

基于 Westgard 多规则理论的伏立康唑药物治疗监测的 HPLC-MS/MS 方法学室内质控的评价

秦辉¹, 楼喻涛², 郝思璇³, 宋飞凤¹, 胡晓平¹, 黄萍^{1,4}, 张轶雯^{1,4*} (1.浙江省人民医院药剂科, 杭州医学院附属人民医院, 杭州 310010; 2.浙江工业大学药学院, 杭州 310014; 3.浙大城市学院医学院, 杭州 310015; 4.浙江省内分泌腺体疾病诊治研究重点实验室, 杭州 310010)

摘要: 目的 建立伏立康唑治疗药物监测的 HPLC-MS/MS 质量控制方法, 应用 Westgard 多规则理论对质控样品进行评估。方法 精密称取分析物伏立康唑对照品和内标氟康唑对照品适量, 分别用甲醇溶解, 与空白血浆基质混匀并按血浆处理方法进行操作, 制备含内标氟康唑的低、中、高浓度质控血浆样品(80, 5 000, 8 000 ng·mL⁻¹), 采用 HPLC-MS/MS 测定 2020 年 12 月随行的 36 组血浆质控样品, 并应用 Excel 绘制 Levey-Jennings 质控图和 Z-分数质控图, 采用 Westgard 多规则理论进行室内质量评估。结果 伏立康唑低、中、高浓度质控值日内、日间 RSDs 分别为 4.9%~5.3%, 6.0%~7.1%, 内标和伏立康唑的提取回收率分别为 110%~112%, 98%~112%, 符合中国药典对生物样品检测的要求。Levey-Jennings 质控图、Z-分数质控图结果均提示随行 36 组质控血浆样品的浓度检测结果均在可控范围内。结论 伏立康唑治疗药物监测室内质量控制体系的建立可有效提高血药浓度监测结果的准确性, 为临床精准的个体化给药提供服务。

关键词: 伏立康唑; 治疗药物监测; 室内质控; Westgard 多规则理论; 质控图

中图分类号: R969.1

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2022)14-1874-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.14.013

引用本文: 秦辉, 楼喻涛, 郝思璇, 等. 基于 Westgard 多规则理论的伏立康唑药物治疗监测的 HPLC-MS/MS 方法学室内质控的评价[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(14): 1874-1879.

Internal Quality Control Evaluation of Therapeutic Drug Monitoring of Voriconazole by LC-MS/MS Using Westgard Multi-rule Theory

QIN Hui¹, LOU Yutao², HAO Sixuan³, SONG Feifeng¹, HU Xiaoping¹, HUANG Ping^{1,4}, ZHANG Yiwen^{1,4*} (1.Department of Pharmacy, Zhejiang Provincial People's Hospital, People's Hospital of Hangzhou Medical College, Hangzhou 310010, China; 2.College of Pharmacy, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China; 3.School of Medicine, Zhejiang University City College, Hangzhou 310015, China; 4.Key Laboratory of Endocrine Gland Diseases of Zhejiang Province, Hangzhou 310010, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an internal quality control method for therapeutic drug monitoring of voriconazole by HPLC-MS/MS and evaluate it by Westgard multi-rule theory. **METHODS** Voriconazole as analyte and fluconazole as internal standard were weighed and dissolved in methanol. Then they were added into the blank plasma matrix according to the plasma treatment method to prepare quality control products with low, medium and high concentration(80, 5 000, 8 000 ng·mL⁻¹). HPLC-MS/MS was applied to determine the concentrations of 36 groups of different quality control products from December 2020. The control charts of Levey-Jennings quality and Z-score were generated by Excel, and Westgard multi-rules were also used for quality assessment. **RESULTS** The intra-day and inter-day RSDs of low, medium and high concentration of voriconazole quality control products were 4.9%–5.3%, 6.0%–7.1%, respectively. While the extraction recovery rates of internal standard and voriconazole were 110%–112%, 98%–112%, respectively. This met the requirements of Chinese Pharmacopoeia for the detection of biological samples. The results of Levey-Jennings quality control chart and Z-score quality control chart indicated that the concentration detection results of the 36 groups of quality control plasma samples were all within the controllable range. **CONCLUSION** The establishment of internal quality control system for therapeutic drug monitoring of voriconazole can effectively improve the accuracy of blood drug concentration monitoring, and provide more accurate clinical individualized medication.

KEYWORDS: voriconazole; therapeutic drug monitoring; internal quality control; Westgard multi-rule theory; quality control chart

基金项目: 浙江省基础公益研究计划项目(LY20H310001)

作者简介: 秦辉, 男, 博士, 主管药师 E-mail: qinhui314@163.com

*通信作者: 张轶雯, 女, 博士, 副主任药师 E-mail: zjzyw2003@163.com

伏立康唑是一种新型广谱的第二代三唑类抗真菌药^[1],是在氟康唑的结构上进行改造制备的衍生物,与其他三唑类药物相比,抗菌作用更强,耐受性更好,主要用于治疗诸如白色念珠菌类、曲霉菌类的侵袭性真菌感染^[2-3]。伏立康唑主要是经细胞色素 P450 微粒体酶中的 CYP2C19 代谢,具有基因多态性,并且容易与其他药物产生药物相互作用,导致个体间伏立康唑血药浓度的药动学差异较大^[4-5],可能发生严重不良反应,甚至造成不可逆损害^[6]。因此,对使用伏立康唑的患者进行血药浓度监测具有重要的临床指导意义。

目前,国内外已报道的伏立康唑血药浓度监测方法主要有酶放大免疫测定法^[7]、HPLC^[8]、液质联用法(HPLC-MS/MS)^[9]、气质联用法(GC-MS/MS)^[10]。其中,液质联用法由于具有分析速度快、灵敏度高、专属性强等优点,已成为药物治疗监测(therapeutic drug monitoring, TDM)领域的金标准,严格的 TDM 质量控制可以保证监测结果的准确性。而 Westgard 多规则质控体系是以概率论发展而来的各种控制规则的误差检出特性曲线,可以提高质控效率,对误差检出具较好的灵敏度,同时对失控误差的识别也具有较好的特异性。本研究采用 HPLC-MS/MS,对 2020 年 12 月伏立康唑血药浓度监测方法中的随行质控血浆样品的测定值进行统计分析,绘制 Levey-Jennings 质控图及 Z-分数质控图来研究本实验室的室内质控质量,以期完善伏立康唑室内质量控制体系,以及提高血药浓度监测的准确性,促进临床个体化用药。

1 材料

1.1 仪器

岛津 HPLC-30A 高效液相系统(日本岛津公司),色谱柱为 Waters X-Bridge C₁₈ 键合硅胶柱(2.1 mm×50 mm, 3.5 μm); Micro21R 低温高速离心机、TSX2330FV 型-30℃冰箱(美国赛默飞世尔科技公司); MS 3 digital 涡旋仪(德国 IKA 公司); AB 4500 QTRAP 三重四级杆(美国应用生物公司); MS105DU 十万分之电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司); MilliQ 超纯水制备仪(德国默克密理博); DK-S12 型 100℃水浴箱(中国森信公司); SB-5200DT 型超声仪(宁波新芝公司)。

1.2 药品和试剂

伏立康唑对照品(批号:100862-201903;纯度:

99.8%)、氟康唑对照品(批号:100314-201906;纯度:99.8%)均购自中国食品药品检定研究院;甲醇、乙腈、甲酸均为色谱纯;试验用水为纯化用水。

2 方法与结果

2.1 检测条件

色谱条件: Waters X-Bridge C₁₈ 色谱柱(2.1 mm×50 mm, 3.5 μm); 流动相为 0.1%甲酸溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~0.5 min, 25%B; 0.5~1.0 min, 25%→80%B; 1.0~2.5 min, 80%B; 2.5~3.0 min, 25%B); 柱温: 40℃; 流速: 0.5 mL·min⁻¹; 进样量: 1.0 μL。

质谱条件: 多重反应监测; 离子化方式: 电喷雾离子化; 离子极性: 正离子; 离子化电压: 5 500 V; 气帘气压力: 30 psi; 温度: 550℃; 喷雾气(N₂)压力: 50 psi; 辅助加热气(N₂)压力: 50 psi; 碰撞气: 9 psi。用于待测物伏立康唑离子对为 m/z 350.0→281.1; 内标氟康唑离子对为 m/z 307.2→238.2; 去簇电压为 90 V, 碰撞能量为 23 eV。

2.2 伏立康唑工作液配制

精密称取 10.16 mg 伏立康唑对照品置于 10 mL 量瓶中,加甲醇使溶解,稀释至刻度,摇匀,即为伏立康唑储备液。取适量甲醇依次将储备液稀释为 0.25, 0.8, 10, 50, 80 μg·mL⁻¹ 的系列浓度伏立康唑工作溶液,储备于 4℃冰箱备用。

2.3 氟康唑工作液配制

精密称取 5.46 mg 氟康唑对照品置于 10 mL 量瓶中,加甲醇使溶解,稀释至刻度,摇匀,即为氟康唑储备液。取适量甲醇依次将储备液稀释为 2 μg·mL⁻¹ 的氟康唑溶液作为内标工作溶液,储备于 4℃冰箱备用。

2.4 血浆质控样品的制备^[11]

取空白血浆 90 μL,分别加入 0.8, 50, 80 μg·mL⁻¹ 的伏立康唑工作液 10 μL,混匀,即得。

2.5 室内质量控制

2.5.1 标准曲线的绘制 按“2.2”项下操作配制 0.25, 0.51, 2.53, 5.07, 10.13, 40.52, 81.04, 101.30 μg·mL⁻¹ 系列浓度标准曲线工作溶液,再按“2.4”项下操作配制系列浓度标准曲线血浆质控溶液;加入 100 μL 内标工作溶液与 200 μL 甲醇,涡旋振荡混合 1 min, 13 871 ×g 离心 5 min 后,移取上清液 50 μL,用纯化水稀释 10 倍后,按照“2.1”项下色谱条件与质谱条件进样测定,记录峰面积。以待测质控血浆样品(X , ng·mL⁻¹)为

横坐标, 伏立康唑与内标峰面积比值为(Y)纵坐标进行线性回归, 得到回归方程 $Y=1.477\ 89X+0.020\ 21(r=0.996\ 9, n=8)$, 该结果表明伏立康唑血药浓度在 $25.325\sim10\ 130\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内具有良好

的线性关系。典型色谱图见图 1~3。

2.5.2 仪器精密度试验 取配制好的血浆质控样品, 按“2.4”项下操作配制成进样溶液, 再按照“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。其

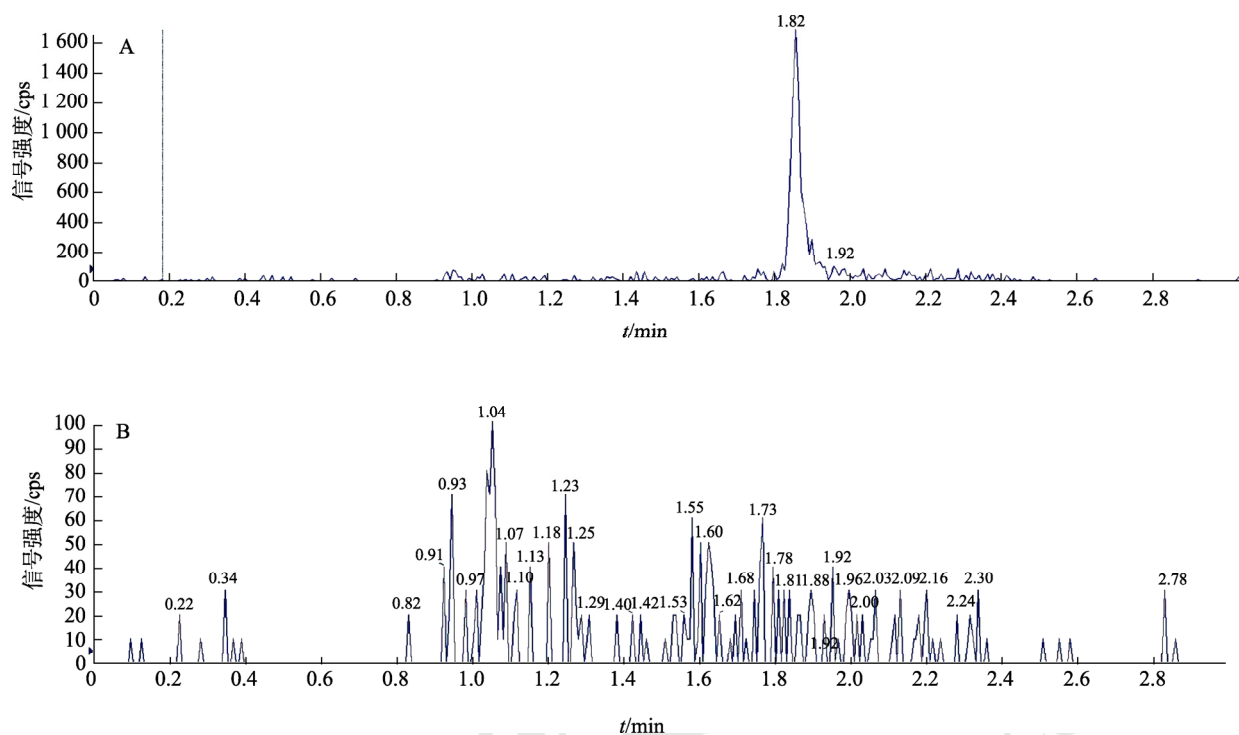


图 1 空白基质下伏立康唑(A)和内标(B)色谱图

Fig. 1 Chromatograms of voriconazole(A) and internal standard(B) of blank matrix

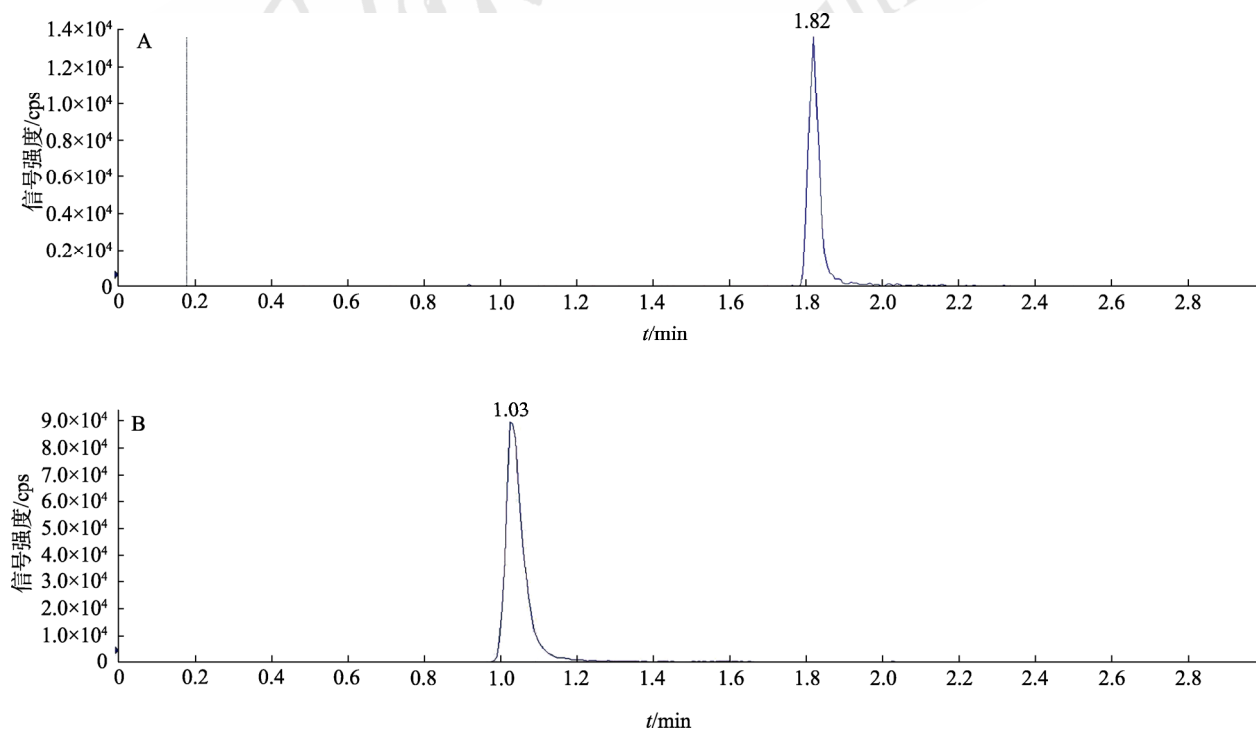


图 2 $0.25\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度下伏立康唑(A)和内标(B)色谱图

Fig. 2 Chromatograms of voriconazole(A) and internal standard(B) at a concentration of $0.25\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

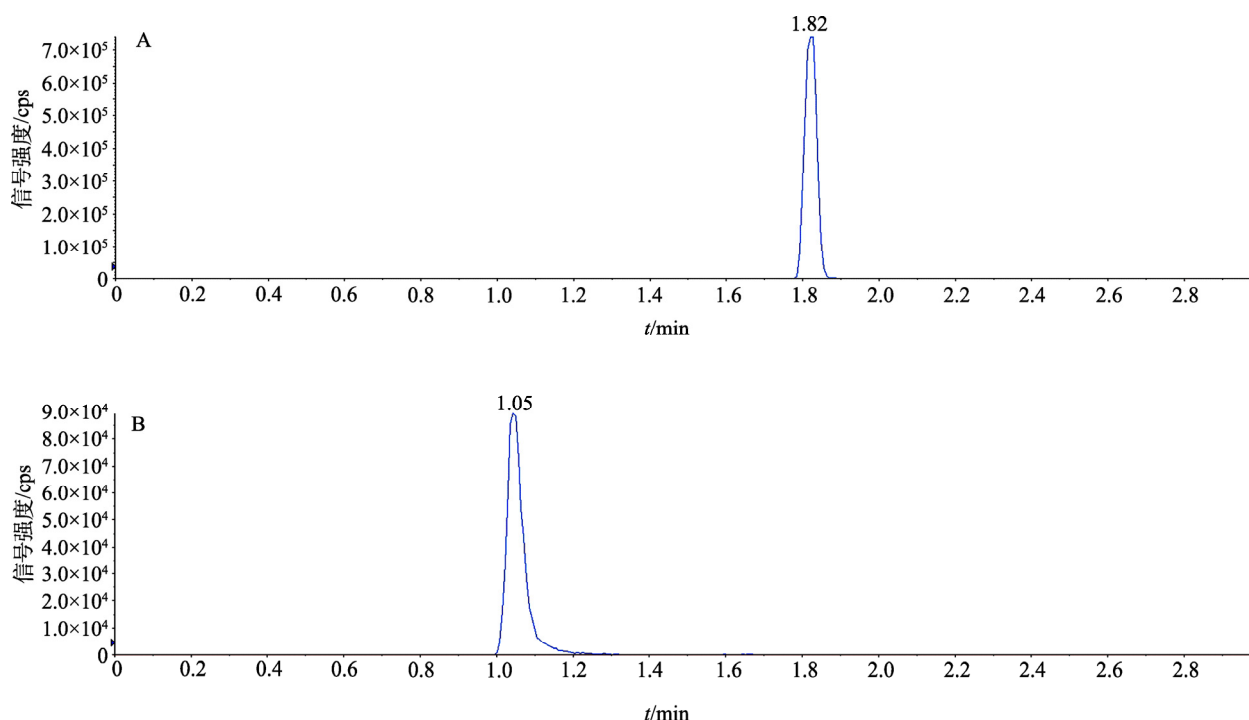


图3 检测样品的伏立康唑(A)和内标(B)色谱图

Fig. 3 Chromatograms of voriconazole(A) and internal standard(B) of test sample

中1 d内配制3批, 每批平行操作6次, 计算日内精密度; 另外2 d各配制1批, 平行操作6次, 计算日间精密度。测定结果均符合中国药典2020年版(四部)对生物样品检测的要求(一般 $RSD \leq 15\%$, 定量下限 $RSD \leq 20\%$), 结果见表1。

2.5.3 提取回收率试验 取新鲜配制的高、中、低($0.8, 50, 80 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)浓度的质控溶液, 以及对应相同浓度的经处理后血浆基质标准溶液(空白血浆用甲醇按1:3进行蛋白沉淀处理)所测定的峰面积强度进行比较, 平行测定6份样品。计算低、中、高浓度质控样品的回收率, 结果见表1。

2.5.4 确定质量控制规则 根据Westgard多规则理论的质控规则, 确定如下6条规则 $1_{2s}/1_{3s}/2_{2s}/R_{4s}/4_{1s}/10_x$, ①合格: 所有质控样品的浓度测定值都在 $\bar{x} \pm 2SD$ 范围内; ②警告: 1_{2s} 表示有1个质控样品测定值超过 $\bar{x} \pm 2SD$; ③失控: 1_{3s} 表示有一个质控样品测定值超过 $\bar{x} \pm 3SD$; 2_{2s} 表示有2个连续

质控样品测定值超过 $\bar{x} \pm 2SD$; R_{4s} 表示相邻2个质控样品测定值超过 $4SD$, 即一个质控超过 $\bar{x} + 2SD$, 另一个质控超过 $\bar{x} - 2SD$; 4_{1s} 表示连续4个连续质控样品测定值同时超过 $\bar{x} \pm SD$; 10_x 表示连续10个质控样品测定值在 $\bar{x}$ 同侧。

2.5.5 绘制Levey-Jennings质控图 通过对2020年12月36组伏立康唑低、中、高浓度质控血浆样品进行数据统计分析, 计算得到实测值分别为(81.614 ± 6.27) $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, ($5\,473.102 \pm 310.75$) $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, ($8\,262.376 \pm 437.08$) $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 相对标准偏差(RSD)分别为7.7%, 5.7%, 5.3%。以测定的质控血浆例数为横坐标, 测定浓度为纵坐标, $\bar{x}$ 为靶值, $\bar{x} \pm SD$ 为控制线, $\bar{x} \pm 2SD$ 为警告线, $\bar{x} \pm 3SD$ 为失控线, 采用Excel软件绘制Levey-Jennings质控图^[12-13], 结果见图4。36组血浆质控品种, 低浓度的实测范围值为 $69.59 \sim 96.40 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 中浓度实测范围值为 $4\,748.58 \sim 5\,973.63 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 高浓度实测范围

表1 伏立康唑质控品血药浓度监测的精密度及提取回收率($n=6$)

Tab. 1 Precision and extraction recovery rate of voriconazole quality control products' concentration($n=6$)

标示浓度/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	日内		日间		提取回收率/%	
	测定值/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	精密度 RSD/%	测定值/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	精密度 RSD/%	内标	伏立康唑
80	85.75 ± 4.29	5.00	79.09 ± 5.61	7.09	110.85 ± 3.38	97.73 ± 7.27
5 000	$5\,529.69 \pm 292.08$	5.28	$5\,491.92 \pm 335.33$	6.11	110.08 ± 4.27	111.60 ± 4.86
8 000	$8\,437.18 \pm 412.00$	4.88	$8\,196.01 \pm 492.27$	6.01	111.80 ± 5.01	105.89 ± 5.30

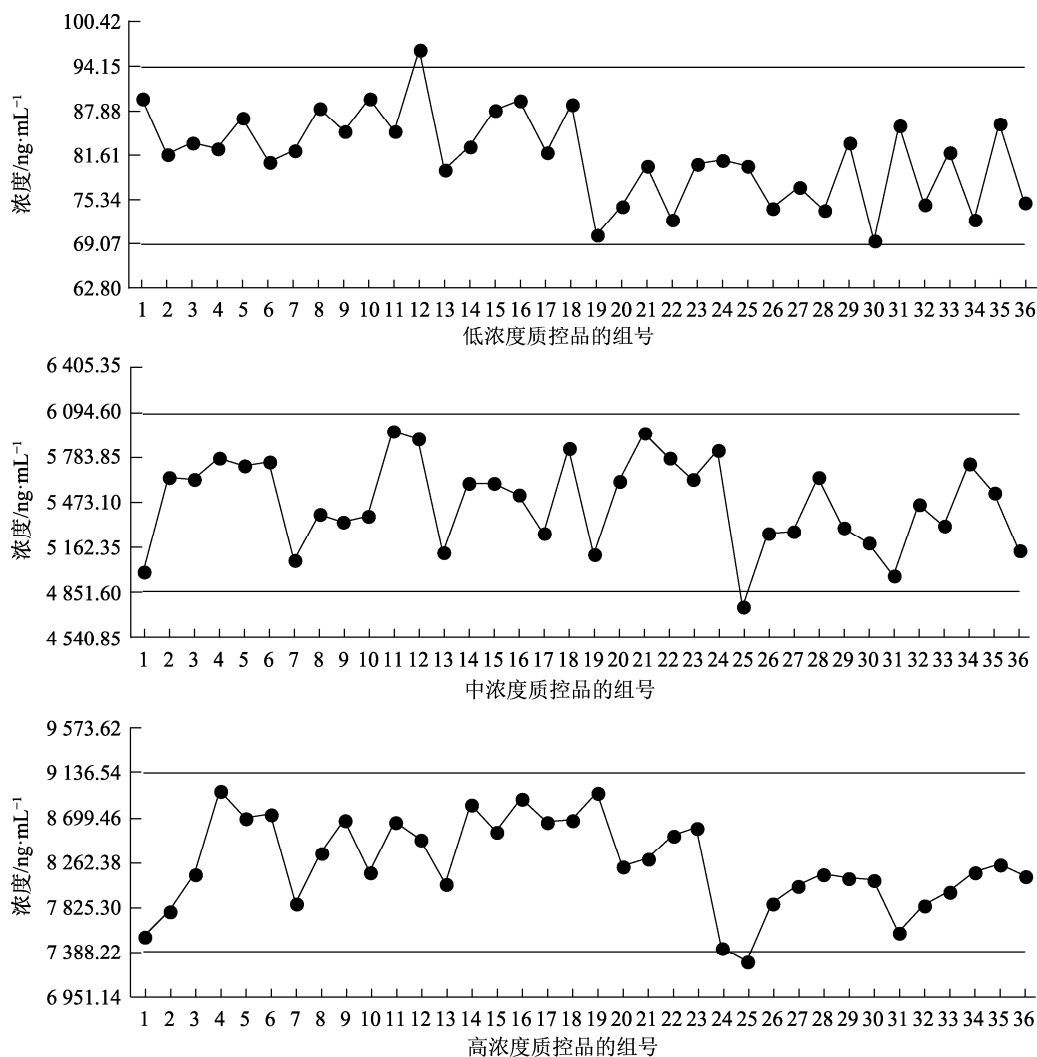


图4 伏立康唑低、中、高浓度质控品 Levey-Jennings 质控图

Fig. 4 Levey-Jennings charts of voriconazole quality control products with low, medium and high concentration

值为 $7\,297.89 \sim 8\,975.25 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，低、中、高浓度测定值均为超出失控线。在随行的 36 组数据中，低浓度质控值中有 14 个低于靶值，22 个高于靶值；第 12 个点测定值为 $96.40 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，超过 $\bar{x} + 2SD$ ($94.15 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)，提示警告 1 次。中浓度质控值中有 17 个低于靶值，19 个高于靶值；第 25 个点测定值为 $4\,748.58 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，超过 $\bar{x} - 2SD$ ($4\,851.60 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)，提示警告 1 次。高浓度质控值中有 20 个低于靶值，16 个高于靶值；第 25 个点测定值为 $7\,297.89 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，超过 $\bar{x} - 2SD$ ($7\,388.22 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)，提示警告 1 次。

2.5.6 绘制 Z-分数质控图 将不同低、中、高 3 个浓度水平的质控测定值转换为 Z 分数形式，绘制在单个质控图上进行比较，可以直观反映实验的系统误差与随机误差。Z 分数 $= (x_i - \bar{x}) / SD$ ， x_i 为第 i 次测定值， $\bar{x}$ 为所有测定值的均值， SD 为所有测定值的标准差，结果见图 5。

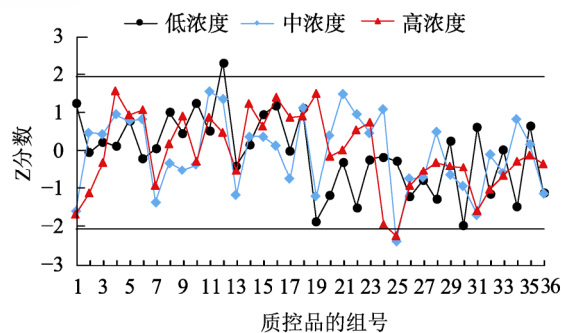


图5 伏立康唑低、中、高浓度质控品 Z-分数质控图

Fig. 5 Z-score charts of voriconazole quality control products with low, medium and high concentration

根据 Westgard 多规则，当出现 $2 < Z < 3$ 或 $-3 < Z < -2$ 时，则违反 1_{2s} 规则，即警告；当 $Z > 3$ 或 $Z < -3$ 时，则违反 1_{3s} 规则，即失控；当连续 2 次 $Z > 2$ 或 $Z < -2$ 时，则违反 2_{2s} 规则，即失控；当连续 2 次 Z 之间差值 > 4 时，则违反 R_{4s} 规则，即

失控;当连续 4 次 $Z>1$ 或 $Z<-1$ 时,则违反 4_{1s} 规则,即失控;当连续 10 次 $Z>0$ 或 $Z<0$ 时,则违反 10_x 规则,即失控。由图 5 可知,低、中、高 3 个浓度水平均未出现失控现象,且结果与 Levey-Jennings 质控图结果保持一致。

3 讨论

中国的 TDM 已经发展了 30 多年,随着十几年来医疗技术水平的高速发展,TDM 领域也在快速前进^[14]。2010 年 12 月,原卫生部印发了《二、三级综合医院药学部门基本标准(试行)》,要求二、三级综合医院药剂科(或药学部)应配备血药浓度监测设备;《三级综合医院评审标准实施细则(2011 版)》和《医疗机构药事管理规定》中均有规定,医疗机构应开展个体化给药治疗方案的研究与监测,而 TDM 是开展个体化给药治疗方案的基础。《抗菌药物临床应用指导原则(2015 年版)》中要求能开展有关抗菌药物品种和特殊患者的血药浓度监测,调整给药方案,实现个体化给药。由上可知,TDM 在现代医疗机构中的重要性愈来愈突显。目前,TDM 的主要技术手段包括酶放大免疫测定技术、高效液相测定技术、液质联用技术和气质联用技术。TDM 的发展方向也不仅仅局限于药物血药浓度值的报告,而开始与药动学、群体药动学以及药物基因组学相结合,从而更加精准地指导个体化给药,促进精准医学的发展。

在 TDM 中,质量控制是精准制定个体化给药方案的关键,因此对 TDM 的室内质量控制就非常重要。Levey-Jennings 质控图联合 Z 分数质控图,运用 Westgard 多规则理论进行室内质量控制评估具有重要意义。Westgard 多规则理论主要通过设定 $1_{2s}/1_{3s}/2_{2s}/R_{4s}/4_{1s}/10_x$ 规则结合 Levey-Jennings 质控图来判断测定结果是否可控,操作过程简单,可以很好地反映随机误差和系统误差,具有较低的假失控率和较强的误差检出能力。目前,逐渐在 TDM 室内质控研究中得到应用。

本研究分析了 2020 年 12 月伏立康唑监测方法中随行低、中、高 3 个浓度水平质控血浆样品的实测值,结果显示,精密度和提取回收率符合中国药典 2020 年版四部对生物样品分析的要求。在应用 Westgard 多规则理论评价本实验室伏立康唑 TDM 室内质控情况时,Levey-Jennings 质控图和 Z-分数质控图均提示测定结果在低、中、高 3

个浓度水平各有 1 次警告,之所以在低、中、高浓度各出现 1 次警告,最大的可能因为配制的操作误差,但都在可控范围内,表明本研究确定的室内质量控制方法保证了血药浓度测定的准确性、可靠性,为临床个体化给药提供了相应的参考依据。

REFERENCES

- [1] XIANG J, YU Q, LIANG M Z, et al. Determination of voriconazole in human plasma and its bioequivalence by HPLC-MS/MS[J]. J Sichuan Univ: Med Sci Ed(四川大学学报:医学版), 2018, 49(1): 102-106.
- [2] SANDHERR M, MASCHMEYER G. Pharmacology and metabolism of voriconazole and Posaconazole in the treatment of invasive aspergillosis: Review of the literature[J]. Eur J Med Res, 2011, 16(4): 139-144.
- [3] GROSU H B, BASHOURA L, OST D, et al. Critical Airway Obstruction due to Pseudomembranous Aspergillus tracheitis[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2014, 190(11): e65-e66. Doi: 10.1164/rccm.201405-0895im.
- [4] LUO X Q, ZHAO M F, QI F, et al. Study on drug interactions between voriconazole and commonly used clinical drugs in patients with hematologic diseases[J]. Chin J New Drugs Clin Rem(中国新药与临床), 2020, 39(2): 108-112.
- [5] XIE S, YE L, YE X, et al. Inhibitory effects of voriconazole, itraconazole and fluconazole on the pharmacokinetic profiles of ivosidenib in rats by UHPLC-MS/MS[J]. J Pharm Biomed Anal, 2020, 187: 113353.
- [6] 黄玉叶, 蔡天进, 胡阳敏. 伏立康唑致严重药物性肝损害 1 例[J]. 中国乡村医药, 2020, 27(15): 34-35.
- [7] KAN Z H. Correlation study and clinical application of HPLC and EMIT method in the determination of voriconazole in patients plasma[D]. Jinan: Shandong University, 2018.
- [8] DING J Z, LIN X Q, WEN Y, et al. Comparative study between high performance liquid chromatography and enzyme-amplified immunoassay method for monitoring voriconazole concentration in human plasma[J]. Chin J Clin Pharm(中国临床药理学杂志), 2020, 29(4): 266-271.
- [9] JIN H B, DONG J, DING Y D. Determination of posaconazole's concentration in plasma by UPLC-MS-MS[J]. Chin J Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志), 2019, 35(24): 3241-3243.
- [10] SMITH A, LEUNG-PINEDA V. Determination of voriconazole concentrations in serum by GC-MS[J]. J Clin Lab Anal, 2016, 30(5): 411-417.
- [11] 中国药典. 四部[S]. 2020: 466-471.
- [12] 张裕, 彭爱红, 余启华, 等. 利用 EXCEL 绘制多规则功效函数图及操作过程规范图[J]. 临床检验杂志, 2021, 39(1): 61-64.
- [13] 李胜东, 胡伯胜, 胡海平. 利用 EXCEL 制作“Levey-Jennings”质量控制图[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(5): 694-695.
- [14] 程道海, 陆华, 刘滔滔, 等. 我国治疗药物监测的现状与展望[J]. 广西医科大学学报, 2016, 33(5): 910-913.

收稿日期: 2021-04-23

(本文责编: 沈倩)