

基于 Levey-Jennings 质控图联合 Westgard 多规则理论建立万古霉素治疗药物监测的室内质控评估方法

李会婷*, 吴妍, 张哲毅, 史天陆# (中国科学技术大学附属第一医院/安徽省立医院药剂科, 合肥 230001)

中图分类号 R978.1 文献标志码 A 文章编号 1672-2124(2022)06-0722-05

DOI 10.14009/j.issn.1672-2124.2022.06.020

摘要 目的:利用 Levey-Jennings 质控图联合 Westgard 多规则理论建立高效液相色谱法测定万古霉素血药浓度的室内质控方法,为万古霉素安全有效的个体化给药提供依据。方法:取万古霉素标准品,溶解后加入空白血清制得质量浓度分别为 10、25 和 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的质控血浆,进行方法学考察以评估其可行性;对 2020 年 6—8 月该院 30 份万古霉素质控品进行监测,绘制 Levey-Jennings 质控图及 Z-分数质控图,结合 Westgard 多规则理论对室内质控进行评估并进行统计分析。结果:万古霉素血清质量浓度在 2.5~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 线性良好,低、中、高浓度质控品的日内和日间精密度的 RSD 及回收率均符合《中华人民共和国药典:四部》(2020 年版)中生物样品测定的要求;室内质控评价结果显示万古霉素失控 1 次,经分析,去除误差因素后未有失控出现。结论:万古霉素治疗药物监测室内质量控制体系的建立有助于提高血药浓度监测结果的准确性,为临床提供精准的个体化药学服务。

关键词 Levey-Jennings 质控图; Westgard 多规则理论; 万古霉素; 血药浓度; 质控

Establishment of Internal Quality Control Evaluation Method for Therapeutic Drug Monitoring of Vancomycin Based on Levey-Jennings Quality Control Chart Combined with Westgard Multi-Rule Theory

LI Huiting, WU Yan, ZHANG Zhetao, SHI Tianlu (Dept. of Pharmacy, the First Hospital Affiliated to University of Science and Technology of China/Anhui Provincial Hospital, Hefei 230001, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To establish the internal quality control evaluation method for therapeutic drug monitoring of vancomycin based on Levey-Jennings quality control chart combined with Westgard multi-rule theory, so as to provide references for rational clinical drug use. **METHODS:** Vancomycin standard was dissolved and blank serum was added to prepare quality control plasma with mass concentrations of 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively, and methodological studies were carried out to assess the feasibility. Totally 30 vancomycin quality control samples in the hospital from Jun. to Aug. 2020 were monitored, and Levey-Jennings quality control chart and Z-score quality control chart were drawn. Combined with Westgard multi-rule theory, internal quality control was evaluated and statistically analyzed. **RESULTS:** Vancomycin showed good linear relationship within the range of 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The intra-day and inter-day precision RSD and recoveries of the low, medium and high concentrations of the quality control samples met the requirements of the Pharmacopoeia of the People's Republic of China: IV (2020 Edition) for the determination of biological samples. The internal quality control evaluation showed one loss of control of vancomycin. After analysis, there was no out of control after removing error factors. **CONCLUSIONS:** The establishment of internal quality control system for therapeutic drug monitoring of vancomycin can effectively improve the accuracy of blood drug concentration monitoring, and provide more accurate individualized pharmaceutical services for clinical practice.

KEYWORDS Levey-Jennings quality control chart; Westgard multi-rule; Vancomycin; Therapeutic drug monitoring; Quality control

万古霉素为糖肽类抗菌药物,用于治疗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)、肠球菌及耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌等革兰阳性菌感染。美国感染病学会发布的有关 MRSA 感

染治疗指南^[1]和《万古霉素临床应用中国专家共识(2011 版)》^[2]指出,万古霉素治疗金黄色葡萄球菌感染成败与其血药谷浓度高低有关,同时不良反应(尤其是肾毒性)的发生与其血药浓度过高有关。2020 年美国万古霉素治疗严重 MRSA 感染的治疗药物监测指南^[3]和《中国万古霉素治疗药物监测指南(2020 更新版)》^[4]推荐,对于重症监护病房患者、肥胖患者、烧伤患者、应用肾损害药物患者及肾功能不全患者、新生

* 主管药师,硕士。研究方向:临床药学与药物质量评价。E-mail: lihuiting0530@163.com

通信作者:主任药师,博士。研究方向:临床药理学及个体化药理学研究。E-mail:tianlu828@163.com

儿/儿童患者、接受肾脏替代治疗等患者,应进行万古霉素监测。目前,万古霉素的治疗药物监测方法包括荧光偏振免疫分析法、微生物法等^[5]。但高效液相色谱法(high-performance liquid chromatography, HPLC)仍是使用最普遍的方法^[6-7]。其较为经济,但步骤繁琐,结果影响因素较多,而国内没有配备定值质控品,对于万古霉素室内质控研究较少且不够完整。因此,本研究在已有实验室条件下,对 HPLC 法测定万古霉素血药浓度的室内质量控制评价体系进行了相关探索。

1 材料

1.1 仪器

Shimadzu LC-2010A 型高效液相色谱仪(紫外检测器, LabSolutions Version 5.51 色谱工作站,日本岛津公司); MS205DU 型十万分之一分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司); SB-5200D 型超声波清洗器(宁波新芝生物科技股份有限公司); TGL-16B 型高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂)。

1.2 药品与试剂

万古霉素对照品(批号:130360-201302),去甲万古霉素(批号:130338-201704,含量 87.7%),均购于中国食品药品检定研究院;甲醇(HPLC 级,西陇科学股份有限公司);水为超纯水;健康人空白血清由我院输血科提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Hypersil ODS 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相:磷酸二氢钾-甲醇(V:V=87:13);检测波长:230 nm; 流速:1 mL/min;柱温:35℃;进样量:20 μL。

2.2 万古霉素工作液的配制

精密称取万古霉素适量至 5 mL 容量瓶中,以超纯水稀释至刻度得到 1 mg/mL 万古霉素储备液。取适量注射用水,依次将储备液稀释为 25、50、100、250 和 500 μg/mL 系列浓度的万古霉素工作液,于 4℃ 冰箱备用。

2.3 去甲万古霉素工作液的配制

精密称取去甲万古霉素 5 mg 至 25 mL 容量瓶中,以注射用水稀释至刻度,溶解后得到 200 μg/mL 去甲万古霉素内标溶液。

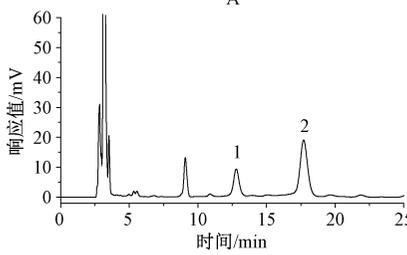
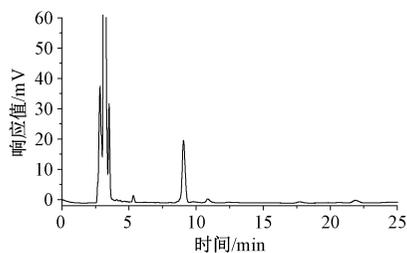
2.4 自制血浆质控品的制备

参考文献^[8],取健康人血清 90 μL,分别加入 25 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL、250 μg/mL、500 μg/mL 和 1 mg/mL 万古霉素工作液 10 μL,得到新鲜配制的自制质控品,质量浓度分别为 2.5、5、10、25、50 和 100 μg/mL。

2.5 方法学验证

2.5.1 专属性考察:按照“2.1”项下色谱条件下进样,去甲万古霉素、万古霉素保留时间分别 12.793、17.707 min,与血清内其他成分分离良好,空白血清无干扰,见图 1。

2.5.2 标准曲线及最低定量限的建立:取“2.4”项下各质量浓度的自制血浆质控品,分别加入去甲万古霉素 20 μL,混匀 30 s 后加入 10% 高氯酸溶液 100 μL,涡旋 1 min,12 000 r/min 离心 10 min(离心半径 6 cm),取上清液 80 μL,按照“2.1”项下色谱条件进样并测定。以万古霉素浓度(X , μg/mL)为横坐标,以万古霉素峰面积与内标峰面积比值(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程, $Y=0.0594X-0.0824$, $r=0.9998$,结果



A. 空白血清样品; B. 血清+内标+万古霉素;

1. 去甲万古霉素内标; 2. 万古霉素

A. blank serum; B. serum+internal standard+vancomycin;

1. norvancomycin; 2. vancomycin

图 1 血清万古霉素高效液相色谱图

Fig 1 High performance liquid chromatography of serum vancomycin

表明,万古霉素血清质量浓度在 2.5~100 μg/mL 线性良好,血清中最低定量限为 0.5 μg/mL。

2.5.3 精密度及回收率测定:取新鲜配制的高、中、低浓度质控品(质量浓度分别为 50、25、10 μg/mL),按照“2.1”项下色谱条件进样分析。每个浓度平行操作 6 次,计算日内精密度;连续测定 3 d,计算日间精密度。同时,取新鲜配制的高、中、低浓度质控品,按照“2.1”项下色谱条件进样分析,万古霉素色谱峰面积与内标色谱峰面积比值代入相对应的随行标准曲线中,每个浓度平行操作 6 次,计算日内回收率;连续测定 3 d,计算日间回收率。结果均满足《中华人民共和国药典:四部》(2020 年版)^[9]中生物样品检测的要求,见表 1。

2.5.4 Levey-Jennings 质控图的绘制:取新鲜配制的高、中、低浓度质控品(质量浓度分别为 50、25、10 μg/mL),经预处理后,以内标法依次测定 2020 年 6—8 月我院 30 组质控品,以测定例次为横坐标、测定浓度为纵坐标, \bar{x} 为靶值, $\pm SD$ 为控制线, $\pm 2SD$ 为警告线, $\pm 3SD$ 为失控线,运用 Excel 软件绘制 Levey-Jennings 质控图,结果见图 2。30 组质控品中,高浓度质控品实测值范围为 45.12~54.34 μg/mL,其中第 7 次所测值为 46.90 μg/mL,第 22 次所测值为 45.12 μg/mL,超过 $\bar{x}-2SD$ (46.97 μg/mL),提出警告 2 次;中浓度质控品实测值范围为 23.84~30.14 μg/mL,其中第 17 次所测值为 30.14 μg/mL,第 23 次所测值为 29.29 μg/mL,超过 $\bar{x}+2SD$ (29.17 μg/mL),提出警告 2 次;低浓度质控品实测值范围为 8.26~10.57 μg/mL,未出现警告或失控。

2.5.5 绘制 Z-分数质控图:由于选择了 3 个质控浓度,为了多水平、更直观准确地进行质量控制,在 Levey-Jennings 质控图基础上,将低、中、高浓度质控样品转换成 Z-分数形式,

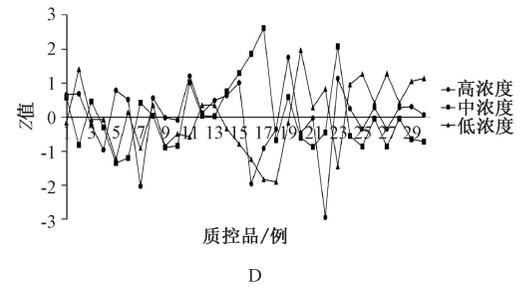
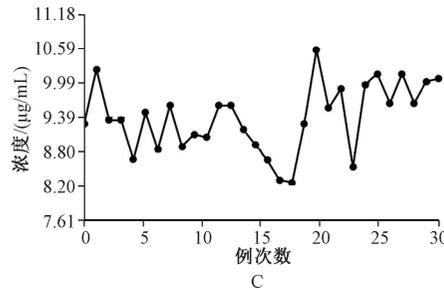
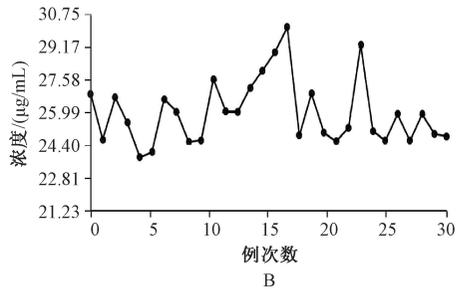
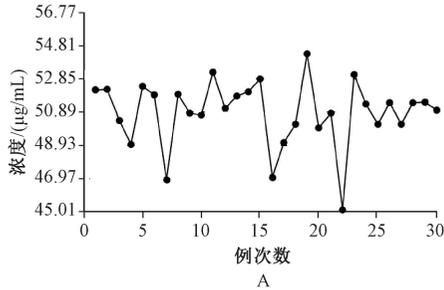
表 1 万古霉素血药浓度监测室内质控精密度和回收率结果 (n=6)

Table 1 Results of internal quality control precision and recovery of vancomycin concentration (n=6)

标示浓度/(μg/mL)	日内			日间		
	测定值/(μg/mL)	RSD/%	回收率/%	测定值/(μg/mL)	RSD/%	回收率/%
10	10.14±0.63	6.22	101.45±0.99	10.14±0.64	6.32	101.29±1.53
25	24.27±0.45	1.83	98.96±1.01	24.51±0.43	1.74	99.87±1.93
50	47.40±1.76	3.71	99.01±1.70	46.54±1.45	3.11	100.64±3.16

绘制在单张质控图进行比较。转换公式为, $Z = (x - x_{\text{mat}}) / s$, x 为质控品测定值, x_{mat} 为同一水平质控品测定值的平均值, s 为该质控品的标准差^[10]。运用 Excel 软件绘制 Z 分数图(见图 2), 结合 Westgard $1_{2s}/1_{3s}/2_{2s}/R_{4s}/4_{1s}/10_x$ 多规则质控原则, 当出现 1 次 $2 < |Z| < 3$ 时, 违反 1_{2s} 规则, 提出警告 1 次, 当出现 1 次 $|Z| > 3$ 时, 违反 1_{3s} 规则, 提出失控 1 次; 当连续 2 次出现

$2 < |Z| < 3$ 时, 违反 2_{2s} 规则, 或连续 2 次 Z 之间差值 > 4 , 违反 R_{4s} 规则, 提示失控; 连续 4 次 $|Z| > 1$, 违反 4_{1s} 规则, 或连续 10 次 $|Z| > 0$, 违反 10_x 规则, 均提示失控。结果显示, 高浓度质控品第 22 次、第 23 次 2 次 Z 差值为 4.08, 违反 R_{4s} 规则, 提示失控 1 次, 经分析考虑为随机误差所致。查找原因发现为操作人员不同所致, 后调整操作人员重新操作测定后未有误差出现。



A. 高浓度质控品 Levey-Jennings 质控图; B. 中浓度质控品 Levey-Jennings 质控图; C. 低浓度质控品 Levey-Jennings 质控图; D. 高、中、低浓度质控品 Z-分数质控图

A. Levey-Jennings chart of high concentration quality control samples; B. Levey-Jennings chart of medium concentration quality control samples; C. Levey-Jennings chart of low concentration quality control samples; D. Z-score charts of high, medium and low concentration quality control samples

图 2 质控数据分布图

Fig 2 Distribution of quality control data

2.6 万古霉素血药浓度监测数据

2020 年 6—8 月测定万古霉素 39 例次, 共 29 例患者, 其中 6 例患者测定 2 次, 1 例患者测定 5 次。首次总体监测结果显示, 仅 41.38% 的万古霉素血药谷浓度在正常范围内, 低于正常范围的有 9 例, 高于正常范围的有 8 例; 万古霉素血药谷浓度监测 ≥ 2 次的 7 例患者中, 4 例经剂量调整后, 万古霉素血药谷浓度恢复至正常范围; 万古霉素治疗期间, 共 2 例患者发生肾损伤, 其万古霉素质量浓度均 $> 20 \mu\text{g/mL}$, 见表 2。

3 讨论

万古霉素是治疗 MRSA 感染的主要药物之一, 但其治疗指数窄, 个体差异较大^[11-12]。若血药浓度过低, 达不到治疗效果, 易产生耐药; 血药浓度过高, 则易引起不良反应(如肾毒性、耳毒性等), 因此, 根据万古霉素血药浓度监测结果进行个体化用药方案的调整, 保证患者达到安全、有效的治疗效果尤

为重要^[13-14]。而治疗药物监测结果的准确性是临床制定和调整个体化给药方案的重要影响因素之一, 质控方法的建立在一定程度上可以保证样品测定的准确性及稳定性, 因此, 建立一套完整的质控体系以保证监测结果的准确性是非常重要的。

自制万古霉素质控血清制备方法简单、成本低廉, 其可行性已有文献报道^[8]。绘制 Levey-Jennings 质控图是实验室常用于判断质控样本合格与否的方法, 其通过上下警戒线、失控线来对质控结果进行简单判定, 但只对随机误差敏感, 且只能显示单个浓度测定的精密度。而 Z-分数质控图可用于多水平的质控物, 全面反映多个浓度的质控结果^[15]。Westgard 多规则质控规则中的 1_{3s} 规则和 R_{4s} 规则可及时发现随机误差, 2_{2s} 规则、 4_{1s} 规则和 10_x 规则可及时发现系统误差, Westgard 多规则质控规则与 Levey-Jennings 质控图和 Z 分数质控图联合, 不仅可以更为准确地判定测定结果的准确性, 还可以在发生失

表2 万古霉素血药谷浓度总体监测和首次监测浓度分布及肾损伤发生情况

Tab 2 Distribution of total and initial monitoring of vancomycin trough concentration and incidence of renal injury

万古霉素质量浓度/ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	总体监测			首次监测			肾损伤发生情况/例	
	例次数	构成比/%	平均值/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	例次数	构成比/%	平均值/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	未发生	发生
<10	10	25.64	6.13 \pm 2.80	9	31.03	5.96 \pm 3.09	9	0
10~20	16	41.03	14.58 \pm 2.07	12	41.38	14.59 \pm 2.14	12	0
>20	13	33.33	27.34 \pm 7.21	8	27.59	25.27 \pm 6.78	6	2
合计	39	100.00	16.67 \pm 9.50	29	100.00	14.86 \pm 8.52	27	2

控时,确定失控类型,为失控原因的确定提供帮助^[16-18]。

通过本实验室连续性质控评价发现,本批次自制万古霉素质控血清共发生警告4次,失控1次,失控发生于高浓度质控品,第22次、第23次2次Z差值为4.08,违反 R_4 规则。当发生失控时,及时查明原因,排除误差,分析可能存在的影响因素并及时纠正,以保证血药浓度检测结果的准确性是十分必要的。因此,实验中应详细记录试剂批号、操作人员、定标日期、实验室环境、冰箱温度、测定中的异常现象、仪器的校正及故障等信息,以便及时发现造成误差的原因。根据我院实验室情况,分析产生随机误差的原因主要为环境温度改变、操作人员不同等;产生系统误差的原因主要为试剂的“瓶底效应”、移液枪的校正等^[19-20]。

目前,国内外指南推荐成人万古霉素有效谷浓度为10~20 $\mu\text{g}/\text{mL}$,新生儿/儿童患者万古霉素谷浓度维持在5~15 mg/L ^[21]。指导剂量调整最关键和实用的为万古霉素血药谷浓度^[22]。按照常规剂量(15 mg/L ,每12 h给药1次)给药时,其导致肾功能损害的发生率为1%~5%^[2,23]。本研究初步统计了2020年6—8月29例患者万古霉素血药浓度测定结果,结果显示,仅有41.38%的患者万古霉素血药浓度在正常范围内,与文献中的达标率基本一致^[24]。多次进行万古霉素血药谷浓度监测的7例患者中,4例通过调整用药方案再次监测血药浓度恢复至正常范围,肾损伤发生率为6.90%,略高于文献报道^[2,23]。分析原因,首先,本研究分析例数偏少;其次,我院万古霉素监测人群均为老年人及危重症患者,该人群脏器功能差,联合用药较多,发生肾损伤患者的万古霉素血药浓度均>20 $\mu\text{g}/\text{mL}$,可知肾毒性的发生与血药浓度过高有着密切联系^[25-26]。

本研究较为全面地建立了HPLC法测定万古霉素血药浓度的质控评价方法,应用Levey-Jennings质控图联合Westgard多规则理论进行质控评估,能够提高误差的检测灵敏度并提示误差的性质,以便发现各种测定误差并及时纠正,保证血药浓

度测定的准确性,为临床制定合理的个体化给药方案提供准确参考。

参考文献

- [1] LIU C, BAYER A, COSGROVE S E, et al. Clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children[J]. Clin Infect Dis, 2011, 52(3): e18-e55.
- [2] 陈佰义, 管向东, 何礼贤, 等. 万古霉素临床应用中国专家共识(2011版)[J]. 中国新药与临床杂志, 2011, 30(8): 561-573.
- [3] RYBAK M J, LE J, LODISE T P, et al. Executive summary: therapeutic monitoring of vancomycin for serious methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections: a revised consensus guideline and review of the American Society of Health-System Pharmacists, the Infectious Diseases Society of America, the Pediatric Infectious Diseases Society, and the Society of Infectious Diseases Pharmacists [J]. Pharmacotherapy, 2020, 40(4): 363-367.
- [4] HE N, SU S, YE Z K, et al. Evidence-based guideline for therapeutic drug monitoring of vancomycin: 2020 update by the division of therapeutic drug monitoring, Chinese Pharmacological Society[J]. Clin Infect Dis, 2020, 71(Suppl 4): S363-S371.
- [5] 莫晓乡, 周家福. 三种方法测定万古霉素血药浓度比较分析[J]. 儿科学杂志, 2017, 23(7): 42-44.
- [6] 王菁, 刘璐, 郑恒, 等. 治疗药物监测的研究进展[J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37(1): 1-8.
- [7] 李容. 高效液相色谱法测定人血清万古霉素浓度[J]. 中国药业, 2018, 27(7): 7-10.
- [8] 董富祥, 马爱玲, 秦玉花. 自制万古霉素质控血清用于血药浓度监测的可行性探讨[J]. 中国临床药理学杂志, 2015, 31(22): 2252-2253.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 466.

(下转第734页)

(上接第721页)

- [12] JARAI R, KAUN C, WEISS T W, et al. Human cardiac fibroblasts express B-type natriuretic peptide: fluvastatin ameliorates its up-regulation by interleukin-1 α , tumour necrosis factor- α and transforming growth factor- β [J]. J Cell Mol Med, 2009, 13(11/12): 4415-4421.
- [13] WANG F, WU Y P, TANG L, et al. Brain natriuretic peptide for prediction of mortality in patients with sepsis: a systematic review and meta-analysis[J]. Crit Care, 2012, 16(3): R74.
- [14] 中国中西医结合学会第三届普通外科专业委员会, 《中国中

医结合外科杂志》学术编辑委员会, 王西墨, 等. 脓毒症肺损伤中西医结合诊治专家共识[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2020, 26(3): 400-408.

- [15] 张瑞, 陈奕杉, 赵国桢, 等. 《中医药单用/联合抗生素治疗常见感染性疾病临床实践指南·脓毒症》临床应用评价与修订意见[J]. 中国中药杂志, 2018, 43(24): 4776-4781.
- [16] 孟繁甦, 刘勇, 罗泽坤, 等. 血必净注射液对脓毒症大鼠心肌细胞凋亡保护作用的机制研究[J]. 中国中医急症, 2019, 28(3): 418-421.

(收稿日期:2022-03-19 修回日期:2022-04-06)