

免疫分析在体内药物分析中的应用及其发展

贺慧洁, 王祝彬(广州军区第一五七医院药剂科, 广东 广州 510510)

中图分类号: R917.799.4

文献标识码: A

文章编号: 1007-7693(2005)07-0602-03

美国免疫学家 Pressmen 和 Eisen 于 1950 年成功地应用碘的放射性同位素标记抗原, 开创了放射免疫的先河。随后, 放射免疫分析的主要原理被广泛采用并发展成为使用各种结合剂和各种标记物的先进分析技术, 衍生出了多种标记免疫分析技术, 如酶免疫分析, 荧光分析等。

在药物学中, 紫外光谱分析和气相、液相色谱已成为药物分析的基本技术, 但近年来免疫分析方法的发展, 使药物测定更快速、灵敏、简便。免疫分析方法在药物学中的应用^[1]主要在: (1) 在实验药物动力学和临床药物学中, 免疫分析方法能提供生物利用度和药物代谢动力学参数等生物药剂学中的重要数据的快速、灵敏、准确的检测方法, 便于了解服药后药物在体内的吸收、分布、代谢以及排泄情况, 为药物的药效和体内的作用方式提供机理; (2) 在治疗药物的检测中, 免疫分析方法常用于那些治疗指数小、超过最大安全浓度时易发生严重中毒的以至于危险的或最佳治疗浓度和中毒浓度有交叉的药物, 以及那些药理效果不宜断定的药物, 如抗癌药物等的高灵敏度和快速测定, 使快速准确的化学诊

断成为可能。其近二十年的发展, 药物免疫学从理论、方法到实验仪器都展现了日新月异的进步, 综观其发展趋势^[2], 主要在于以下四个方面: ①药物免疫分析方法的灵敏度的不断提高②测定体液中各种药物的免疫试剂盒相继建立; ③各种高灵敏度的药物免疫传感器相继出现, 使测定更为快速方便, 且使连续检测成为可能; ④在体液中进行药物的同时免疫分析测定。由于药物免疫学方法的不断改进和发展, 从而促进了药物学, 尤其是药物代谢动力学的发展。

1 药物免疫分析方法

1.1 放射免疫分析法

放射免疫分析 (radioimmunoassay, RIA), 这种方法通过比活度 (specific activity) 高的示踪物, 观察抗原与抗体结合反应产物来定量微量物质的一种分析方法。目前^[3], 几乎对各类药物都有成功的放射免疫分析方法, 它的特点是特异性强、灵敏度高、能达至皮克 (Pg, 10^{-12} g) 水平, 且对成分复杂的生物样品无需预处理, 因而在体内药物分析中能达至方便、快速、准确。同时由于商品化的试剂盒及全自动 RIA 分

析仪的出现使得这项工作得到较快的普及。宋振玉在青蒿素的代谢和药理研究中^[4],建立了放射免疫测定法,并用此法研究了青蒿素在狗体内的血药过程。结果表明:该法对青蒿素及活性衍生物的抗疟官能团-双氧桥结构有特异性,对此官能团的脱氧青蒿素交叉反应很小。该法测得的血药浓度为全部有效药物的总浓度,与药效平衡,可将此总浓度看作一个整体,计算综合药物动力学参数,作者认为这对于血药浓度的测定仍有意义。

开始于1986年^[5],由Ekins等发展微小型、多分析物的微斑点(microspot)分析,并从1991-1992年与Boehringer Mannheim合作发展第三代超灵敏,或寡核苷酸微点阵(microarray)技术,另外,于1992年在美国开始了另一个长期发展计划,称为Genosensor Project,该项研究专门用于DNA/RNA的分析。小型微点阵技术首先对DNA检测和筛选最具有应用价值,分析范围涉及到内分泌,变态反应,传染病以及治疗药物的筛选。但在以后发展中由于其放射性污染,应用受到诸多限制。

1.2 酶免疫分析法

20世纪70年代在RIA基础上发展起来的酶免疫分析(enzyme immuno-assay简称EIA),是一种非放射性标记免疫分析技术。EIA的基本原理同RLA相似,但标记物是一种对人无害的酶。它用酶标记抗原或抗体,用高活性的酶催化底物显色或发光,具有特异性强,操作简便,快速,灵敏度可以和RIA媲美,并且避免了应用过程中的同位素污染且标记物稳定,有效期长,所以EIA法问世后在生物医学检验领域发展很快,现以达到自动化,商品化的程度。郭大智采用双抗体酶免疫分析法^[6],检测睾酮,孕酮,雌酮和雌三醇,实验表明,这些测定具有很高的灵敏度,并且此测定方法可节约激素特异抗体4~10倍。初测人和动物的血,奶,尿样品表明所建立的测定方法可分别用于人和动物体液中睾酮,孕酮,雌酮和雌三醇的定量检测。

1.3 荧光免疫分析

荧光免疫分析(Fluorescence Immunoassay, FIA)的特点是用小分子的荧光物质标记抗原或抗体,标记物稳定,其灵敏度范围可与RIA, EIA相比,根据是否需要将结合与游离的标记物分离,可以将荧光免疫法分为均相和非均相两大类,在体内药物分析中主要用均相FIA法。根据测定方法或标记物的不同,可将FIA分为荧光偏振免疫分析,荧光淬灭免疫分析,荧光免疫分析等。杨凌等^[7]采用荧光偏振免疫法测定健康人血浆同型半胱氨酸水平。结果表明:男、女性HCY水平存在显著差异,男性一般高于女性,40岁以上年龄组的HCY浓度存在显著差异,随着年龄增高HCY水平升高。

1.4 发光免疫分析法

发光免疫分析法^[8]在药物测定中尚未得到广泛应用,现在只被用来测定一些激素和甾体化合物,但由于其高灵敏度、低成本,在以后药物测定中应用潜力很大,现在发光免疫分析方法的趋势是以过氧化草酸来替代鲁米诺,用葡萄糖氧化酶催化发光,其中也出现了一些新的发光体系,如用1,2-

二氧杂环丁烷 AMPPD 标记,碱性磷酸酯酶催化花氧化,在BSA等存在下,发光强度和灵敏度极高。还有时间分辨电发光体系,在脉冲电激发后滞后一段时间,用光电管检测其体系发光,此法已用于测定雌二醇等物质。

2 药物免疫分析方法的新发展

2.1 多组分免疫分析技术(Multianalyte Immunoassay)

多组分免疫分析技术(MIA)^[9]即在同一份样品中同时测定两种或两种以上的相关分析物的免疫分析技术。这种技术的应用对需要测定多种物质的综合检查能够提供有意义的临床信息,并有利于诊断和治疗检测,特别是对垂体、性腺、肾上腺或甲状腺等功能的分析以及对药物联合使用的探讨和研究有重要的意义。

MIA技术常基于用不同标记物对多种抗原或半抗原标记,竞争法测定各物质的量。现在常用的标记物有放射性核素、酶和荧光物质等。例如用两种放射性核素¹²⁵I和¹³¹I标记,多道闪烁技术仪检测,同时对人胰岛素和促生长素进行免疫测定,用 β -半乳糖苷酶和磷酸二酯酶两种酶标记混合,同时测定药物苯巴比妥和苯妥因。但一般如用不同类的标记物进行标记时,测定效应很低由于进行同时检测时,几种标记物的测定条件需相互妥协,适合于能同时检测的标记物体系很少,因此很少有多于两种标记物体系同时检测的报道。但近来金属羰基化合物和稀土离子络合物的利用可能会有所突破。

2.2 新型均相免疫分析方法的发展

均相免疫分析方法是用来测定临床药物和非蛋白性基团的最为有效的方法,不需分离,易自动化,但灵敏度较低使其受到一定的限制,而新型均相免疫分析法——克隆酶给予体免疫分析的发展使其有所改进。

克隆酶给予体免疫分析(CEDIA, cloned enzyme donor immunoassay)^[10]利用重组DNA技术,合成 β -galactosidase的两个独立存在时无酶活性的蛋白质片段,但两者结合时则显示酶活性的原理,作为分析方法的基础,较小的片段(70-90氨基酸)被称为酶给予体片段(Enzyme Acceptor, EA)。由于药物的ED标记物与抗体结合后不在与EA形成酶,所以当样品中游离药物量增加时,使游离ED药物增多,从而使组成的活性酶量增多,加入底物显色测定。CEDIA是现在最为灵敏的均相免疫分析法之一,灵敏度可达 10^{-11} mol/L,而且有很高的精确度。CEDIA已被用于药物的测定,大量此类方法的药盒也在开发之中。

2.3 免疫分析法和其它技术的联用

随着各学科和技术之间的相互渗透,色谱和流动注射法等技术与IA相结合可以弥补免疫分析技术上的一些局限,从而使之有了更好的选择性、灵敏度和快速测定等特点。

由于药物和代谢物之间的结构存在着一定的相似性,使药物在免疫分析测试中可能发生部分交叉反应,从而出现假阳性,而利用色谱技术对药物、激素等分子间微小差别的高识别性,和免疫分析法连用有两种方式,①免疫识别在色谱分离前;②色谱分离后用IA检测。前者利用免疫分析的高

特异性捕捉、富集、纯化生物样品。然后用高效液相色谱检测。首先用于药物分析中的体系是免疫柱与反相色谱的联用。当体液通过免疫柱后,用甲醇/水流动相洗脱,然后转移到反相柱中分离检测。此法已相继应用于苯妥因、孕酮、地高辛、雌激素、黄曲霉素、细胞抑制素等的测定。此法不但可以提高灵敏度,而且增加方法的选择性。后者色谱分离后用免疫分析法检测,一般使用分步检测,此法灵敏度可与HPLC/MS相媲美,用于测定孕酮灵敏度可达(10pg/mL, HPLC/RIA联用测定黄体生成激素释放因子的类似物极其代谢物灵敏度可达50pg/mL^[11])。还有,可利用免疫分析测试中存在的交叉反应,来测定药物和其代谢物的量,这对代谢的研究很有意义。

综上所述,免疫分析方法由于具有高选择性、低检出限,再生物体液药物检测中渐渐占据主导地位。但由于用免疫分析时,产生的抗体易变性,成本比较贵,而且当样品中存在大量的药物代谢物时可能会产生部分交叉反应,这就要求开发更高特异性、高亲和性的抗体。现在分子生物学和计算机分子图象学的发展,使根据药物结构预测抗体的结合位点结构成为可能。可能在以后发展中药物结构、抗体结合位点进行分析,用基因工程的方法合成针对各种药物的高特异性、高亲和性抗体^[12],从而使免疫分析技术有很大改进,达到测定极微量的药物。

参考文献

- [1] Collins WP. Alternative Immunoassay. 1st ed, New York: John Wiley & Sons Ltd, 1985:1.
- [2] Goadin JP. Clin Chem, 1990, 36(8):1408.
- [3] 范振符. 放射免疫分析的最新发展. 免疫分析与临床, 2000年03期.
- [4] 赵凯存, 陈其明, 宋振玉, 等. 青蒿酯和青蒿素的放射免疫测定法. 药学报, 1985, 20(8):610.
- [5] Ekms RP. Development of microspot multi-analyte radiometric immunoassay using dual fluorescent labelled antibodies [J]. And China Acta, 1989, (227):73.
- [6] 郭大智. 检测睾酮、孕酮、雌酮与雌三醇的双抗体酶免疫分析法. 核学报, 2002, 16(1):45.
- [7] 杨凌, 胡敏燕, 侯凡凡, 等. 荧光偏振免疫法测定健康人血浆同型半胱氨酸水平. 中国药学杂志, 2001, 36(11):751.
- [8] Krica LJ. Clin Chem, 1991, 37(9):1472.
- [9] Krica LJ. Clin Chem, 1992, 38(3):327.
- [10] Jenkins SH. J Immunol Methods, 1992, 150:91.
- [11] Umo H, Matsuo S. J Chromatogr, 1991, 566:57.
- [12] Butt WR. Practical Immunoassay: The state of Art. Marcel Dekker Inc, 1984:1.

收稿日期:2005-03-14