

# 酶放大免疫法与酶联免疫吸附法测定他克莫司血药浓度的对比研究

王春燕<sup>1\*</sup>, 纪松岗<sup>1</sup>, 陆世宇<sup>2</sup>, 冷萍<sup>3</sup>, 徐霞<sup>1#</sup> (1. 解放军第401医院药剂科, 山东青岛 266071; 2. 大连医科大学药学院, 辽宁大连 116044; 3. 青岛大学医学院附属医院药剂科, 山东青岛 266003)

中图分类号 R969.1; R979.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)30-2816-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.30.12

**摘要** 目的: 比较酶放大免疫(EMIT)法和酶联免疫吸附(ELISA)法测定人全血中他克莫司(FK506)浓度的相关性, 为临床合理用药提供参考依据。方法: 采用EMIT法和ELISA法分别测定122例肝肾移植患者他克莫司的血药浓度, 考察两种方法的相关性。结果: 两种方法测得的数据比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ), EMIT法测定全血中他克莫司浓度较ELISA法高3.7 ng/ml, 两者相关性一般( $r = 0.6359$ )。结论: EMIT法和ELISA法测定他克莫司血药浓度结果差异显著, 两法检测结果不可替换, 在进行血药浓度监测中应予以关注并各自建立治疗窗范围。

**关键词** 他克莫司; 酶放大免疫分析法; 酶联免疫吸附法; 血药浓度

## Determination of Blood Concentration of Tacrolimus by EMIT vs. ELISA

WANG Chun-yan<sup>1</sup>, JI Song-gang<sup>1</sup>, LU Shi-yu<sup>2</sup>, LENG Ping<sup>3</sup>, XU Xia<sup>1</sup> (1. Dept. of Pharmacy, No. 401 Hospital of PLA, Shandong Qingdao 266071, China; 2. College of Pharmacy, Dalian Medical University, Liaoning Dalian 116044, China; 3. Dept. of Pharmacy, The Affiliated Hospital of Qingdao University School of Medicine, Shandong Qingdao 266003, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To compare the correlation of EMIT and ELISA for the determination of tacrolimus (FK506) concentration in whole human blood, and to provide evidence for rational use of drugs in the clinic. METHODS: Trough concentration of FK506 in 122 patients underwent liver and renal transplantation were determined by EMIT and ELISA, respectively. The correlation of these two methods were studied. RESULTS: There were significant differences between EMIT and ELISA ( $P < 0.05$ ). Tacrolimus blood concentration determined by EMIT were 3.7 ng/ml more than by ELISA. The correlation of the two methods was not good ( $r = 0.6359$ ). CONCLUSIONS: The difference in the results of EMIT and ELISA for the determination of tacrolimus blood concentration have statistical significance. But the results of the two methods should not be compared with each other. Great importance should be attached to set up their corresponding therapeutic window for blood concentration monitoring.

**KEYWORDS** Tacrolimus; EMIT; ELISA; Blood concentration

的沉淀机制是降低水的介电常数, 导致具有表面水层的生物大分子脱水, 相互聚集, 最后析出。常用的有机沉淀剂有乙醇、甲醇、乙腈等。笔者建立硫酸锌沉淀法测定万古霉素血药浓度的方法<sup>[3]</sup>, 头孢噻利提取回收率大于75%, 操作快速、简便, 出峰稳定, 减少了有机溶剂对血样处理过程的影响, 且避免了其产生的毒性污染。头孢噻利血药浓度监测国内有报道, 由于万古霉素与头孢噻利在本试验条件下完全分离, 因此可作为内标测定含量。

本文进行了多种流动相试验, 说明乙腈有助于改善二者的分离, 且峰形较好, 文献<sup>[4]</sup>报道流动相采用0.02 mg/L 乙酸铵-甲醇(75:25), 保留时间及峰形受流动相pH值影响大, 且乙酸铵对柱效影响较大, 会减少柱的寿命。而文献<sup>[5]</sup>采用乙腈-pH 6.5 磷酸盐缓冲液(12:88)洗脱, 主要用于头孢噻利的纯度控制, 两种洗脱保留时间约在5 min左右。在本文流动相下, 不需调节缓冲液pH值, 保留时间较合适, 峰形对称, 且10 min以内与内标达到快速、完好的分离, 理论板数在5 000以上。

\* 副主任药师, 硕士研究生。研究方向: 临床药学。电话: 0532-51870213。E-mail: wangchunyan401@126.com

# 通信作者: 副主任药师, 硕士研究生。研究方向: 临床药学。电话: 0532-85813585。E-mail: xia\_ph@126.com

本试验所建立的测定血清中头孢噻利的HPLC法, 室温下即可测定, 专属性强、灵敏度高。血清样品采用硫酸锌沉淀, 不仅简化了前处理步骤, 而且使蛋白沉淀更充分, 上清溶液稳定, 分离度好, 峰形理想。本试验所建立的HPLC法各项方法学指标均符合生物样品定量分析的基本要求, 适用于临床药动学的研究。

## 参考文献

- [1] Mine Y, Watanabe Y, Sakamoto H, et al. *in vitro* antibacterial activity of FK037, a novel parenteral broad-spectrum cephalosporin[J]. *J Antibiot*, 1993, 46(1): 71.
- [2] 仲琰, 邢为藩. 第四代头孢菌素-硫酸头孢噻利[J]. 国外医药抗生素分册, 2000, 21(2): 75.
- [3] 涂厉标. 高效液相色谱法测定血清去甲万古霉素与万古霉素的浓度[J]. 医药导报, 2007, 26(5): 485.
- [4] 陈漪. HPLC法测定人血清中硫酸头孢噻利浓度[J]. 中国临床药学杂志, 2010, 19(3): 153.
- [5] 卢协勤, 张根元. 高效液相色谱法测定注射用硫酸头孢噻利的含量[J]. 抗感染药学, 2007, 4(4): 169.

(收稿日期: 2014-04-15 修回日期: 2014-05-13)

他克莫司(FK506)是大环内酯类强效免疫抑制剂,临床常用于肝、肾等器官移植的免疫抑制治疗。由于其治疗窗窄、在药动学和药效学上存在明显个体差异,且给药剂量与血药浓度之间缺乏紧密相关性<sup>[1]</sup>,需要常规监测血药浓度并及时调整用药剂量,从而提高疗效和减少不良反应。目前用于监测他克莫司浓度的方法有酶放大免疫(EMIT)法、酶联免疫吸附(ELISA)法、微粒酶免疫分析(MEIA)法以及液-质联用(LC-MS/MS)法、放射受体分析法、生物分析法等。各方法间具有方法学、提取步骤、代谢物辨识等差异,所得结果不可替换<sup>[2]</sup>。本试验分别用EMIT法与ELISA法测定FK506全血浓度,考察两种不同测定方法的差别和相关性,以便临床医师和临床药师了解两种测定方法的差异,避免因患者随访过程中数据前后参考不一致而影响诊疗判断,为临床及患者个体化用药提供依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Vival\_E全自动生化分析仪(美国Dade Behring公司); ELX-800酶标仪(美国Bio-tek公司); FAX-2200平板振荡器(美国STAT公司); DK-S12型电热恒温水浴箱(上海华连医疗器械有限公司); TGL-16C小台式高速离心沉淀机(转速:16 000 r/min,离心半径:5.9 cm,上海安亭科学仪器厂); YKH-1型液体快速混合器(江西医疗器械厂); 2811934型涡流混匀器(美国Labnet公司)。

### 1.2 药品与试剂

EMIT法测定试剂:FK506检测试剂(批号:8R019UL)、FK506样本前处理试剂(批号:8R078UL-E1)、FK506定标液(批号:8R109UL-F1)、FK506质控品(批号:12842、12843),均为美国Dade Behring公司提供;甲醇为色谱纯。ELISA法测定试剂:PRO-TracTM II Paclimus ELISA试剂盒(美国DiaSorin公司,批号:130185B);纯净水由解放军第401医院制剂中心制备。

## 2 方法

### 2.1 样本收集

收集我院2013年3月—2013年6月服用FK506的肝肾移植患者血样122份。将全血样品分成2份,一份样本用EMIT法测定,另一份用ELISA法测定。

### 2.2 EMIT法

2.2.1 样本测定:按照美国Dade Behring公司Vival\_E全自动生化分析仪的标准操作规程处理样本并进行检测。样本使用乙二胺四乙酸二钾(EDTA-2K)抗凝,将需要处理的样本或者定标液或者质控液彻底颠倒混匀,依次将样本200  $\mu$ l、甲醇200  $\mu$ l和样本预处理液50  $\mu$ l加入到1.5 ml离心管中,用涡流混匀器充分混匀至少10 s(以没碎块为准),混匀后静置 $\geq$ 2 min,混匀好的样本以离心半径为5.9 cm、14 000 r/min离心5 min,尽量将离心好的上清液全部倒入符合仪器用的试管中测试,应用分光光度法进行测量。每批次测定样本时均对质控品进行平行测定。

2.2.2 精密密度及回收率:各取低、中、高质量浓度的FK506质控品,分别在同日和不同日内测定日内、日间RSD并计算回收率。结果日内、日间RSD均在5%以内,回收率也在90%~110%之间,结果见表1。

2.2.3 标准曲线:由Vival\_E全自动生化分析仪自动生成。采用四点对数曲线法,求得标准曲线公式为 $A=R_0+K*(1/(1+\exp$

$(-(a+b*(\ln C))))$ ),参数 $R_0=2.653\ 61\times 10^2$ , $K=7.179\ 96\times 10^2$ , $a=-4.529\ 89\times 10^2$ , $b=1.720\ 81\times 10^2$ ,标准曲线见图1。

表1 EMIT法测定FK506的精密密度与回收率试验结果( $\bar{x}\pm s$ , $n=5$ )

Tab1 Results of recovery and precision tests of tacrolimus concentration determined by EMIT( $\bar{x}\pm s$ , $n=5$ )

加入量, ng/ml	日内精密密度		日间精密密度		方法回收率,%
	测得量,ng/ml	RSD,%	测得量,ng/ml	RSD,%	
5	4.96 $\pm$ 0.11	2.22	4.94 $\pm$ 0.17	3.44	99.20 $\pm$ 2.28
10	9.94 $\pm$ 0.23	2.31	9.92 $\pm$ 0.29	2.92	99.40 $\pm$ 2.30
20	19.80 $\pm$ 0.35	1.77	19.62 $\pm$ 0.47	2.40	99.00 $\pm$ 1.73

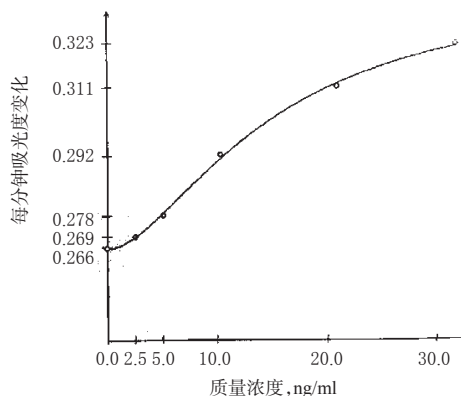


图1 EMIT法标准曲线

Fig 1 Standard curves of EMIT

### 2.3 ELISA法

2.3.1 样本测定:按照美国DiaSorin公司FK506检测试剂盒的标准操作规程处理样本并进行检测。将标准品、质控品和样本经前处理后加入酶标板孔里,再加入FK506单克隆抗体,在室温下孵育30 min后加入FK506辣根过氧化物酶工作液,再孵育60 min,然后洗板,再加入显示剂孵育15 min。最后加入酸终止反应,通过双波长450/630 nm测定每孔吸光度。每批次测定样本时均对质控品进行平行测定。

2.3.2 精密密度与回收率:取保存在全血样本中的质量浓度为1、3、10 ng/ml的FK506标准品,分别于同日和不同日测定日内、日间RSD并计算其方法回收率,结果见表2。

表2 ELISA法测定FK506的精密密度和回收率试验结果( $\bar{x}\pm s$ , $n=5$ )

Tab2 Results of recovery and precision test of tacrolimus concentration determined by ELISA( $\bar{x}\pm s$ , $n=5$ )

加入量,ng/ml	日内精密密度		日间精密密度		方法回收率,%
	测得量,ng/ml	RSD,%	测得量,ng/ml	RSD,%	
1	1.006 $\pm$ 0.03	2.59	0.99 $\pm$ 0.04	3.91	100.20 $\pm$ 3.45
3	2.99 $\pm$ 0.04	1.22	3.03 $\pm$ 0.06	2.10	99.67 $\pm$ 2.10
10	10.05 $\pm$ 0.13	1.34	10.08 $\pm$ 0.20	2.04	100.50 $\pm$ 2.48

2.3.3 标准曲线:采用四参数法计算结果,标准曲线公式 $Y=(a-d)/[1+(x/c)^b]+d$ ,参数 $a=1.491$ , $b=1.489$ , $c=4.535$ , $d=0.212\ 0$ , $r=0.999\ 9$ , $\text{err}=0.004\ 034$ ,标准曲线见图2。

### 2.4 数据分析

分别用EMIT法和ELISA法测定FK506血药浓度。样本的正态性检验用Kolmogorov-Smirnov法。如符合正态分布,则用配对t检验比较两组样本均数有无差异,Deming回归法比较两种测定方法的相关性;反之则用Wilcoxon配对检验和

Passing-Bablok 回归法进行分析<sup>[3-4]</sup>。同时绘制两法测定结果 Bland-Altman 偏差图和散点图。采用 MedCalc 软件 (Version 13.1.0.0) 进行统计学分析。

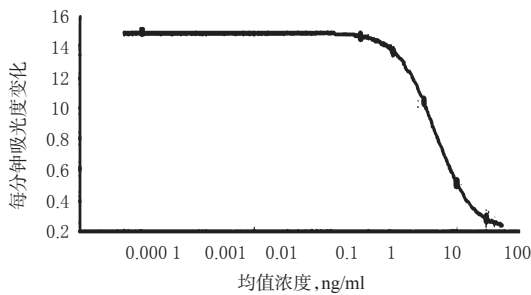


图2 ELISA 法标准曲线  
Fig 2 Standard curves of EMIT

### 3 结果

#### 3.1 EMIT 法和 ELISA 法测定全血中 FK506 质量浓度差异性分析

Kolmogorov-Smirnov 正态分布检验结果表明,两种方法测定全血中 FK506 浓度结果不呈正态分布。Wilcoxon 配对检验显示两种方法测定结果有显著性差异 ( $P < 0.05$ )。以 EMIT 法和 ELISA 法测定同一样本浓度的均值为横坐标 (ng/ml), EMIT 法和 ELISA 法测定同一样本浓度之差 ( $\bar{d}$ ) 为纵坐标,以  $\bar{d} \pm 1.96 SD$  为上下浓度限 [95% 置信区间 (CI)], 绘制 Bland-Altman 偏差图, 见图 3A。结果显示, EMIT 法测定全血中 FK506 浓度较 ELISA 法高 3.7 ng/ml, 95% CI 为 0.7~6.8 ng/ml。

#### 3.2 EMIT 法和 ELISA 法测定全血中 FK506 质量浓度相关性分析

对每一样本, 以 ELISA 法测定值为横坐标 ( $x$ ), EMIT 法测定值为纵坐标 ( $y$ ), 采用 Passing-Bablok 回归法进行线性回归, 以 Spearman 检验比较两种方法测定结果的相关性。结果表明, EMIT 法和 ELISA 法测定结果相关性一般, 回归方程和 Spearman 相关系数分别为  $y = 2.701 0 + 1.305 4x$ ,  $r = 0.635 9$ , 见图 3B。

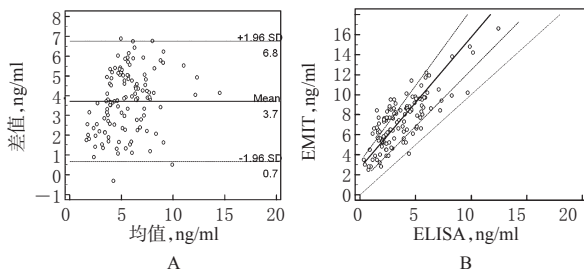


图3 EMIT 法和 ELISA 法测定 FK506 血药浓度的 Bland-Altman 偏差图和散点图

A. Bland-Altman 偏差图; B. 散点图

Fig 3 Bland-Altman deviation map and scatter diagram of tacrolimus concentration determined by EMIT and ELISA

A. Bland-Altman deviation map; B. scatter diagram

### 4 讨论

目前暂时未有关于 EMIT 法和 ELISA 法的对比研究。本文就两法检测结果进行对比分析, 考察在国内实验室环境下, 不同检测系统、检测方法测定 FK506 血药浓度的相关性。在

对两种检测系统精密测定及临床样本比对试验中, EMIT 法和 ELISA 法所用的分别是同一批号的试剂, 且试剂均在有效期内。

FK506 浓度检测方法有多种, 不同的方法对样本提取的过程和对代谢物的识别不同, 因此所得的结果也不相同, 不应直接比较。LC-MS/MS 法精密测定、准确度、灵敏度均优于免疫分析法, 但仪器昂贵, 操作要求高, 一般实验室难以配备; EMIT 法自动化程度高、样本预处理简单快速并且适用急诊, 国内应用较多; ELISA 法测定步骤比较烦琐, 但费用相对较低, 适合临床批量样本的检测<sup>[5]</sup>。

影响 FK506 血药浓度测定的因素很多, 为客观评价两种方法的可靠性以及准确性, 本研究认真按照标准规程操作, 使样本的采集、环境温度的控制、标本存放以及预处理等各个步骤尽可能保持一致, 尽量避免人为原因造成的检测误差。EMIT 法与 ELISA 法的检测结果有差异, 首先是两种仪器的检测原理不同; 其次, 当样本中存在某些物质具备与待测药物相同的抗原表面标志的时候, 可以导致抗体和那些化学结构接近于母体的代谢产物、样本中内源性物质发生交叉反应, 结果也会出现偏差<sup>[6]</sup>; 再次, 两种系统间的偏差不可能排除环境因素对其所造成的影响<sup>[7]</sup>, 尽管本研究严格操作和控制室温, 但仍然不能避免环境温度有轻微的变化。

随着器官移植人群逐年增多, 有些患者缺乏 FK506 测定方法相关知识, 常用在不同医院测得的数据进行比较, 而忽视了检测方法是否一致, 结果是否具有可比性。从本文的检测结果来看, 两组数据比较具有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), EMIT 法检测值普遍比 ELISA 法高但相关性一般 ( $r = 0.635 9$ ), 两种方法的测定结果不可替换, 不应互相比对。因此, 建议同一患者应长期选用同一种方法检测 FK506 的血药浓度, 为临床合理调整器官移植患者的诊疗方案, 特别是免疫抑制剂的用药剂量提供参考依据。

### 参考文献

- [1] Akbas S H, Yavuz A, Tuncer M, et al. Evaluation of the new EMIT tacrolimus assay in kidney and liver transplant recipients[J]. *Transplantation Proceedings*, 2004, 36(1): 86.
- [2] 周永恒, 石磊, 唐镜波. 影响他克莫司血药浓度的因素[J]. *中国药房*, 2005, 16(24): 1 909.
- [3] 焦正, 张明, 仲龙瑾, 等. 两种单克隆抗体荧光免疫偏振法测定人全血中环孢素浓度的比较[J]. *中国医院药学杂志*, 2006, 26(7): 789.
- [4] 宋晓勇, 张永州, 吴先闯, 等. EMIT 法与 HPLC 法测定人血浆中环孢素 A 浓度的比较研究[J]. *中国药房*, 2011, 22(26): 2 443.
- [5] 丁春雷, 刘丽宏, 马萍, 等. 他克莫司治疗药物监测研究进展[J]. *中国药房*, 2008, 19(20): 1 580.
- [6] 黄成琼, 马传学, 朱清华. EMIT 法和 HPLC 法监测环孢菌素 A 血药浓度比较研究[J]. *药学与临床研究*, 2009, 17(2): 104.
- [7] 乔小云, 陈冲, 蒋俊毅. 用酶增强免疫分析法监测他克莫司血药浓度的质控评估[J]. *药学服务与研究*, 2010, 10(1): 40.

(收稿日期: 2014-04-01 修回日期: 2014-05-24)