

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)10-0065-05  
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.10.013



# 万古霉素治疗药物监测中不同牛血清替代人血清可行性分析

朱双燕, 邹进, 李燕, 蒲强红, 刘易陇

(四川省乐山市人民医院, 四川 乐山 614000)

**摘要:**目的 分析万古霉素治疗药物监测(TDM)中不同牛血清替代人血清作为空白基质的可行性。方法 建立测定万古霉素血药浓度的高效液相色谱(HPLC)法。收集医院2022年1月至2023年1月接受万古霉素治疗患者的血清样本105份(已检测血药浓度), 关联人血清和不同厂家(厂家1和厂家2)的不同牛血清(小牛血清、新生牛血清、胎牛血清)作为空白基质的标准曲线, 得到相应的血药浓度。采用 Passing - Bablok 回归分析法和 Bland - Altman 法考察测定结果的相关性和一致性。结果 以人血清和不同牛血清作为空白基质时, 万古霉素质量浓度在1~100 mg/L 范围内与峰面积线性关系均良好( $R^2 > 0.999$ ); 日内精密度、日间精密度的 RSD 均小于15%, 相对回收率均在85%~115% 范围内。人血清与不同牛血清作为空白基质均有良好的相关性( $r > 0.999$ ), 但均有系统误差和比例误差。厂家1的3种牛血清(小牛血清1、新生牛血清1、胎牛血清1)对比人血清作为空白基质检测值的相对平均偏差和95%一致性界限均小于50% 允许总误差( $\pm 15\%$ ), 厂家2的3种牛血清(小牛血清2、新生牛血清2、胎牛血清2)对比人血清作为空白基质检测值的相对平均偏差或95%一致性界限超出 $\pm 15\%$ 。结论 使用 HPLC 法进行万古霉素 TDM 时, 部分厂家生产的牛血清能替代人血清作为空白基质进行检测。

**关键词:** 万古霉素; 治疗药物监测; 人血清; 小牛血清; 新生牛血清; 胎牛血清; 空白基质; 高效液相色谱法

## Feasibility Analysis of Different Bovine Serum Replacing Human Serum in Therapeutic Drug Monitoring of Vancomycin

ZHU Shuangyan, ZOU Jin, LI Yan, PU Qianghong, LIU Yilong

(Leshan People's Hospital, Leshan, Sichuan, China 614000)

**Abstract: Objective** To analyze the feasibility of different bovine serum replacing human serum as blank substrate in the therapeutic drug monitoring (TDM) of vancomycin. **Methods** The high-performance liquid chromatography (HPLC) method for determining the plasma concentration of vancomycin was established. A total of 105 serum samples (plasma concentration had been tested) from patients receiving vancomycin treatment in a hospital from January 2022 to January 2023 were collected, the vancomycin plasma concentration of human serum and different bovine serum (calf serum, newborn calf serum, fetal calf serum) from manufacturers 1 and 2 was obtained through the correlation of the vancomycin plasma concentration of above serum samples and the standard curves of human serum and bovine serum as the blank substrate. The Passing - Bablock regression analysis and the Bland - Altman method were used to explore the correlation and consistency of the measurement results. **Results** When human serum and different bovine serum as the blank substrate, the linear range of vancomycin was 1 - 100 mg / L ( $R^2 > 0.999$ ). The RSDs of intra-day precision and inter-day precision were lower than 15%, and the relative recovery rate of

第一作者: 朱双燕, 女, 硕士, 主管药师, 研究方向为药物浓度监测, (电子信箱)363826374@qq.com。

- [35] DONG GZ, LEE JH, KI SH, et al. AMPK activation by isorhamnetin protects hepatocytes against oxidative stress and mitochondrial dysfunction [J]. Eur J Pharmacol, 2014, 740: 634 - 640.
- [36] LIU Q, JIN Z, XU Z, et al. Antioxidant effects of ginkgolides and bilobalide against cerebral ischemia injury by activating the Akt/ Nrf2 pathway *in vitro* and *in vivo* [J]. Cell Stress Chaperones, 2019, 24(2): 441 - 452.
- [37] CARDOSO SM, OLIVEIRA CR. Inhibition of NF -  $\kappa$ B renders cells more vulnerable to apoptosis induced by amyloid beta peptides [J]. Free Radic Res, 2003, 37(9): 967 - 973.
- [38] SMITH D, TWEED C, FERNYHOUGH P, et al. Nuclear factor - kappaB activation in axons and Schwann cells in experimental sciatic nerve injury and its role in modulating axon regeneration: studies with etanercept [J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2009, 68(6): 691 - 700.
- [39] FREUDENTHAL R, BOCCIA MM, ACOSTA GB, et al. NF - kappaB transcription factor is required for inhibitory avoidance long-term memory in mice [J]. Eur J Neurosci, 2005, 21(10): 2845 - 2852.
- [40] SARNICO I, LANZILLOTTA A, BENARESE M, et al. NF - kappaB dimers in the regulation of neuronal survival [J]. Int Rev Neurobiol, 2009, 85: 351 - 362.
- [41] NIU YL, ZHANG WJ, WU P, et al. Expression of the apoptosis-related proteins caspase - 3 and NF - kappaB in the hippocampus of Tg2576 mice [J]. Neurosci Bull, 2010, 26(1): 37 - 46.

(收稿日期: 2023 - 05 - 16; 修回日期: 2023 - 11 - 27)

vancomycin was in the range of 85% to 115%. The correlation of human serum with different bovine serum as blank substrate was good ( $r > 0.999$ ), but with systematic and proportional errors. The relative average deviations and 95% limits of agreement (95% LoA) of the detection values of three bovine serum from manufacturer 1 (calf serum 1, newborn calf serum 1, fetal calf serum 1) compared to human serum as the blank substrate were all lower than the 50% of total allowable error ( $\pm 15\%$ ), while the relative average deviations or 95% LoA of the detection values of three bovine serum from manufacturer 2 (calf serum 2, newborn calf serum 2, fetal calf serum 2) compared to human serum as the blank substrate were over  $\pm 15\%$ . **Conclusion** In the TDM of vancomycin by HPLC, the bovine serum produced by some manufacturers can replace human serum as the blank substrate for detection.

**Key words:** vancomycin; therapeutic drug monitoring; human serum; calf serum; newborn calf serum; fetal calf serum; blank substrate; HPLC

万古霉素为全球首个问世的糖肽类抗菌药物,对多数革兰阳性菌的抗菌作用较强,可有效治疗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染<sup>[1]</sup>。但其治疗窗窄、个体差异大,可引起耳毒性、肾毒性等不良反应<sup>[2]</sup>,推荐进行治疗药物监测(TDM)<sup>[3]</sup>。目前常用监测方法主要为酶放大免疫测定技术<sup>[4]</sup>、荧光偏振免疫分析法<sup>[4]</sup>、高效液相色谱(HPLC)法<sup>[5]</sup>及高效液相色谱串联质谱法<sup>[6]</sup>。其中,HPLC法专属性强、准确度高,成本较低<sup>[7]</sup>,一般需采用有机试剂沉淀蛋白法对生物样品进行预处理<sup>[8]</sup>,在绘制标准曲线和制备质量控制(简称质控)样品时均需使用空白血清,但人血清较难获得,且有携带乙型肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒等的风险。动物血清价廉易得,其中牛血清中的蛋白质、电解质等成分与人血清相似,可作为空白基质<sup>[9]</sup>,但其种类和生产厂家较多,且产地、提取工艺均会影响牛血清的质量。鉴于此,本研究中分析了来自2个厂家的3种牛血清(小牛血清、新生牛血清、胎牛血清)替代人血清作为空白基质用于万古霉素TDM的可行性。现报道如下。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

Agilent 1260型高效液相色谱仪(美国Agilent Technologies公司);MS105DU型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司,精度为0.01 mg);Vortex-2型涡旋混匀仪(上海沪析实业有限公司);L500-A型低速离心机(湘仪离心机仪器有限公司);MICRO21R型低温高速离心机(赛默飞世尔科技<中国>有限公司);UPTA20型超纯水机(上海力辰邦西仪器科技有限公司);PHS-3E型pH计(上海雷磁仪器有限公司)。

### 1.2 试剂

万古霉素对照品(中国食品药品检定研究院,批号为130360-201302,含量99.8%);人血清(我院健康人血制备);小牛血清1(批号为20210110X),新生牛血清1(批号为20220412F),胎牛血清1(批号为20220412F),均购自北京鑫泉永硕科技有限公司(下文以厂家1指代);小牛血清2(批号为20220121),新生牛血清2(批号为20220601),胎牛血清2(批号为20220312),均购自平

睿生物科技(北京)有限公司(下文以厂家2指代);乙腈和甲醇均为色谱纯,磷酸二氢钾和磷酸均为分析纯,水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Eclipse Plus C<sub>18</sub>柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:0.01 mol/L磷酸二氢钾缓冲溶液(pH 3.2) - 甲醇(80:20, V/V);流速:1 mL/min;检测波长:236 nm;柱温:30 °C;进样量:10 μL。

### 2.2 溶液制备

取万古霉素对照品9.98 mg,精密称定,置10 mL容量瓶中,加甲醇-水(20:80, V/V)溶解,定容,制成质量浓度为1 mg/mL的对照品贮备液;取适量,加甲醇-水(20:80, V/V)稀释,制成质量浓度分别为10, 25, 50, 100, 250, 500, 1 000 mg/L的系列对照品溶液和质量浓度分别为50, 200, 500 mg/L的系列质控溶液,于-80 °C冷藏,备用。

### 2.3 样品预处理

取血清样品适量,3 500 r/min离心10 min,取上清液500 μL,置2 mL EP管中,加800 μL乙腈,涡旋1 min,4 °C、12 000 r/min离心10 min;取上清液,置10 mL EP管中,加3 mL二氯甲烷,3 500 r/min离心10 min;取上清液,经0.22 μm微孔滤膜滤过,完成预处理。

### 2.4 方法学考察

系统适用性试验:取2.2项下对照品溶液(质量浓度为100 mg/L)、2.3项下预处理的空白血清各适量,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果空白血浆+对照品溶液色谱图中,在与对照品溶液色谱相应位置有吸收峰,理论板数按万古霉素峰计不低于3 000,分离度大于1.5。详见图1。

线性关系考察:分别吸取2.2项下系列对照品溶液各适量,加血清适量,按2.3项下方法处理,制成万古霉素质量浓度分别为1, 2.5, 5, 10, 25, 50, 100 mg/L的系列血清对照品溶液。按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分质量浓度( $X$ , mg/L)为横坐标、峰面积( $Y$ )为纵坐标进行线性回归,得回归方程分别为

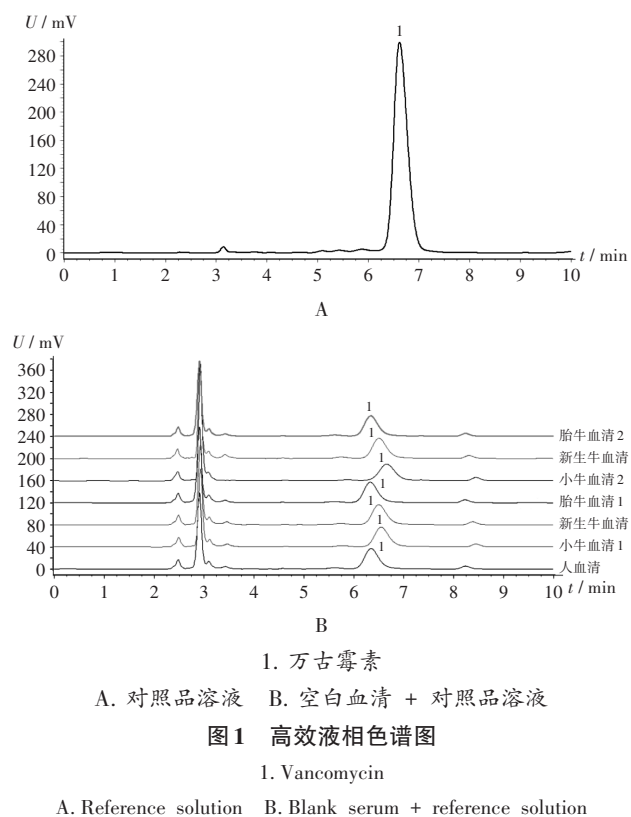


图1 高效液相色谱图

A. Reference solution B. Blank serum + reference solution

$Y_{人} = 7.2749 X_{人} - 0.0576 (R^2 = 0.9999)$ ,  $Y_{小牛1} = 6.9281 X_{小牛1} + 2.758 (R^2 = 0.9996)$ ,  $Y_{新生牛1} = 7.5124 X_{新生牛1} - 0.2651 (R^2 = 0.9998)$ ,  $Y_{胎牛1} = 7.7163 X_{胎牛1} + 0.168 (R^2 = 0.9995)$ ;  $Y_{小牛2} = 9.026 X_{小牛2} - 3.207 (R^2 = 0.9998)$ ,  $Y_{新生牛2} = 9.4842 X_{新生牛2} - 5.2506 (R^2 = 0.9994)$ ,  $Y_{胎牛2} = 8.542 X_{胎牛2} - 1.8531 (R^2 = 0.9994)$ 。结果表明,各血清样品中万古霉素质量浓度在1~100 mg/L范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取2.2项下系列质控溶液各适量,平行5份,加血清适量,按2.3项下方法处理,配制成万古霉素质量浓度分别为5,20,50 mg/L的系列血清质控溶液。按2.1项下色谱条件,1 d内连续测定5次,计算日内精密度;连续测定3 d,计算日间精密度。结果的RSD均小于15%,表明方法精密度良好<sup>[10]</sup>。

回收试验:取“精密度试验”项下系列血清质控溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积A;用流动相替代血清制备上述系列溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积B。计算万古霉素的相对回收率,相对回收率(%) = 峰面积A / 峰面积B × 100%。结果均在85%~115%范围内,表明方法准确度较好。

## 2.5 空白基质血清替代可行性

血清样本测定:收集医院2022年1月至2023年1月已进行万古霉素TDM患者的血清样本,剔除质量浓

度 < 1 mg/L、> 100 mg/L 的样品,共收集有效样品105份,根据前述回归方程,得人血清和不同牛血清作为空白基质时的样品质量浓度。

测定结果分布与比较:采用Shapiro - Wilk法检验,对7种血清标准溶液中万古霉素血药浓度进行正态性检验,结果均不符合正态分布( $P < 0.05$ );采用Wilcoxon配对秩和检验,结果表明以人血清与不同牛血清为空白基质时样品质量浓度有显著差异( $P < 0.05$ )。

Passing - Bablok回归分析:Passing - Bablok法用于2种方法一致性评价<sup>[11]</sup>,主要考察其系统误差、比例误差和随机误差。回归方程为 $Y = \alpha + \beta \times x$ ,其中总体截距 $\alpha$ 表示系统误差,若其95%置信区间(CI)包含0,则认为2种方法不存在系统误差;总体斜率 $\beta$ 表示比例误差,若其包含1,则认为2种方法不存在比例误差;残差标准差(RSD)表示随机误差,95%的随机误差在 $\pm 1.96 RSD$ 范围内,若区间过大,2种方法可能不一致。Passing - Bablok线性模型的有效性采用Cusum法检验,若 $P < 0.05$ ,则提示2种方法不存在线性关系,Passing - Bablok法不适用。分别以人血清、不同牛血清标准溶液中万古霉素的质量浓度为横、纵坐标进行线性回归(见图2)。结果显示,Spearman相关系数( $r$ )均大于0.999,表明相关性良好,Cusum法检验结果的 $P > 0.05$ ;95%的随机误差均在 $\pm 1.96 RSD$ 范围内,故均不存在随机误差,但均存在较小的系统误差和比例误差。误差是否在医学决定水平的总允许误差范围内,需结合Bland - Altman一致性分析结果判断。

Bland - Altman一致性分析:Bland - Altman法同时监测系统误差与比例误差<sup>[11-12]</sup>,可更好地评价2种方法测定结果的一致性。以2种方法测定结果的平均值为横坐标、差值/平均值的百分比为纵坐标绘制散点图(见图3),图中央的水平实线表示平均偏差,上下2条虚线为95%一致性界限(LoA),图形中位于LoA范围内点需占所有点的95%,且该LoA不超过医学决定水平处的偏差。参考国家卫生健康委临床检验中心(NCCL)2023年临床检验室间质量评价计划中的允许总误差(TEa)<sup>[13]</sup>,其中NCCL - C - 43项下抗生素TDM万古霉素TEa为 $\pm 30%$ ,以检测结果与校准品标示值的相对偏移不超出TEa<sup>[11]</sup>的50%(即 $\pm 15%$ )为临床可接受,提示2种方法等价。结果显示,小牛血清1作为空白基质检测值的相对平均偏差比人血清高2.1%,新生牛血清1和胎牛血清1分别较其低3.0%,6.1%,且相对平均偏差和95%LoA均未超出 $\pm 15%$ ,故厂家1的3种牛血清均能替代人血清作为空白基质。小牛血清2、新生牛血清2、胎牛血清2作为空白基质检测值的相对平均偏差分别较人血清低18.5%,21.6%,14.3%,其中胎牛血清2虽

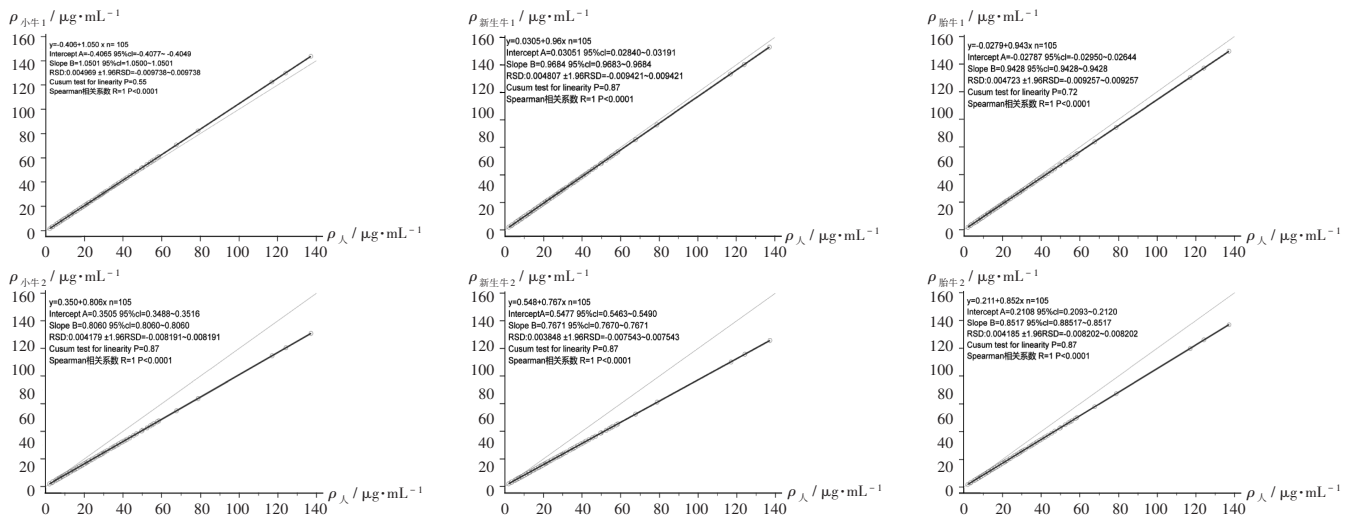
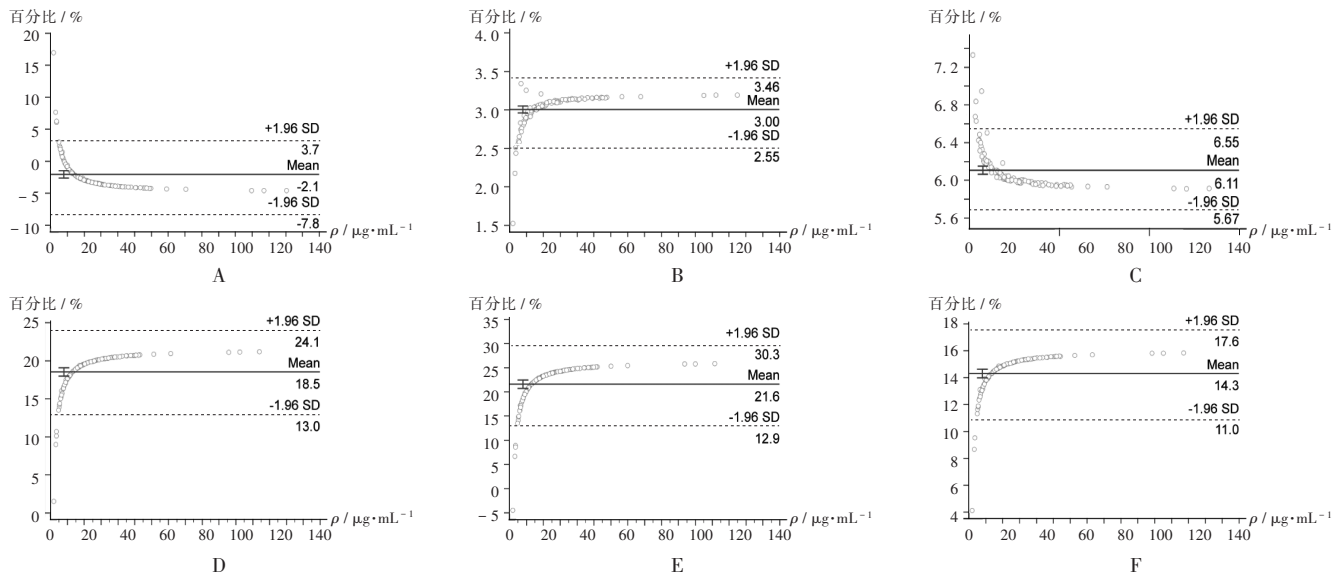


图2 不同牛血清替代人血清作为空白基质的 Passing – Bablok 图

Fig. 2 Passing – Bablock diagram of different bovine serum replacing human serum as blank substrate



A. 人血清与小牛血清1 B. 人血清与新生牛血清1 C. 人血清与胎牛血清1 D. 人血清与小牛血清2 E. 人血清与新生牛血清2 F. 人血清与胎牛血清2

图3 不同牛血清替代人血清作为空白基质的 Bland – Altman 图

A. Human serum and calf serum 1 B. Human serum and newborn calf serum 1 C. Human serum and fetal calf serum 1 D. Human serum and calf serum 2 E. Human serum and newborn calf serum 2 F. Human serum and fetal calf serum 2

Fig. 3 Bland – Altman diagram of different bovine serum replacing human serum as blank substrate

未超出  $\pm 15\%$ , 但其 95%LoA 超出  $\pm 15\%$ , 故厂家 2 的 3 种牛血清均不能替代人血清作为空白基质。

### 3 讨论

不同动物的血清组分不同(有 1 000 多种), 且其组分及含量与供血动物(产地、性别、年龄、生理条件、营养条件)及提取工艺(采集时间、采集方法)有关<sup>[14]</sup>。本研究选取 3 种牛血清, 其中胎牛血清是在母牛怀孕 5 ~ 8 个月时通过胎牛心脏穿刺采血获取的血清; 新生牛血清取自出生 24 h 内的新生牛; 小牛血清取自出生 10 ~ 30 d 的小牛。上述 3 种血清中促细胞生长因子、促贴附因子、激素及其他活性物质等组分种类及比例不

同<sup>[14-15]</sup>。在 TDM 中, 选择不同的小牛血清作为空白基质, 经乙腈沉淀后离心, 再用二氯甲烷萃取, 不同种类牛血清中组分的细微差距对 TDM 结果影响不大; 但不同厂家的牛血清, 因血清的来源及提取、加工工艺等不同, 作为空白基质对万古霉素 TDM 结果的影响较大。目前, 市售牛血清厂家较多, 质量差异较大<sup>[16]</sup>, 其能否取代人血清用于 HPLC 法的 TDM, 需先做质控对比, 误差应在 TEa 范围内。

有研究表明, 采用小牛血清替代人血清会存在较大误差<sup>[17-18]</sup>, 与本研究结论略有不同。本研究结果显示, 采用不同的牛血清替代人血清均有误差产生, 总误

差可能来源于系统误差、比例误差和随机误差,测定结果的误差并非均由人血清和牛血清成分差异所致,还存在操作误差(如样品在处理过程中经有机试剂沉淀、萃取等多次操作,标准品的配置过程经多次溶解稀释等),但总误差均应控制在TEa范围内。本研究中对105份使用过万古霉素患者的血清样本采用Passing - Bablok回归分析考察相关性,采用Bland - Altman法确定偏差。其中前者对样本量的要求需大于等于100<sup>[19]</sup>,其优点在于受离群值的影响较小<sup>[20-21]</sup>,不要求样本分布和测量误差满足特别的假设。本研究结果显示,6种牛血清与人血清作为空白基质的相关性均良好,厂家1的3种牛血清误差均在50%TEa范围内,故均可替代人血清作为空白基质,误差大小小牛血清 < 胎牛血清 < 新生牛血清;从经济学角度分析,血清价格排序为小牛血清 < 新生牛血清 < 胎牛血清,故使用HPLC法进行万古霉素TDM时,厂家1的小牛血清为人血清最佳替代选择。厂家2的血清误差均超过TEa,故均不能作为人血清的替代空白基质。

本研究的不足之处在于仅选择了2个厂家的牛血清,同一厂家的3种牛血清并非为同一批号,未进行同一批号多组对比验证,同一种血清未进行多批号对比验证等,后续需进一步研究。

综上所述,在万古霉素TDM中,部分牛血清可替代人血清作为空白基质进行检测。

### 参考文献

[1] GHASEMIYEH P, VAZIN A, ZAND F, et al. Pharmacokinetic assessment of vancomycin in critically ill patients and nephrotoxicity prediction using individualized pharmacokinetic parameters[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13:912202.

[2] ODA K, JONO H, NOSAKA K, et al. Reduced nephrotoxicity with vancomycin therapeutic drug monitoring guided by area under the concentration - time curve against a trough 15 - 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  concentration [J]. *Int J Antimicrob Agents*, 2020, 56 (4) : 106109.

[3] HE N, SU S, YE Z, 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.

[4] CHEN CY, LI MY, MA LY, 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.

[5] REN F, LIU YX, LI S, et al. Therapeutic drug monitoring of free vancomycin concentration in practice: A new analytical

technique based on the HFCE - UF sample separation method[J]. *Biomed Chromatogr*, 2023, 37(3) : e5559.

[6] FAN YX, PENG XL, YU JC, et al. An ultra - performance liquid chromatography - tandem mass spectrometry method to quantify vancomycin in human serum by minimizing the degradation product and matrix interference [J]. *Bioanalysis*, 2019, 11(10) : 941 - 955.

[7] 周 强,潘清清,沈 敏,等. 超高效液相色谱快速检测万古霉素浓度方法的建立和性能评价[J]. *检验医学*, 2020, 35(1) : 39 - 46.

[8] JAVORSKA L, KRČMOVA LK, SOLIČHOVA D, et al. Modern methods for vancomycin determination in biological fluids by methods based on high - performance liquid chromatography - A review[J]. *J Sep Sci*, 2016, 39(1) : 6 - 20.

[9] 李顺炜,袁孔现,朱 虹,等. 反相高效液相色谱法测定血液中去甲万古霉素浓度的研究[J]. *安徽医药*, 2015, 19(8) : 1470 - 1473.

[10] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 466 - 471.

[11] 李志辉,杜志成. *MedCalc 统计分析方法及应用*[M]. 北京: 电子工业出版社, 2018: 222.

[12] LUDBROOK J. Confidence in Altman - Bland plots: a critical review of the method of differences [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2010, 37(2) : 143 - 149.

[13] 国家卫生健康委临床检验中心. 2023年临床检验室间质量评价计划[EB/OL]. (2022 - 05 - 08)[2023 - 05 - 06]. <https://www.nccl.org.cn/mainCn>.

[14] 李彩霞,王福科,刘 流. 超高效液相色谱 - 质谱联用技术分析新生牛和胎牛血清组分[J]. *南方医科大学学报*, 2014, 34(5) : 751 - 753.

[15] 李自良,王家敏,赵彩红,等. 不同类型牛血清对MDCK细胞培养效果研究[J]. *生物学杂志*, 2020, 37(4) : 21 - 25.

[16] RIFFAULT S, HÄGGLUND S, GUZMAN E, et al. A Single Shot Pre - fusion - Stabilized Bovine RSV F Vaccine is Safe and Effective in Newborn Calves with Maternally Derived Antibodies[J]. *Vaccines(Basel)*, 2020, 8(2) : 231.

[17] 刘 威,姚树永. 喹硫平血药浓度监测中血清代用品的研究[J]. *药学与临床研究*, 2018, 26(2) : 97 - 100.

[18] 张熙洁,张晓旭,姜 晖,等. 空白基质对万古霉素血药浓度监测的影响[J]. *中国抗生素杂志*, 2016, 41(12) : 956 - 960.

[19] 闻 浩,陆梦洁,刘玉秀,等. 定量测量Bland - Altman一致性评价方法研究及临床应用[J]. *医学研究生学报*, 2015, 28(10) : 1107 - 1111.

[20] LUDBROOK J. Linear regression analysis for comparing two measurers or methods of measurement; but which regression?[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2010, 37(7) : 692 - 699.

[21] LUDBROOK J. A primer for biomedical scientists on how to execute model II linear regression analysis [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2012, 39(4) : 329 - 335.

(收稿日期:2023 - 07 - 06;修回日期:2024 - 01 - 24)