

液相色谱-串联质谱联用技术检测抗高血压药物依从性在临床试验中的应用价值

王悦¹, 孙宁玲², 王捷^{1,3}

1. 南京医科大学第一附属医院, 临床医学研究院, 中国, 南京, 210029
2. 北京大学人民医院, 心血管内科, 中国, 北京, 100044
3. 哥伦比亚大学医学院, 心脏科, 美国, 纽约, NY10032

通讯作者:

王捷, E-mail: jw147@cumc.columbia.edu

服药依从性不佳在高血压患者管理中普遍存在, 虽然已有传统的询问患者用药史并结合对医生处方的记录、患者用药的计数, 以及电子药盒的使用, 但仍需要更为客观和高灵敏度的方法与传统方法相结合, 来监测和管控高血压患者的服药依从性。2022年初, 欧洲高血压学会首次发布《建立和应用化学检测方法监测高血压患者依从性》共识性文件^[1] (以下简称“共识”), 推荐建立标准化液相色谱-串联质谱联用 (LC-MS/MS) 方法监测高血压患者服药依从性, 并首先应用于两种临床情境: 一是顽固性高血压患者, 二是在服用第二种抗高血压药物后收缩压降低幅度小于 10 mmHg 的患者^[1]。而更加值得关注的是, 服药依从性还直接影响抗高血压药物和医疗器械临床试验的成败, 能否客观监测患者服药依从性是决定抗高血压临床试验结果是否可靠的关键环节。本文主要参照“共识”中推荐的基本原则, 阐述 LC-MS/MS 方法监测患者服药依从性在中国抗高血压临床试验中的应用价值、注意要点以及未来应用趋势。

1. 服药依从性在高血压临床试验中的重要意义

高血压是影响全世界 25% 成年人的常见慢性疾病, 如果未及早发现和适当治疗, 可能导致心肌梗塞、脑卒中、肾功能衰竭甚至死亡, 造成沉重经济和社会负担^[2]。高血压患者多数需要长期服用抗高血压药物, 但 30%-50% 的患者存在不依从服药的情况^[3]。服药依从性不佳最直接的后果是血压控制率降低, 增加患

者心血管疾病发病率和死亡率。多个研究结果显示，23%-66%的顽固性高血压患者其实并非难治，而实际为服药依从性不佳所导致^[4]。

服药依从性与药物干预和医疗器械干预治疗高血压临床试验的成败直接相关。在抗高血压药物临床试验中，患者总体服药依从性为43%-78%^[5]，这不可避免地会低估药物的降压疗效，导致研究结果不可靠。药物依从性不佳的问题同样出现在非药物干预（器械干预）抗高血压临床试验中，在接受器械治疗的高血压研究中同时服用抗高血压药物时，服药依从性是一个可能会干扰对器械降压作用评价的关键混杂因素，甚至会翻转临床试验的结论。

经导管去肾神经术（RDN）是一种使用射频或超声等能量去除肾交感神经的经导管介入性的器械治疗高血压方法，是近年来受到高度关注治疗高血压的非药物治疗的方法之一。因出于保护患者安全的伦理学考量，在未经证实RDN确切降压疗效的情况下，参加RDN临床试验的高血患者不能长期停止服用抗高血压药物（最长停药时间不能超过3-4个月），因此参加RDN临床试验的患者不可避免地会伴随服用抗高血压药物，这成为评价RDN降压疗效的一个重要乃至决定性混淆因素。

早期 Symplicity HTN-1 和 HTN-2 等临床试验显示了 RDN 治疗顽固性高血压的积极疗效和安全性^[6,7]，但随后的 Symplicity HTN-3 研究为阴性结果，事后分析（post-hoc analysis）显示 HTN-3 研究失败的重要原因之一就是患者服药依从性不佳^[8]，在该研究并未监测患者真实服药依从性的情况下，研究者认为超过 50%的患者没有完全依从服药方案，在试验过程中受试者抗高血压药物的任意加减，干扰了器械治疗对血压的作用。中国学者给予了高度的关注。之后由我国学者牵头采用国产肾神经标测/选择性消融系统（SyMapCath®TM /SymPioneer®TM）进行的 RDN SMART 暨 Sympathetic Mapping/Ablation of Renal Nerves Trial（ClinicalTrials.gov, NCT02761811）临床试验中，为了准确评估患者所服用高血压药物对 RDN 的影响，在这个临床试验中率先应用 LC-MS/MS 方法对患者的尿液进行分析，确保试验过程中受试者的服药依从性^[9]，并严格控制入选患者抗高血压药物的种类、剂量、厂家和加减顺序，这与欧洲高血压协会等国际组织达成的共识高度一致。之后所开展的 SPYRAL HTN

OFF-MED 和 SPYRAL HTN ON-MED 两项临床试验中也采用 HPLC-MS/MS 法定性检测患者血浆或尿液中抗高血压药物，以监测患者实际服药依从性^[10]。

2. 抗高血压药物服药依从性检测方法的发展历程

虽然长期以来广泛使用的监测服药依从性的方法有患者自述、患者日志、处方记录、药物计数、电子药盒等，这些都属于间接监测法，操作简单、时间和人力成本低，但灵敏度普遍受限制，容易受患者和社会认知的主观影响，研究证实容易高估患者的依从性^[11]。监测服药依从性准确性最高的是直接观察治疗，可避免间接监测法潜在的主观偏倚，但需要大量人力和物力，经济成本高，限制了其常规应用^[12]。

近年来，随着色谱检测技术的飞速发展，LC-MS/MS 技术被用于检测人体生物样本中药物含量，以客观监测患者服药依从性。该方法可在 3-5 分钟内精确检测人血浆和尿液中多种药物及其代谢物的含量，检测灵敏度可达 ng/ml 级别^[13]。该技术近十多年在北美得到长足发展^[14,15]，已广泛应用于临床诊断、生命科学和医学制药等领域^[16]。在我国，随着第三方检测实验室大规模建立，以及学术和产业的共同推动下，这种检测方法费用大幅下降，LC-MS/MS 技术在我国临床领域的应用进入到了快速发展时期^[14]，近几年一系列有关 LC-MS/MS 临床应用的方法学指南建议与专家共识陆续出台^[17,18,19]，这也促成该技术成为目前方便且可及的服药依从性监测方法。

欧洲高血压学会等多个国际学会推荐，将 LC-MS/MS 方法应用于高血压患者管理中，检测患者的实际服药依从性^[13]，并将这种检测方法界定为“化学依从性检测法（chemical adherence testing）”中的一种^[1]，其检测谱可涵盖尿液或血液中所有种类抗高血压药物及其代谢物。欧洲心脏病学会和欧洲高血压学会指南认为，应用该检测法监测高血压患者服药依从性可解决目前未满足的临床需求，具有广阔的应用前景^[4]。

欧洲高血压学会建议可根据高血压临床试验设计的特点和检测方法本身性质，同时采用化学依从性检测法与其他间接监测法等多种方法结合，共同来评估患者服药依从性，如考虑检测方法的可靠性、对白衣依从的灵敏度、长期可行性以及经济成本等因素^[1]，这样可以更加准确的评估患者真实的服药依从性^[1,3,12,20]。

3. 在临床试验中应用 LC-MS/MS 监测抗高血压药物依从性需注意的要点

依照欧洲高血压学会“共识”中推荐的基本原则，结合临床试验的一般要求和高血压临床试验的特点，特别是通过 SMART 试验所获得的实际经验，我们认为将 LC-MS/MS 应用于临床试验中监测抗高血压药物依从性时，至少有以下五点需要考虑：

（1）伦理学要求：在临床试验中检测人体样本中抗高血压药物含量以监测服药依从性，必须获得当地伦理委员会的批准（当>500 例高血压患者时还需获得中国人类遗传资源管理办公室的批准），应告知患者检测的背景和意义，获得患者的同意，并将过程记录在诊疗记录中。当检测出患者不依从处方服药时，随访医生需充分考虑多种导致依从性不佳的可能因素，采取合适的方式与患者沟通，避免污名化处理。

（2）抗高血压药物检测谱：LC-MS/MS 检测抗高血压药物谱应符合实施临床试验所在地的诊疗环境。在欧洲和美国，20 -25 种药物可覆盖 95% 的处方抗高血压药物，5 种药物可覆盖 50% 以上处方抗高血压药物^[21]。中国临床诊疗环境非常复杂，数据显示，在三甲医院内至少存在着六大类 172 种抗高血压药物，中药复方制剂尚未计算在内^[9]。对于一些半衰期短的药物，同时检测原型药物及其代谢物将有助于提高检测准确性。

（3）检测方法学验证：检测实验室应具有 ISO15189 等相关国际认证，在完成方法学验证后再开展正式大规模检测。目前尚未有针对 LC-MS/MS 方法检测抗高血压药物的指导原则，但一般要求定性检测的方法学验证至少涵盖干扰实验、基质效应、稳定性研究和检测限等指标；对于定量检测，还应包括检测下限、线性、偏差、回收率和精密度的验证，同时建议采用外部质量控制。

（4）检测的实施：LC-MS/MS 最常用的检测样本为人体血液和尿液。血液标本需要有创性采集，但可以提供较多关于服药时间和规律的信息，常用于定量分析；尿液相对血液易于采集，但由于患者个体代谢差异造成检测浓度结果波动大，常用于定性检测。“共识”建议在患者到医院就诊时采集样本，尿液最少采集 1.5 mL，血液标本至少 1 mL。临床试验中的样本采集次数和检测间隔，主要根据试验阶段和研究设计而确定，比如是探索性研究还是验证性研究，是药物还是医疗器械临床试验等。从标准化的原则出发，对多中心临床试验应当委托第三

方有资质的实验室统一进行检测，样本转移时使用冷链运输，同时考虑避光^[1]。因在临床试验过程中，常在获得患者服药依从性结果后，才能实施方案所规定的后续操作步骤，因此检测实验室应当在最短的时间内（一般要求 1-2 天内）出具检测结果。

（5）检测结果解读：需特别注意，具有极短或极长消除半衰期的药物可能会导致假阴性或假阳性结果；肾功能受损或某些药物相互作用，也会改变清除率而可能影响检测结果。因此，为了避免对结果的误判，检测人员需结合药代动力学、药物遗传学和药理学相互作用等对检测结果进行充分解读。另外，当 LC-MS/MS 与其他间接检测法联合应用并检测结果不一致时，应以后者更具客观性的结果为准，并可将 LC-MS/MS 检测方法的科学性和可靠性，以通俗易懂的语言向患者进行宣教，纠正其服药不依从性。

4. 建立符合中国诊疗环境的 LC-MS/MS 检测抗高血压药物方法

近年来我国药监部门和研究人员已逐步意识到临床试验中监测服药依从性的必要性，但尚未建立指导性文件在临床试验方案中广泛规定和采取足够行之有效的手段监测患者的服药依从性。在我国临床试验实践中，多年来一直采用药品计数等方法监测服药依从性，尚未有在高血压的临床试验中建立 LC-MS/MS 法监测高血压患者服药依从性的先例。

在中国的诊疗环境中建立 LC-MS/MS 检测抗高血压药物方法具有巨大的挑战，因为高血压患者使用了大量的仿制抗高血压药物。调查发现，中国临床实践中使用的仿制药数量众多，平均每种药物活性成分有 113.9 种获批药物；而美国 FDA 数据显示在美国的临床实践中，平均每种活性成分只有 4.2 种获批药物^[22]。医疗器械临床试验方法学也日趋接轨国际水准。

我国学者目前已开始建立并应用符合中国诊疗环境的 LC-MS/MS 方法，用来监测抗高血压器械注册临床试验高血压患者服药的依从性^[9]。王捷团队在应用肾神经标测和选择消融系统开展的以高血压为适应症的注册临床试验（SMART Study, [clinicaltrials.gov ID: NCT02761811](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02761811)）中，使用可检测尿液中涵盖六大类 55 个化学分子的抗高血压药物的 LC-MS/MS 方法，同时联合传统药品计数方法，来共同检测患者的服药依从性，以排除抗高血压药物对研究带来的影响^[9]。该研究对连续入组的 92 例高血压患者的尿样进行监测，显示在完成 28 天药物洗脱期

时、去肾神经手术后 3 个月和 6 个月时，分别有高达 92.4%，97.8%和 95.5%的患者完全依从服用抗高血压药物^[9]。该研究采用的 LC-MS/MS 方法不仅对患者服药依从性进行了客观监测，同时还确保了患者在临床试验中保持良好的用药依从性，从而排除了药物对器械治疗降压的干扰关键混杂因素，保证了该创新器械治疗高血压临床试验的质量^[9]。

5. LC-MS/MS检测高血压患者服药依从性的应用场景及局限性

随着LC-MS/MS检测技术的逐步推广，我们预计未来采用该方法检测高血压患者服药依从性主要应用于以下两种场景的临床试验中，以期获得更加可靠、可信的研究结果：

(1) 在高血压药物临床试验中，对患者服药依从性进行精准检测和管控。在有条件的医院可以在院内建立LC-MS/MS检测方法，无条件的医院可将标本送到第三方检测中心测定。

(2) 在器械治疗高血压的临床试验中，检测和分析患者在试验中降压药物的服用情况，为管控患者的服药依从性提供依据，排除药物对器械降压效果评估的干扰。

未来若检测成本进一步降低，该方法也有可能扩展到真实世界临床研究中，如对“难治性高血压”或者反复出现合并症的“极高危的高血压患者”的服药情况做出正确判断，了解患者是否按医嘱服药，寻找血压控制不佳的原因，为正确诊疗提供依据，但目前还受实际临床诊疗流程和费用等因素所限制。

然而，LC-MS/MS 方法应用于临床试验中仍存在局限性：首先，服药依从性是动态的，受诸多外部因素影响，单次检测只能检测到依从性的横断面结果，无法反映患者长期的服药情况，以致难以关联患者心血管结局事件；其次，目前 LC-MS/MS 对抗高血压药物的检测，多是定性或是半定量的检测方法，无法给出准确的定量信息；再者，如患者在提前知晓的情况下，可能会在采集尿样或血样前改变服药的行为，即产生白大衣依从，从而高估患者真实的服药依从性。因此，建议在短时间内（即获得患者知情同意当天）或长期不定时（告知患者将定期监测依从性或采取样本，但不告知具体何时）进行药物监测，则可以一定程度上克服这一缺陷^[23]。鉴于这些局限性，选择多种方法以组合方式进行检测，则可以获得更为准确的服药依从性检测结果。

LC-MS/MS 方法联合传统间接检测法，可更加全面、客观监测高血压患者服药依从性，从而在高血压临床试验中帮助排除药物干扰产生的关键混杂因素，以获得更加可靠的临床试验结果，进而提供高质量的循证医学证据。我国学者建立的符合中国诊疗环境的 LC-MS/MS 检测尿液中抗高血压药物方法，已应用于创新医疗器械治疗高血压的临床试验中。虽然该检测方法的行业标准有待继续完善，但我们希望通过该检测技术在高血压临床试验中探索应用，能够进一步完善我国药物和医疗器械临床评价技术和临床评价体系。

参考文献:

- [1] Lane D, Lawson A, Burns A, et al. Nonadherence in hypertension: how to develop and implement chemical adherence testing [J]. *Hypertension*. 2022, 79(1): 12-23.
- [2] Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, et al. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data [J]. *Lancet*. 2005, 365(9455): 217-223.
- [3] Vrijens B, Antoniou S, Burnier M, et al. Current situation of medication adherence in hypertension [J]. *Front Pharmacol*. 2017, 8: 100.
- [4] Jung O, Gechter JL, Wunder C, et al. Resistant hypertension? Assessment of adherence by toxicological urine analysis [J]. *J Hypertens*. 2013, 31(4):766–774.
- [5] Cramer J, Rosenheck R, Kirk G, et al. Medication compliance feedback and monitoring in a clinical trial: predictors and outcomes [J]. *Value Health*. 2003, 6(5): 566-573.
- [6] Krum H, Schlaich M, Whitbourn R, et al. Catheter-based renal sympathetic denervation for resistant hypertension: a multicentre safety and proof-of-principle cohort study [J]. *Lancet*. 2009, 373(9671): 1275- 1281.
- [7] Krum H, Barman N, Schlaich M, et al. Catheter-based renal sympathetic denervation for resistant hypertension: durability of blood pressure reduction out to 24 months [J]. *Hypertension*. 2011, 57(5): 911-917.
- [8] Kandzari DE, Bhate DL, Brar S, et al. Predictors of blood pressure

- response in the SYMPLICITY HTN-3 trial [J]. *Eur Heart J*. 2015, 36(4): 219-27.
- [9] Wang Y, Wang JW, Wang Y, et al. Monitoring antihypertensive medication adherence by LC-MS/MS: method establishment and clinical application [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2021, 78(4): 581-596.
- [10] Kandzari DE, Kario K, Mahfoud F, et al. The SPYRAL HTN Global Clinical Trial Program: Rationale and design for studies of renal denervation in the absence (SPYRAL HTN OFF-MED) and presence (SPYRAL HTN ON-MED) of antihypertensive medications [J]. *Am Heart J*. 2016, 171(1):82-91.
- [11] Vrijens B, Urquhart J. Methods for measuring, enhancing, and accounting for medication adherence in clinical trials [J]. *Clin Pharmacol Ther*. 2014, 95(6): 617-626.
- [12] Breckenridge A, Aronson JK, Blaschke TF, et al. Poor medication adherence in clinical trials: consequences and solutions [J]. *Nat Rev Drug Discov*. 2017, 16(3): 149-150.
- [13] Unger T, Borghi C, Charchar F, et al. 2020 International Society of Hypertension Global Hypertension Practice Guidelines [J]. *Hypertension*. 2020, 75(6):1334–1357.
- [14] 刘华芬. 液相色谱-串联质谱技术临床应用思考与面临的挑战 [EB/OL]. <https://www.ivdchina.org/cclabd/show-1283.html>. 2021-12-16/ 2022-10-16.
- [15] Lynch KL. CLSI C62-A: a new standard for clinical mass spectrometry [J]. *Clin Chem*. 2016, 62(1): 24-29.
- [16] 易可可, 谢洁, 龚晓云等. 液相色谱-串联质谱应用研究进展 [J]. *计量科学与技术*. 2021, 2: 7-15.
- [17] 中国医师协会检验医师分会临床质谱检验医学专业委员会. 液相色谱串联质谱临床检测方法的开发与验证[J]. *检验医学*. 2019, 34(3): 189-196.
- [18] 中国药理学会治疗药物监测研究专业委员会, 中国药学会医药生物分析专业委员会, 中国科学院大连化学物理研究所. 色谱技术用于治疗药物监测质量保障的专家共识 (2021 版) [J]. *中国药学杂志*. 2021, 56(17): 1443-1448.
- [19] 中国标准化协会. 液相色谱-质谱联用用于临床治疗药物监测通用技术要求

(征求意见稿) [EB/OL]. www.china-cas.org/zxdtxhtz/2967.jhtml. 2022-09-16/
2022-10-16.

[20] Fitzgerald RL, Rivera JD, Herold DA. Broad spectrum drug identification directly from urine, using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Clin Chem. 1999, 45 (8 Pt 1): 1224-1234.

[21] NHS Digital. Prescription Cost Analysis - England, 2018 [PAS][EB/OL]. <https://digital.nhs.uk/data-and-information/publications/statistical/prescription-cost-analysis/2018>. 2019-03-28/ 2022-09-10.

[22] Yan ZP, Chen YW. Comparative analysis of approved generic drug in China and America [J]. Chin New Drug. 2007, 16(21):1731–1733.

[23] Berra E, Azizi M, Capron A, et al. Evaluation of adherence should become an integral part of assessment of patients with apparently treatment-resistant hypertension [J]. Hypertension. 2016, 68(2): 297-306.