

酶放大免疫测定技术法检测丙戊酸药物浓度的 动态飘逸校正系数

周清武

(四川省绵阳市中心医院药学部, 四川 绵阳 621000)

摘要:目的 探讨酶放大免疫测定技术法检测丙戊酸药物浓度的动态飘逸校正系数。方法 以 50 $\mu\text{g/mL}$ 丙戊酸标准水溶液为质控样品,采用德国西门子全自动生化仪,分别在 1 个试剂盒的第 48,108 次测试时做质控检测,进行质控检测浓度动态飘逸指数函数的推拟。结果 动态飘逸系数 $k = (1 + 0.00066 \times n^{0.55535})^n$, 动态飘逸校正系数 $k' = 1 / [(1 + 0.00066 \times n^{0.55535})^n]$, 并以第 1,20,31,97,120,135 次质控样品检测浓度验证计算,相对误差在 $\pm 6\%$ 以内。结论 推拟得到的动态飘逸校正系数可用于丙戊酸质控检测浓度的动态校正,有利于丙戊酸血药浓度的准确检测,可减少丙戊酸检测系统不定期定标或质控产生的试剂浪费。

关键词:酶放大免疫测定技术;丙戊酸;动态飘逸;校正系数;试剂瓶底效应

中图分类号:R914.1;R971*.6

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2018)05-0022-04

Dynamic Drift Correction Coefficient for Detection of Valproic Acid Concentration by EMIT

Zhou Qingwu

(Department of Pharmacy, Mianyang Central Hospital, Mianyang, Sichuan, China 621000)

Abstract: Objective To investigate the dynamic drift correction coefficient for detection of valproic acid concentration by enzyme multiplied immunoassay technique(EMIT). **Methods** 50 $\mu\text{g/mL}$ valproic acid standard water solution was taken as the quality control sample. The automatic biochemical analyzer made in Germany Siemens was used to do the quality control test at the 48th,108th tests of a kit, in order to speculate the dynamic drift exponential function of the quality control detection concentration. **Results** The dynamic drift coefficient was obtained: $k = (1 + 0.00066 \times n^{0.55535})^n$, and the dynamic correction coefficient was obtained: $k' = 1 / [(1 + 0.00066 \times n^{0.55535})^n]$. The detection concentration of the 1st, 20th, 31st, 97th 120th and 135th quality control samples were used to verify the calculation, and the relative errors were between -6% and 6% . **Conclusion** The obtained dynamic drift correction coefficient can be used for the dynamic correction of quality control concentration of valproic acid, which is conducive to the accurate detection of blood concentration of valproic acid, and it can reduce the waste of reagents produced by the irregular calibration or quality control of the valproic acid detection system.

Key words: enzyme multiplied immunoassay technique; valproic acid; dynamic drift; correction coefficient; reagents bottle base effect

丙戊酸为临床常用抗癫痫药物,具有阻止异常放电的扩散作用,对所有类型的癫痫都有效,是小发作的首选药,长期毒性低,不良反应少,主要用于单纯或复杂失神发作、肌阵挛发作,大发作的单药或合并用药治疗,对复杂部分性发作也有一定疗效^[1-3],还可治疗情感障碍及躁狂症等精神疾病^[4-6]。由于丙戊酸血药浓度个体差异大,安全范围窄,治疗指数低^[7-8],高浓度所致震颤、共济失调、烦躁和木僵等中毒反应与无效症状相似^[9-11],易导致治疗无效或中毒。通过治疗药物监测(therapeutic drug monitoring, TDM),可以指导临床个体化合理用药。酶放大免疫测定技术(enzyme multiplied immunoassay technique, EMIT)是目前 TDM 监测的主要手段之一,仪器自动化程度高,可多品种多样本连续检测,检测时间短,样品处理简单^[12];试剂盘瓶中的试剂较多时,相邻质控检测重复性很好;缺点是试剂昂贵,试剂盘瓶中的试

剂较少与较多的标准质控检测比较,重复性较差^[13-14];偏差的规律性很强,呈现动态飘逸现象,在批量检测较少的试验中尤为突出,过去常用多次定标或质控来纠正较大偏差,但试剂浪费较大。动态飘逸现象是指 EMIT 法检测丙戊酸血浆样品时,随着试剂盘瓶中试剂检测次数的增加,试剂挥发导致试剂浓缩,标准质控的实测浓度会持续向上飘逸^[15],试剂越少,飘逸值越大。为获取准确的丙戊酸血药浓度检测数据,本研究中推拟了 EMIT 法检测人血浆丙戊酸药物浓度的动态飘逸校正系数,可以动态校正丙戊酸实测浓度的飘逸值,减少试剂浪费。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Viva-E 型全自动生化仪(德国 Siemens 公司);
VORTEX-5 型漩涡混合器(上海精宏实验设备有限公

司);TDL-60B型普通台式离心机(上海安亭科学仪器厂);微量移液器(上海求精生化仪器厂)。

1.2 试药

丙戊酸检测试剂盒(siemens healthcare diagnostics公司,批号为4G019UL-J2),包括丙戊酸抗体试剂A和酶试剂B;丙戊酸定标液(siemens healthcare diagnostics公司,批号为4G109UL-G4);丙戊酸钠标准品(中国食品药品检定研究院,批号为100963-201302)。

2 方法与结果

2.1 标准操作规程

2.1.1 仪器系统

定期比色盘及针清洗,保持较低的盘空白标准偏差(SD),屏蔽空白值偏差较大的比色杯。系统液体管路不漏气,系统用纯化水电导率小于 $10\ \mu\text{S}/\text{cm}$,装满桶后立即加盖密封,静置24 h以上,自然排尽水中空气,且尽可能新鲜,以减少微生物污染和生长机会,保持试剂和样品注射器内无气泡。

2.1.2 丙戊酸标准溶液

丙戊酸的化学结构简单,钠盐水溶性好,化学性质稳定。 $50\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 的丙戊酸标准质控水溶液,可用丙戊酸钠标准品适量,加灭菌注射用水溶解并稀释成 $50\ \mu\text{g}/\text{mL}$,取100 mL置200 mL磨口玻璃试剂瓶,与丙戊酸定标液一样,存于 $2\sim 8\ ^\circ\text{C}$ 冰箱中,能保持较长时期的浓度稳定。试验表明,丙戊酸标准质控水溶液,在 $2\sim 8\ ^\circ\text{C}$ 冰箱中,密封保存3年,质量浓度下降率低于3%。

2.1.3 丙戊酸检测试剂

将在 $2\sim 8\ ^\circ\text{C}$ 冰箱中冷藏的试剂,置 $26\ ^\circ\text{C}$ 水浴中5 min,可平衡至室温,检测结束时,立即封盖并放回 $2\sim 8\ ^\circ\text{C}$ 冰箱中,尽量缩短室温放置时间,以保持试剂稳定。

2.2 动态飘逸现象及原因分析

现象:本研究在大量的EMIT法检测丙戊酸血药浓度过程中发现,随着试剂检测次数的增加,检测试剂逐渐减少,标准质控的实测质量浓度会逐渐升高,且初期升高系数较小,后逐渐变大,呈现动态飘逸现象,具有非常稳定的规律性,即“试剂瓶底效应”^[15-16]。

原因分析:试剂瓶口内径1.4 cm,单个样品检测需时14 min,多个样品批量检测,每增加1个样品,需增加0.5 min,本实验室多为单个样品检测。检测试剂瓶底吹 $16.5\ ^\circ\text{C}$ 冷风,溶剂挥发导致试剂浓缩,应是引起EMIT法检测丙戊酸标准质控药物浓度产生上翘飘逸的根本原因。

2.3 动态飘逸校正系数的方法推拟

2.3.1 相关的假定与公式推导

EMIT法检测丙戊酸的多次试验中发现,标准质控的检测浓度存在动态飘逸现象,假定飘逸系数(k),其

公式为:

$$k \times C_{\text{标准}} = C_{\text{测定}} \quad (1)$$

因试剂挥发与检测时长有关,试验发现,单个样品检测需时14 min,多个样品批量检测,每增加1个样品,需增加0.5 min,认定每14 min的样本检测为1个检测次数(n)值时长单位,每增加到14 min时, n 值就加1,并且 n 值从新试剂盒被定标后或首次质控检测起开始计算。

又假定第 n 次检测前的每次检测浓度增加的平均系数为 a ;那么第1次检测的飘逸系数就为 $(1+a)$,第2次检测的飘逸系数为 $(1+a) \times (1+a)$,第3次检测的飘逸系数为 $(1+a)^3$,以此类推,第 n 次检测的飘逸系数为 $(1+a)^n$,即得公式:

$$(1+a)^n = k \quad (2)$$

将(2)式代入(1)式,可得:

$$C_{\text{测定}} = [(1+a)^n] \times C_{\text{标准}} \quad (3)$$

当 n 值较大时做一个质控检测,在(3)式中,已知 $C_{\text{测定}}$, n , $C_{\text{标准}}$,容易计算出一个 n 值对应的 a 值,标记为 a_1 。

后来发现, a 值也同样存在动态飘逸现象,呈现先小后大的上翘抛物线,试想,抛物线可用指数函数来描述,假定指数函数的系数为 b ,指数为 c ,变量为 n ,那么就存在一个指数函数:

$$a = b \times n^c \quad (4)$$

如果用更大的 n 值再做一个质控检测,按(3)式计算,同样可得一个 a_2 值。在(4)式中容易看出,2个不同的 n 值做了质控检测后, a 值和对应的 n 值已经知道,只有 b , c 为未知数,得二元一次方程组: $a_1 = b \times n_1^c$, $a_2 = b \times n_2^c$,得 b , c 值。

将(4)式代入(3)式得:

$$C_{\text{测定}} = [(1 + b \times n^c)^n] \times C_{\text{标准}} \quad (5)$$

$$\text{显然,动态飘逸系数 } k = (1 + b \times n^c)^n \quad (6)$$

由(1)式知, $C_{\text{标准}} = (1/k) \times C_{\text{测定}}$,令 $1/k = k'$, k' 即为将实测浓度换算为真实浓度的动态飘逸校正系数,即:

$$k' = 1 / [(1 + b \times n^c)^n] \quad (7)$$

2.3.2 a , b , c 值的计算

本研究中用自配的 $50\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 丙戊酸标准水溶液做质控检测。因 n 值较小时,实测浓度的飘逸值也较小,故考虑在第50,100次检测前后各取1个点做标准质控检测,计算出来的 a , b , c 值会更准确一些。第48次检测浓度为 $C_{48} = 65.5\ \mu\text{g}/\text{mL}$, $C_{108} = 129.5\ \mu\text{g}/\text{mL}$,由(3)式可解: $a_{48} = e^{[\ln(65.5/50)/48]} - 1 = 0.00564$; $a_{108} = e^{[\ln(129.5/50)/108]} - 1 = 0.00885$ 。再由(4)式得二元一次方程组: $0.00564 = b \times 48^c$, $0.00885 = b \times 108^c$,得 $b = 0.00066$, $c = 0.55535$ 。

2.4 推拟结果

2.4.1 推拟得到的动态飘逸系数

将 b, c 值代入(6)式,即得丙戊酸标准质控检测的动态飘逸系数: $k = (1 + 0.00066 \times n^{0.55535})^n$,用飘逸系数对检测次数可作图1推拟图。

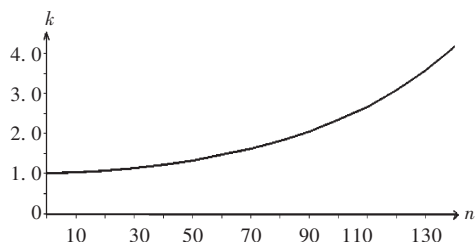


图1 丙戊酸质控检测动态飘逸系数与检测次数的曲线图

2.4.2 推拟得到的动态飘逸校正系数

由(7)式可知,丙戊酸标准质控检测的动态飘逸校正系数为: $k' = 1 / [(1 + 0.00066 \times n^{0.55535})^n]$,即为本研究的核心成果。

2.5 动态飘逸校正系数的试验验证与应用

以 $50 \mu\text{g/mL}$ 丙戊酸标准水溶液为质控样品,分别在试剂盒的第1,20,31,97,120,135次测试时做质控试验,检测浓度用动态飘逸校正系数校正,相对误差在 $\pm 6\%$ 以内,符合《中国药典》对生物样品检测的准确度在 $\pm 15\%$ 以内的规定^[17]。结果见表1。

表1 动态飘逸校正系数的试验验证

n	测定质量浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	校正质量浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	相对误差 (%)
1	50.6	50.6	1.1
20	55.1	51.4	2.8
31	60.3	52.6	5.1
97	109.4	48.7	-2.6
120	160.3	52.0	4.0
135	184.2	47.7	-4.6

2.6 不同批次丙戊酸检测试剂盒之间的 k 值比较

在近期使用的2个不同批次丙戊酸检测试剂盒之间,相同方法得到2个不同的动态飘逸系数,当 $n = 140$ 时, $k_1 = 4.178$, $k_2 = 4.485$,测定浓度与飘逸系数的高低值比较,偏差同为 7.35% ,符合《中国药典》规定。

2.7 室温变化对丙戊酸检测浓度的影响

EMIT法检测药物浓度的室温要求在 $18 \sim 25^\circ\text{C}$,室温变化对质控检测结果会有较大影响,尽量保持室温与定标或质控室温一致,如果温差低于 2°C ,可以减少温度对检测结果的不良影响^[13-14]。试验显示,室温每升高(或降低) 1°C ,丙戊酸检测浓度平均增加(或减少) 2.5% 。室温 $25, 24, 23, 22, 21^\circ\text{C}$ 时测定质量浓度分别为 $104, 102, 100, 97, 94 \mu\text{g/mL}$ 。

3 讨论

3.1 试剂浓缩与检测时长

批量检测越多,检测时长越短,试剂浓缩越少,飘逸系数越小。样品盘有51个样本位,如果丙戊酸的1个试剂盒检测140个样本,单个样品检测需要的最大时长为 $14 \times 140 = 1960 \text{ min}$,批量样品检测需要的最小时长为 $(14 + 0.5 \times 50) \times 2 + (14 + 0.5 \times 37) = 111 \text{ min}$,约合8个单位的检测时长,即如果1个试剂盒全部满盘进行丙戊酸批量检测, n 为8, k 为1.017,检测偏差会小于 2% 。故尽可能批量检测,可以有效减小检测浓度的动态飘逸系数。同时,为减少试剂挥发,检测结果出来后应尽快密封试剂瓶。

由 $a = 0.00066 \times n^{0.55535}$ 可知,当 $n = 1$ 时, $a = 0.066\%$;当 $n = 140$ 时, $a = 1.027\%$,即 a 值的渐增区间为 $0.066\% \sim 1.027\%$ 。

3.2 k 与 k' 值的实际应用

使用 k 值,可预知丙戊酸实测浓度的飘逸倍数,由 $k = (1 + 0.00066 \times n^{0.55535})^n$ 可知,当检测次数 $n > 32$ 时,飘逸系数 $k > 1.15$,检测偏差会超过《中国药典》对生物样品的最大偏差限制($< 15\%$),应引起血药浓度监测工作者的注意。当 $n = 140$ 时, k 为4.178,标准质控的检测浓度会增加3.178倍。因丙戊酸检测的最大浓度限为 $150 \mu\text{g/mL}$, k 在 $2 \sim 4$ 范围时,检测前先将全血样品用注射用水稀释 $2 \sim 4$ 倍,检测结果再放大 $2 \sim 4$ 倍计算,可以有效减少中高浓度全血样品引起的超限检测。使用 k' 值,可将丙戊酸实测浓度换算为真实浓度。

3.3 出现较大偏差的纠正方法

过去,本实验室首先考虑的是重新定标,那是当时掌握的唯一方法,优点是重新获得定标曲线,短期内准确度较高,缺点是浪费大量的昂贵试剂,但不久后又再次出现较大偏差,不得不再次定标,在批量检测较少的实验室必然会出现较大亏损。后来,以质控校正方法为主,优点是短期准确度较好,有人主张尽量批量检测,在1个样品盘的中间位置,放置1个标准质控样品,可以解决1个批次的检测准确性问题^[18-19]。缺点是不适合以单个样品检测为主的实验室,否则会因经常质控而对而浪费较多试剂。目前,使用动态飘逸校正系数方法的优点是校正后得到的丙戊酸血药浓度数据准确度高,可以用到最后一滴可测试剂,试剂浪费少。EMIT法检测丙戊酸药物浓度的动态飘逸系数在单个样品检测过程中的变化较大,掌握这种变化现象的产生原因、规律及解决办法,对丙戊酸药物浓度监测工作有非常大的益处。

3.4 室温变化对检测结果的影响

如果温差较小,可用温度系数予以校正,即与定标

或质控室温比较,每升高 1℃,计算浓度就减少 2.5%;反之,每降低 1℃,计算浓度就增加 2.5%。

3.5 其他

在有限试剂盒得出的研究结果中发现,EMIT 法检测丙戊酸药物浓度的动态飘逸校正系数,在不同批次试剂盒之间的波动较小,即可在不同试剂盒之间使用。另外,不同试剂盒之间的质量浓度,有可能不完全一致,为确保本研究成果的准确应用,在使用新的丙戊酸检测试剂盒时,首次做标准质控检测是必要的,如果有偏差,可计算一个试剂校正系数,将新旧试剂盒校正一致,这样就可以代替新购丙戊酸试剂盒的常规定标,平时只需偶尔抽验质控,就能防止意外情况的发生。

参考文献:

- [1] 刘俊,江佳. 268 例丙戊酸血药浓度监测结果分析[J]. 安徽医药,2012,16(8):1182-1183.
- [2] 尹玉琴,荆海霞,赵益斌. 546 例丙戊酸钠血药浓度监测结果分析[J]. 中国药业,2010,19(5):9-11.
- [3] 赵文萃,张琦. 丙戊酸钠治疗小儿癫痫的中毒反应及其血药浓度的关系[J]. 空军医学杂志,2015,31(4):233-239.
- [4] 李宏斌. 不同血药浓度丙戊酸治疗躁狂症临床研究[J]. 今日健康,2016,15(3):40.
- [5] 文春光,郑小泳,黄金焕,等. 丙戊酸镁缓释片与丙戊酸钠缓释片治疗精神病躁狂发作的疗效比较[J]. 中国基层医药,2013,20(6):908-909.
- [6] 王云兵. 丙戊酸钠联合奥氮平治疗老年痴呆患者精神障碍的临床疗效[J]. 现代医药卫生,2016,32(16):2570-2571.
- [7] 姜庆城. 癫痫患者体内不同丙戊酸钠血药浓度与疗效的关系[J]. 中国实用神经疾病杂志,2015,18(24):79-80.
- [8] 凌小林,廖家斌,谭翱,等. 癫痫患者丙戊酸钠血药浓度的影响因素及与疗效的关系[J]. 中国现代医生,2016,54(27):105-111.
- [9] 吴先闯,张永州,宋晓勇,等. 酶放大免疫测定法监测丙戊酸血药浓度的结果分析[J]. 中国医院用药评价与分析,2014,14(1):49-51.
- [10] 乔小云,钱巧,王晶. 丙戊酸钠血药浓度监测结果的相关因素分析[J]. 药学服务与研究,2011,11(6):447-449.
- [11] 陈英才,文程,王薇. 丙戊酸钠血药浓度监测及其治疗儿童癫痫 224 例疗效分析[J]. 儿科药学杂志,2012,18(10):28-30.
- [12] 杨艳,张婉婷,姚晓东,等. 均相酶扩大免疫分析法与高效液相色谱法测定癫痫患儿丙戊酸钠血药浓度比较研究[J]. 中国生化药物杂志,2015,35(4):169-172.
- [13] 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):40-43.
- [14] 乔小云,朱怀军,王羽. 酶放大免疫分析法监测万古霉素血药浓度的质控评估[J]. 药学与临床研究,2013,21(5):516-519.
- [15] 张丽娟,陈璐. 酶增强免疫分析法测定环孢素 A 和他克莫司血药浓度的质量控制[J]. 中国医药导报,2014,1(36):79-107.
- [16] 张君仁. 体内药物分析[M]. 北京:化学工业出版社,2002:92.
- [17] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2010:附录 196.
- [18] 王欣,张晋萍,黄莉莉. 他克莫司血药浓度监测中质控图的应用[J]. 中国药房,2006,17(8):600-601.
- [19] 蔡和平,王卓,徐慧欣,等. 质控图分析及其在环孢素治疗药物监测中的应用[J]. 世界临床药物,2009,30(10):612-614.

(收稿日期:2017-11-28)

更正

因编校疏漏,《中国药业》杂志 2018 年第 27 卷第 3 期第 27~29 页《反相高效液相色谱法测定复方壮药艾条中桂皮醛含量》一文中,通信作者许建文的单位信息有误,补充更正如下:

反相高效液相色谱法测定复方壮药艾条中桂皮醛含量*

桂裕昌¹,杜沛霖²,许建文^{3Δ},周雨晴¹,梁迪⁴,饶远森¹

(1. 广西中医药大学第一附属医院,广西南宁 530023; 2. 广西中医药大学,广西南宁 530200; 3. 广西医科大学第一附属医院,广西南宁 530021; 4. 广西中医药大学附属国际壮医医院,广西南宁 530001)

Content Determination of Cinnamaldehyde in Moxa Sticks with Compound Zhuang Medicine by RP-HPLC

Gui Yuchang¹, Du Peilin², Xu Jianwen³, Zhou Yuqing¹, Liang Di⁴, Rao Yuansen¹

(1. The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi, China 530023; 2. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi, China 530200; 3. The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi, China 530021; 4. International Zhuang Medical Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi, China 530001)

特此更正,并向作者及读者致歉!

中国药业杂志社编辑部

2018 年 3 月 5 日