU-20A3在线脱气(日本岛津公司);TGL-16G高速离心机(上海安亭科学仪器厂);岛津AUW1200电子分析天平(日本岛津公司);Heto 3410 Ultra Freeze 超低温-70℃冰箱(丹麦Heto公司);IKA Vortex Genius 3振荡器(广州仪科实验室技术有限公司);Finnpipette系列取液器(美国Thermo Finnpipette公司)。

1.2 药品与试剂

地高辛对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100015-200308,含量:99.1%);盐酸尼菲卡兰对照品(内标,山东鲁抗辰欣药业有限公司,批号:060801,含量:100.2%,水分:0.08%)。乙腈为色谱纯;甲酸、乙酸铵均为分析纯;水为纯净水。空白血浆由辽宁省血液中心提供。

[5] Yu Y, Ji S, Chen Y, *et al.* Resistance of strains producing extended-spectrum beta-lactamases and genotype distribution in China[J]. *J Infection*, 2007, 54(1):53.

[6] 冯福英,兰小鹏,杨湘越,等.大肠埃希菌和肺炎克雷伯菌质粒AmpC酶基因型及流行病学分析[J]. *中华检验医学杂志*, 2007, 30(3):156.

[7] 卢锦萍,罗征秀,符州.铜绿假单胞菌耐药性及耐药机制研究进展[J]. *儿科药学杂志*, 2011, 17(6):53.

[8] 姜如金,朱健铭,吴康乐.多药耐药鲍曼不动杆菌氨基糖苷类与喹诺酮类耐药相关基因研究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2011, 21(21):4431.

[9] Naber CK. Future strategies for treating *Staphylococcus aureus* bloodstream infections[J]. *Clin Microbiol Infect*, 2008, 14(Suppl 2):26.

*药师,硕士研究生。研究方向:药物分析。电话:024-28856262。E-mail: sally19840124@yahoo.com.cn

[#]通信作者:主任医师,博士。研究方向:临床药学。电话:024-28856262。E-mail:sysgb@126.com

(收稿日期:2013-04-19 修回日期:2013-06-08)

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Ultimate XB-C₁₈(100 mm×2.1 mm,3 μm);流速:0.3 ml/min;柱温:40 ℃;进样量:20 μl;流动相:5 mmol/L 乙酸钠(0.1%甲酸)溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱程序见表1。

表1 流动相梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution process for mobile phase

t, min	A, %	B, %
0.01	80	20
1.00	65	35
1.50	35	65
3.00	35	65
3.50	80	20
4.50	停止	停止

2.2 质谱条件

离子源:电喷雾电离源(ESI);离子检测方式:多离子反应监测(MRM);离子极性:正离子;气帘气:30 psi;碰撞气(CAD):Low;离子源喷射电压(IS):5 500 eV;源温度:350 ℃;源内气体1(Gas1, N₂):45 psi;气体2(Gas2, N₂):40 psi。用于定量的离子对分别为地高辛 m/z :798.4/97.2,碰撞能:25 eV;内标尼菲卡兰 m/z :406.3/251.3,碰撞能:25 eV;扫描时间:0.2 s。二级质谱图见图1。

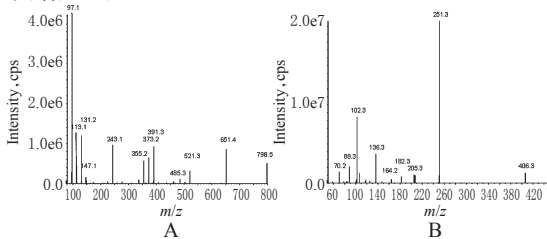


图1 地高辛的与内标的[M+H]⁺的二级质谱图

Fig 1 MS² spectra of [M+H]⁺ for digoxin and its internal standard

2.3 溶液的配制

2.3.1 地高辛标准溶液:准确称取地高辛对照品0.010 09 g,置于10 ml棕色量瓶中,用水溶解并稀释至刻度,得到1 000 mg/L的地高辛储备液。分别精密量取一定体积的储备液,用甲醇-水(50:50, V/V)依次稀释成质量浓度为0.5、1、2.5、5、15、50 μg/L的系列标准溶液备用;再用同样方法将储备液稀释成质量浓度为1、5、40 μg/L的溶液,分别作为低、中、高3个质控浓度的标准溶液备用。

2.3.2 内标溶液:准确称取的盐酸尼菲卡兰对照品0.010 98 g(含尼菲卡兰0.010 07 g)置于10 ml棕色量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,得到1 000 mg/L的尼菲卡兰储备液。量取一定体积的尼菲卡兰储备液,用甲醇-水(50:50, V/V)稀释为30 μg/L的溶液作为内标溶液备用。

2.4 血浆样品处理

取人血浆300 μl,精密加入内标(30 μg/L尼菲卡兰)溶液20 μl,涡旋30 s,加入乙醚-二氯甲烷(3:2, V/V)900 μl,振荡涡旋30 s,16 000 r/min离心5 min,取上清吹干,用5 mmol/L乙酸钠(0.1%甲酸)溶液100 μl复溶。取20 μl进样分析。

2.5 方法学验证

2.5.1 专属性:分别取自6份不同健康人体的空白血浆、加入标准溶液和内标溶液的空白血浆、受试者给药后的血浆300 μl,每个样品中分别加入甲醇-水(50:50, V/V)80 μl混匀,其余

按“2.4”项下自“加入乙醚-二氯甲烷(3:2, V/V)900 μl”起操作,得到色谱图。结果血浆中内源性物质不干扰待测物和内标的测定,专属性良好。典型色谱图见图2。

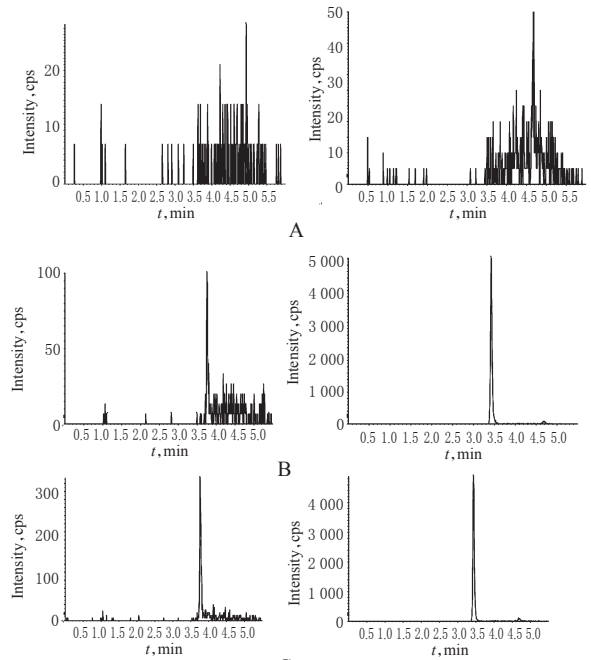


图2 典型色谱图

A. 空白血浆;B. 空白血浆+1 mg/L地高辛(相当于血浆中浓度0.2 μg/L)+30 μg/L内标;C.口服地高辛片0.125 mg/d,给药7 d达到稳态血药浓度后,下一次给药前的血浆样品

Fig 2 Typical chromatograms

A. blank plasma; B. blank plasma+1 mg/L digoxin (equal to plasma concentration of 0.2 μg/L)+30 μg/L internal standard; C. plasma sample after oral administration of digoxin 0.125 mg/d on the seventh day

2.5.2 标准曲线的制备:向1.5 ml离心管中加入300 μl空白血浆,加入地高辛系列标准溶液60 μl,依次配制成相当于地高辛质量浓度为0.1、0.2、0.5、1、3、10 μg/L的血浆样品,其余按“2.4”项下自“精密加入内标(30 μg/L尼菲卡兰)溶液20 μl”起操作,并以上述色谱和质谱条件进行测定,建立地高辛的标准曲线,记录色谱。以待测物地高辛浓度(X)为横坐标,待测物地高辛色谱峰面积(A_x)与内标尼菲卡兰色谱峰面积(A_i)的比值(Y)为纵坐标,用加权(W=1/x²)最小二乘法进行线性回归运算,得典型的回归方程为Y=0.074 7 X+0.023 9(r=0.994 8),结果表明,地高辛血药浓度在0.1~10 μg/L范围内线性关系良好。

2.5.3 最低检测限:按“2.5.2”项下标准曲线制备方法制备质量浓度为0.1 μg/L血浆样品6份,分别进样分析。标准曲线上最低质量浓度点(0.1 μg/L),其信噪比为8,平行测定6份,准确度在真实浓度的80%~120%范围内,相对标准偏差(RSD)为12.3%。其灵敏度可以满足临床地高辛治疗浓度监测的需求。

2.5.4 方法的精密度和准确度:按“2.5.2”项下制备质量浓度为0.2、1.8 μg/L的质量控制(QC)样品,每一浓度进行6样本分析,连续测定3 d,根据当日的标准曲线,计算QC样品的测得浓度。根据QC样品结果计算本法的精密度和准确度,见表2。结果,日内、日间RSD均<15%,准确度均在85%~115%范围内,表明血浆样品分析方法的精密度和准确度良好。

2.5.5 回收率与基质效应考察:按“2.5.2”项下制备质量浓度为

表2 精密度与准确度试验结果(n=18)

Tab 2 Results of precision and accuracy tests(n=18)

浓度, $\mu\text{g/L}$		精密度, %		相对误差, %
加入量	测得量	日内RSD	日间RSD	
0.20	0.20 ± 0.01	4.2	12.1	5.9
1.00	1.00 ± 0.01	9.6	10.0	0.6
8.00	8.00 ± 0.02	5.8	3.9	9.9

0.2、1.8 $\mu\text{g/L}$ 的QC样品,每一浓度进行6样本分析,得到地高辛和内标尼非卡兰的峰面积值(A_{DGX})和(A_{NLC})。另取空白血浆300 μl ,乙醚-二氯甲烷(3:2)900 μl ,振荡涡旋30 s,16 000 r/min离心5 min,上清液转移至10 ml试管中,分别精密加入地高辛质量浓度为1.5、40 $\mu\text{g/L}$ 的对照溶液60 μl 和内标(30 $\mu\text{g/L}$ 尼非卡兰溶液)20 μl ,每一浓度6样本分析,涡旋30 s,吹干,用5 mmol/L乙酸铵(0.1%甲酸)水溶液100 μl 复溶;取20 μl 进样分析,得到地高辛和内标尼非卡兰的峰面积值 B_{DGX} 和 B_{NLC} 。同时精密量取质量浓度为1.5、40 $\mu\text{g/L}$ 的地高辛QC溶液60 μl ,加入水300 μl ,每一浓度进行6样本分析,其余按“2.4”项下自“精密加入内标(30 $\mu\text{g/L}$ 尼非卡兰溶液)20 μl ”起依法操作,以20 μl 进样分析,得到地高辛和内标尼非卡兰的峰面积值 C_{DGX} 和 C_{NLC} 。按公式:提取回收率(%)= $A/B \times 100\%$ 计算,地高辛的提取回收率为75.2%~82.5%,内标尼非卡兰的平均提取回收率为66.2%。按公式:基质效应(%)= $B/C \times 100\%$ 计算,地高辛的基质效应范围为85.1%~89.5%,内标尼非卡兰的平均基质效应为91.6%。

2.6 血药浓度测定

200名老年患者(年龄 ≥ 60 岁)口服地高辛片0.125 mg/d或0.25 mg/d,血药浓度达稳态后,于服药后第7天,服药后的4 h取静脉血1 ml,全血经3 000 g离心10 min,取血浆备用。按照“2.4”项下方法处理样品,用LC-MS/MS测定地高辛血药浓度,结果见表3。

表3 地高辛血药浓度监测结果(n=200)

Tab 3 Results of plasma concentration monitoring of digoxin(n=200)

药品剂量, mg/d	年龄, 岁	检测例次	血药浓度, $\mu\text{g/L}$
0.25	60~70	43	1.29 ± 0.73
	>70~80	31	1.45 ± 0.71
	>80	11	1.65 ± 0.72
0.125	60~70	64	1.24 ± 0.62
	>70~80	34	1.31 ± 0.50
	>80	17	1.55 ± 0.66

血药浓度在治疗浓度(0.5~2.0 $\mu\text{g/L}$)内的共141例次,占70.5%,其中在0.50~0.79 $\mu\text{g/L}$ 的有18例次(9.0%),在0.80~2.00 $\mu\text{g/L}$ 的有123例次(61.5%);低于治疗浓度范围下限(<0.5 $\mu\text{g/L}$)的共16例次(8.0%),高于治疗浓度范围上限(>2.0 $\mu\text{g/L}$)的共41例次(20.5%),其中在2.01~3.00 $\mu\text{g/L}$ 的有32例次(16.0%),在3.01~4.00 $\mu\text{g/L}$ 的有9例次(4.5%)。

3 讨论

3.1 质谱条件的选择

地高辛的分子质量为797,选定的正离子扫描条件下, $m/z = 798$ 为地高辛的母离子 $[M+H]^+$ 的响应值比负离子扫描方式的响应值大,所以选择正离子模式扫描在MRM模式。地高辛和尼非卡兰的 m/z 分别为798.4/97.2、406.3/251.3。

3.2 血浆样品处理方法的选择

采用简单的甲醇或乙腈的沉淀蛋白方法,效果不理想,响应值过低,无法达到最低的检测限(0.1 $\mu\text{g/L}$)。笔者分别研究

了不同有机溶剂组成的液-液提取方法,包括无水乙醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、叔丁基醚等单独应用及乙醚-二氯甲烷(3:2, V/V)等多种有机溶剂配比的提取试剂。结果表明,乙醚-二氯甲烷(3:2, V/V)和叔丁基醚回收率较高,但叔丁基醚提取后,重溶解样品混浊,不适于质谱分析要求。最终选用乙醚-二氯甲烷(3:2, V/V)为提取试剂。

3.3 血浆样品稳定性研究

考察了地高辛在不同条件下的稳定性。结果表明,地高辛储备液于4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下放置30 d稳定(RSD=2.7%);血浆样品处理后于4 $^{\circ}\text{C}$ 样品室至少能放置24 h(RSD $\leq 5.35\%$),室温环境下至少能放置4 h(RSD $\leq 3.23\%$),-70 $^{\circ}\text{C}$ 冰冻下至少能稳定放置30 d(RSD $\leq 4.11\%$),且反复3次冻融循环后仍保持稳定(RSD $\leq 5.13\%$)。

3.4 采血时间

成人地高辛消除半衰期平均约36 h,口服后药物需5~7个半衰期才能达到稳定状态,地高辛在血中的浓度随着药物的吸收、分布、代谢和排泄过程的变化而变化,不论口服还是静脉注射,血清地高辛浓度都有一个快速下降的分布相(6~8 h完成分布)和缓慢下降的消除相。只有在消除相的血清药物浓度才反映药物对心脏的作用。因此,为了评价药物对心脏的作用,正确的采血时间是药物达到稳态后,在静脉注射给药后4 h或距末次服药6~8 h后进行。若药物在体内尚处于吸收相而过早取样,测定值会偏低,此假性偏低可能误导增加剂量,导致中毒^[6]。故本试验采血时间为第7天服药后4 h。人体内约50%的地高辛与骨骼肌受体结合,运动可使地高辛与肌肉组织的结合增加,血浓度下降,故采样前患者需要适当休息。

4 结论

本文建立了一种快速、灵敏度高、选择性好的LC-MS/MS法测定人血浆中地高辛的浓度,可用于治疗药物监测(TDM)。地高辛安全治疗范围窄,个体差异大,因此临床药师应该与临床医师密切配合,根据TDM结果和临床症状,综合分析影响血药浓度的多方面因素,适当调整给药剂量和给药间隔,实现个体化、科学化给药,减少不良反应的发生,确保临床治疗效果。

参考文献

- [1] 李红梅.地高辛的临床使用及血药浓度监测[J].医学创新研究,2008,5(28):110.
- [2] 乔小云,王羽,王璐璐,等.均相酶扩大免疫分析法检测地高辛血浓度的质量控制与评价[J].中国药师,2010,13(3):387.
- [3] Kwon HJ, Sim HJ, Lee SI, et al. HPLC method validation for digitalis and its analogue by pulsed amperometric detection[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, 54(1):217.
- [4] Josephs RD, Daireaux A, Westwood S, et al. Simultaneous determination of various cardiac glycosides by liquid chromatography-hybrid mass spectrometry for the purity assessment of the therapeutic monitored drug digoxin[J]. *J Chromatogr A*, 2010, 1 217(27):4 535.
- [5] Li S, Liu G, Jia J, et al. Therapeutic monitoring of serum digoxin for patients with heart failure using a rapid LC-MS/MS method[J]. *Clin Biochem*, 2010, 43(3):307.
- [6] 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.

(收稿日期:2012-11-12 修回日期:2013-5-19)