



—— 中华人民共和国 ——

**反兴奋剂条例实施细则
与兴奋剂检测技术手册**

主编：丁磊

安徽文化音像出版社

中华人民共和国反兴奋剂条例 实施细则与兴奋剂检测技术手册

主编：丁 磊

(第二卷)

安徽文化音像出版社

(一)分析方法的设定依据

1. 做好文献总结、整理工作

对已有报道的药物进行测定,应系统总结前人的文献,从中找出哪些问题已解决,还存在哪些问题等。对尚无文献报道的,也可根据药物的性质情况,参考相似类型药物的文献资料。

2. 充分了解待测药物的特性与体内状况

药物的理化性质和体内过程是建立方法的主要依据。药物的理化性质包括酸碱性(PKa)、亲脂性、溶解度、极性、光谱特征、稳定性等,这些性质与分析方法的选择、实验条件的改善密切相关。与常规分析方法不同,体内药物分析的对象是来自生物体内的样品,因此对药物在体内的状况必须了解,如药动学参数、体内代谢情况等。这涉及样品取样频率与间隔,分析方法的选择等。

3. 明确测定的目的,要求

应了解拟建立的方法是用于测定药代动力学参数,还是用于临床药浓监测。前者要求具有一定的灵敏度和准确度,不强调简便、快速,设计方法时应考虑到不同时间获得的样品中药物浓度变化较大这一因素。而用于临床药浓监测,则要求方法简便、快速。另外,是否要求同时测定母体药物和代谢物,若需同时测定两者,则应选择具有分离能力或专属的测定方法。

4. 结合实验室条件

根据实验室现有的和可能获得的设备条件加以考虑,选择可行的方法。

(二)方法建立的一般实验步骤

方法初步拟定后,还需进行一系列实验工作,以选择最佳实验条件及验证所拟定的方法是否适合实样检测。通常包括下列步骤:

1. 以纯品进行测定

取药物或其代谢物纯品适量,按拟定方法测定,求得浓度与测定响应值之间的关系,进行线性范围、最适测定浓度、检测灵敏度、测定最适条件(如 PH 值、温度、反应时间等)等的选择。

2. 空白样品测定

取空白生物样品,按拟定的方法进行处理,测定空白值(或色谱图)。空白值高低或色谱图状况将影响到方法的灵敏度和专属性,应力求将空白值降低。在色谱分析中应力求减少体内样品中内源性杂质峰,对无法消除的内源性杂质峰应设法使其从待测物的色谱区域内移开。能否取得良好的样品空白实验结果,是决定测定方法实际可行性的关键环节,必须设法解决。

3. 以水代替空白样品,添加标准后测定

以水代替空白生物样品,添加标准后按拟定的方法进行测定,以了解提取回收率及最低检测浓度的大致情况,从而对萃取溶剂、 pH 值、挥发浓缩等条件进行选择。

4. 空白样品中添加标准后测定

于空白生物样品中添加一定量标准品后按拟定方法进行测定,求得样品回收率数据,建

立标准曲线。若采用色谱法测定,多数情况下需要用内标法定量,则应首先选择合适的内标,然后进行回收率的测定。

5. 体内实际样品测定

经过上述(一)至(四)步骤后进行实际样品的测定。但要指出的是,以上步骤只是生物样品实样检测前的准备工作,不能完全确定是否适用于实样测定。因药物在体内变化是复杂的,如不注意药物代谢和蛋白结合情况,则应用体外建立的方法,进行体内实样测定时往往会失败,甚至导致错误的结论,所以在设计方法时强调对药物体内过程要有一定程度的了解,从而选择避免干扰和适合样品实际情况的方法。有时也可采用专属性强,已证明用于体内实样测定的步骤和方法作为对照测定,以此来检验所建立的方法的实际可行性。

(三) 方法的评价

对于所建立的体内药物分析方法的可行性与可靠性,需要应用若干标准来进行方法学的考察与评价。这是研究和建立一个新的分析方法时,必须着重抓住的几个环节。评价一个体内药物分析方法的优劣主要有以下几个指标:精密度、准确度、灵敏度、专属性或选择性、可测浓度范围、测定所需时间以及对生物样品的适应性等,现择要讨论如下:

1. 准确度

准确度(accuracy)是方法评价的最基本要点之一,它是表示测定结果与真值的符合程度。常用回收率(recovery)数值反映测定的准确程度,也可通过与其他已建立的方法进行比较的办法来加以反映。

将已知量的药物纯品加到空白样品(如血样)中去,经过一系列的处理、测定,所得药物量与加入量之比值的百分率即为回收率。回收率当然越接近 100% 越好,但因样品组分复杂,含量低,处理步骤多时就很难达到高的回收率。对于一个方法来说,更为重要的是每次测定所得回收率要保持恒定,虽然有时回收率较低,但只要重现性好,通过校正后仍可采用。根据回收率测定方法不同可分为绝对回收率和方法回收率。

(1) 绝对回收率

绝对回收率也称萃取回收率、提取回收率,它反映了一个方法的萃取效率,与体内样品检测灵敏度有关,是评价体内药物分析方法的重要指标之一。现以色谱法为例,说明绝对回收率的求算过程。例如取一定量被测药物标准品,加到空白血样中,按规定方法处理,使最后溶液中药物标准品浓度为 $1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,测定色谱峰面积,记为 $A_{\text{测}}$,另取 $1\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的药物标准品的纯溶剂溶液直接进样,测得色谱峰面积记为 $A_{\text{真}}$,用外标法计算。

$$\text{回收率}(\%) = \frac{A_{\text{测}}}{A_{\text{真}}} \times 100\%$$

绝对回收率应考察高、中、低 3 个浓度;低浓度选择在定量限(LOQ)附近,高浓度在标准曲线的上限附近,中间选一个浓度。对于回收率的大小与变异不宜苛求,一般添加量在 $10^{-6} \sim 10^{-9}$ 级,绝对回收率若能达到 50% ~ 80%,应认为是令人满意的。

在色谱分析中常采用内标法测定含量,将药物标准品和内标准物质加到空白血样中,按规定方法处理,测得药物和内标峰面积,求出它们的比值 $R_{\text{测}} = A_{\text{药}}/A_{\text{内}}$ 。另取相同浓度的药物标准品和内标准物质的纯溶剂溶液进样,得药物标准品和内标峰面积,计算两者的比值 $R_{\text{真}} = A'_{\text{药}}/A'_{\text{内}}$ 。再根据下式求出回收率:

$$\text{回收率}(\%) = \frac{A_{\text{测}}}{A_{\text{真}}} \times 100\%$$

在内标法中,应注意药物与内标准物质各自用外标法测得的绝对回收率应相近,两者相差应小于 10%,否则回收率偏离 100% 太远。

(2) 方法回收率

取一系列浓度的药物标准品加到空白体液中,按设定方法测定,根据标准品浓度及响应的测定信号值绘制标准曲线,先按最小二乘法求出回归方程:

$$y = bx + a$$

然后取高、中、低浓度的药物标准品添加到空白体液中,每个浓度至少平行测定 5 份,按标准曲线制备方法同法测定,所得信号值代入回归方程,求得测定值。最后与加入量比较,得方法回收率。除定量限外,各浓度点测得的平均值偏离实际加入量应小于 h,定量限这一点应小于 20%。

在测定回收率时,不管采用何种方法,都要注意以下几个问题:①添加的药物量必须与实际测定量相近;②添加物质必须与实际存在的状态相似;③必须同时做空白试验。上述①、②两点的原因:一是如果添加量大,实际测定量小,那么有可能测定量在回收率的误差范围内,这样就不可靠;二是如果添加量大,蛋白质实际结合能力小,这样存在在空白血样中的添加药物部分没有结合,与实际存在的情况不符,测得回收率容易偏高。因此在报道一个方法的回收率时,必须说明添加量。

方法的准确度有时也可用一个已证明有相当专属性和可靠性的方法与新建立的方法同时进行测定,然后比较两法测得结果的相关程度。用相关系数 r 来表示,一般要求 $r > 0.95$,直线的斜率接近 1,表明两法吻合。

2. 精密度

精密度(Precision)是表示一组测量值彼此符合的程度。有多种表示方法,在体内药物分析中常用的表示方法有:

$$\text{①标准差(SD): } SD = S = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$$

$$\text{②相对标准差(RSD),即变异系数(CV): } RSD = CV = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100\% \quad n \geq 5$$

精密度测定通常采用高、中、低三种浓度进行测定。低浓度选择在定量限(LOQ)附近,高浓度在标准曲线的上限附近,中间选一个浓度。每个浓度平行测定 5~7 次,计算测定结果的标准差。除定量限外,各浓度点 RSD 不应大于 15%,定量限这一点不应大于 20%。

精密度可进一步分为日内或批内精密度和日间或批间精密度。前者表示一次测定的重复性,后者表示不同时间测定结果的重复性。

3. 灵敏度

灵敏度(sensitivity)是指一种方法可以检测出有关化合物的最小量,常用以下几种表示方法。

(1) 检测限(limit of detection, LOD)

检测限表示在生物介质中药物的最低可测度(或绝对量)。如 10^{-9}g 、 10^{-12}g 等,不必定量。通常以被测信号和背景噪音比 S/N 为 2~3 倍时的被测物的绝对量来表示, $LOD = 3N/S$

(N = 噪音, S = 被测物信号/单位重量)。例如,在色谱分析中,测得 $N = 1\text{mm}$,取 $2\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的样品液 $20\mu\text{L}$ 进样,测得峰高 30mm 。按上式计算:

$$\text{LOD} = \frac{3N}{S} = \frac{3 \times 1}{\frac{30}{2 \times 20}} = \frac{3}{3/4} = 4(\text{ng})$$

即以 $S/N = 3$ 时,测得样品的 LOD 为 4ng 。

也可通过多次空白试验,求得背景响应的标准差,再乘以 2 或 3,作为 LOD 的估计值,然后配制相应检测限浓度样品,反复测试来确定。

(1) 定量限(limit of quantification, LOQ)

定量限是指生物介质中药物可定量测定的最低量,表示方式和测定方法与检测限相同,它与检测限的不同在于定量限规定的最低测得浓度应该符合一定精密度和准确度的要求。通常以标准曲线的最低浓度点作为定量限。也可以 $S/N = 10$ 或空白背景响应的标准差乘以 10 作为估计值,再通过试验确定。

在进行药物制剂人体生物利用度和生物等效性试验时要求 LOQ 至少能满足测定 3 ~ 5 个半衰期时样品中的药物浓度,或 C_{max} 的 $1/10 \sim 1/20$ 时的药物浓度。

(3) 最低检测浓度

最低检测浓度则多指可进行定量测定的某一药物的最低浓度,它与样品体积大小等因素有关,可通过下式求得,

$$\text{最低检测浓度} = \frac{\text{LOQ}}{\text{进样体积}}$$

以上表示灵敏度的方法均是指仪器的灵敏度,即进入仪器的最低绝对量或最低浓度。如果我们要知道体内样品的浓度检测限,则要根据样品处理方法,考虑稀释度。

体内样品的浓度检测限 = 仪器的浓度检测限 $\times$ 样品稀释度

例如,取血样 1mL ,经处理后,进样前的血样最终体积为 0.1mL/L ,已知最低检测浓度为 10^{-6} ,则血样中被测物的最低浓度为 0.1×10^{-6} 。若经处理后,最终体积为 10mL ,则血样中被测物的最低浓度为 10×10^{-6} 。这表明显然仪器灵敏度相同,但因样品预处理方法不同,就有可能影响到实际样品测定的灵敏度。

要提高检测灵敏度,可采用如下一些方法:①提高仪器本身的灵敏度;②提高进样量;③降低仪器噪音;④提高样品的浓缩程度或降低样品稀释度;⑤消除干扰,降低空白值,这可通过改变色谱条件,改进预处理方法来减少干扰杂质的影响。

4. 方法的专属性

方法的专属性(specificity)也称选择性(selectivity),是指样品中含有其他共存物质时,该法定量测定被测物的能力。即测定的讯号应是属于被测物所特有的,否则就易受干扰。考察一个方法是否专属,应着重考虑代谢物、内源性物质和同时服用药物的干扰。专属性的测定通常取 6 个个体空白样品(要求对这 6 个个体的取样时间、膳食结构以及影响实验的其他因素加以控制),采用拟定的方法进行测定。所得结果与接近于定量限的被测物浓度的纯溶剂溶液所得结果进行比较。在药物、代谢物、内标物的 t_{R} 处不应有大的干扰,任何有大的干扰的空白应舍去。如果大于 10% 的空白样品显示大的干扰,应另取一组空白样品重试,如果仍有 10% 以上的空白样品显示大的干扰,则应改变拟定的方法,以消除干扰。

在报告专属性对,若采用色谱法测定,至少要提供空白生物样品色谱图,空白生物样品外加标准品色谱图及用药后的样品色谱图。

5. 线性范围

线性范围(linear range)是指利用该法取得精密度、准确度均符合要求的试验结果,而且成线性的供试物浓度的变化范围。通常是将药物标准品加入空白体液中,制成一系列不同浓度的标准液,按规定方法处理、测定。根据药物标准品浓度和响应的信号值绘制标准曲线,或计算回归方程,求出 r 值和浓度范围。标准曲线的制备一般由一个空白,一个另标准(空白样品加内标)和 5~8 个非另标准(系列浓度标样)组成,要求覆盖实际的样品浓度范围,包括 LOQ。空白和另标准不用作标准曲线的计算,仅作为对干扰的考察。线性程度可用最小二乘法处理数据,求得相关系数 r ,一般 r 不应低于 0.99,同时必须符合一定的精密度和准确度。要求 LOQ 处偏离标准浓度应小于等于 20%,其他各点应小于等于 15%。

6. 稳定性

药物的稳定性(stability)是贮存条件、药物的化学性质、空白生物样品和容器系统的函数。在特定的容器和生物样品中待测物的稳定性不能外推至其他系统。在生物样品中待测物的稳定性包括长期贮存、短期贮存和冷冻-解冻循环过程中的稳定性,也包括标准贮备液中待测物的稳定性。

(1) 长期贮存稳定性

长期稳定性的贮存时间应超过收集第一个样品至最后一个样品分析所需的时间周期。贮存温度一般为 -20°C ,如果需要也可在 -70°C 贮存。要求高、低浓度至少分别测定 3 次,与第一天测得的相应浓度的结果进行比较。

(2) 短期室温稳定性

高、低浓度各 3 份于室温下放置 4~24h(根据实际操作在室温中需维持的时间而定),在不同时间点取样,进行分析,与 0h 测得结果进行比较。

(3) 冷冻-解冻稳定性

取高、低浓度样品至少各 3 份,于 -20°C 贮存 24h,取出置室温放置使自然融解。当融解完全后,取样,进行分析。然后再把样品放回冷冻状态保持 12~24h,如此解冻-冷冻应重复循环二次以上,然后比较各次分析结果。

(4) 贮备液稳定性

药物与内标的贮备溶液的稳定性应对其在室温下至少 6h 的稳定性进行考察,然后将其冷藏或冷冻 7~14d 或恰当周期后进行测定,所得仪器响应值与新鲜配制溶液所得响应值进行比较。

二、应用实例

例 1:叶丽卡等用 HPLC 法测定生物样品中淫羊藿苷的浓度。

1. 实验方法

(1) 色谱条件 色谱柱:Zorbax ODS($10\mu\text{m}$, $4.6\text{mm} \times 250\text{mm}$);柱温: 35°C ;流动相:四氢呋喃-水-冰醋酸(20:75:5);流速: $1.0\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$;紫外检测波长:270nm;检测灵敏度:0.02AUFS;纸速: $2\text{mm} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

(2) 生物样品的处理

①血浆:取样品 0.1mL 置 10mL 离心管中,加入乙酸乙酯 3.5mL,振荡 3min,离心($2000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 5min),移取上清液,于 50℃ 水浴用氮气吹干,残渣加内标液 10 μL ,振荡溶解后进样 20 μL 。

②粪和尿:大鼠粪便样品于室温风干称重后,置乳钵内研成细末,用生理盐水按 10% 稀释使其成混悬液。取混悬液 0.5mL。或尿样 0.5mL 用乙酸乙酯 4.0mL。提取两次,合并两次提取液,于 50℃ 水浴用氮气吹干,加入甲醇 1.0mL,振荡溶解后进样 10 μL 。

③组织匀浆:将大鼠断头处死,取心、肝、脾、肺、肾、胃、肌肉、脑、睾丸各组织,称重,用组织匀浆器制成生理盐水匀浆,使每 mL 含各组织 0.4g,取此匀浆 0.2mL,按血浆样品处理方法进行处理分析。

2. 结果与讨论

(1) 色谱行为 在上述色谱条件下,淫羊藿苷(icariin, ICA)与内标、淫羊藿提取液中的其他 6 种成分及血浆内源性物质得到良好分离(见图 8-26),ICA 及内标苯甲酸的保留时间分别为 7.92min 和 11.93min。

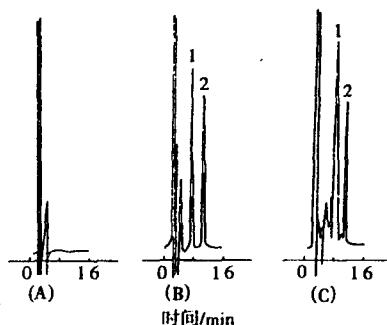


图 8-26 淫羊藿苷在血浆中的色谱图

(A) 空白血浆; (B) 空白血浆加样品和内标; (C) 大鼠静注淫差别藿提取液后的血浆样品
1. 淫羊藿苷; 2. 内标

(2) 标准曲线的制备 用甲醇精密配制成 $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ICA 标准贮备液,再用甲醇稀释成 $100\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 标准工作液,置冰箱保存。另用甲醇制成 $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内标贮备液,再用甲醇稀释成 $40\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 标准工作液,置冰箱保存。用 ICA 标准工作液及空白生物样品配制标准系列,按样品预处理方法操作,以 ICA 与 IS 峰高比为纵坐标,ICA 浓度为横坐标绘制标准曲线,计算回归方程及相关系数。由于粪和尿中的代谢产物干扰内标色谱峰,因此粪和尿采用外标法,以 ICA 峰高为纵坐标,ICA 浓度为横坐标绘制标准曲线。结果血浆、尿、组织匀浆和粪的线性范围分别为:1~128, 2~32, 2~32, 4~64 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。血淫羊藿苷在血浆中的色谱 M 浆的标准曲线方程($n=6$)为:

$$y = 0.122x - 0.0099, r = 0.9999$$

其他生物样品标准曲线方程的 r 值均大于 0.99。

(3) 回收率 分别于空白血浆中准确加入一定量的 ICA 标准工作液,按上述方法经提取后进行 HPLC 分析,按血浆标准曲线方程测得浓度,求出方法回收率。标准品经提取后,与标准品直接进样测定所得各对应标准品与内标峰高比值相比较,求得血浆样品的提取回收率,见表 8-17 其他生物样品的方法回收率均大于 95.26%,提取回收率均大于 73.57%。

表 8-17

血浆样品的回收率和精密度*

药物浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	测定浓度 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	方法回收率 ($\bar{x} \pm s, \%$)	提取回收率 ($\bar{x} \pm s, \%$)	精密度 RSD(%)	
				日内	日间
2	2.02 ± 0.06	101.0 ± 3.0	80.35 ± 3.5	2.0	3.0
8	8.42 ± 0.46	105.2 ± 5.8	51.41 ± 4.5	3.1	5.5
32	31.23 ± 0.76	97.60 ± 2.4	81.07 ± 2.0	2.0	2.6
128	129.7 ± 4.84	101.4 ± 3.8	83.63 ± 3.1	3.4	3.7

* $n=5$ 。

(4)精密度 用空白血浆制成合 ICA2,8,32,128 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 样品溶液各 5 管,测定日内及日间误差,结果见表 8-24。其他生物样品的日内、日间相对标准偏差(RSD)均小于 7.1%。

(5)灵敏度测定按色谱峰信噪比(Sw)为 3 作为检测下限,结果显示 ICA 的最低检测浓度为 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

(6)色谱分析条件选择 淫羊藿提取液中的主要化学成分为淫羊藿苷,还有其他黄酮类化合物存在,因此在上述色谱条件下可出现 6~7 个峰。为了获得最佳分离效果,首先用甲醇:水为流动相进行分离,当比例为 55:45 时,虽然 ICA 与其他化学成分已分离,但其保留时间较长,峰形较宽,且柱压较高。为此,选用对黄酮类化合物分离选择性较好的四氢呋喃,并加入一定量的冰醋酸,使弱酸化合物分离效果更佳。经过调整不同比例,多次试验,最后确定四氢呋喃:水:冰醋酸最佳配比为 20:75:5。

(7)内标选择 为能用内标法准确测定 ICA 浓度,本文对槲皮素、芦丁、橙皮苷、氨茶碱、阿斯匹林、非那西汀、黄体酮、苯甲酸和兰蓐甲素等 13 种药物进行了测定,考察其与 ICA 在血浆中的分离情况,结果用保留时间小于 ICA 的药物作内标时,往往被血浆中干扰峰所干扰。阿斯匹林、非那西汀均在 ICA 前 1~1.5min 出峰,却被淫羊藿提取液中其他成分所干扰。兰蓐甲素和苯甲酸均在 ICA 后 2~4min 出峰,没有任何峰干扰,因此两者均可作为内标,考虑到苯甲酸方便易得,故选用苯甲酸作为内标。

(8)提取溶媒的选择 本文考察了用乙醇、乙酸乙酯及乙醇:乙酸乙酯(1:5)为溶媒对 ICA 进行提取测定,发现前者提取回收率小于 60%,而后者虽然提取回收率大于 95%,但带入杂质峰较多,而且色谱系统稳定性下降。因此实验选用乙酸乙酯为提取溶媒,各生物样品的提取回收率均大于 73%,且方法稳定。

(9)药物在生物样品中的稳定性 于各空白样品中加入 IAC 标准品,配制成 15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度的样品数份,置 -20℃冰箱保存,分别于第 0、5、15、30d 按实验方法测定,RSD 均小于 7.1%。说明该药物在各生物样品中 -20℃冰箱保存下,至少可稳定 1 个月。

(10)血药浓度的测定 为了检验上述方法是否能满足 ICA 的药代动力学研究,应用本方法进行了大鼠静脉注射淫羊藿提取液。由大鼠颈静脉按 10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 静脉注射,于给药后 5,10,15,20,25,30,40,60,80,120,180min 于颈静脉各取血 0.25mL,肝素抗凝,离心后取血浆 0.1mL,按上述方法提取和测定 ICA 浓度,以给药时间为横坐标,血浆中 ICA 的浓度对数为纵坐标绘制药时曲线,见图 8-27。血药浓度测定结果表明,本文建立的分析方法可满足 ICA 药代动力学研究的需要,具有灵敏度高、准确性好等优点。

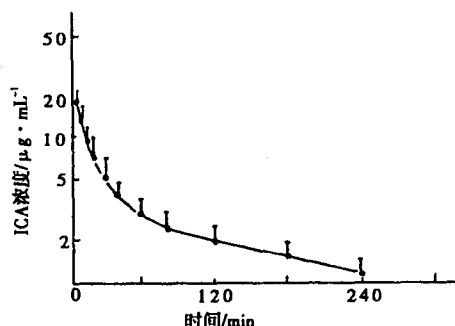


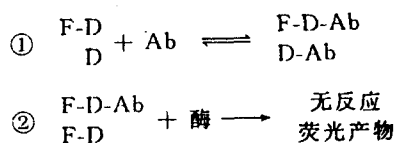
图 8-27 大鼠平均血药浓度 - 时间曲线

第二节 荧光免疫分析

荧光免疫分析 (fluorescence immunoassay, FIA) 是以荧光物质或潜在荧光物质为标记物, 当标记的药物与特异抗体相结合时, 发生荧光强度的改变, 或在相应的酶作用下发生荧光来检测待测样品中药物浓度的一种方法。也可分为均相与非均相两类, 均相荧光免疫分析能自动化操作, 是目前应用比较广泛的免疫分析法。按标记物产生荧光方式不同, 可将荧光免疫分析分为底物标记荧光免疫分析, 荧光偏振免疫分析, 荧光淬灭和荧光增强免疫分析等。

一、底物标记荧光免疫分析

底物标记荧光免疫分析 (substrate labeled fluorescence immunoassay, SLFIA) 是以一种酶底物来标记药物, 酶底物本身不发生荧光, 但受到相应的酶作用时, 能裂开产生荧光, 以 D 代表药物, F 代表酶底物, 即一种潜在荧光物质。酶反应可表示如下:



只有游离的 F-D 能被酶催化产生荧光。而结合物 F-D-Ab 因位阻的关系。酶不能与其作用, 所以无荧光发生。因此, 无须分离即可直接测定反应混合物的荧光强度, 荧光强度与 F-D 量呈正比, 与待测药物量呈正比。

在 SLFIA 中使用的标记化合物为 β -半乳糖甙-伞形酮 (β -G-U), 它是 β -半乳糖甙酶的作用底物 β -G-U 标记到药物上不产生荧光, 但能被 β -半乳糖甙酶催化裂解生成荧光化合物, 最大 λ_{ex} 409nm, λ_{em} 445nm, β -G-U-drug 与抗体结合后, 由于空间位阻不能与酶作用, 因此无荧光产生。

二、荧光偏振免疫分析

荧光偏振免疫分析(fluorescence Polarization immunoassay, FPIA)中常用的标记物为具有强荧光的荧光素、罗丹明染料等。其测定原理如下:

在光源和样品之间设置一偏振片(第一偏振片)将产生在某一平面振动的偏振光作为激发光激发荧光标记药物,使之发生荧光。由于游离荧光标记药物分子小,布朗转动速度快,产生的荧光不能形成在一个平面振动的偏振光,而是向各个方向分散;而与抗体相结合的荧光标记药物,因分子增大,布朗转动速度减慢,故能形成在某一平面振动的偏振光(荧光偏振光),其方向可与激发偏振光方向相同或相垂直,这取决于荧光标记物分子的荧光跃迁矩同激发跃迁矩是平行(0°)还是垂直(90°)。若两者是相垂直的,则改变第二偏振片方向,使与第一偏振片成 90° ,在检测器上可测得该荧光标记结合物发射的荧光偏振光的强度,而两偏振片成 0° 时,测不到荧光标记结合药物发射的荧光偏振光。若荧光标记物分子的荧光跃迁矩同激发跃迁矩相平行,则情况刚好同上相反。对于游离标记药物,第二偏振片无论处在上述哪种状态下(0° 或 90°),测得的偏振光强度总是相等的。因此,在两种情况下测得的反应液的荧光强度差值仅与标记结合物的量有关。上述原理可用图 8-28 表示。

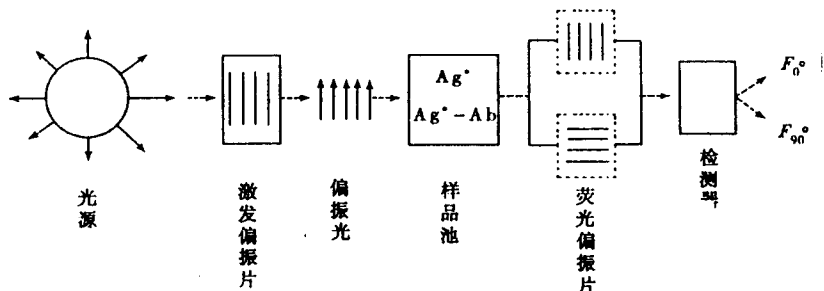


图 8-38 荧光偏振免疫分析原理示意图

图中 F_{0° , F_{90° 分别指第二偏振片与第一偏振片成 0° 或 90° 时测得的荧光强度。 $F_{0^\circ} = F_{0^\circ}^B + F_{0^\circ}^F$, $F_{90^\circ} = F_{90^\circ}^B + F_{90^\circ}^F$ 。

FPIA 是均相免疫分析,不需将 B 和 F 分离即可测定 B 的偏振荧光,易于自动化。目前已有专门的自动化仪器及与之相配套的药盒出售。

三、荧光淬灭及荧光增强免疫分析

荧光淬灭免疫分析(fluorescent quenching immunoassay)的原理是基于标记药物的荧光强度当与抗体结合之后被淬灭这一性质。由于游离标记药物具有荧光,与抗体结合的标记药物失去荧光,利用这一性质可加入已知量的非标记药物与之竞争。建立竞争抑制曲线,供样品测定用。

荧光增强免疫分析(fluorescent enhancement immunoassay)与荧光淬灭免疫分析相似,也是利用荧光标记药物和抗体结合之后荧光强度发生改变这一性质来进行分析的,不同之处是

结合后使荧光增强,而不是淬灭。

Shaw 等利用荧光淬灭免疫分析法测定血清中的庆大霉素含量,以荧光素作为标记物,当荧光素标记的庆大霉素与庆大霉素抗血清(抗体)结合时,荧光发生部分淬灭,其荧光淬灭的程度和样品中庆大霉素的含量相关,根据荧光淬灭程度可求得样品中庆大霉素的含量。图 8-29 是由庆大霉素剂量-荧光强度的标准曲线。随着未标记庆大霉素的量的增加,荧光素标记的庆大霉素与抗体的结合量减少,荧光淬灭程度降低,在标准曲线上表现为荧光强度呈上升趋势。

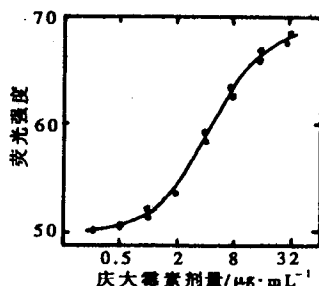


图 8-29 庆大霉素剂量-荧光强度曲线

第三节 毛细管电泳免疫分析

20 世纪 80 年代初发展的毛细管电泳 (capillary electrophoresis, CE) 是一种新型分离分析技术,它是指以高压电场为驱动力,以毛细管为分离通道,依据样品中各组分之间的迁移速度和分配行为上的差异而实现分离的一类液相分离技术,在分离机理上与液相色谱之间有互补性,比液相色谱更适合体内药物分析。其在生物、临床、药物、食品、环境分析等领域有广泛的应用。

免疫分析是建立在抗原抗体免疫结合反应的基础上,利用抗体(或抗原)作为选择性试剂,测定抗原、半抗原(或抗体)的方法。免疫分析的特点是有极高的选择性和灵敏度,在临床化学分析和药物分析等方面有重要地位。但在技术上也存在一定局限性。将免疫分析与色谱等分离技术联用,可弥补免疫分析技术上的一些局限性,提高免疫分析的速度与自动化程度。例如,液相色谱与免疫分析联用,流动注射分析与免疫分析联用。近几年来 CE 与免疫分析的联用越来越受到人们的关注,这种联用技术的发展为 CE 开拓了一个新的应用领域,也为免疫分析注入了新的活力。

毛细管电泳免疫分析 (capillary electrophoresis - based immunoassay, CEIA) 是利用抗原抗体复合物与游离的抗原、抗体在电泳行为上的差异,将 CE 作为免疫分析中的分离检测手段。这一联用技术结合了免疫分析的高选择性、CE 的高分离效率和激光诱导荧光检测 (laser induced fluorescence detection, LIF) 技术的高灵敏度检测。与传统的免疫分析相比有很多优势:① 免疫结合反应在均相溶液中进行。反应一般在 5 ~ 10min 内即可达到平衡。② CE 一般只需要纳升级的样品与微升级的缓冲溶液,很适合于微量免疫分析。③ CE 的应用使传统免疫分析中繁琐的分离步骤得到简化,CE 分离一般在几分钟内完成,结合在线的 LIF 检测,大大提

高了免疫分析速度,而且易自动化,可以进行实时的监测与控制。④由于 CE 具有很高的分离效率,因此既可解决免疫分析中的交叉反应性问题,又可以进行多组分同时分析。

一、毛细管电泳免疫分析的发展

毛细管电泳免疫分析是 20 世纪 90 年代发展起来的一种新型分析技术。1991 年 Nielsen 等用毛细管区带电泳(CZE)与紫外检测研究了人生长激素与其单克隆抗体的反应。将抗原与抗体混合温育一段时间后,用 CZE 分析反应混合物,在 10min 内,抗原抗体复合物与游离的抗原、抗体完全分离。此后,毛细管等电聚焦(CIEF)和胶束电动毛细管色谱(MECC)等模式也被用来分析抗原抗体复合物。但由于紫外检测的灵敏度低且特异性差,达不到免疫分析的要求,因此必须用更灵敏的检测技术。1993 年 Schultz 等用异硫氰酸荧光素标记的胰岛素作为示踪物,采用 CZE 与激光诱导荧光检测技术进行免疫分析,测定胰岛素的浓度。之后,Chen 等研究了吗啡等滥用药物的 CZE - IJF 免疫分析法,Shimura 等研究了重组人生长激素的 CIEF - LIF 免疫分析法。LIF 的应用提高了检测灵敏度和检测特异性,从而使毛细管电泳免疫分析开始得到迅速发展。

二、CEIA - LIF 的标记物

CEIA 用 LIF 检测,标记物是荧光染料。用于标记的荧光染料必须具备下列条件:①能与抗原或抗体共价结合,结合后不易离解,未结合染料及其降解产物易于分离;②荧光量子产率高,结合后无明显下降;③荧光稳定性好,光漂白作用弱;④不影响抗原抗体结合反应,无附加的抗原性;⑤有适当的激发光源可以用来激发。常用的荧光染料主要有荧光素类、罗丹明类、藻红素等。

三、毛细管电泳分离模式

CE 有多种分离模式(见第九章),已经与免疫分析联用的有 CZE、CIEF 和 MECC 三种。

①CZE 是 CE 中最简单,最常用的分离模式。它是在毛细管内进行的自由溶液电泳,毛细管内通常只充入有一定缓冲能力的背景电解质,主要依据样品中的带电粒子的电泳淌度不同,在外电场作用下实现分离。各带电粒子的净电荷与质量比(荷质比)之间的差异,是决定 CZE 分离的主要因素,抗原与抗体结合形成复合物后,会引起荷质比的变化,从而可以通过 CZE 将它与游离的抗原或抗体分开。目前大部分 CEIA 的工作都用 CZE 模式,这是因为 CZE 的分离体系接近生物体内的状态,因此不会影响抗原抗体之间的结合反应,同时 CZE 的分离效率与样品分子的扩散系数成反比,这对扩散系数小的抗体分子的分离很有利。CZE 的主要缺点是抗体等蛋白质分子在毛细管壁上的吸附会大大降低 CZE 的分离效率,从而影响分析的精度与重现性。

②MECC 是在 CZE 基础上,在缓冲体系中加入表面活性剂,如十二烷基磺酸钠(SDS),当高于临界胶束浓度时,表面活性剂的疏水端聚集形成胶束,利用溶质在水相和胶束相中分配行为的差异进行分离。MECC 是惟一的既能分离中性物质又能分离带电组分的毛细管电泳

技术,适合一些小分子药物的免疫分析。

③CIEF 是根据等电点的差异来分离多肽或蛋白的毛细管电泳技术,它的优点在于可以在分离的同时对样品进行浓缩,从而提高检测灵敏度。CTEF 的缺点是操作复杂,而且由于分离过程中在毛细管内存在 pH 值梯度,因此对抗原抗体复合物的稳定性和分离条件都提出了更高要求。

在结构上与抗原相差微小的抗原类似物在免疫分析中会引起交叉反应,在临床分析中表现为“假阳性”现象,这是常规免疫分析方法很难解决的问题之一,而 CE 却能够识别抗原与其类似物在结构上的微小差异,在电泳谱图上,抗原和抗原类似物的迁移时间不同,表现为不同的峰。

四、免疫分析方法

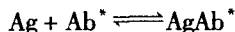
根据分析对象的不同,CEIA 可以采用标记抗原的竞争性免疫分析与标记抗体的非竞争性免疫分析两种模式。

(一)标记抗原的竞争性免疫分析

竞争性免疫分析原理见第六章。当免疫反应结束后用 CE-LIF 检测可以得到两个峰,分别代表了游离的标记抗原(F)与标记抗原抗体复合物(B)的量,定量的方法与传统的免疫分析方法相同。竞争性分析模式主要用于小分子抗原、半抗原的免疫分析。

(二)标记抗体的非竞争性免疫分析

非竞争性免疫分析的原理可用下式表示:



过量的标记抗体(Ab^*)与被测抗原(Ag)混合温育 Ag 与 Ab^* 结合,定量地转化为抗原抗体复合物(AgAb^*),用 CE 分离后 LIF 检测可得到两个峰,其中对应于 AgAb^* 的峰可用来定量测定样品中 Ag 的浓度。非竞争性模式主要用于大分子抗原的免疫分析。

CEIA 是一种新兴的免疫分析方法,有广泛的发展前景,它所具有样品用量少、分析速度快、易于自动化、可以进行多组分同时分析等优点是传统免疫分析方法很难相比的。CEIA 的主要问题是它不能像传统免疫分析方法那样同时分析多个样品。

第四节 手性色谱法在体内药物分析中的应用

手性药物以外消旋体给药后,在生物体内各对映体比例可随时间改变。再加上对映体之间的相互作用等因素的影响,使之血浆浓度的变异性增加,如果忽视了其立体选择性,那么外消旋体的药代动力学参数,如 $t_{1/2}$, AUC 及计算机拟合的房室模型的临床意义就较难评价。例如拉贝洛尔(labetalol)化学结构中有两个不对称碳原子,所以混合物中含有 4 个光学异构体,其 α -阻断作用主要由 S,R-异构体引起, β -阻断作用主要由 R,R-异构体引起,而占“药物”50%的 S,S-和 R,S-异构体是非活性异构体,若其药代动力学参数是根据 4 个

化合物组成的混合物获得的,这些数据由于忽视了立体选择性,因此是无意义的,并可能得出误导结论。

尽管对映体的内在药理活性并不总是存在明显的差异,但它们的动力学差异可出现在体内过程的所有方面。若忽视了对映体专一性药代动力学,药代动力学参数将有被错误解释的危险,特别是在阐明不同类型病人的药物浓度与作用的关系时,对镜像对称的药物,只要有可能,就应该对镜子两边的化合物分别研究它们的药代动力学性质。因此,在评价手性药物和研制手性新药时,应采用立体选择性实验方法对不同的对映体作出分别的评价。同时,对服用外消旋体药物进行治疗药物监测(TDM)时,也应分别监测各对映体的血药浓度。

一、手性药物体内外代谢研究

例1:曾苏等采用手性配合交换 HPLC 分离测定氧氟沙星对映体及其在代谢研究中的应用。

氧氟沙星(ofloxacin, OFLX)是一全合成抗菌药物,其作用机理是抑制细菌的 DNA 促旋酶。氧氟沙星分子在喹诺环上 C₃ 位上有一甲基,形成一个手性中心。研究表明,对于不同的革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌, S₂-(一)-OFLX 的抗菌活性是 R₂-(+)-OFLX 的 8~128 倍,是其外消旋体的 2 倍。为了研究两种对映体在体内外代谢的差异,作者以 L-苯丙氨酸为配合剂,铜离子为配合离子,在 ODS 制备 HPLC 柱上拆分纯化了 S₂-(一)和 R₂-(+)-OFLX,建立了生物样本中 OFLX 对映体的 RP-HPLC 分析方法,用于两种对映体的体内外代谢研究。

(一)制备色谱分离氧氟沙星对映体

(1)色谱条件 Shimpack PREP-ODS(25cm×20mm, i.d. 10 μ m)色谱柱;手性流动相添加剂溶液(6mmol·L⁻¹ L-苯丙氨酸和 3mmol·L⁻¹ 硫酸铜 pH 值 3.5)-CH₃OH(84:16)为流动相;流速 4.6mL·min⁻¹;检测波长:293nm。

(2)S-(一)和 R-(+)-氧氟沙星的制备拆分将(±)-氧氟沙星配成 15g·L⁻¹ 微酸溶液,进样 0.5mL,于柱后分别接收两峰洗脱液。将洗脱液置于旋转蒸发仪,于 45℃ 水浴真空除去甲醇,然后加入醋酸按至饱和。用 CH₂Cl₂ 提取 4 次,每次 50mL,合并有机溶剂提取液,于 45℃ 水浴真空浓缩至少量后,加无水硫酸钠脱水,过滤。滤液于 45℃ 水浴真空蒸干,残渣于五氧化二磷真空干燥器中干燥后配成水溶液,用 Perkin-Elmer 241 型自动旋光仪分别测定旋光度,结果表明:第一个洗脱峰为 S-(一),第二个峰为 R-(+)-氧氟沙星。

(3)S-(一)和 R-(+)-氧氟沙星光学纯度分析 以 CI-C-ODS(0.15m×6mm, i.d.) 为分析柱,手性流动相添加剂溶液—甲醇(86:14)为流动相,流速 1.1mL·min⁻¹,荧光检测器 λ_{ex} 330nm, λ_{em} 505nm。吸取上述两种光学异构体水溶液 20 μ L,注入 HPLC 仪进行分析,采用峰面积归一化法,计算得 S-(一)-氧氟沙星和 R-(+)-氧氟沙星的光学纯度分别为 99.14%和 99.29%(见图 8-30)。

(二)生物样本中氧氟沙星对映体的分析

氧氟沙星主要代谢途径如图 8-31 所示,在苯并喹诺环上 C₃ 位羧基的葡醛酸化,少量

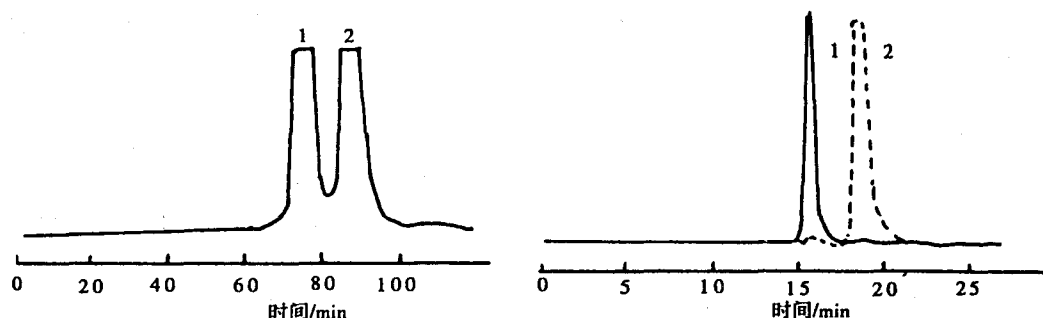


图 8-30 氧氟沙星的 HPLC 图

的去甲基氧氟沙星和氧氟沙星 N-氧化物。氧氟沙星代谢呈现出种属差异。

应用前述建立的色谱条件研究 OFLX 在大鼠肝微粒体中体外一、二相代谢与人体内的立体选择性代谢。

(1)一相反应 取微粒体适量,用 NADPH 再生系统溶液稀释至 $2\text{mg 蛋白质} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的悬浮液,充 O_2 后,加入 OFLX 对映体, 37°C 预孵育 5min 后,加辅酶溶液启动反应,分别在孵育一定时间后,加三氯乙酸中止反应,离心,取上清液进样。

(2)二相反应 取 $2\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 蛋白质的大鼠肝微粒体孵育液 1.0mL ,分别加入 OFLX 对映体 $27.7 \sim 969.5\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,经 37°C 预孵育 5min 后,加入 UDPGA,反应 30min,加 1mL 甲醇终止反应,加入环丙沙星作为内标,离心后,取上清液 $20\mu\text{L}$,HPLC 分析。

(3)氧氟沙星在人体内的立体选择性代谢 5 名健康志愿者口服 300mg 消旋 OFLX,于服药后 2,4,6,8,12,16 和 24h 收集尿样,测量尿体积,过滤除去不溶性杂质,取尿样一定量,加内标,混匀进样。

(4)结果 OFLX 对映体在微粒体中的 HPLC 色谱图见图 8-31;一、二相代谢结果见图 8-33 和表 8-18;尿中 OFLX 两对映体的累积排泄速率见图 8-34。

表 8-18

微粒体		$V_{\max}$	K_m	Cl_{int}	Ratio
		$(\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$	$(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	$(\text{L} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1})$	$S(-)V_{\max}/R(+)V_{\max}$
对照组	S(-)	0.343 ± 0.02	0.235 ± 0.04	1.43 ± 0.25	
	R(+)	0.317 ± 0.01	0.267 ± 0.07	1.18 ± 0.23	3.08 ± 0.04
BNF 组	S(-)	$0.467 \pm 0.07^{\Delta\Delta}$	$0.170 \pm 0.03^{\Delta}$	2.55 ± 0.38	
	R(+)	$0.393 \pm 0.06^{\Delta}$	$0.162 \pm 0.03^{\Delta}$	$2.38 \pm 0.38^{**}$	1.19 ± 0.20
PB 组	S(-)	$0.176 \pm 0.01^{***}$	$0.134 \pm 0.02^{**}$	$1.34 \pm 0.15^{\Delta\Delta}$	
	R(+)	$0.156 \pm 0.012^{***}$	$0.146 \pm 0.02^{**}$	$1.08 \pm 0.09^{\Delta\Delta*}$	1.13 ± 0.21

* $\bar{x} \pm s$, $n=4$; ** $P < 0.05$; *** $P < 0.001$ (与对照组); $\Delta P < 0.05$; $\Delta\Delta < 0.01$ (BNF 比 PB); # $P < 0.05$ [R-(+)-比 S-(-)-OFLX]。

例 2:姚彤炜等应用 GITC 法拆分大鼠肝微粒体中普罗帕酮对映体及其在代谢研究中的应用。

盐酸普罗帕酮(propafenone hydrochloride,简称 PPF)为抗心律失常药。目前临床上仍以

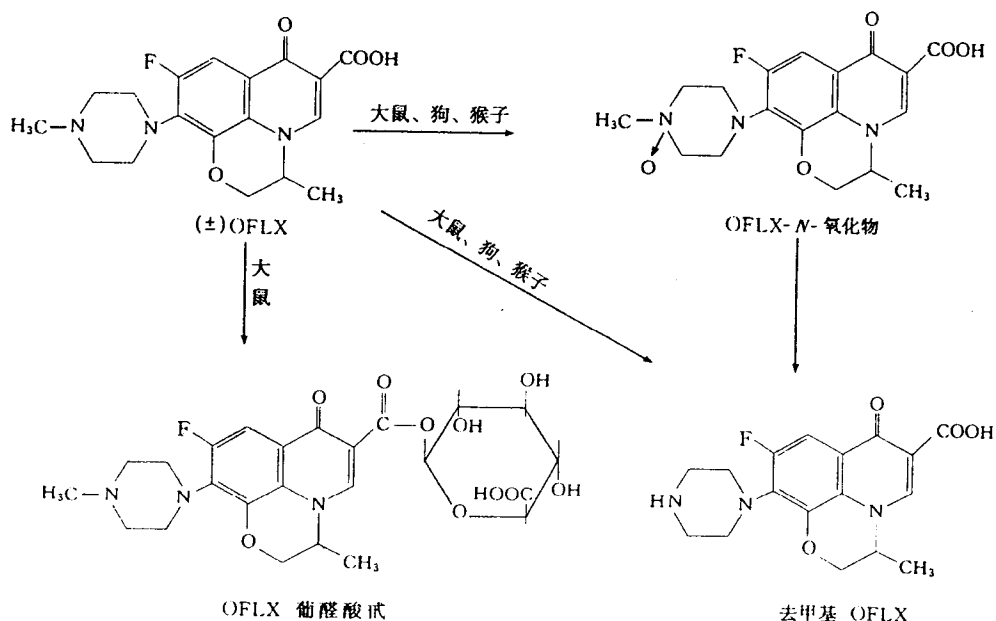


图 8-31 氧氟沙星主要代谢途径

(A)空白微粒体;(B)添加 OFLX 对映体的空白微粒;(C)OFLX 与微粒体共孵育
1.S-OFLX 2.R-OFLX 3.内标—环丙沙星

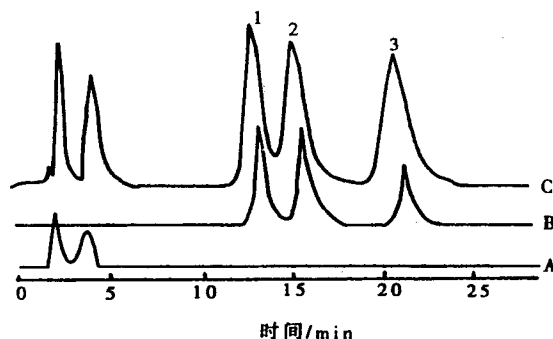


图 8-32 OFLX 的 HPLC 色谱图
氧氟沙星对映体二相代谢酶动力学参数

外消旋体给药。R-PPF 与 S-PPF 的钠通道阻滞作用相似,然而 S-(+)-PPF 的毒副作用(β 受体阻断作用)远高于 R-(-)-PPF。该毒副作用在长期给药时就会明显地体现出来。因此对消旋普罗帕酮两对映体代谢有无立体选择性的研究具有重要的临床意义。PPF 的代谢途径主要有 CYP3A4 和 CYP1A2 介导的 N-去丙基化反应、CYP2D6 介导的 5-羟基化反应和葡萄糖化反应(见图 8-35)。

作者考察了 G1TC 柱前衍生化条件,建立了 RP-HPLC 法分析鼠肝微粒体和人肝转基因细胞 S_9 溶液中 PPF 对映体含量,并用于 PPF 的 N-去丙基氧化代谢研究。

1. PPF 的手性 HPLC 分析法