

例：血浆中庆大霉素测定⁽¹³⁾：

仪器：TDX (Abbott) 测定仪。

方法：测定血中加20 μ l血浆，400 μ l缓冲液 (pH7.5)，40 μ l荧光抗原，40 μ l抗体，35 \pm 0.5 $^{\circ}$ C 15分钟，标准品、样品、空白同时进行。以荧光偏振度为纵坐标，标准品浓度为横坐标作图得标准曲线 (图3)。

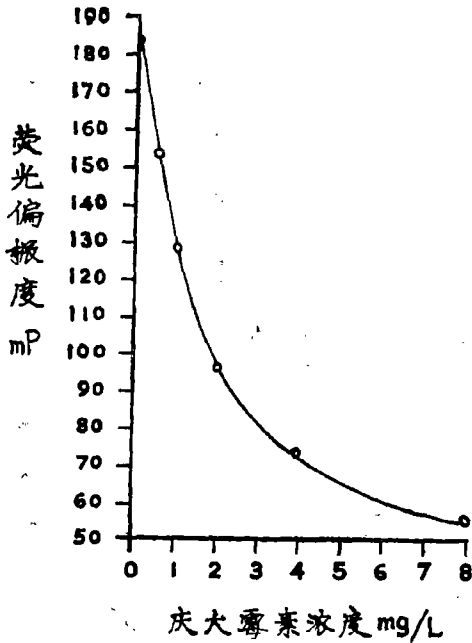


图3 庆大霉素标准曲线

表6 庆大霉素测定数值

标准值 (μ g/ml)	1.0	4.0	8.0
检测值 (μ g/ml)	1.03	4.09	7.90
批内CV (%)	2.63	1.67	2.55
批间CV (%)	3.44	2.22	2.72

灵敏度0.16 μ g/ml

FPIA法可直接测定抗原、抗体的结合反应，使分析准确度高，重复性好。药物浓度与荧光偏振程度呈反比的特征曲线为药物低浓度分析提供了十分可靠的灵敏度。

参考文献

1. Blanchard, J. : J. Chromatography 226 : 455, 1981
2. Weterlund, D. : Anal Chem Acta 63 : 99, 1973
3. Mule, S. J. : J Chromatography 63 : 289, 1971
4. Werner, M. : Clin Chem 25 : 2020, 1979
5. Hyde, P. M. : J Anal Toxicol 9 : 269, 1985
6. Dewalff, F. A. et al. : Therapeutic Relevance of Drug Assay 1979, P. 9
7. Shuger, D. : Biochem Biophys Acta 8 : 302, 1952
8. Rosen Thasil, A. F. : Clin Chem 21 : 1766, 1975
9. Klein Hammer, G. : "Enzymimmunnassay" 542, 1978
10. 过章夫：分析(日文)67 : 495, 1980
11. Finley, P. R. : Clin Chem 22 : 911, 1976
12. Michael, E. et al. : Clin Chem 27 : 1190, 1981
13. 雅培：TDX荧光偏振免疫分析仪说明书

体液中药物色谱分析方法评价

D. Dadgar等 (爱尔兰, 国立高等教育学院化学系)

色谱分析法如高效液相色谱法、气相色谱法等已被广泛地应用，并成为测量体液中

药物及代谢物浓度的有力的工具，然而一个好的实验室方法必须从统计学方面加以验

证,要考虑这种方法的专一性、检测限度、准确度、精密度、线性关系和回收率。

在药物分析方面,有关色谱法的应用有大量的报道,与改进的方法一样,新的方法在分析和制剂学杂志上的报道越来越多,但往往不易重演,有时常需对这些方法加以改进,一旦某种方法得到改进,就要重新对其进行统计学上的验证。从理论上讲,一种色谱法一产生就应该能使别人能重演或基本重演,可实际上却常因许多原因而做不到这一点:

1. 原法指定的柱,与“新”柱或其它柱相比,可能已部分地失去了它原有的如柱效,涂布的均匀性等性质,并在色谱行为上表现一定的差异。

2. 由于缺少文章中指定的柱和高纯度的试剂,使人们难以寻找与报道近似的条件,如一个 C_{18} 反相柱,报道在日本能用,但在欧洲或美国就不一定适用,反相亦然。况且即便同是 C_{18} 柱,也不能保证完全相同。

3. 因此倘若决定用某种代用柱,就必须改变其它色谱条件,如HPLC中流动相组成、GLC中的柱温等,以得到最佳的结果。

4. 有时因应用及对灵敏度的要求不同,对方法也有不同的要求,比如改善特殊分析的灵敏度,必须改变提取方法使回收率增加,或制备衍生物,或用更灵敏的检测器。再如,有时要求测原药物时还测定药物的代谢物,而原方法仅仅是测定药物。

以上几点说明有必要对原方法重新评价。在目前发表的应用性文章中绝大部分还缺少这方面的系统而有价值的评论。

评 价

医药管理部门FDA要求对临床和非临床实验研究实行“优良实验操作规程”,根据这些规定,对色谱法评价的基本标准就是检查它的可靠性,包括药物稳定性、专一性、

检测限度、准确度、精密度、线性关系和回收率。在药物分析领域有关的报道很多,其中有许多优秀的文章,其中 De Leenheer 和 Nelis 对体液中药物选择分析的评价和进展进行了讨论,但仅简单提到评价方法,本文详细讨论了色谱法评价的各个标准。

最重要的是制备标准贮备液和工作液,应保留称重记录并由另一人检查,记录制备过程,贴上标签,写上化学名、制备日期及使用期限、浓度、溶剂组成和贮存条件。生物标准液是用相同体积不同浓度的标准品溶液加到空白体液中所制得。

全部分析仪器如自动移液管、分离器、滴定管等必须定时检查,仪器最好每日用线性、标准物的检测限度或其它指标校准。每台仪器必须备有“维护手册”,记录有可能出现的故障和维护方法。

为减少在提取、衍生化或蒸发有机溶剂过程中的误差,常需要选择一个合适的内标,要求它不仅与被测物有相似的分子结构和物理性质,其色谱带与被测物要比较接近,即 K' 值为被测物的 $\pm 30\%$ 以内。

测定生物样品时,应同时制备一条标准曲线。标准曲线由药物与内标的峰高比或面积比对药物浓度进行线性回归而得,因此,从测得的峰高比或峰面积比即可求出生物样品中的药物浓度。

药物的贮备液或待测样液等在不同的温度、光照、湿度和pH条件下贮存,可能产生分解,应经常加以检查,尤其是那些因长期保存可能吸附于玻璃或其它如塑料等材料上的药物的稳定性。使用的塑料注射器或容器可能产生塑料屑,真空容器的塞子可能产生高聚物污染,这些都已证明会干扰药物测量。测定药物稳定性的条件应与样品分析的条件相同,因为实验操作中也会有药物的分解或损失,这反映出了分析方法的回收率、

重现性和精密度。另外,选用的方法应有足够的灵敏度以测定低浓度的分解物或反映分析时的微小变化。

专一性

在生物样品测定中,可能因其它化合物或药物的存在而干扰被测药物或其代谢物的分析,如有干扰峰存在,可以通过综合分析找出干扰源。例如在用GLC法测定血中苯丁胺时,有一个保留时间与其相同的干扰峰,后来发现干扰是来源于使用的塑料移液管的尖部。消除这种干扰的方法很多,比如采用选择性好的提取方法,使用专一的检测器或变换色谱参数等。

检测器的限度

检测器的限度(LOD)是指能在分析中正确检测的被测定物的最低浓度。数学上定义最大空白信号以上30为LOD($O = \text{检测峰对峰噪声的标准差}$)。若以 S_x 表示浓度 C_x 的信号值, δ_{S_x} 为对应浓度变量 δ_{C_x} 的信号变量值,那么显然 S_x 与 C_x 有如下线性关系:

$$\frac{\delta_{C_x}}{C_x} = \frac{\delta_{S_x}}{S_x}$$

由于各种因素如日间检测器响应值的变化,使得检测限量不是一个常数,它必须经统计后确定,在此以下的值应不作报道。

准确度和精密度

准确度为测定值与标准值的接近程度,常以误差表示。绝对误差即观测值与标准值的差值。相对误差为该差值对标准值的百分比,在色谱分析中常用以表示准确度。准确度应在与其它可靠方法比较后确定,比如与放射性同位素标记药物法比较,经线性回归分析($r \geq 0.98$)后判断这两种方法的相关性是为最可靠的评价标准。

精密度表示结果的重现性,表示为在测

定条件下反复实验结果的百分相关系数。

在药物的色谱分析中,方法的准确度和重现性是以日内和日间测定结果来表示的,测定至少在标准曲线整个浓度范围内重复四次。进行日内分析时,可由不同量的标准品加入空白体液中测定后得到峰高或峰面积比的平均值,对标准值的平均值作图进行回归分析,此时浓度值与峰高或峰面积比值相对应,依标准回归曲线可进行计算,由这些结果产生精密度。对日间分析,每日均要作标准线,因此可有四条或更多的标准曲线用于表现重现性的统计计算。

线性关系

线性关系是由在设定的浓度范围内重复测定不同浓度的生物标准品,并对结果进行线性回归分析而确定的。实际上,在日内分析中得到的线性回归曲线即可证实分析的线性关系。

回收率

制备的生物标准品的回收率是用两种方法计算的。其一,比较一系列加入的标准品(经提取分离)与参比标准品的峰高;其二,比较二者线性回归曲线的斜率。

质量控制

分析过程及样品中药物分析的可靠性应该依据内部或外部的质量控制方案用每批样品加以检查。质量控制中的样品可由非分析工作者准确地将已知量的被测药物加入空白体液。至少应有全部样品的10%成为质量保证(QA)的样品,如果QA样品不在 $\pm 10\%$ 以内,一般来讲这批样品需重新测定。

[Trends in analytical chemistry《分析化学进展》,5(5):115~117,1986(英文)]

贺卫东译 孔庆洪校