



南京药学院药物分析教研室 编写

关系容易发生异常。此外，当合并用药产生体内代谢过程的改变，以及长期或预防用药时，测定血中药物浓度以维持体液内有效药浓，又避免发生过量，这对提高疗效和安全用药方面也可起重要作用。

由此可见，不断发展的医疗事业对有关《体内药物分析》这类书籍需要的迫切性及其重要意义。这就是我们要编写本书的出发点。

另外，我国药学院系为了进一步提高教学质量，纷纷开设选修课程，体内药物分析课程的开设引起了广泛的关注与兴趣，有的院系已将这门课程列为专门化课程之一，急需相应的教材与参考书籍，这也是促进本书加速编写的动力。

全书分作八章编写。第一章概述，着重阐明了有关体内药物分析的意义、任务、特点与动向，同时也讨论了样本制备、分析工作的质量管理以及测定方法选择的基本问题。第二~八章，从药物类型、方法特色、应用领域以及样品类别等方面选取若干典型实例进行了讨论。书末附录则表列了常用药物的治疗有效血药浓度与中毒血药浓度；介绍有关体内药物分析的专著与期刊，以使读者参阅应用或必要时进一步研究探索。

本书的第一、五、六、七章由吴如金编写；第二、三章由姜心如编写；第四、八章分别由杨玉君、周培的编写；全书由安登魁通读整理定稿。

由于编者水平所限，书中一定存在不少缺点和错误，敬请读者批评指正。

**安登魁**

1982.6.18于南京药学院

## 前 言

《体内药物分析》是根据当前国内正在逐步受到重视并亟待开展起来的药物动力学研究、临床用药监护、制剂的生物利用度测定等等工作的需要，为在生物样品中进行药物测定而编写的。本书是一部导论性的书籍，对体内药物分析所涉及的有关问题进行了概括性的叙述，并通过若干实例为读者提供开展这类工作时所需的基本知识与基本方法。

本书的重点是：在当前，如何为“临床用药监护”工作的开展提供帮助；从发展角度来看，如何通过药物进入体内后的代谢物的考察，为进行药物的研究与设计开拓思路。

在近代医疗实践中，医药工作者共同关心的问题之一就是：为什么对不同病人用一定剂量的药物往往会引起不同的治疗效果。以往，只有经过反复试验、悉心观察，才能确定药物的临床最佳用量；近年来，由于使用分析技术来测定人体体液中药物的浓度，促进了药物动力学的发展，并为建立药物动力学动态过程中定量的数学模型打下了基础。目前医药工作者已有可能协作起来，根据病人体液中药物含量来制定科学的治疗方案。这就是：临床合理用药监护。

在临床用药时，要想达到最佳疗效的剂量常常由于个体的不同而有较大差异，不少药物的常用剂量，对某些病人可能疗效甚微，而对另一些病人则会导致严重中毒，完全满意者不多。有时标准给药方案由于对一些病人不能发挥足够程度的药理效果，往往就被误认为这些药物无效。值得指出的是：药物治疗中经常出现的严重不良反应，半数以上是因剂量过高所造成的。实践证明：最佳疗效剂量的确定，常可借助于血中药物浓度的测定，从而也有助于解释一种药物在常用剂量下不能产生疗效或产生意外毒性的原因；这种测定对那些肠胃道、心血管、肝或肾病患者来说，尤其重要，因为在这些病人身上服药剂量与血药浓度之间的

# 目 录

第一章	概述·····	1
第二章	体内磺胺类药物的分析·····	44
第三章	体内巴比妥类药物的分析·····	75
第四章	体内解热镇痛类药物的分析·····	95
第五章	体内苯骈二氮杂萘类(安定类)药物的分析·····	142
第六章	洋地黄强心甙类药物——狄戈辛的放射免疫测定和酶免疫测定·····	180
第七章	内源性雌性甾体激素——雌酮、雌二醇、雌三醇及其缀合物的测定·····	204
第八章	体内抗生素类药物的分析·····	229
附 录	I. 常用药物的治疗有效血药浓度、中毒血药浓度及致死血药浓度表·····	292
	II. 有关体内药物分析的专著与主要期刊简介·····	294

# 第一章 概述

本章拟就体内药物分析所涉及的基本任务、内容及其特点，阐明其在药品质量管理、临床合理用药及药理学研究等方面的重大意义和当前发展动向，并就样本及样品处理、分析质量管理，以及方法的合理选择，测定方法的建立等问题进行论述，以便对体内药物分析工作有一概括的了解。

## 一、体内药物分析的意义、任务、特点和动向

### (一) 体内药物分析的实际意义和现实需要

随着分析技术的进步从而有可能对人和动物机体内（体液和组织中）微量药物及其代谢物的浓度进行定量测定，这对于药品质量管理、药物的临床应用和药物动力学研究等工作具有重大的实际意义<sup>(1,2)</sup>。

对体内药物浓度进行测定愈来愈需要，其推动力之一，是药品的质量管理工作的改进与提高愈来愈涉及到体内的问题。这是由于：

人们在长期医疗实践和医药生产中认识到，要做到安全有效地使用药物及寻找新药，至少须从两个方面作出努力：

一方面，即从宏观方面，从管理上、技术上对药品生产、储运、分配等各个环节按“药品生产和质量管理规范”（G. M. P）与“全面质量管理”（T. Q. C）要求进行。求得从物质上对药品质量有充分的保证。

另一方面，即从微观方面，加强对药物在机体内作用规律的研究，包括对药物制剂在体内利用效率的研究（生物利用度）。以便进一步了解与阐明药物剂型、工艺~药浓~药物效应；药物的作用点及其体内的转化等等关系。通过这种深入的了解与阐明药

物在体内的效率、效应和副作用，已成为评价药物质量的重要内容和依据。

体内药浓测定推动力之二，是由临床上合理用药的需要所提出来的。近年来国外开展了“给药方案个体化”<sup>[3]</sup>与“治疗药物监护”(Therapeutic drug monitoring, TDM)工作<sup>[4,5,6]</sup>，已成为临床药剂学的中心课题，成为临床药师主要工作内容之一。这是由于生命现象的重要特点之一，是个体差异很大，机体对药物的反应也是如此。从给药到产生疗效，是一个非常复杂的过程。在大多数情况下，不能依据剂量来预测机体的反应。根据现代药理学研究，大多数药物的药理作用与体内血药浓度存在密切的关系，所以当前趋向于依据个体病人的体液（最常用的是血液）药浓的监测来指导合理用药，以达到安全有效的治疗。

不少作者提出了在不同情况下（有人认为<sup>[5]</sup>可多达十三种情况，诸如有效血浓的范围较狭、肝肾病患者等等）需要进行临床监护，列出了各种药物动力学参数与临床监护之间的关系<sup>[7]</sup>。

药物滥用 (Drug abuse) 已成为资本主义社会病态的反映。一些兴奋剂、致幻剂、镇静剂的过度服用，以及药物（如激素等）用于运动、竞技场上的丑闻时有发生。吸毒问题（吗啡、海洛因、大麻等）作为严重的社会问题普遍出现。这些都促使国外对体内药物、毒物的检测，筛分 (screening) 工作日益重视。而当药物过量 (overdose) 或误服急待解毒急救时，也需要进行检测，这已成为医疗临床上常遇到的任务。

体内药物浓度测定和代谢物的检测等的推动力之三，是随着药物及其制剂的体内过程（吸收、分布、代谢、排泄）、作用机理的研究增多，需要测定各种动力学参数，以使比较定量地去说明浓度与效应、疗效的关系，药物结构与效应的关系等等问题。同时，在药物动力学和代谢研究中对于活性代谢物的检测，也将成为新药设计中产生前导 (lead) 药物的一条途径。它对改进原有药物结构、性质（例如使它更成功地进入受体部位）也很有好处<sup>[8]</sup>。

显然，要开展上述药物的体内研究和临床实际工作，首先要

解决的问题是建立体内微量药物及其代谢物的分离，分析方法。有时还应包括由药物所引起或与药物效应有关的体内内源性生理活性物质（如各种激素、前列腺素及5-羟色胺等神经介质等等）的浓度测定方法。而当某些药物所致的生理与药理指标的变化易于检测时（如有人测定血糖变化作为降血糖药物的指标），也可考虑作为测定的项目；甚致以测定某些药理效应用来代替有关物质浓度的测定。

总之，当前每一种新药问世、新剂型的创制、药物的实验研究、临床疗效观察、作用机理的阐明等均需要进行体内药物浓度变化的各种参数的测定。

数年前（1976年）国外就有人在“药物分析现状”一文<sup>[9]</sup>中提到“体液中药物测定已成为药物分析工作者的一种重荷”。近年创刊（1979年）的“临床药物监测”杂志，在其创刊号综论中认为：“历史必将证明体液中药物浓度的定量技术是药理学中最大进展之一”<sup>[10]</sup>，“药物动力学的成熟，同样依赖于体液中灵敏及合适的分析方法的发展”<sup>[11]</sup>。

1981年召开的日本药学会101届年会以“致力于探索生命科学的药学”（“生命科学指向の薬学へ”）作为一个口号，这次年会的特色是：药学从过去以物质为中心转变到与生命科学的结合上来<sup>[12]</sup>。日本病院协议会等已经提及如何调查确定“药物血中浓度测定的设备”及“药物体液中浓度测定指导方针”<sup>[13]</sup>。此外，日本一些药学期刊和公司（如新日本科学研究所和第一化学药品株式会社）在药学期刊上刊登了承接体内药物分析的各项委托<sup>[14]</sup>，也表明了这项工作已具有社会需要。

这些需要也反映在现代综合性药学期刊中有关体内药物分析的论文大量涌现，而在一些药物临床、药理研究、临床化学等期刊中则更俯拾皆是！一些文摘性期刊则将体液中药物的分析内容列出专栏。近年来许多专著（如药物血液测定、临床药物监护、某些方法应用于体内分析等等主题）和会议录的出现更表明这个学科已处在其发展过程的一定阶段。

近年来，国内也开始在生物药剂学（如生物利用度测定），临

床药物监护，药物动力学研究等方面开展了工作，取得了进展，也要求建立与开展体内药物测定工作，并必将推动这一工作的迅速发展。

## **(二) 学科的任务及其定义**

体内药物分析作为一门待发展的学科，需要对其任务与特点进行必要的探讨。

从上节的叙述中已可以看到体内药物及其代谢物（有时还包括一些内源性生理活性物质）的分析，的确已给药物分析工作者提出了新的任务，即从传统的对药物及其制剂的理化性质和稳定性考察、规格制订、质量监督等工作的基础上，兼而深入到体内药物分析工作中去，以便在回答越来越多的药物临床效应和药物研究中需要阐明的问题上，作出自己的贡献。很多这样的任务已经摆在面前，可以预见，必将有更多这方面的课题与工作需待开展、深化与完成。

显然，体内药物分析涉及了很多学科，需要许多学科参予工作。作为工具、手段和眼睛的分析工作往往成为研究工作的“瓶颈”，由于它通不过，使研究工作不得进展的情况亦属常见。它的工作任务主要可归结为：

1. 进行各种体液和组织中药物及其代谢物复杂的测定工作；
2. 进行新测定方法的研究设计，供常规测定之用；
3. 提高和增进测定技术和效率，进行分析质量管理以获得可靠结果；
4. 参与临床和药理研究中对所获得结果进行阐明工作；
5. 进行方法学研究，提供合理的、最佳分析条件；估计、评定各种方法能达到的灵敏、专属、准确的程度；探讨各种方法应用于体内药物分析中的规律性问题。从而充分发挥所长，发展本门学科。

就此，如果试对“体内药物分析”下一定义的话，可以表述为：“体内药物分析（主要是指人体内，如包括动物也可泛称为机体内）是通过分析手段了解药物在体内的数量和质量的变化，获得药物动力学的各种参数，以及药物在体内转变、代谢的方式、



途径等等信息。从而为药物生产、医疗临床、实验研究等方面对所研究的药物作出估计与评价，以及对药物改进和发展作出贡献。随着工作的深入必将对药物~人的内在关系作出更准确的表达和描述”。

### (三) 方法学的特点和动向

体内药物分析就其任务和分析对象，如同大多数临床生化工作一样<sup>[15]</sup>归纳起来带有如下的特点：

1. 样品复杂，大多需要分离、净化 (clean up)。需要从不同组分的生物体液、组织中进行复杂的含量测定。因为样品中存在有各种直接的或间接的影响、干扰测定结果的物质，因而它是在大量复杂组分中进行微量或超微量药物及代谢物的测定工作。

2. 仅有少量样品可供分析。尤其是在连续测定过程中，很难再度获得完全相同的样品。

3. 被测定物浓度或活性极低，有时且需要测定其变化了原来状态的络合物及代谢产物。

4. 往往要求很快地提供测定结果，尤其在毒物学检测中。

5. 实验室应拥有可以进行多种分析项目的装备和能力。

6. 工作的负荷量极大，而且往往随着工作深入开展会成倍地甚或按指数级数增长。

7. 测定数据的处理及结果的阐明不太容易。

同时还应注意到随着药物开发、研究的进展，高效、长效药物的出现，呈现出一种趋向：即药物服用的剂量越来越小；体液中药物浓度越来越低；对检测技术要求装备、费用越来越高<sup>[16]</sup>。所以，对体内分析方法学的研讨改进与选择性(专属性)、准确性以及效率、费用等几个方面提出了新的要求，这包括：

高度灵敏的定量方法的运用，一般要求最低检测量为  $10^{-9}$ ~ $10^{-7}$ g，乃至需要高达  $10^{-15}$ ~ $10^{-12}$ g。

高选择性的分离、分析方法的建立，合理的样品净化、分离手段的采用。

方法应达到所要求的精密度和准确度，稳定而较高的回收率

等等。

求解出具有实验与临床上有意义的参数和数据。

这就使得当前体内药物分析的方法，具有类型的多样性和综合性的特点，方法类型涉及到化学、物理化学、生物化学和放射示踪方法等等。最常用的为气相色谱法 (GLC)、高效液相色谱法 (HPLC)、荧光分光光度法、各种免疫竞争分析 (如放射免疫分析、RIA；酶免疫分析、EIA 等。) 以及各种联合技术的应用如气相色谱-质谱联用 (GC-MS) 薄层层析 (TLC)-放射示踪技术等。

在体内超微量的分析工作中，拥有并掌握先进的分离测定技术，对开展工作往往有决定性的作用。当然，就每一单位来说则每将有所侧重。

国外在方法学上的进展，有些值得注意的动向是：

1. 系统筛选 (筛分) 方法的建立 尤其在毒物及药物滥用、服药过量等方面，可以供快速、系统的检测一些未知样品；

2. 自动分析仪器的采用 尤其是专项或综合 (可作多项测定，有的达 18 种用途) 分析仪的采用；或自动化操作仪器的运用如全自动的高效液相色谱仪系列；此外，一些小型常备仪器的改革可大大提高效率，也值得注意。

3. 商品试剂盒 (Kit) 的供应 这种办法使得一些较复杂试剂得到方便的、成套的供应，并使方法易于普及和降低费用，在 RIA 与 EIA 等免疫测定中更属普遍。

4. 数据处理的电子计算机化 由测定的结果求解出具有实验与临床上意义的参数和数据，其中涉及到曲线的绘出、模型的建立、模拟方程的运算等等。由于体内模型的复杂性，这些问题的处理已到了非借助于电子计算机不可的程度，而即使一些较简单的模型其数据依靠不依靠电子计算机运算，在判断结论的精密性甚致可否性 (是正结论还是负结论) 上都有很大的差别。

5. 试验中心和协作网的建立 分工负责某些内容、项目的检测，分析质量管理，开展技术咨询、指导工作。国外一些实验中心宣称“每周七天、每天 24 小时开展服务工作”，其服务范围遍

及全球。

这些方法学的特点、问题和动向，也给体内药物分析提出了如何更切实、更有成效地进行人员培养和训练，以及在职工作人员的提高进修问题和积极开展科学研究等更高的要求。

## 二、样本的种类、取样与储存

### (一) 样本种类

采用何种体液以供体内药物分析之用，也是经常遇到的问题。原则上任何体液均可用来分析，但实际上最常采用的是比较容易得到的血样（血浆、血清、全血）、尿液、唾液。在一些特定情况下也有采用乳汁、泪液、脊椎液、汗液、胆汁、羊水、精液、粪便以及各种组织或其他接近有关药物作用点的检体<sup>[2,17]</sup>。

1. 血样 血浆 (plasma) 和血清 (serum) 是体内药物测定最常采用的样本，其中选用最多的是血浆。当药物在体内达到稳定状态时，血浆中药物浓度被认为是与药物在作用点的浓度紧密相关，且由于很多药物的血浆浓度已被测定可资借鉴。值得注意的是某些药物与血浆结合率低，这时血浆内药物含量与体内药物总量之比很低<sup>[18]</sup>（见表 1-1），也就是血浆药浓低。

血浆的取得是在加肝素或草酸等抗凝剂的全血经离心后分取，其量约为全血的一半。血清则是由血液中纤维蛋白元等影响

表 1-1 血浆蛋白结合和血浆内所含的药物总量<sup>[18]</sup>

蛋白结合率(%)	血浆内药物量/体内药物总量(%)
0	6.7
50	12
60	15
70	19
80	26
90	42
95	78
100	100

下引起血块凝结而析出的，血块凝结时往往易造成药物的吸附损失。

全血 (whole blood): 对大多数药物来说血浆浓度与红细胞中的浓度成正比，所以测定全血并不能提供更多的数据。而全血的精制较血浆、血清更显麻烦，尤其是在溶血后血色素等可能会给测定带来影响。

但有些药物 (如氯噻酮) 可与红血球结合，其动力学行为与在血浆中不同，则属例外；又如一些三环降压药物，对各别病人来说，在血浆和红血球的分配比率不是一个常数，故宜采用全血进行药物动力学的研究。

血样取样量受到一定限制，抽血比较麻烦。尤其是间隔时间较短的多次取样时，病人感到负担，不易得到配合，但随着高灵敏度测定方法的建立，取样量往往仅需 0.1ml，可改用刺破手指取血，从而减少病人的负担。

2. 尿液 (urine) 目前临床测定的样本除血浆和血清外，另一种最常用的样本是尿液。体内药物的清除主要是通过尿液排出，药物以原形 (母体药物; parent) 或缀合物 (扼合物、结合物; conjugate)、其他代谢物形式排出。尿液药物浓度比较高，收集量大，为某些生物利用度测定、药物动力学及药物代谢研究工作所感兴趣。

尿液样本一般取其某一较长时间间隔的尿样 (如 8、12 或 24 小时内) 进行测定，求其排泄量 (累计量)，以及通过分离、浓集供代谢物的鉴定之用。然而由于尿中药物浓度改变不直接反映血药浓度；加上尿液排出过程中，不仅包括肾小球的过滤，还包括肾小管的重新吸收；这样就使得尿液与血液中药液的相关性很不理想。受试者肾功能正常与否将影响药物的排泄，这些都将对测定结果的阐明带来困难。

此外，采集尿液还具有不可能在较短时间内多次取样，排尿时间较难掌握 (尤其是对婴儿) 以及不易采集完全的缺点。尿液还易受细菌污染，对样品的保存不利。

3. 唾液 (saliva) 由于人们发现唾液中药物浓度通常与

血浆浓度相关，因此利用唾液作为样本，就成为一种简便的、无损害的（non-invasive）并能反映血药浓度的方法<sup>[2,19,20]</sup>。唾液的采取可不受地点、时间的限制，病人亦无不快感觉、易于接受，且许多用于血浆测定的方法稍加改进或几乎可直接用于唾液的药浓测定。此外，一些药物（如狄戈辛、茶碱、苯妥英钠等）的唾液药浓与血中游离的（非结合型）药物的浓度相当<sup>[21]</sup>，从唾液药浓可推定血浆中游离药物的浓度，这也引起了大家的注意。血药浓度中游离型药物浓度与总浓度（游离型+结合型）的比率（F/T）、唾液与血浆浓度的比率（S/P），以及它们之间的相关性的研究成为临床分析的热门课题。一些药物的F/T和S/P比率见表1-2。唾液分析已开始作为临床治疗药物的监测之用<sup>[22]</sup>。

唾液是由腮腺、颌下腺、舌下腺和口腔粘膜内许多散在的小腺体分泌的，在口腔内合并成全唾液（混合唾液）。唾液的pH约为 $6.9 \pm 0.5$ 。唾液的分泌量每日约1~1.5升，个体差异较大，

表1-2 一些药物的血浆中游离型药物浓度/总的药物浓度以及唾液/血浆浓度比率的比较<sup>[21]</sup>

药物名称	血浆中药物F/T比率	S/P比率
氨基比林	0.85	0.80
安替比林	>0.90	0.83~1.0
酰胺咪嗪 (carbamazepine)	0.24~0.37	0.37
狄戈辛	0.77	0.78
非那西汀	0.60~0.70	0.60
苯妥英钠	0.10~0.14	0.09~0.11
扑痫酮	0.78~0.97	0.97~1.08
茶碱	0.41	0.52
苯巴比妥	0.40~0.60	0.30~0.38
水杨酸盐	0.20~0.55	0.35
甲苯磺丁脲	0.09	0.012
锂	1.0	2.2~2.3

同一人每日之间、每日之内亦有变动。由这些腺体所分泌的唾液可有相当大的差别，其组成受各种因素的影响，如刺激的有无、类型、强度与持续时间；食物；年龄；性别以及疾病和药物。总的来说，唾液含有体液所有的电解质（主要为  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Cl}^-$ 、 $\text{HCO}_3^-$ ），其中最主要的有机成分是粘液和淀粉酶。

唾液的采样一般是在漱口后 15 分钟，收集口内自然流出或经舌在口内搅动后流出的混合唾液，然后以 2000~3000rpm 离心 15 分钟，小心吸取上清液，供样品进一步分离净化之用。也有应用机械的（如口嚼石蜡薄片，但味道不好，且易造成样品污染及吸附；或吸吮一小块聚四氟乙烯，或玻璃大理石）或味觉的办法（如酒石酸、维生素 C）或二者兼有（嚼口香糖）的办法来刺激唾液流，促进唾液的分泌。但刺激不仅引起唾液成分的变化而且还大幅度地增加唾液分泌量。以酸刺激为例，唾液分泌速度可达 5ml/分，为无刺激基础分泌量的 8~20 倍。

用刺激的办法采取唾液的优点是短时间内可得到大量唾液；唾液的 pH 在 7 左右的狭小范围（未刺激唾液 pH 变异大），这对弱酸或弱碱性药物在唾液的排泄可能是主要的；可减少唾液/血浆分布比率的个体差异。但另一方面唾液中的药浓可能会受到刺激唾液流的影响。

此外，在一些特定目的情况下则采用血、尿、唾液以外的样品，如采取乳汁测定药浓，以判明乳汁中排出的药物可能对乳儿的影响（婴儿的排泄、代谢机能还不够发达，易受影响）。

O'Brien<sup>[23]</sup>在讨论“人乳中药物的排出”就药物（132 种）可能从乳中排出及对乳儿的影响，列表作了说明。

又如，泪液的 pH 为  $7.9 \pm 0.4$ ，pH 变动较小，泪液中的药浓与血清中非结合型的药物浓度很为一致。

在动物药理实验中，为了了解药物在各器官、组织的分布、积蓄或研究其代谢物，则往往采取肝脏及各种脏器组织制成匀浆及进行测定。

总之，样本类型的选取，取决于试验的目的，所获得结果能否说明问题以及是否易于取得、是否适于分析等等因素。

## **(二) 样本代表性与典型性**

由于分析时仅取很少一部分样本，以其结果说明整体，因此样品的代表性问题很重要。即使样品是取自封闭系统如血样，也会因取样时人们可能禁食或进餐而有变化。所以应力求使取样条件“标准化”（包括摄取标准膳食、控制饮水量）

对小动物每次取血样时，要注意使其不致改变正常生理上能负担的程度。又如尿及粪便则要保证在整个阶段中完整地取得，样品要混合均匀后分取。

取样时间及其间隔，涉及到实验设计，也是能否取得典型的有用参数的一个方面。通常取样应包括峰值及浓度变化迅速阶段的样品在内。这在药物动力学研究中尤为重要。

## **(三) 样品储存和稳定性**

关于样品储存和稳定性考察应予注意。

取样后最好是立即进行分析，因为即使冷藏（4℃）、冰冻（-20℃）有时也不能完全保证样品本身不起一点变化，所含药物不发生降解。

用血浆作为样品时，应尽快从全血中离心分离出血浆，一般至迟不超过24小时，分离后再行冰冻保存<sup>[24]</sup>。若不预先分离，则因冰冻有时易引起细胞溶解，阻碍血浆或血清的分离。

尿液多采取冷藏方法或加入甲苯以抑制细菌生长。

组织性样品多在-20℃速冻，无需加防腐剂。

Tin等<sup>[25]</sup>曾对含有咖啡因、茶碱、可可豆碱的血清，唾液和脊椎液样品进行HPLC测定时，考察了在不同储存条件下对色谱峰的影响。实验结果表明：将血浆和唾液在室温保存，结果使色谱峰严重变坏；冷藏后的样品同样显出对峰有着不良的影响，同时也出现额外的峰；冰冻的血浆其光谱峰未发生改变，这也说明血浆等样品以保存在冰冻状态为宜。

药物在生物样品中的稳定性问题，特别是标准对照样品多以聚集血清（pooled serum）加标准液制备而成的对照血清（control serum）的使用期限问题，时有文献探讨。Wilsky<sup>[26]</sup>曾就一些抗癫痫药物（苯巴比妥、扑痫酮等）在血浆中稳

定度问题，作了实验论证。一般来说认为在 4℃ 保存 6 个月不致影响其浓度，但当血浆中有细菌或霉菌生长时，则影响到药物的稳定性，浓度也就会逐渐下降，至于样品的 pH 对药物的影响也有待考查。

有人利用添加剂来增加生物样品中药物的稳定性，如 Yap 等<sup>[27]</sup>鉴于三硝基甘油在血清中很易降解，所以在含有三硝基甘油的血清中添加少量硝酸银，使最终浓度为 0.05M，能够有效地抑制药物的降解，但在全血中添加硝酸银则形成凝胶，致使用己烷提取时发生困难。

#### (四) 样品沾污

防止样品在采集、运送、储存、处理过程中受到沾污也是值得重视的问题。

例如，关于塑料容器的增塑剂带来的沾污，已被一些分析工作者所注意，有的作者提醒：塑料对样品的污染，可以在样品送抵分析实验室前即已发生。如应用塑料注射器抽取血样时，发现在色谱图上有沾污物的峰出现<sup>[28]</sup>。

由于样品沾污可使荧光测定中空白值剧烈增加，也可使荧光强度猝灭。这种影响样品荧光强度的污染来源，一般为去污剂、润滑油(涂活塞)、橡皮塞、滤纸等；玻璃仪器不够洁净、配制试剂的蒸馏水纯度不够也往往成为污染的原因。

### 三、样本制备——药物及其代谢物的分离、净化、浓集与结构改变

在进行体内药物及其代谢物测定时，除了极少数情况，将体液经简单处理后进行直接测定外，通常在最后一步测定之前，需要采用适当的样本制备，以进行分离、净化(纯化)、浓集，必要时尚需对待测组分进行结构的化学改变，然后进行测定。

所以，样本制备是体内药物分析极其重要的一个环节；也往往是分析中最困难、最繁复的一部分。样本制备也是为了使样本经过处理达到适应和符合测定方法所要求的程度，以提高测定的灵敏度和专属性。样本制备还是有关某一方法是否可供实用，可



接受作为常规方法以及决定测定工作的效率的主要因素之一。

样本制备涉及很多方面，总的来说需要考虑：(1) 如何根据分离的基本准则采取相应的分离步骤和净化技术；(2) 如何按照最后一步测定方法的性质及对样品的要求，制订出操作步骤；(3) 如何达成分析任务所提出的各项要求(灵敏、专属、可靠等)。

对于分离方法的选择，有的作者<sup>(29)</sup>从样品中待测组分的性质、分析的要求、分离的数量和样品的数目等，归纳出十个准则：亲水-疏水性；离子-非离子型；挥发-非挥发性；介质的简单-复杂；定性-定量检测；个别组分-一组组分；分离-制备；净化-回收；成本-速度；以及个人习惯与可能得到的设备等，可供考虑与借鉴。

考虑到体内药物分析具有在复杂体系中测定痕量物质这样一个特点，还应估计与考虑到微量测定中的一些特殊问题(例如样品的吸附损失、样品的稳定性、回收率的重现等)；各种干扰物对测定的影响等。这些均应在样品制备中予以考虑。

显然，分离与净化等步骤也受到最后测定方法性质的制约。例如，最后一步测定方法不具有高的分辨力(如紫外分光光度法)与兼有分离作用的方法(如GLC和HPLC)，则前者分离纯化的要求就要比后者要高；又如当使用放射性标记药物于体内代谢研究，当要求测定其原形药物及已知代谢物时，则其样品处理，一般来说不要求很苛刻，而在各种免疫测定中通常不必考虑药物的分离，仅需要采取简单的浓集(溶剂提取步骤)，这是由于免疫测定本身具有很高的特异性。

鉴于分析对象与体液、组织等的复杂性，因此很难就其样品处理规定一个固定的程序与方式，而必须结合实际要求和情况灵活运用各种方法和手段来解决面临的问题。

下面主要就样本制备中一些共同问题分述如下：

### (一) 去除蛋白

去除蛋白是血浆、血清及组织匀浆等样品的最先的处理步骤。大多数药物进入体内很快与蛋白形成结合物(Bound)与游离(Free)药物处于平衡状态。为了测定体液中药物的总浓度