

# 超高效液相色谱-串联质谱法与化学发光微粒子免疫法测定万古霉素血药浓度的比较分析

时正媛<sup>1</sup>, 谢洁<sup>2</sup>, 李姿颖<sup>2</sup>, 江游<sup>2</sup>, 续茜桥<sup>1</sup>, 杨春静<sup>1</sup>, 付延伟<sup>1</sup>, 鄢丹<sup>3\*</sup> (1. 首都医科大学附属北京世纪坛医院药学部, 北京 100038; 2. 中国计量科学研究院前沿计量科学中心, 国家市场监管技术创新中心(质谱), 北京 100029; 3. 首都医科大学附属北京友谊医院药学部, 北京 100050)

**摘要:**目的 比较国产 QLIT-6610MD 超高效液相色谱-串联质谱(UHPLC-MS/MS)法和化学发光微粒子免疫分析法(CMIA)测定万古霉素血药浓度的相关性,建立测定结果换算关系。方法 收集接受万古霉素治疗患者的血清样本 95 例,分别用 UHPLC-MS/MS 和 CMIA 法进行测定,对测定结果进行回归分析,用 Spearman 法进行相关性比较,Bland-Altman 法评价一致性。结果 以 UHPLC-MS/MS测定结果( $x$ )和 CMIA 测定结果( $y$ )所作的线性回归方程如下: $y=1.088x+0.174$ ,两组结果间存在较好的相关性(Spearman 相关系数为 0.969 1)。CMIA 方法的测定结果高于 UHPLC-MS/MS 法所测结果,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。结论 2 种方法测定的万古霉素血清浓度可通过方程式进行结果互算,为临床个体化用药方案的制订提供参考。

**关键词:**万古霉素;血清;治疗药物监测;超高效液相色谱-串联质谱法;化学发光微粒子免疫检测法

doi:10.11669/cpj.2025.02.010 中图分类号:R917 文献标志码:A 文章编号:1001-2494(2025)02-0180-04

## Comparison of UHPLC-MS/MS and Chemiluminescence Microparticle Immune Assay in Determination of Vancomycin Concentration in Human Serum

SHI Zhengyuan<sup>1</sup>, XIE Jie<sup>2</sup>, LI Ziyang<sup>2</sup>, JIANG You<sup>2</sup>, XU Xiqiao<sup>1</sup>, YANG Chunjing<sup>1</sup>, FU Yanwei<sup>1</sup>, YAN Dan<sup>3\*</sup> (1. Department of Pharmacy, Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038, China; 2. Technology Innovation Center of Mass Spectrometry for State Market Regulation, Center for Advanced Measurement Science, National Institute of Metrology, Beijing 100029, China; 3. Department of Pharmacy, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To analyze the consistency and correlation between UHPLC-MS/MS and chemiluminescence microparticle immune assay (CMIA) in measuring vancomycin concentration in serum. **METHODS** The concentration of vancomycin was measured by UHPLC-MS/MS and CMIA methods respectively in 95 serum samples of patients receiving vancomycin treatment. A correlation analysis and an agreement analysis were conducted for the two methods used linear regression and Bland-Altman method. **RESULTS** Based on the results of UHPLC-MS/MS( $x$ ) and CMIA( $y$ ), the linear regression equation was determined as follows:  $y=1.088x+0.174$ . Spearman correlation analysis indicated a significant correlation between the results by the two methods ( $P<0.05$ ), and the Spearman correlation coefficient was 0.969 1. There was statistical difference between vancomycin serum concentrations measured by these two methods. The result was higher by CMIA compared with UHPLC-MS/MS. **CONCLUSION** The results of the two methods can be calculated to one another by equation, which provides reference for the formulation of clinical individualized medication plan.

**KEY WORDS:** vancomycin; serum; therapeutic drug monitoring; UHPLC-MS/MS; CMIA

万古霉素(vancomycin)属于糖肽类抗生素,主要用于治疗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)、耐甲氧西林表皮葡萄球菌(MRSE)和肠球菌等引起的严重感染<sup>[1-6]</sup>。由于其血药浓度治疗窗窄,血药浓度过高会导致严重的肾毒性和耳毒性,血药浓度过低则起不到较好的杀菌作用,甚至产生细菌耐药。

《中国万古霉素治疗药物监测指南(2020 更新版)》及国际血药浓度监测(therapeutic drug monitoring, TDM)指南均建议临床使用万古霉素时应进行 TDM<sup>[7-13]</sup>。

TDM 的发展过程中会用到不同的检测技术,而不同的方法得到的结果会有一定的差异。目前临床

基金项目:国家重点研发计划-重大科学仪器设备开发专项资助(2020YFF01014606)

作者简介:时正媛,女,博士,副主任药师 研究方向:治疗药物监测与个体化给药  
研究方向:中西医结合临床药学 Tel:(010)63139318

\* 通讯作者:鄢丹,男,博士,主任药师

检测万古霉素常用的方法为免疫法,该方法操作简单,但其专属性不强<sup>[14-16]</sup>。超高效液相色谱-串联质谱(UHPLC-MS/MS)法对于人员和环境的要求较高,目前主要用于科学研究,该方法的优势在于准确性、灵敏度高,越来越受到临床治疗药物检测领域的重视<sup>[17-19]</sup>。QLIT-6610MD UHPLC-MS/MS 联用仪是国内自主研发仪器,在保持准确定量的基础上精简了质量分析器结构,同时具有离子阱质量分析器的高灵敏度优势。本研究采用 UHPLC-MS/MS 建立了万古霉素血药浓度的检测方法,并与化学发光微粒子免疫检测法(chemiluminescent microparticle immunoassay, CMIA)进行对比,为国产质谱仪器的开发和临床应用提供方法学参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

QLIT-6610MD UHPLC-MS/MS (皖械注准 20222220215,安徽砺沐医疗器械有限公司);化学发光微粒子免疫分析仪(ARCHITECT i1000SR,德国 Abbott GmbH & Co. KG 公司)。AX-105 1/10 万分析天平(瑞士 Mettler Toledo 公司);Vortex-Genie2 涡旋混合器(美国 Scientific Industries 公司);3K15 低温高速离心机(美国 Sigma Aldrich 公司);Milli-Q 纯水机(美国 Millipore 公司)。

万古霉素对照品(批号:425992,北京百灵威公司);万古霉素检测试剂盒(注册证号:鲁械注准 20212400421,山东英盛生物技术有限公司);甲醇、乙腈均为质谱级;甲酸、乙酸铵均为色谱级;Abbott i1000 自动免疫分析仪配套微粒子化学发光法商品试剂盒(德国 Abbott GmbH & Co. KG 公司);注射用盐酸万古霉素(礼来苏州制药有限公司);水为超纯水。

### 1.2 血清样本采集

空白血清样本由体检健康人的空白血清混匀得到。UHPLC-MS/MS 法和 CMIA 比对用样本的采集,选取在我院住院患者 95 例,男 67 例,女 28 例,年龄 8~92 岁,平均 75 岁。原发疾病包括肺部感染、脓毒症、恶性肿瘤、心功能不全、呼吸心脏骤停、呼吸衰竭、乳糜性胸腔积液、纵隔脓肿等,临床均有体温升高和白细胞升高等感染症状。所有患者均使用注射用盐酸万古霉素治疗。用药第 4 天,给药前 30 min 采集血样,进行首次谷浓度监测;药物输注结束后立即采集血样,检测峰浓度。本研究已通过首都医科大学附属北京世纪坛医院伦理审查,编号:sjtkyll-lx-2021(21),由患者或者家属签署知情同意书。

### 1.3 溶液配制

精确称取万古霉素对照品 1.0 mg,溶于 1 mL 超纯水中,得到  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  储备液,用超纯水将储备液依次稀释成质量浓度为 1.56、3.13、6.25、12.5、25.0、50.0、100、500  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的梯度溶液。以上溶液均于  $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$  避光储存。

### 1.4 样本前处理

血清样本或校准品或质控品在室温下解冻,取 100  $\mu\text{L}$  至 1.5 mL 离心管中,加入 350  $\mu\text{L}$  提取液,涡旋振荡混匀 5 min,以  $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min 后,取 100  $\mu\text{L}$  上清液于 1.5 mL 离心管中,加入 100  $\mu\text{L}$  超纯水混匀,转移至进样小瓶中,放入液质联用仪进样分析。

### 1.5 色谱质谱条件

色谱条件<sup>[20]</sup>:采用 Kinetex  $\text{C}_{18}$  色谱柱( $3 \text{ mm} \times 50 \text{ mm}, 2.6 \mu\text{m}$ ),以体积分数 0.1% 甲酸水为流动相 A,体积分数 0.1% 甲酸甲醇为流动相 B,采用梯度洗脱:0~1 min 10% B,1.01~3 min 99% B,3.01~5 min 10% B。流速  $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ,柱温  $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,进样体积 5  $\mu\text{L}$ ,所得万古霉素与万古霉素内标色谱图(图 1)。

质谱条件<sup>[20]</sup>:电喷雾离子源(ESI),正离子模式,子离子扫描(QTPIS);电喷雾电压 5 000 V,离子源温度  $300 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,大气压接口温度  $300 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ,鞘气压强  $2.96 \times 10^5 \text{ Pa}$ ,辅助气压强  $1.38 \times 10^5 \text{ Pa}$ ,反吹气压强  $5.52 \times 10^3 \text{ Pa}$ 。其他质谱参数列于表 1。

### 1.6 CMIA 法

采用试剂盒对样本血清中万古霉素进行定量检测,其信号值与万古霉素含量成反比。检测范围为  $3.0 \sim 100.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,方法定量限为  $\leq 3 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

### 1.7 两种方法检测比对

比对样本分别采用雅培公司 ARCHITECT i1000 SR 微粒子化学发光免疫分析仪和 UHPLC-MS/MS 法两种方法检测,严格按照雅培 i1000 试剂说明书和 UHPLC-MS/MS 法检测步骤操作,在当日质控合格的前提下,进行样本检测。2 种方法共分析了 95 个样品。用 Bland-Altman 图、Passing-Bablok 回归和 Spearman 检验评估 2 种方法的一致性和相关系数。配对样本  $t$  检验或 Wilcoxon 检验用于比较 2 种方法测量的平均值。

## 2 结果

### 2.1 UHPLC-MS/MS 法测定人血清中万古霉素浓度的方法学评价

#### 2.1.1 专属性 取 6 份不同来源的空白血清,

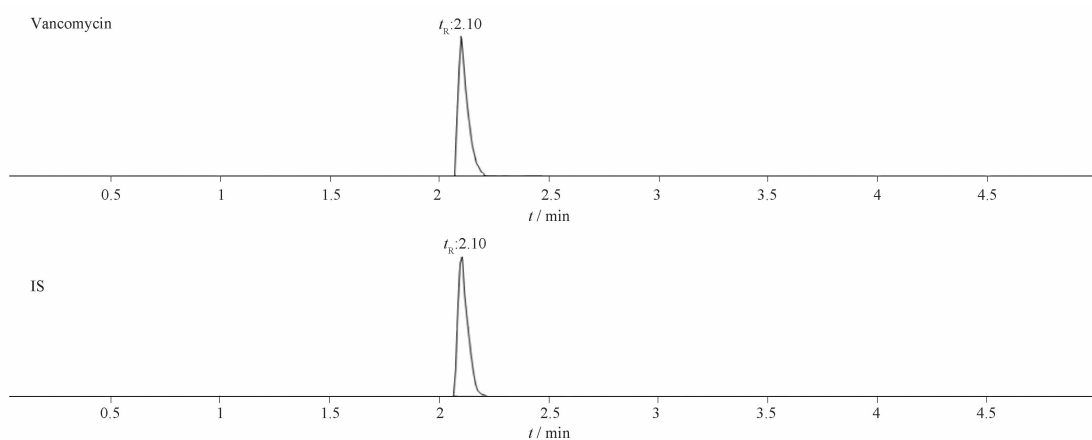


图1 万古霉素及其内标提取离子色谱图

Fig. 1 Extracted ion chromatograms of vancomycin and internal standard

表1 人血清中万古霉素检测的质谱参数

Tab. 1 The dermination mass spectrum parameters of vancomycin in human serum

Analyte	$m/z$ (Parention)	$m/z$ (Daughterion)	$T$ (Enrichment) /ms	Fragmentation /point q	Fragmentation energy/%
Vancomycin	725.4	144.0	150	0.13	35
IS	690.8	144.0	200	0.14	40

加入一定浓度万古霉素标准溶液,所配制成的模拟生物样本经过前处理得到的色谱图,和实际临床样本得到的色谱图进行比对。结果表明,在选用条件下,血清中内源性物质不干扰被测物和内标的测定,专属性良好。

**2.1.2 标准曲线制备** 以不同浓度标准品为横坐标,万古霉素与内标去甲万古霉素色谱峰的峰面积比值为纵坐标,用加权最小二乘法进行线性回归运算,线性范围为  $1.56 \sim 50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $r^2 \geq 0.99$ 。

**2.1.3 方法的准确度和精密度** 日内、日间相对标准偏差(RSD) < 15%,准确度范围在 95.97% ~ 97.74%。

## 2.2 检测结果比对

比较2种方法,95例样本中有3例低于定量下限,92例纳入统计。UHPLC-MS/MS法测得的值( $x$ )为  $(20.14 \pm 11.80) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,CMIA法测得的值( $y$ )为  $(22.23 \pm 13.19) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,Wilcoxon配对检验显示CMIA法的结果高于UHPLC-MS/MS法。Passing-Bablok回归方程为  $y = 1.088x + 0.174$ (图2),Spearman相关系数为0.9691。经Bland-Altman分析,2种方法产生的偏倚为2.093,95%可信区间为  $(1.5751 \sim 2.6106) \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (图3)。

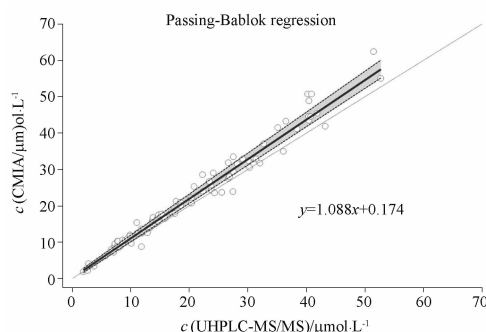


图2 人血清样本中万古霉素检测结果的 Passing-Bablok 回归分析。  $n = 92, \bar{x} \pm s$

Fig. 2 Passing-Bablok regression results of vancomycin in human serum samples.  $n = 92, \bar{x} \pm s$

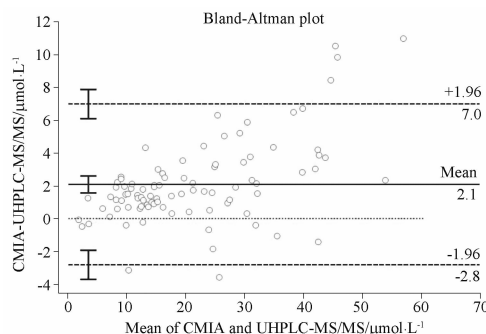


图3 人血清样本中万古霉素检测结果的 Bland-Altman 图。  $n = 92, \bar{x} \pm s$

Fig. 3 Bland-Altman plot of vancomycin in human serum samples.  $n = 92, \bar{x} \pm s$

## 3 讨论

利用先进的检测技术进行TDM,可以提高药物的疗效并减低不良反应的发生,推动了个体化精准用药的发展。本研究利用我国自主研发的质谱仪建

立的万古霉素检测方法快速简便,并与 CMIA 法进行比较,二者相关性良好,拟合方程相关系数在 0.9 以上;CMIA 法检测结果高于质谱方法,存在约 2.093 的偏倚。有文献报道比较各种免疫法与质谱法测定血浆中万古霉素浓度的相关性,发现检测结果分别存不同程度的偏倚<sup>[21]</sup>。这与本研究结果相似,可能由于免疫学方法测定过程中,万古霉素的代谢产物有一部分可能会影响到检测特异性。本研究共收集 95 例样本,其中 3 例质谱检测低于定量下限,是由于临床给药为去甲万古霉素,而免疫法不能区分,因此研究结果基于 92 例样本的比对分析,结果还需要进一步扩大样本量证实。

对于万古霉素的临床应用,前期已基于 CMIA 法的检测结果积累了大量的个体化用药经验,并取得了良好的预后效果<sup>[22-23]</sup>。在给药剂量制订过程中,要考虑到不同检测方法的结果不同,对于新建的方法不应代替原方法指导个体化用药方案的制订。本研究利用 2 种方法间的线性相关性,将 CMIA 法测定结果换算成 UHPLC-MS/MS 方法估算值,估算结果可以供临床医生借鉴,从而为患者提供更精准的万古霉素的个体化治疗方案,同时为国产检测仪器的推广使用提供实验基础。

## REFERENCES

- [ 1 ] HUANG S, LIN W W, WANG C L, *et al.* Interpretation of vancomycin serum concentration based on decision tree and clinical practice[J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2016, 51(19): 1710-1713.
- [ 2 ] CHEN Y L, CHEN K, YE ZH K, *et al.* Development of chinese practice guidelines on the rapetic drug monitoring of vancomycin[J]. *Chin J Evid-Based Med*(中国循证医学杂志), 2015, 15(2): 236-239.
- [ 3 ] ZHOU J Q, ZHU C L, GUAN N N, *et al.* Progress in optimization of vancomycin dosage regimen[J]. *J Henan Univ Med Sci* (河南大学学报 医学版), 2022, 41(3): 162-167.
- [ 4 ] BIAN Y C, YAO Q Q, SHI J, *et al.* Correlation analysis between the concentration of vancomycin in peritoneal dialysate and serum in patients with peritoneal dialysis-associated peritonitis[J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2022, 57(6): 486-490.
- [ 5 ] LIU C, BAYER A, COSGROVE SE, *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.
- [ 6 ] RYBAK M J, LE J, LODISE TP, *et al.* Therapeutic monitoring of vancomycin for serious methicillin-resistant staphylococcus aureus infections: arevised consensus guideline and review by 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]. *Am J Health Syst Pharm*, 2020, 77(11): 835-864.
- [ 7 ] CHEN B Y, GUAN X D, HE L X. China expert consensus on clinical application of vancomycin[J]. *Chin J New Drugs Clin Rem*(中国新药与临床杂志), 2011, 30(8): 561-573.
- [ 8 ] FAWLEY J, NAPOLITANO L M. Vancomycin enema in the treatment of *Clostridium difficile* infection [J]. *Surg Infect (Larchmt)*, 2019, 20(4): 311-316.
- [ 9 ] Na H E, SHAN S U, ZHIKANG Y E, *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(4): S363-S371.
- [ 10 ] RYBAK M J, LOMAESTRO B M, ROTSCHAFFER J C, *et al.* Therapeutic monitoring of vancomycin in adults summary of consensus recommendations from the American society of health-system pharmacists, the infectious diseases society of America, and the society of infectious diseases pharmacists[J]. *Pharmacotherapy*, 2009, 29(11): 1275-1279.
- [ 11 ] ELYASI S, KHALILI H, DASHTI K S, *et al.* Vancomycin-induced nephrotoxicity: mechanism, incidence, risk factors and special populations. A literature review[J]. *Eur J Clin Pharmacol*, 2012, 68(9): 1243-1255.
- [ 12 ] CHU Y, LUO Y, QU L, *et al.* Application of vancomycin in patients with varying renal function, especially those with augmented renal clearance[J]. *Pharm Biol*, 2016, 54(12):2802-2806.
- [ 13 ] BRUNIERA F R, FERREIRA F M, SAVIOLLI L R M, *et al.* The use of vancomycin with its therapeutic and adverse effects: A review[J]. *Eur Rev Med Pharm Sci*, 2015, 19(4):694-700.
- [ 14 ] ZHAO W, KAGUELIDOU F, BIRAN V, *et al.* External evaluation of population pharmacokinetic models of vancomycin in neonates; the transferability of published models to different clinical settings [J]. *Br J Clin Pharmacol*, 2013, 75(4):1068-1080.
- [ 15 ] LI X W, ZHAI Y, LIN M H, *et al.* Consistency evaluation of clinical test data of olanzapine by liquid chromatography tandem mass spectrometry kit[J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2023, 58(16): 1518-1523.
- [ 16 ] CHEN C Y, LI M Y, MA L Y, *et al.* Precision and accuracy of commercial assays for vancomycin therapeutic drug monitoring: Evaluation based on external quality assessment scheme[J]. *J Antimicrob Chemother*, 2020, 75(8): 2110-2119.
- [ 17 ] PARKER SL, VALERO Y. G, MEJIA J L O, *et al.* An LC-MS/MS method to determine vancomycin in plasma (total and unbound), urine and renal replacement therapy effluent[J]. *Bioanalysis*, 2017, 9(12): 911-924.
- [ 18 ] VIDAL F R, OSSANES D S, BIRK L, *et al.* Development and validation of a dried plasma spot LC-MS/MS method for therapeutic monitoring of vancomycin and comparison with enzyme - multiplied immunoassay[J]. *Biomed Chromatogr*, 2023, 37(4): e5586. DOI:10.1002/bmc.5586.
- [ 19 ] ZHANG T, WATSON D, AZIKE C, *et al.* Determination of vancomycin in serum by liquid chromatography-high resolution full scan mass spectrometry[J]. *J Chromatogr B*, 2007, 857(2): 352-356.
- [ 20 ] XIE J, LI Z Y, QU Z Y, *et al.* Determination of Vancomycin in Serum by Quadrupole-Linear Ion Trap Tandem Mass Spectrometry [J]. *J Chin Mass Spectrom Soc* (质谱学报), 2023, 44(5): 602-613.
- [ 21 ] OYAERT M, PEERSMAN N, KIEFFER D, *et al.* Novel LC-MS/MS method for plasma vancomycin; comparison with immunoassays and clinical impact[J]. *Clin Chim Acta*, 2015, 441: 63-70. DOI: 10.1016/j.cca.2014.12.012.
- [ 22 ] HE N, SU S H, ZHAI S D, *et al.* Evidence-based guideline for therapeutic drug monitoring of Vancomycin:2020 update [J]. *Clin Med J* (临床药物治疗杂志), 2021, 19(1): 12-16.
- [ 23 ] CHEN H Q, SHI Q P, KONG L T, *et al.* Clinical value of individualized pharmaceutical services for patients receiving vancomycin for severe infections; a retrospective case-control study based on real-world data [J]. *J South Med Univ* (南方医科大学学报), 2020, 40(10): 1380-1389.

(收稿日期:2024-01-26)