

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.22.014

高效液相色谱法和酶放大免疫法检测伏立康唑血药浓度相关性分析*

李俊明,卓思珺,陈仕鹏,刘成裕,谢瑞杰[△]

(广西壮族自治区柳州市人民医院药学部,广西 柳州 545006)

摘要:目的 探讨高效液相色谱(HPLC)法和酶放大免疫(EMIT)法测定人血清伏立康唑(VRC)质量浓度的相关性。方法 收集医院2019年至2020年住院和门诊患者常规VRC检测样本2 045份,对其中59份样本同时采用两种检测方法,并采用双侧配对 t 检验分析结果的相关性;建立回归方程并绘制Bland-Altman图;按质量浓度结果分为A组($<1.0\mu\text{g/mL}$)、B组($1.0\sim5.5\mu\text{g/mL}$)和C组($>5.5\mu\text{g/mL}$),采用Wilcoxon检验、Passing-Bablok线性回归和Bland-Altman法分析3组的相关性及一致性。分析2 045份样本血药浓度测定结果。结果 两种测定方法具有高度相关性($r=0.879, P<0.05$);不同质量浓度下,两种测定方法一致性很差,EMIT法检测结果均高于HPLC法。结论 临床测定VRC血药浓度时,应关注不同检测方法的差异,相应调整临床用药剂量;HPLC法和EMIT法检测结果不具有直接比较意义。

关键词:高效液相色谱法;酶放大免疫法;伏立康唑;血药浓度;相关性;一致性

中图分类号:R969.3;R978.1*9

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)22-0056-04

Correlation Analysis of Voriconazole Plasma Concentrations Detected by HPLC and EMIT

LI Junming, ZHUO Sijun, CHEN Shipeng, LIU Chengyu, XIE Ruijie

(Department of Pharmacy, Liuzhou People's Hospital, Liuzhou, Guangxi, China 545006)

Abstract: Objective To investigate the correlation between the determination results of voriconazole (VRC) in human serum by the high-performance liquid chromatography (HPLC) method and enzyme amplified immunoassay technique (EMIT) method. **Methods** A total of 2 045 samples of routine VRC testing were collected from inpatients and outpatients in the hospital from 2019 to 2020. Bilateral paired t -test was used to analyze the correlation between the results of 59 samples determined by the two test methods. The regression equation was established and the Bland-Altman plot was drawn. The experiment was divided into group A ($<1.0\mu\text{g/mL}$), group B ($1.0\sim5.5\mu\text{g/mL}$) and group C ($>5.5\mu\text{g/mL}$) according to the results of mass concentration, and the Wilcoxon test, Passing-Bablok linear regression and Bland-Altman method were used to analyze the correlation and consistency of the two methods in the three groups. The determined results of serum drug concentration of 2 045 samples were analyzed. **Results** The results determined by the two methods had a high correlation ($r=0.879, P<0.05$). At different mass concentrations, the consistency of the two methods was very poor, and the result determined by EMIT method was higher than that determined by the HPLC method. **Conclusion** When determining the VRC serum concentration, we should pay attention to the difference of different determination methods and adjust the clinical dosage according to the results. The results determined by the HPLC method and EMIT method could not be compared directly.

Key words: HPLC; EMIT; voriconazole; serum drug concentration; correlation; consistency

伏立康唑(VRC)为三唑类抗真菌药,抗菌活性强、抗菌谱广,临床应用广泛^[1-2]。VRC在体内呈非线性代谢、个体差异大,剂量与血药浓度相关性不稳定,应针对患者具体情况并结合血药浓度结果制订个体化用药方案,最大限度发挥疗效、减少药品不良反应^[3-5]。高效液相色谱(HPLC)法为检测VRC血药浓度的常用方法^[6],而近年酶放大免疫(EMIT)法也逐步用于血药浓度检测^[7-8]。为探讨这两种检测方法对VRC血药浓度的影响,本研究中收集VRC达稳态血药浓度的真菌感染患者血液样本59份,分别使用两种方法进行测定,分

析测定结果的相关性,并对我院两种检测方法结果进行比较分析,以便临床正确解读检测数据,调整用药方案。现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料

纳入标准:年龄2~90岁;采血时VRC已达稳态浓度(即负荷给药24 h后或常规给药6 d后)。

排除标准:标本量 $<4\text{ mL}$;标本溶血。

样本收集:收集医院2019年至2020年住院和门诊患者常规VRC检测样本2 045份,2019年收集1 054份,

*基金项目:广西壮族自治区卫生和计划生育委员会自筹经费科研课题[Z20180291;Z20170686];广西壮族自治区柳州市人民医院院内立项课题[ly201604]。

第一作者:李俊明,女,硕士研究生,副主任药师,研究方向为临床药学,(电子信箱)289381050@qq.com。

[△]通信作者:谢瑞杰,女,硕士研究生,副主任药师,研究方向为临床药学,(电子信箱)Xierj1001@163.com。

其中 59 份采用 2 种方法平行检测,其余均采用 HPLC 法检测;2020 年收集 991 份,均采用 EMIT 法检测。

1.2 血药浓度检测方法

1.2.1 HPLC 法

色谱条件:色谱柱为 Hypersil ODS 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相为 25 mmol/L KH₂PO₄缓冲液 - 甲醇 - 乙腈(55:15:30, V/V/V);流速为 1.0 mL/min;检测波长为 256 nm;柱温为 35 °C;进样量为 10 μL。

样本处理及内标选择:采用 10% HClO₄溶液沉淀蛋白法前处理血清样本,以硝西洋作内标。

方法学考察:按相关规定进行精密度、稳定性、重复性试验考察。结果表明,仪器精密度良好,供试品溶液在室温下放置 12 h 内基本稳定,方法重复性良好。

1.2.2 EMIT 法

按照 Viva - E 型全自动生化分析仪(西门子医学诊断产品有限公司,定量范围为 0.5 ~ 16.0 μg/mL)的操作规范。取血液样本,5 000 r/min 离心 5 min,取上清液,采用 EMIT VRC 测定试剂检测。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 18.0 及 MedCalc 19.0.4 统计学软件分析。组间差异采用双侧配对 *t* 检验、配对 Wilcoxon 检验、Passing - Bablok 法和 Bland - Altman 法分析,并对测定结果进行一致性评价。

2 结果

2.1 VRC 血药浓度检测结果相关性分析

结果见表 1。计算可知,两种检测方法测得的 VRC 血药浓度结果具有高度相关性($r = 0.879, P < 0.05$)。

2.2 检测模型建立及相关性分析

59 份样本的配对样本 *t* 检验分析显示,两种检测方法结果间存在显著差异。以 EMIT 法血药浓度(C_{EMIT})测定结果($Y, \mu\text{g/mL}$)为纵坐标, HPLC 法血药浓度(C_{HPLC})测定结果($X, \mu\text{g/mL}$)为横坐标,建立回归方程 $Y = 0.0547 + 1.743X (n = 59)$, Spearman 相关系数为 0.923(图 1 A);配对 Wilcoxon 测试分析结果显示,两种方法结果间存在显著差异。分别以两种检测方法结果的差值($C_{\text{HPLC}} - C_{\text{EMIT}}$)和均值($\bar{C}_{\text{HPLC \& EMIT}}$)为纵坐标和横坐标,以 95% 的置信区间设定血药浓度的上下限,绘制 Bland - Altman 偏差图(图 1 B)。结果显示, $\bar{C}_{\text{EMIT}}$ 为 $(5.4322 \pm 3.48798) \mu\text{g/mL}$, 高于 HPLC 法的 $(3.2831 \pm 2.05287) \mu\text{g/mL}$, 差值的均数($\bar{d}$)值的 94.9%(56/59) 在 95% 置信度内。可见, Wilcoxon 检验和 Bland - Altman 分析结果均显示两种检测方法的一致性差。

2.3 不同质量浓度范围的两种检测方法相关性分析

HPLC 法检测 VRC 有效谷浓度(C_{min})范围为 1.0 ~ 5.5 μg/mL^[3,7-8]。按 3 个质量浓度范围,将 59 份

表1 HPLC法及EMIT法VRC血药浓度检测结果(μg/mL, n = 59)

Tab. 1 Results of serum drug concentration determined by HPLC and EMIT (μg/mL, n = 59)								
编号	HPLC 法	EMIT 法	编号	HPLC 法	EMIT 法	编号	HPLC 法	EMIT 法
01	4.55	9.70	21	7.01	14.67	41	0.31	0.36
02	7.31	16.00	22	1.16	0.67	42	4.40	5.00
03	2.91	8.48	23	1.57	3.53	43	5.67	7.88
04	2.44	5.17	24	2.89	5.13	44	5.65	6.65
05	2.16	4.17	25	2.75	5.55	45	2.61	3.96
06	2.45	5.37	26	5.76	9.14	46	1.36	2.57
07	1.44	2.16	27	3.44	6.56	47	6.24	10.93
08	1.67	4.28	28	2.61	4.78	48	5.19	9.24
09	4.83	9.00	29	1.75	3.56	49	2.31	3.02
10	1.25	2.22	30	1.34	2.27	50	2.03	2.55
11	1.53	2.14	31	0.80	0.12	51	6.26	4.53
12	6.04	9.83	32	1.51	3.99	52	1.36	2.57
13	6.43	10.08	33	1.80	4.02	53	5.02	5.07
14	2.25	5.01	34	1.43	3.64	54	6.84	9.23
15	0.82	0.94	35	0.95	1.90	55	3.71	5.33
16	6.74	13.13	36	1.15	2.16	56	6.58	8.78
17	0.87	2.10	37	6.75	6.50	57	4.61	6.17
18	3.78	6.10	38	2.57	3.81	58	3.63	5.43
19	0.79	0.73	39	2.77	5.14	59	5.09	9.40
20	2.61	5.43	40	1.95	2.65			

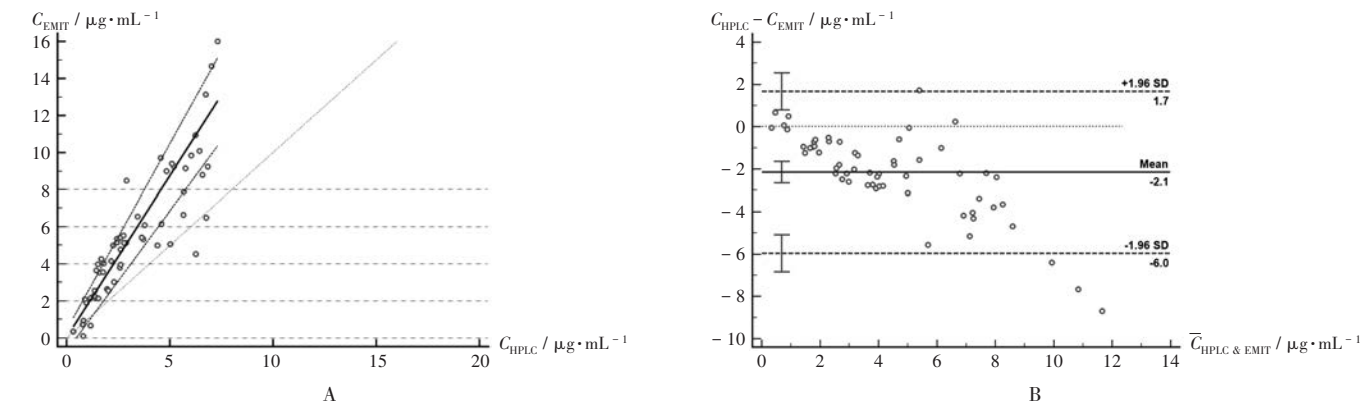
样本分为 A 组(< 1.0 μg/mL, 6 份)、B 组(1.0 ~ 5.5 μg/mL, 40 份)和 C 组(> 5.5 μg/mL, 13 份),并采用 Wilcoxon 检验, Passing - Bablok 回归和 Bland - Altman 分析。A 组、B 组、C 组的回归方程分别为 $Y_1 = -5.110 + 7.385X_1 (n = 6)$, $Y_2 = -0.0124 + 1.853X_2 (n = 40)$, $Y_3 = -38.494 + 7.584X_3 (n = 13)$, Spearman 相关系数分别为 0.771, 0.878, 0.505。结果表明, A 组和 B 组两种检测方法相关性较好, 而 C 组相关性较差。Wilcoxon 检验结果显示, 两种检测方法结果在 3 个质量浓度范围内均有显著差异; Bland - Altman 分析结果表明, C_{EMIT} 分别比 C_{HPLC} 高 0.27, 2.03, 3.39 μg/mL, 表明 3 个质量浓度范围的一致性差。详见图 2。

2.4 我院患者 VRC 血药浓度检测结果

2 045 份样本主要来源于重症医学科、血液科、呼吸科(2019 年占 92.98%, 2020 年占 92.23%), 患者年龄和血药浓度均符合正态分布。血药浓度, HPLC 法测定结果 $\bar{C}$ 为 $(2.67 \pm 1.88) \mu\text{g/mL}$, 最大血药浓度为 11.76 μg/mL; EMIT 法测定结果 $\bar{C}$ 为 $(4.18 \pm 2.69) \mu\text{g/mL}$, 有 3 例超过峰浓度(16.0 μg/mL)。详见表 2。

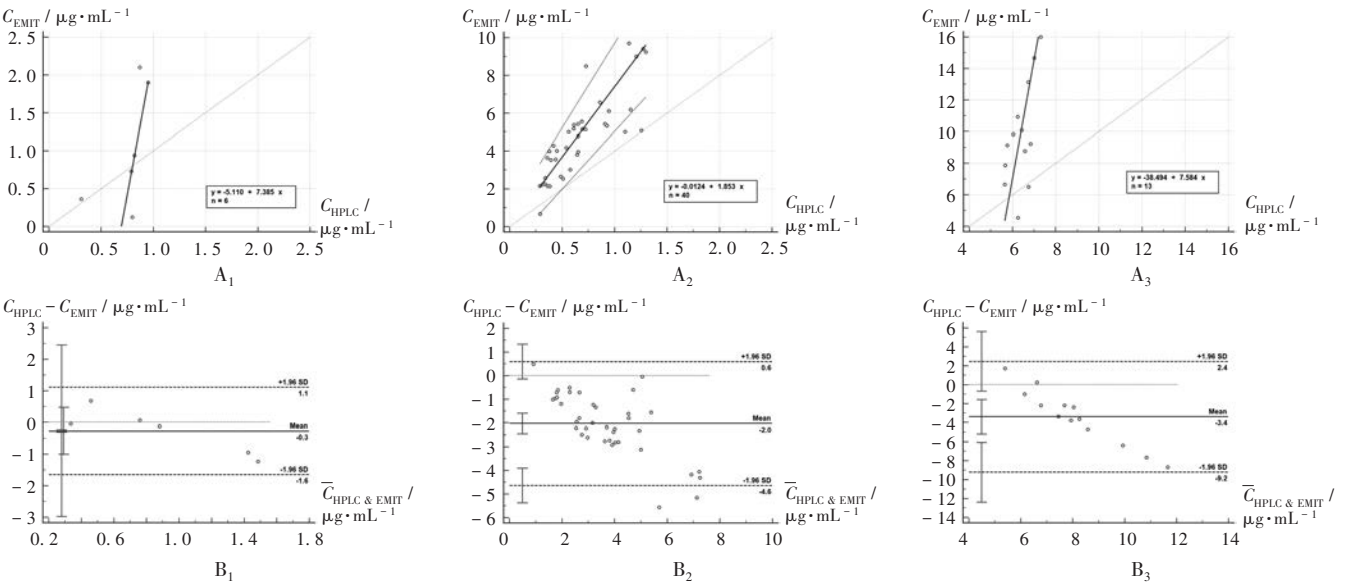
3 讨论

HPLC 法被临床广泛用于测定各种药物的血药浓度^[9-10], 具有灵敏度高、专属性强的优点。但 HPLC 法测



A. 线性回归图 B. Bland - Altman 偏差图
图1 同一质量浓度下两种检测方法血药浓度结果分析
A. Linear regression chart B. Bland - Altman deviation plot

Fig.1 Serum drug concentration determined by two methods at the same mass concentration



A₁, B₁. 质量浓度 < 1.0 μg / mL A₂, B₂. 质量浓度 1.0 ~ 5.5 μg / mL A₃, B₃. 质量浓度 > 5.5 μg / mL
A. Passing - Bablok 回归图 B. Bland - Altman 偏差图

图2 不同质量浓度下两种检测方法血药浓度结果分析

A₁, B₁. Mass concentration < 1.0 μg / mL A₂, B₂. Mass concentration of 1.0 ~ 5.5 μg / mL A₃, B₃. Mass concentration > 5.5 μg / mL

A. Passing - Bablok regression analysis chart B. Bland - Altman deviation plot

Fig.2 Serum drug concentration determined by two methods under different mass concentrations

表2 我院患者VRC血药浓度测定结果(n = 2 045)

Tab.2 Determination results of VRC serum concentration in patients in our hospital (n = 2 045)

方法	$C_{\min}$ (μg/mL)	$C_{\max}$ (μg/mL)	$\bar{C}$ (μg/mL)	RSD(%)	< 1.0 μg/mL[例(%)]	> 5.5 μg/mL[例(%)]	治疗窗内[例(%)]	治疗窗外[例(%)]
HPLC法(n = 1 054)	0	11.76	2.67	1.88	154(14.61)	99(9.39)	801(76.00)	253(24.00)
EMIT法(n = 991)	0	16.00	4.18	2.69	82(8.27)	251(25.33)	658(66.40)	333(33.60)

定前需对样本进行前处理,等待时间长且测定过程复杂,不适用于大样本量分析测定^[11]。EMIT法属酶免疫分析技术,其检测基于样本中的药物与葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PD)标记的药物竞争抗体结合位点,与抗体结合后,酶活性发生改变,根据酶活性来确定样本中待测药物的浓度^[12]。EMIT法所需样本体积较小,一直

是临床用于确定内源性和外源性物质的工具,具有自动化程度高,样本处理简单、快速的优点,适用于急诊和大样本量分析测定。但EMIT法是利用抗原-抗体相互识别并结合来产生检测信号,与待测药物具有相同的抗原表面标志(如代谢物、内源性物质等)或抗体有多个抗原结合位点时,会干扰检测结果;同时,样本质量、环

环境温度等因素也显著影响检测结果。因而其灵敏度和准确性相对较低。EMIT法测定人血浆中VRC浓度时,可能无法区分药物与VRC类似物或代谢产物,导致产生的值更高影响结果^[13-14]。

目前,关于VRC目标血药浓度和用药方案调整推荐的研究中多数是基于HPLC法的检测结果。丁记者等^[14]及阚智慧^[15]对样本进行对比研究,均发现两种检测方法具有明显的相关性和一致性,LI等^[13]对比了419例儿童样本的测定结果,发现两种检测方法存在明显相关性,但EMIT法测定结果显著高于HPLC法。本研究结果显示,两种检测方法存在较好的相关性,但总体上EMIT法与HPLC法测定结果有显著差异。在0~5.5 μg/mL范围内两种检测方法具有很好的相关性。Wilcoxon测试和Bland-Altman分析表明在3个质量浓度范围,EMIT法结果均较HPLC法高,并存在显著差异。

因本研究中平行对比的样本量偏小,故对我院HPLC法(1 054例)和EMIT法(991例)的测定结果进行回顾性分析以作为补充。结果表明,在样本主要来源科室分布相近、年龄和血药浓度均符合正态分布的情况下,EMIT法较HPLC法测定结果普遍偏高。

上述研究之所以出现不同的结论,可能与样本来源有一定关系,已建立的HPLC法线性范围较窄,样本测定结果较集中,均与治疗窗浓度1.0~5.5 μg/mL接近^[15]。丁记者等^[14]的研究对象为口服VRC患者,可能病情和所使用药物种类相对简单,而LI等^[13]的研究样本主要为儿童,其中大多数接受了造血干细胞移植,同时使用了多种药物造成干扰。本研究中患者主要来源于重症监护室,病情和用药情况复杂,测定结果分布范围宽。另外,造成结论不一与样本量也有一定关系,本研究样本量偏小,回顾性数据欠严谨。因此,关于两种检测方法的相关性和一致性需更大样本量、更进一步的深入研究。

综上所述,EMIT法和HPLC法检测VRC血药浓度时,结果总体相关性良好,鉴于EMIT法存在测定结果偏高的可能,建议在临床检测时,尤其是对于病情复杂、用药品种多的患者,应予以关注并作相应调整,同一患者多次检测应使用同一种方法,以便为临床提供更准确可靠的个体化用药依据。

参考文献

- [1] CZYRSKI A, RESZTAK M, ŚWIDERSKI P, et al. The Overview on the Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Interactions of Triazoles[J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(11): 1961.
- [2] JOVIĆ Z, JANKOVIĆ SM, RUŽIĆ ZEČEVIĆ D, et al. Clinical Pharmacokinetics of Second - Generation Triazoles for the Treatment of Invasive Aspergillosis and Candidiasis[J]. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet*, 2019, 44(2): 139 - 157.
- [3] 张青, 张松, 王雨来, 等. 血药浓度监测下伏立康唑致肝酶升高及视觉异常的药学监护[J]. *中国药业*, 2021, 30(14): 122 - 124.
- [4] SCHULZ J, KLUWE F, MIKUS G, et al. Novel insights into the complex pharmacokinetics of voriconazole: a review of its metabolism[J]. *Drug Metab Rev*, 2019, 51(3): 247 - 265.
- [5] CHEN K, ZHANG X, KE X, et al. Individualized medication of voriconazole: a practice guideline of the division of therapeutic drug monitoring, Chinese Pharmacological Society [J]. *Ther Drug Monit*, 2018, 40(6): 663 - 674.
- [6] PERREAULT S, MCMANUS D, ANDERSON A, et al. Evaluating a voriconazole dose modification guideline to optimize dosing in patients with hematologic malignancies[J]. *J Oncol Pharm Pract*, 2019, 25(6): 1305 - 1311.
- [7] 王林军. 双波长高效液相色谱法同时检测环孢素A及伏立康唑血药浓度[J]. *中国药业*, 2019, 28(2): 17 - 20.
- [8] 王磊, 孙文利, 陈佳琦, 等. 环孢素A血药浓度监测相关实验室检测研究进展[J]. *中华临床实验室管理电子杂志*, 2019, 7(2): 65 - 70.
- [9] EL - MASRY SM, EL - MORSI RM. Simple HPLC Method for Quantitative Determination of Carbinoxamine in Human Plasma: Application in Pharmacokinetic Studies and Therapeutic Drug Monitoring[J]. *Drug Res (Stuttg)*, 2019, 69(6): 342 - 347.
- [10] TOME T, ČASAR Z, OBREZA A. Development of a Unified Reversed - Phase HPLC Method for Efficient Determination of EP and USP Process - Related Impurities in Celecoxib Using Analytical Quality by Design Principles [J]. *Molecules*, 2020, 25(4): 809.
- [11] NICOLÒ AD, IANNIELLO A, BENAGLI C, et al. Lack of concordance between EMIT assay and LC - MS / MS for Therapeutic Drug Monitoring of Mycophenolic Acid: Potential increased risk for graft rejection? [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2020, 187: 113337.
- [12] CHEN B, GU ZD, CHEN H, et al. Establishment of high - performance liquid chromatography and enzyme multiplied immunoassay technology methods for determination of free mycophenolic acid and its application in Chinese liver transplant recipients[J]. *Ther Drug Monit*, 2010, 32(5): 653 - 660.
- [13] LI XJ, LI W, LI M, et al. Correlation between enzyme multiplied immunoassay technique and high - performance liquid chromatography in the quantification of voriconazole in a paediatric population [J]. *Scand J Clin Lab Invest*, 2021, 81(2): 121 - 126.
- [14] 丁记者, 林小青, 温悦, 等. 高效液相色谱法与酶放大免疫分析法检测人血浆中伏立康唑浓度的比较[J]. *中国临床药学杂志*, 2020, 29(4): 266 - 271.
- [15] 阚智慧. HPLC和EMIT法用于伏立康唑血浆浓度检测的相关性与临床应用[D]. 济南: 山东大学, 2018.

(收稿日期: 2022 - 01 - 12; 修回日期: 2022 - 05 - 06)