

LC/MS/MS based determination of cardiac glycosides

Jörg Teske, Jens-Peter Weller, Hans Dieter Tröger

Abstract

The purpose of the study was to establish a LC/MS/MS based method for the determination of cardiac glycosides (digitoxin, digoxin) in different matrices for forensic investigations. An API 2000 tandem mass spectrometer equipped with ESI (Turboionspray®) and a Shimadzu high pressure gradient system were used for LC/MS/MS analyses. Chromatographic separation was performed on a Luna 5 μ phenyl-hexyl column using gradient elution (ammonium formiate/methanol/water). Positive electrospray ionisation was chosen and the mass spectrometer was run in multiple reaction monitoring mode (MRM) detecting $[M+NH_4]^+$ adduct ions of digitoxin, digoxin and its metabolites. The validation procedure in spiked serum samples gave good results for linearity, recovery, accuracy and precision. The LOD (S/N = 3) were always below 1 ng/ml for all analytes. In comparison with standard reference material and immunochemical screened clinic samples a good correlation could be obtained. The presented method can be used for identification and quantification of digitoxin, digoxin and its metabolites and meets the requirements of forensic investigations. The determination of the cardiac glycosides by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry is superior to immunochemical methods and can be utilised to problematic matrices, even in cases of exhumation.

Einleitung

Die Cardenolide Digitoxin und Digoxin sind kardiotope Substanzen, die zur Behandlung von Patienten mit Herzinsuffizienz eingesetzt werden. Sie bewirken eine Steigerung der Kontraktionskraft (positive Inotropie) und eine Verlangsamung der Frequenz (negative Chronotropie und Dromotropie) des Herzens. Die Bedeutung von Herzglykoside (HG) bei der Behandlung der Herzinsuffizienz ist zwar zurückgegangen, und der therapeutische Nutzen einer Digitalisbehandlung wird teilweise kritisch gesehen [1-3], aktuelle Richtlinien und Empfehlungen befürworten jedoch für ein bestimmtes Patientkollektiv eine Digitalisbehandlung, zumeist in Kombination mit anderen Herz-Kreislaufpräparaten [4,5].

Somit sind die genannten Substanz auch weiterhin regelmäßig im Zusammenhang mit forensisch-toxikologischen Fragestellungen relevant. Wegen der relativ geringen therapeutischen Breite von Digitoxin und Digoxin ist auch aus klinischer Sicht eine Kontrolle der Serumspiegel sinnvoll [6,7], wobei in der Regel immunochemische Verfahren [8-13] zur Anwendung kommen.

Während diese Immunoassays für Serumproben im Rahmen des Drugmonitorings in der Regel zuverlässige Ergebnisse liefern, sind sie für typische Matrizes bei forensischen Fragestellungen, zumeist nur sehr eingeschränkt einsetzbar. Prinzipiell besteht bei Verwendung von Immunoassays immer die Gefahr von Verfälschungen oder überhöhten Meßwerten durch Interferenzen mit sogenannten DLIS oder EDLF (digioxin-like immunoreactive substances / endogenous digitalis-like factors) [14-17]. Bei postmortal gewonnenen Proben versagen die Test eventuell ganz bzw. können allenfalls in Kombination mit aufwendigen Probenvorbereitungsprozeduren verwendet werden [18-21]. Erst mit der Einführung und Verbreitung der LC-MS wurde eine sichere Bestimmung von Herzglykosiden auch weitgehend matrixunabhängig möglich.

Für die Bestimmung der HG mittels LC-MS und LC-MS-MS sind in der Literatur Methoden mit verschiedenen Ionisierungstechniken (ESI, APCI, im positiven oder negativen Modus) beschrieben [22-28]. Im Folgenden wird ein LC-MS-MS Verfahren für Digitoxin und Digoxin einschließlich der Spaltprodukte, die durch sequentielle Abspaltung der jeweiligen Zucker der Seitenkette bis zu Genin entstehen, vorgestellt, das auch auf komplexe Matrizes angewendet werden kann. Nach Voruntersuchungen wurde dazu eine Methode entwickelt, bei der Ammoniumaddukte bei positiver Elektrosprayionisation mittels Tandemmassenspektrometrie (MRM-Modus) erfaßt werden.

Material und Methode

Die Untersuchungen wurden mit einem API 2000 Tandem-Massenspektrometer (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) mit einer Elektrospray-Quelle (Turboionspray®) durchgeführt, welche mit einem Hochdruck-Gradienten-HPLC-System (Shimadzu) aus den folgenden Komponenten gekoppelt war: 2 Pumpen (LC-10Advp), Kontroller (SCL-10Avp), Autoinjektor (SIL-10ADvp), Säulenofen (CTO-10Asvp) und Degasser (DGU-14A). Die chromatographische Trennung erfolgte an einer 50 x 4,6 mm Luna 5µ Phenyl-Hexyl-Säule (Phenomenex, Aschaffenburg, Germany) unter Verwendung eines Gradienten (Eluenten A: Wasser/Methanol, 95 + 5, Eluenten B: Acetonitril/Methanol 50 + 50; beide Eluenten enthielten zusätzlich 10 mM Ammoniumformiat und 0,1 % Ameisensäure). Bei einem Fluß von 0,4 ml / min wurde der Anteil des Eluenten B, beginnend mit 50 %, innerhalb von 4 min auf 100% erhöht und nach weiteren 2 Minuten zur Systemequilibration wieder auf 50% abgesenkt.

Die Massenspektrometrische Detektion erfolgte nach ESI im positiven Modus bei Registrierung von 2 MRM-Übergängen pro Substanz (Tab 1) unter folgenden Bedingungen: Quelltemperatur 400 C°, Ionspraynadel +5000 V, Curtain-Gas 20 psi (Stickstoff), Nebulizer-Gas 40 psi (Stickstoff), Hilfsgas 60 psi (Stickstoff), Kollisions-Gas bei 3 (Stickstoff), Dwell time 50 ms.

Tabelle 1: Target- und Qualifier-MRM-Übergang der erfaßten Analyten

	Precursorion	Tochterion
	[m/z]	[m/z]
Digitoxin (DT3)	782	635
	782	243
Digitoxigenin-bis-digitoxosid (DT2)	652	97
	652	375
Digitoxigenin-mono-digitoxosid (DT1)	522	505
	522	375
Digitoxigenin (DT0)	392	375
	392	339
Digoxin (DG3)	798	652
	798	243
Digoxigenin-bis-digitoxosid (DG2)	668	651
	668	97
Digoxigenin-mono-digitoxosid (DG1)	538	521
	538	355
Digoxigenin (DG0)	408	355
	408	337
Oleandrin	594	577
	594	373

Probenvorbereitung für Blut/Serum

In ein 2 ml Polypropylen-Vial wurden 100 µl Wasser vorgelegt, mit 25 µl des internen Standards (1 ng/µl Oleandrin) und 1 ml Blut bzw. Serum versetzt und anschließend bei leichtem Schütteln mit Essigester/Dichlormethan (80 + 20) für 10 min flüssigextrahiert. Die organische Phase wurde abgenommen, eingedampft und 40 µl des mit 150 µl des Starteluenten gewonnenen Rekonstitutes nach Filtration am API 2000 vermessen.

Ergebnisse

Untersuchung von Blut und Serum

Mit der Methode werden die HG Digitoxin und Digoxin einschließlich der Abbauprodukte nach Abspaltung der terminalen Zucker der Seitenkette chromatographisch getrennt und mittels Tandemmassenspektrometrie erfaßt (Abb1). Da deuterierte Digitoxin- oder Digoxinanaloga zumindest kommerziell nicht verfügbar sind, wurde Oleandrin als innerer Standard verwendet. Zur Überprüfung der bei der ESI zu erwartenden matrixabhängigen Suppression [29] wurden 2 Batches der Analyten nach Zugabe zum Eluenten und nach Zugabe zum Seumextrakt untersucht; die Ergebnisse sind in Tabelle 2 dargestellt.

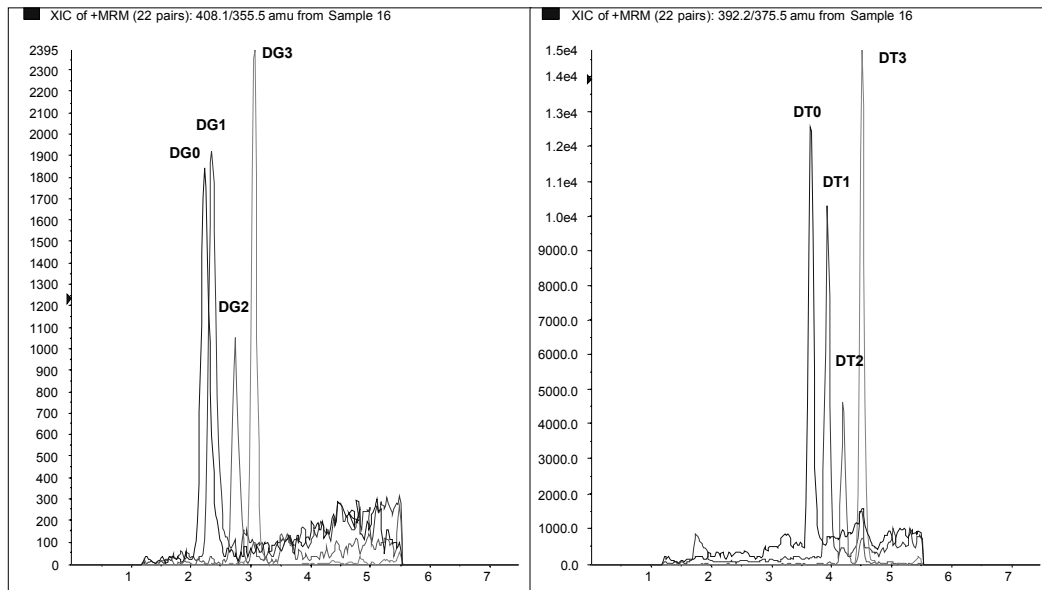


Abb. 1: Extrahierte Ionenchromatogramme der Target-MRM-Übergänge der erfaßten Analyten

Tabelle 2: Matrixbedingte Ionensuppression der HG im Serum

Substanz	Relative Peakfläche im Eluent	Relative Peakfläche im Serumextrakt	Signaldepression im Serumextrakt
DT3	0.12	0.12	43%
DT2	0.36	0.36	43%
DT1	0.82	0.73	49%
DT0	1.26	0.93	58%
DG3	0.24	0.22	47%
DG2	0.31	0.24	56%
DG1	0.60	0.43	59%
DG0	0.52	0.38	58%
Oleandrin	1.00	1.00	43%

Für alle Analyten und den inneren Standard wurde im Serum eine relevante Signaldepression in der Größenordnung von 50 % festgestellt. Die Suppression ist jedoch für Oleandrin und die anderen Herzglykoside vergleichbar. Oleandrin ist somit insbesondere für die Ausgangssubstanzen, DT3 und DG3, geeignet, den Matrixeffekt als interner Standard zu kompensieren. Da für die Abbauprodukte zum Teil relevante Abweichungen der relativen Peakflächen auftreten, sollte die Kalibration jedoch nicht als Lösungsmittelkalibration sondern im Serum bzw. im Blut erfolgen. Bei komplizierten Matrizes ist darüber hinaus eine Standardaddition sinnvoll.

Im Rahmen der Validierung wurde die Anwendbarkeit der Methode zur Bestimmung der Herzglykoside im Serum bis in den toxikologisch relevanten Konzentrationbereich belegt. In Abbildung 2 sind exemplarisch Werte der Kalibration für Digitoxin dargestellt. Für alle Analyten konnten bezüglich Wiederfindung, Präzision und Richtigkeit befriedigende Ergebnisse erzielt werden; die LODs (S/N=3 für den Target-MRM) lagen für alle Analyten unter 1 ng/ml (detaillierte Werte zur Validierung werden an anderer Stelle publiziert).

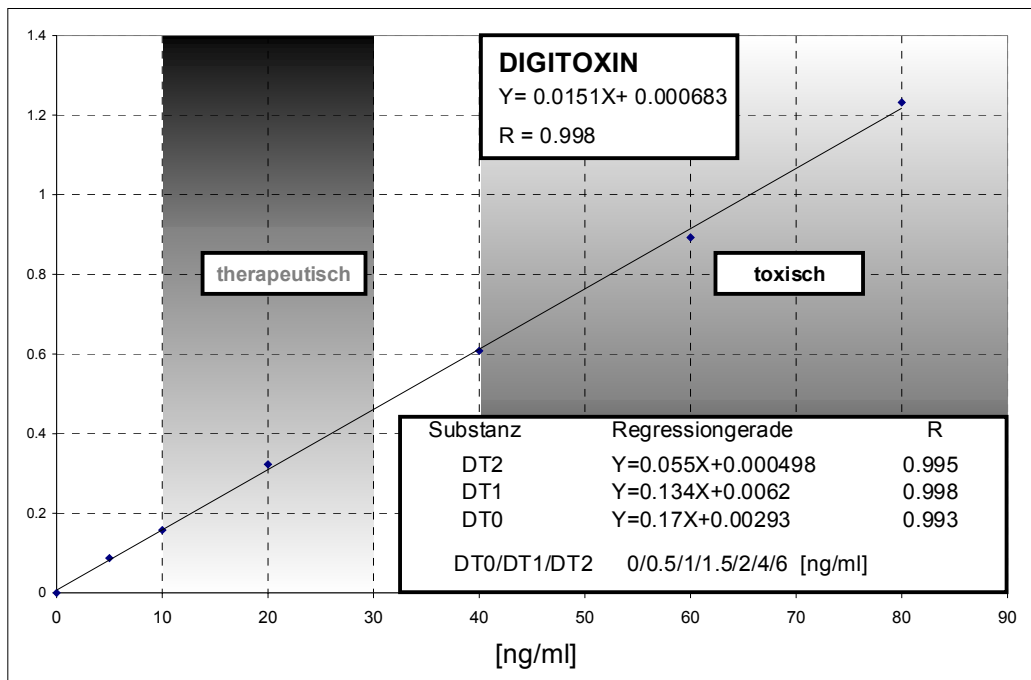


Abb. 2: Lineare Kalibration für Digitoxin und Digitoxinabbauprodukte

Bei orientierenden Vergleichsmessungen mit jeweils 30 Seren, die zuvor im Rahmen des klinischen Drugmonitorings mittels Immunoassay (FPIA) untersucht worden waren, wurde eine gute Korrelation erzielt (Abb. 3). Bei der Untersuchung von Referenzmaterial ergaben sich mit dem Verfahren Meßwerte, die die Anwendbarkeit belegen.

Aufarbeitung von Organproben

Das bei forensischen Fragestellungen, insbesondere bei Todesfällen, verfügbare Untersuchungsmaterial ist häufig nur mit Einschränkungen für immunchemische Untersuchungen auf Digitalisglykoside geeignet, da neben ggf. postmortal veränderten Körperflüssigkeiten häufig auf Organmaterial zurückgegriffen werden muß. Organkonzentration der Digitalisglykoside können darüber hinaus hilfreiche Zusatzinformationen für die Beurteilung entsprechender Fälle liefern. [18,30].

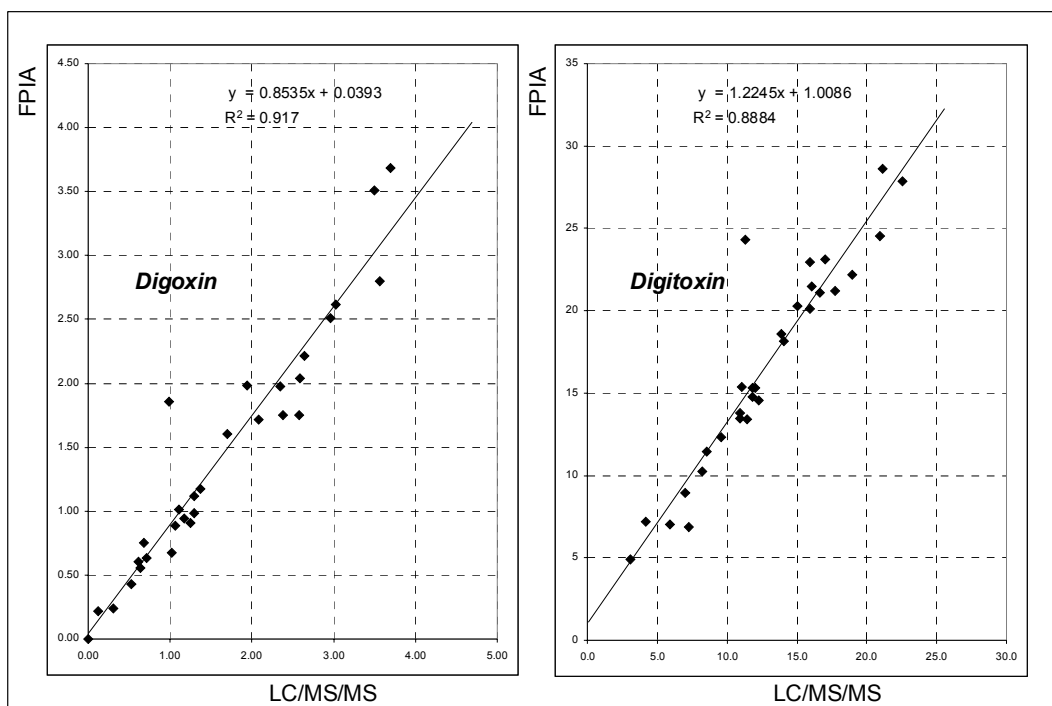


Abb. 3: Vergleichsuntersuchung von Serumproben auf Digoxin und Digitoxin mittels FPIA und LC/MS/MS

Tabelle 3: Ergebnisse der Untersuchung von Referenzmaterial (DGKL: AP 3/06)

	Digitoxin [ng/ml]	Digitoxin [ng/ml]
Zielwert (Probe A)	38.6	2.05
Bereich	26.2 - 51.0	1.43 - 2.67
Meßwert	34.2	1.61
Zielwert (Probe B)	10	0.823
Bereich	6.8-13.2	0.58 - 1.07
Meßwert	9.2	0.64

Nach der im Serum durchgeführten Validierung wurde die Methode in einer Reihe von Fällen zur Aufarbeitung von Organmaterial angewendet. Dazu wurden die Organe (Leber und Niere) mit Phosphatpuffer (pH = 8) nach Zugabe des internen Standards am UltraTurrax homogenisiert (5g Gewebe und 20 g Puffer) und 5g des Homogenates anschließend mit 3 ml Essigester/Dichlormethan (80 + 20) flüssigextrahiert und weiter wie oben für Blutproben beschrieben behandelt. Die Quantifizierung erfolgte mittels Standardaddition nach 2-Punkt-Aufstockung.

Kasuistik

Ein älteres Ehepaar verstarben innerhalb von 24 Stunden, was die Aufmerksamkeit der Ermittlungsorgane auf sich zog. In der Gemeinde wurde ein Verdacht gegen einen erbbegünstigten Betreuer geäußert, er habe die Eheleute möglicherweise mit „Diacopam“ (gemeint war wohl Diazepam) vergiftet. Im Rahmen der Ermittlungen wurde die Hausärztin der Eheleute befragt, die eine Digitoxin-Verordnung für die herzkrankte Frau einräumte und sich daran erinnerte, dass sie im Rahmen eines Patientengesprächs zusammen mit dem Betreuer über die Risiken und Gefahren des Medikamentes aufgeklärt habe. Somit war dem Betreuer Digitoxin als potentielles Gift bekannt. Allerdings lag die Beerdigung der Eheleute zu diesem Zeitpunkt schon 10 Monate zurück. Die Staatsanwaltschaft entschloß sich aufgrund der Sachlage und der vorliegenden Vorwürfe zu einer Exhumierung. Bei der Obduktion konnten für die toxikologischen Analysen lediglich fäulnisveränderte Gewebeproben von Leber und Nieren gesichert werden.

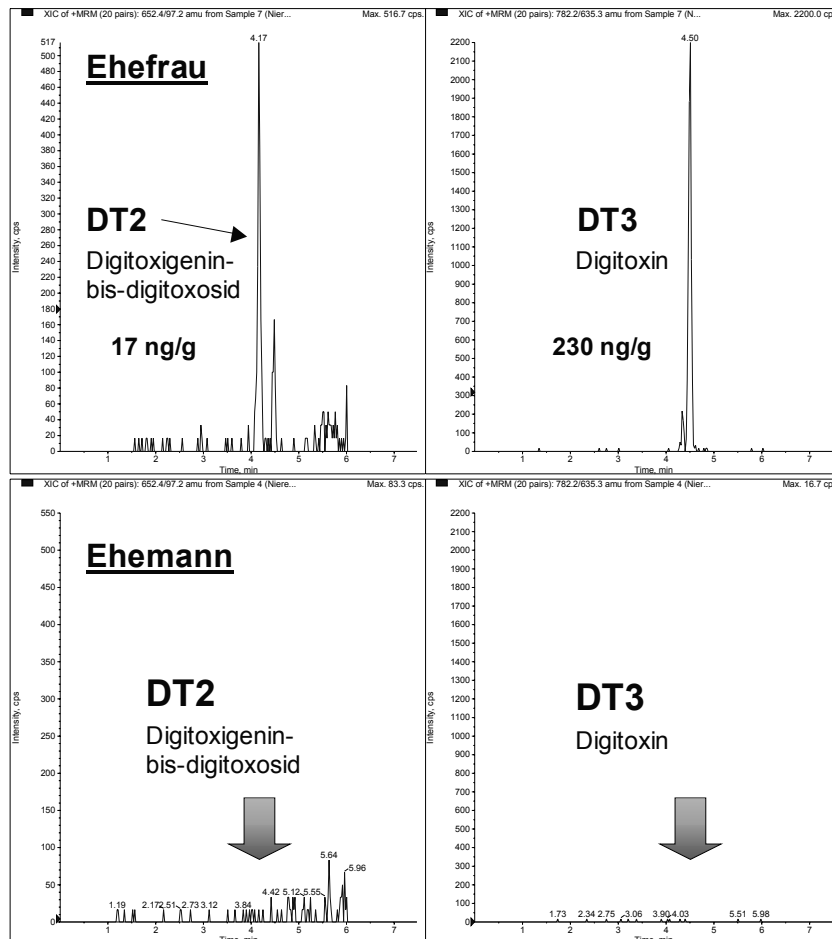


Abb. 4: Ionenchromatogramme der Target-MRM-Übergänge für Digitoxin und DT2 der untersuchten Extrakte aus Nierengewebe

Diese Proben wurden mit den beschriebenen Analyseverfahren aufgearbeitet und untersucht (Abb. 4). Bei der Untersuchung der Gewebeproben der Ehefrau fand sich Digitoxin (Niere: 230 ng/g, Leber: 165 ng/g) und DT2 (Niere: 17 ng/g, Leber: 8 ng/g); DT1 war zum damaligen Zeitpunkt noch nicht in die Methode integriert, messbare Konzentrationen an DT0 und Digoxin lagen nicht vor. In den Gewebeproben des Ehemanns konnten keine Herzglykoside nachgewiesen werden.

Die vorgefundenen Konzentrationen in den Proben der Frau sind prinzipiell mit der eingeräumten Medikation vereinbar; es ergaben sich zumindest keine Hinweise, die für eine Beibringung einer tödlichen Überdosis sprechen. Da hingegen die Untersuchungen der Gewebeproben des Ehemanns, der kein Digitoxin verordnet bekam, negativ verliefen und auch weitere toxikologische Analysen, einschließlich der LC-MS-MS- Untersuchungen auf die in Rede stehenden Benzodiazepine, keine toxikologisch relevanten Befunde lieferten, mußte im vorliegenden Fall davon ausgegangen werden, dass es sich um natürliche Todesfälle aufgrund von altersbedingten Vorerkrankungen handelt, die nur zufällig zeitnah innerhalb von 24 h erfolgten.

Schlußfolgerung

Die beschriebene Methode ist geeignet, die Herzglykoside Digitoxin und Digoxin einschließlich der genannten Abbauprodukte mittels Tandemmassenspektrometrie im therapeutischen und toxischen Bereich quantitativ zu erfassen. Neben der Ermittlung von Blut- und Serumkonzentrationen können damit auch Gewebeproben untersucht und für die Bewertung bei forensisch-toxikologischen Fragestellungen herangezogen werden. Die diesbezüglich zur Verfügung stehenden Vergleichswerte [30,31], die früher mit anderen Methoden erzielt wurden, können somit zukünftig durch weitere Messungen auf der Basis massenspektrometrischer Analysen verifiziert und ergänzt werden.

Anhand der geschilderten Kasuistik ist ersichtlich, dass die Methode auch bei kompliziertesten Matrixverhältnissen geeignet ist, eine relevante Herzglykosid-Einnahme entweder eindeutig nachzuweisen oder auszuschließen.

Literatur

- [1] M. Parker, M. Gheorghide, J.B. Young, P.J. Costantin, K.F. Adams, R.J. Cody et al. (1993) Withdrawal of digoxin from patients with chronic heart failure treated with angio-tensin-converting-enzyme inhibitors. RADIANCE Study. N Engl J Med 329:1-7
- [2] B.F. Uretsky, J.B. Young, F.E. Shahidi, L.G. Yellen, M.C. Harrison, M.K. Jolly (1993) for the PROVED investigation Group. Randomized study assessing the effect of digoxin withdrawal in patients with mild to moderat cronic congestive heart failure: result of PROVED Trial. J Am Coll Cardiol 22:955-962

- [3] The Digitalis Investigation Group (1997) The effect of digoxin on mortality and morbidity in patients with heart failure. *N Engl J Med* 336:525-533
- [4] U. C. Hoppe, E. Erdmann (2001) Leitlinien zur Therapie der chronischen Herzinsuffizienz. Im Auftrag der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie – Herz- und Kreislaufforschung. *Z Kardiol* 90:218-237
- [5] S.A. Hunt (2006) ACC/AHA 2005 guideline update for the diagnosis and management of chronic heart failure in the adult: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Writing Committee to Update the 2001 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure. *J Am Coll Cardiol* 47(7):1503-1505
- [6] S.G. Terra, J.B. Washam, G.D. Dunham, W.A. Gattis (1999) Therapeutic range of digoxin's efficacy in heart failure: wath is evidence? *Pharmacotherapy* 19:1123-1126
- [7] S.S. Rathore, J.P. Curtis, Y. Wang, M.R. Briston, H.M. Krumholz (2003) Association of serum digoxin concentration and outcomes in patients with heart failure. *JAMA* 289:871-881
- [8] V.P. Butler, D. Tse-Eng (1982) Immunoassay of digoxin and other cardiac glycosides. *Methods Enzymol* 84:558-77
- [9] E. Haber (1985) Antibodies and digitalis: the modern revolution in the use of an ancient drug. *J Am Coll Cardiol* 5(5 Suppl A):111A-117A.
- [10] P. Datta, A. Dasgupta (1998) Interference from digitoxin-like immunoreactive factors reduced in a new monoclonal chemiluminescent digitoxin assay. *Ther Drug Monit* 20(6):663-668
- [11] H.M. Dodds, R.L. Norris, A.G. Johnson, S.M. Pond (1995) Evaluation and comparison of the TDxII, Stratus, and OPUS digoxin assays. *Ther Drug Monit* 17(1):68-74
- [12] N.C. Saccoia, L.P. Hackett, R.G. Morris, K.F. Ilett (1996) Enzyme-multiplied immunoassay (EMIT 2000) digoxin assay compared with fluorescence polarization immunoassay and amerlex 125I-radioimmunoassay at two Australian centers. *Ther Drug Monit* 18(6):672-677
- [13] B. Solnica (2004) Comparison of serum digoxin concentration monitoring by fluorescence polarization immunoassay on the TDxFLx and dry chemistry enzyme immunoassay on the Vitros 950. *Clin Chem Lab Med*.42(8):958-964
- [14] K.A. Gruber, J.M. Whitaker, VM Buckalew (1980) Endogenous digitalis-like substances in plasma of volume-expanded dogs. *Nature* 287:743-745
- [15] S.A. Jortani, R. Valdes (1997) Digoxin and its related endogenous factors. *Crit Rev Clin Lab* 34: 225-274
- [16] Y. Bentur, A. Tisipiniku, U. Taitelman (1999) Post-mortem digoxin-like immunoreactive substances (DLIS) in patients not treated with digoxin. *Human Exp Toxicol* 18: 67-70
- [17] W. Schoner (2002) Endogenous cardiac glycosides, an new class of steroid hormones. *Eur J Biochem* 269:2440-2448
- [18] R. Aderjan, H. Bur, G. Schmidt (1979) Investigation of cardiac glycosid levels in human postmortem blood and tissues determined by a special radioimmunoassay. *Arch Toxicol* 42:107-114
- [19] A.R. Hastreiter, R.L. van der Horst (1984) Tissue concentrations at autopsy in infants and children receiving therapeutic digoxin. *J Forensic Sci* 29:139-146

- [20] J. Plum, Th. Daldrup (1986) Detection of digoxin, digitoxin, their cardioactive metabolites and derivatives by high-performance liquid chromatography and high-performance liquid chromatography-radioimmunoassay. *J Chromatogr* 377:221-231
- [21] S. Ritz, P. Harding, W. Martz, H.W. Schütz, H.-J. Kaatsch (1992) Measurement of digitalis-glycoside levels in ocular tissues A way to improve postmortem diagnosis of lethal digitalis-glycoside poisoning? I. Digoxin, *Int J Leg Med* 105(3):149-154
- [22] A. Tracqui, P. Kintz, B. Ludes, P. Margin (1997) High-performance liquid chromatography-ionspray mass spectrometry for the determination of digoxin and some related cardiac glycosides in human plasma. *J Chromatogr B* 692:101-109
- [23] F. Guan, A. Ishii, H. Seno, K. Watanabe-Suzuki, T. Kumazawa, O. Suzuki (1999) Identification and quantification of cardiac glucosides in blood and urine samples by HPLC/MS/MS. *Anal Chem* 71:4034-4043
- [24] M. Yao, H. Zhang, S. Chong, M. Zhu, R.A. Morrison (2003) A rapid and sensitive LC/MS/MS assay for quantitative determination of digoxin in rat plasma. *J Pharm Biomed Ana* 32:1189-1197
- [25] E. Lacassie, P. Marquet, S. Martin-Dupont, J.-M. Gaulier, G. Lachatre (2000) A non-fatal case of intoxication with foxglove, documented by means of liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry
- [26] A. Kessler (2001) Massenspektrometrische Isotopenverdünnungsanalyse von Digoxin und Digitoxin in menschlichem Serum – Referenzmethode in der klinischen Chemie, Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- [27] G. Gosa, D. Allegrone, E Del Grosso (2005) LC-ESI-MS/MS characterization of strophanthin-K. *J Pharm Biomed Anal* 38(1):79-86
- [28] P. Kaiser, T. Akerboom, W. Graham, H. Reinauer (2006) A novel LC-IDMS/MS method for the determination of the cardiac glycosides digoxin and digitoxin using caesium adducts. *Clin Lab* 52:37-42
- [29] B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C. M. Chavez-Eng (2003) Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS. *Anal. Chem.* 75: 3019-3030
- [30] J. Plumb, T. Daldrup (1985) Verteilung von Digoxin, Digitoxin und ihrer kardioaktiven Metaboliten im menschlichen Herz- und Nierengewebe - Eine post mortem-Untersuchung. *Z Rechtsmedizin* 94:257-272
- [31] E. Lacassie, P. Marquet, S. Martin-Dupont, J.-M. Gaulier, G. Lachatre (2000) A Non-fatal case of intoxication with foxglove, documented by means of liquid chromatography-electrospray-mass spectrometry. *J Forensic Sci* 45/5: 1154-1158

Dr. rer. nat Jörg Teske,
 Dr. rer. nat. Jens-Peter Weller,
 Prof. Dr. med. Hans Dieter Tröger,
 Institute of Legal Medicine,
 Hannover Medical School,
 Carl-Neuberg-Strasse 1,
 30625 Hannover, Germany