

生物药物分析

曾经泽 编著

1.6

中国医药科技出版社

内 容 提 要

本书分为总论与各论两部分。总论介绍基本概念、体内药物存在状态及其与分析的关系和样品的预处理方法等。各论介绍光谱法、层析法和竞争蛋白结合分析等三类主要分析方法。光谱法包括比色法、紫外分光光度法和荧光法；层析法包括气相层析、高效液相层析、气-质联用和薄层层析；竞争蛋白结合分析法包括放射免疫、酶免疫和荧光免疫等。此外，各论还介绍酶分析法和同位素技术的应用和生物药物分析方法的设计与评价。

本书重点讨论如何将基础分析应用于生物样品中药浓度的测定，可供医院药师、临床医师、医药院校师生和从事有关研究工作的科技人员参考。

生 物 药 物 分 析

曾经泽 编著
伍朝笈 审阅

*
中国医药科技出版社 出版
(北京西外北礼士路甲38号)
河北昌黎县印刷厂 印刷
新华书店北京发行所 发行

*
开本787×1092mm^{1/32} 印张11⁰/16
字数253千字 印数1—3,200
1990年2月第1版 1990年2月第1次印刷
ISBN 7-5067-0081-6/R·0082
定价4.90元

前 言

作者曾于1983年编写《体内药物分析》讲义一册，该讲义是国内以方法学为系统介绍生物样品中药物分析方法的首次尝试，已作为三届全国临床药学进修班及五届研究生课教材使用，并在校际对口专业间进行了交流。当前，随着学科的发展以及科研、教学中新资料的积累，深感有重新编写新书的必要。在这次编写过程中，广泛参考了国内、外最新资料，将原讲义大部分内容更新，并使用《生物药物分析》这一书名。

随着临床药理学和临床药理学的迅速进展，体内药浓测定技术已形成新兴学科——生物药物分析 (biopharmaceutic analysis)。当您迈入这一新领域时，就会发现生物药物分析虽然是基于分析化学之上的学科，但有其自身的方法学特点，同时您也会感觉到仅具备一般药物分析知识（化学分析与仪器分析）是不够的，因为您所面临的微量被测组分存在于复杂的生物介质之中，而浓度又呈动态变化，此外分析方法设计还必须同临床药理学、临床药理学及药代动力学研究课题相结合，这就必须了解药物在体内存在的状态及其与分析的关系，必须结合人（或动物）体内情况来设计药物分析方法。本书将在分析化学基础上阐述如何把有关的分析方法和技术运用于生物样品分析中，以及介绍各类分析方法的原理、特点、方法设计与评价等，旨在引导读者正确应用方法和设计新方法。

全书共十二章，其中第十章（酶分析法）由梁茂植同志编写。在本书编写过程中，作者结合自己在国内、外的科研实践，广泛参考了最新文献、资料，大胆抒以己见，提出了方法学中评价标准等若干问题。但由于水平有限，书中错误疏漏在所难免，恳望读者不吝批评指正。

本书的出版承蒙北京协和医科大学陈兰英主任药师和本校李正义主任药师的大力支持，上海医科大学陆明廉教授对本书初稿提出很多宝贵意见，谨致谢意。

作者

1987年5月 于华西医科大学

目 录

第一篇 总 论

第一章 概述	3
一、生物药物分析的重要性和意义.....	3
(一)研究药物体内过程的重要性.....	3
(二)生物药物分析与其它学科的关系.....	9
二、生物药物分析的对象、任务和特点.....	11
(一)生物药物分析的对象.....	11
(二)生物药物分析的任务.....	12
(三)生物药物分析的特点.....	16
第二章 体内药物存在的状态及其与分析的关系	18
一、药物与血浆蛋白结合.....	19
(一)游离型药物和结合型药物.....	19
(二)药物血浆蛋白结合率测定法.....	20
(三)药物血浆蛋白结合与生物药物分析的关系.....	26
二、药物代谢.....	30
(一)氧化.....	32
(二)还原.....	34
(三)水解.....	34
(四)乙酰化.....	35
(五)结合.....	35
第三章 测定前样品的处理	38

一、生物样品的一般处理原则·····	38
(一)样品均匀化·····	38
(二)去蛋白处理·····	39
(三)冷冻干燥·····	46
(四)结合物水解·····	47
(五)生物样品的贮存·····	48
二、各种样品的处理·····	50
(一)血液·····	50
(二)尿样·····	53
(三)唾液·····	54
(四)粪便·····	57
三、组分分离及其它与测定有关的技术·····	57
(一)药物及代谢物的萃取·····	58
(二)组分浓集方法·····	79
(三)衍生化处理·····	80

第二篇 各 论

第四章 光谱法 ·····	104
一、比色法和紫外分光光度法原理简介·····	104
二、比色法·····	105
(一)在代谢型测定中的应用·····	105
(二)在药浓监测中的应用·····	107
三、紫外分光光度法·····	109
(一)体液样品不经处理直接测定·····	109
(二)药物经过萃取、纯化后测定·····	110
(三)通过改变吸收光谱后测定·····	113
四、荧光法·····	119

(一)原理简介·····	119
(二)应用实例·····	123
第五章 气相层析法 ·····	129
一、概述·····	129
(一)载气·····	130
(二)进样室·····	130
(三)柱温·····	131
(四)层析柱·····	131
(五)检测器·····	133
二、顶空分析法·····	136
三、生物样品中药物浓度定量方法·····	139
(一)内标加入的必要性·····	140
(二)内标的选择与评价·····	142
(三)多内标法·····	152
(四)内标的应用·····	154
四、气相层析法在生物药物分析中的发展趋势·····	157
五、应用实例·····	158
第六章 高效液相层析法 ·····	165
一、概述·····	165
(一)仪器简介·····	166
(二)常用层析方法·····	170
二、分配层析的应用·····	173
(一)化学键合相及反相HPLC·····	173
(二)离子抑制及离子对HPLC·····	176
三、定量方法·····	181
(一)内标法·····	181
(二)外标法·····	182

(三)标准加入法·····	182
四、应用实例·····	186
第七章 质谱法及其联用技术 ·····	198
一、概述·····	198
二、定量方法·····	202
(一)组分的电离方法·····	202
(二)选择性离子监测·····	205
(三)内标法定量·····	206
三、应用·····	208
(一)质谱直接进样技术·····	208
(二)气-质联用·····	210
第八章 薄层层析法 ·····	221
一、薄层定量方法简介·····	221
二、应用实例·····	226
第九章 竞争蛋白结合分析 ·····	236
一、概述·····	236
(一)基本原理·····	236
(二)方法分类·····	241
(三)抗体的制备·····	242
(四)抗体质量和对免疫分析的评价·····	248
二、放射免疫分析·····	255
(一)标记药物的制备·····	255
(二)结合标记药物与游离标记药物的分离·····	258
(三)标准曲线·····	261
(四)方法的优缺点·····	262
(五)应用实例·····	263
三、荧光免疫分析·····	267

(一) 荧光标记物·····	268
(二) 荧光免疫分析法·····	269
四、酶免疫分析·····	277
(一) 非均相酶免疫分析·····	280
(二) 均相酶免疫分析·····	282
五、其它竞争蛋白结合分析·····	289
(一) 自旋标记免疫分析·····	290
(二) 浊度免疫分析·····	291
(三) 其它竞争蛋白结合分析·····	292
第十章 酶分析法·····	294
一、概述·····	294
二、在生物药物分析中的应用·····	296
(一) 酶反应中形成产物的测定·····	296
(二) 辅助因子浓度的监测·····	301
(三) 酶抑制剂的测定·····	304
第十一章 同位素在生物药物分析中的应用·····	311
一、常用同位素·····	311
(一) 放射性同位素·····	311
(二) 稳定性同位素·····	314
(三) 使用中的某些问题·····	315
二、同位素的检测·····	316
(一) 电离辐射与吸收光谱·····	318
(二) 闪烁体溶液及闪烁计数测定·····	319
三、放射性同位素在生物药物分析中的应用·····	325
(一) 放射性层析·····	325
(二) 同位素稀释分析法·····	327
(三) 放射自显影技术·····	333

(四)放射性呼吸测定法·····	334
(五)同位素衍生物分析·····	336
第十二章 生物药物分析方法设计与评价 ·····	337
一、生物药物分析方法设计·····	337
(一)建立方法前应了解的内容·····	337
(二)分析方法的选择·····	338
(三)分析方法的建立·····	340
二、生物药物分析方法评价·····	353

第一篇 总 论

分析化学与其它学科相结合，迄今已繁衍出很多新的分支，生物药物分析即为其中之一。就分析化学方法学本身而言，其基本理论和仪器分析的基本原理在分析化学各分支中并无差异，然而却不能将有关理论和原理千篇一律地应用到分析化学的各领域中。作为一名分析工作者在接受一个生物样品后，除按一般药物分析要求对被测组分的理化性质应有所了解外，还必须掌握以下几点：

1. 分析的目的、意义及与临床应用或科研课题的关系。
2. 被测组分在样品中所处的物理、化学状态。
3. 被测组分在样品中的含量以及共存的干扰杂质情况。

与一般以控制药品质量为目的的药物分析相比，生物药物分析的对象虽然也是药物，然而生物样品中药物的含量通常很低（一般为 μg 、 ng 水平），而微量药物又处于极其复杂的生物介质中。生物样品中的药物决非药物与生物材料的机械混合物，药物在体内经过吸收、分布、代谢、排泄等过程，其化学结构和物理状态都可能发生变化。化学结构变化主要是药物在代谢酶的作用下产生一个或多个代谢物，物理状态的变化主要是药物及代谢物可与血浆蛋白结合。另外，药物存在于大量的生物介质中，样品内不仅药物浓度低，而且存在着众多的干扰杂质，除少数测定方法外，一般测定前都需要将药物自生物介质中分离出来，经纯化和浓集后测

定。因此，生物样品进行分析前，必须进行适当的预处理。

本书第一、二、三章将系统介绍生物药物分析的意义、对象、任务和方法学特点，讨论药物在生物样品中的化学状态和物理状态及其与分析的关系，并介绍样品预处理的具体方法和操作技术。有关这方面的知识是生物药物分析至关重要的内容。预处理技术研究是当前生物药物分析发展的一个新方向，样品预处理是否适当，往往是整个分析方法成败的关键。因此，在具体分析方法介绍之前，有必要对这方面的知识进行较为详细的讨论。

第一章 概 述

一、生物药物分析的重要性的意义

(一) 研究药物体内过程的重要性

药物质量和剂量与临床疗效的密切关系已为人们熟知，并引起了足够重视。对于药物的质量，已按照国家药典等有关质量标准严加控制，而剂量则由临床医生视病人的病情、生理、年龄等酌情增减，以期达到用药的安全和有效。长期以来，人们都是将药物的剂量与其药理作用强度直接联系起来。近年来，随着临床药理学、临床药学和生物医学等方面研究的进展以及现代分析技术的应用，进一步洞察了药物在体内的作用规律。经研究发现：药物在体内的药理作用强度和类型，一方面取决于体细胞上药物受体接触的药物化学结构及其浓度；另一方面取决于受体对药物的敏感性。这两方面决定了药物的药理作用强度。药物-受体间的相互作用服从质量作用定律，呈现吸附和解吸附动态平衡关系。



R代表药物受体，D代表药物分子，RD代表药物-受体复合物，E代表药理作用。被占领的受体数量，取决于受体周围的药物浓度，^①以及单位面积或单位受体容积内受体总数。当被占领的受体数增加时，药物的药理作用强度增加。由此可见，药理效应与RD的浓度成正比，而生成RD的浓度高低，又与R和D的多少密切相关。例如：糖尿病患者体内胰岛素受体的数量以及对胰岛素的亲和性都会改变；因而会导致

药物的药理作用强度改变。又如：异丙肾上腺素和去甲肾上腺素等拟肾上腺素类药物，它们的作用强度可能因预先使用的其它肾上腺素能药物或某些疾病而改变，从而导致对药物反应性改变。有关这方面的研究，属于药效动力学(pharmacodynamics)范畴。然而，在大多数情况下，受体的组成是相对稳定的。在药代动力学研究中，就是在不考虑受体本身变化的前提下，直接将药物药理作用强度与体细胞上受体接触的药物浓度相联系，即认为作用部位的药物浓度是直接与该药物的药理作用强度相关的。但欲直接测定作用部位的药物浓度是很困难的，因一般作用部位所在的体内脏器、组织中有足够的血流量，并且流速较快，而药物又主要是通过血流运输到作用部位的，所以，血药浓度可作为作用部位药物浓度的可靠指标。这就是说：药物的药理作用强度不完全取决于摄入的剂量，而是取决于血药浓度。

四十年代后期，Brodie等人发现药物的药理作用与血药浓度密切相关，相同的血药浓度对不同种属的动物可产生极为相似的药理反应。有些药物虽然有效剂量种属差异很大，而其有效血药浓度却很接近。然而，对某些药物而言，同种属中的个体欲获得相近的血药浓度，剂量相差可达10—20倍之多，即明显存在“化学上等价而生物学上不等价”的问题。这是由于从药物进入体内到产生一定的血药浓度，要经过一系列过程。例如，口服某种药物之后，要经过吸收、分布、代谢和排泄等一系列体内过程，见图1-1。

从图1-1可知，从药物进入体内到产生一定的血药浓度，这一过程受很多因素的影响。可将这些影响因素分成两类：

1. 内因

(1) 生理 性别、年龄和妇女妊娠期等对某些药物体内

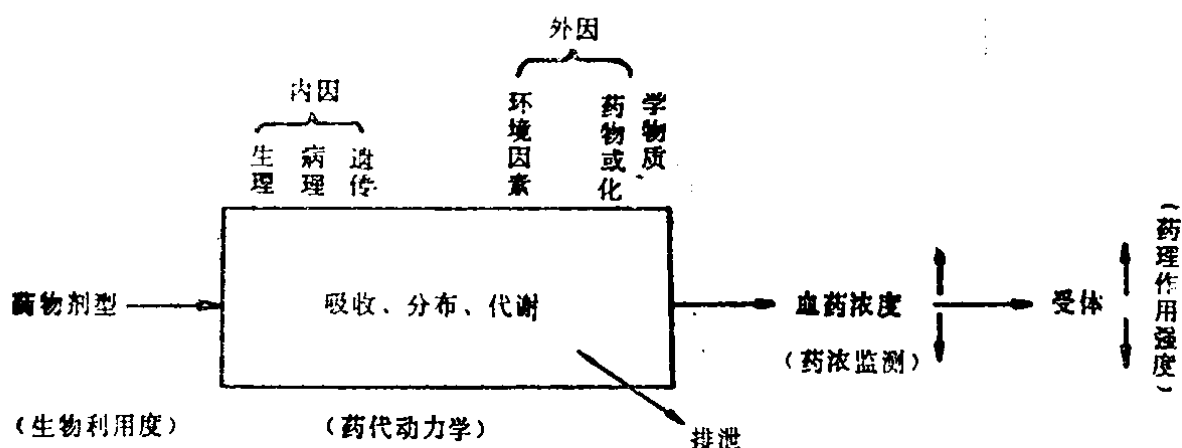
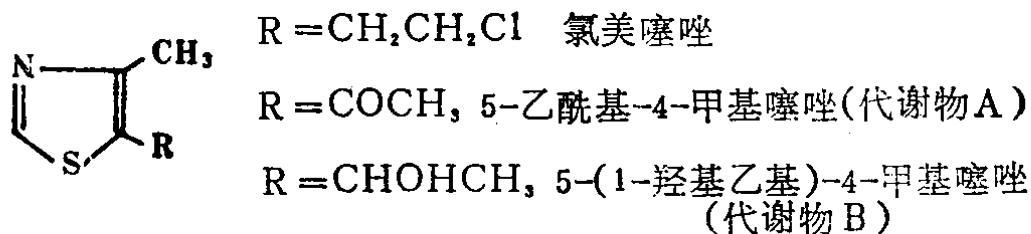


图 1-1 药物体内过程及影响血药浓度的因素

过程有影响。例如，某些首过效应高的药物如催眠镇静药氯美噻唑 (Chlormethiazole) 进入体内后大部分经肝脏代谢失去活性。氯美噻唑及其代谢物的化学结构如下：



其代谢程度在年轻人体内显著高于老年人，见图 1-2^[1]，因此，影响到达体循环的药物浓度，从而影响疗效。

(2) 病理 胃、肠道疾病影响药物的吸收；肾脏疾病影响药物的排泄；肝脏疾病影响药物的代谢。例如：正常人肝脏对氯美噻唑有较高的代谢作用，口服给药后的血药浓度明显比静脉注射低；而肝硬化病人因肝脏代谢药物的能力差，口服和静脉注射氯美噻唑的血药浓度接近相等，见图 1-3^[2]，若剂量控制不当，有可能引起中毒危险。

(3) 遗传 遗传因素决定机体对药物的反应，其主要表现于对药代动力学的影响。由于种族之间以及同种族个体之间药物代谢酶活性有先天差异，影响代谢药物的能力，因此

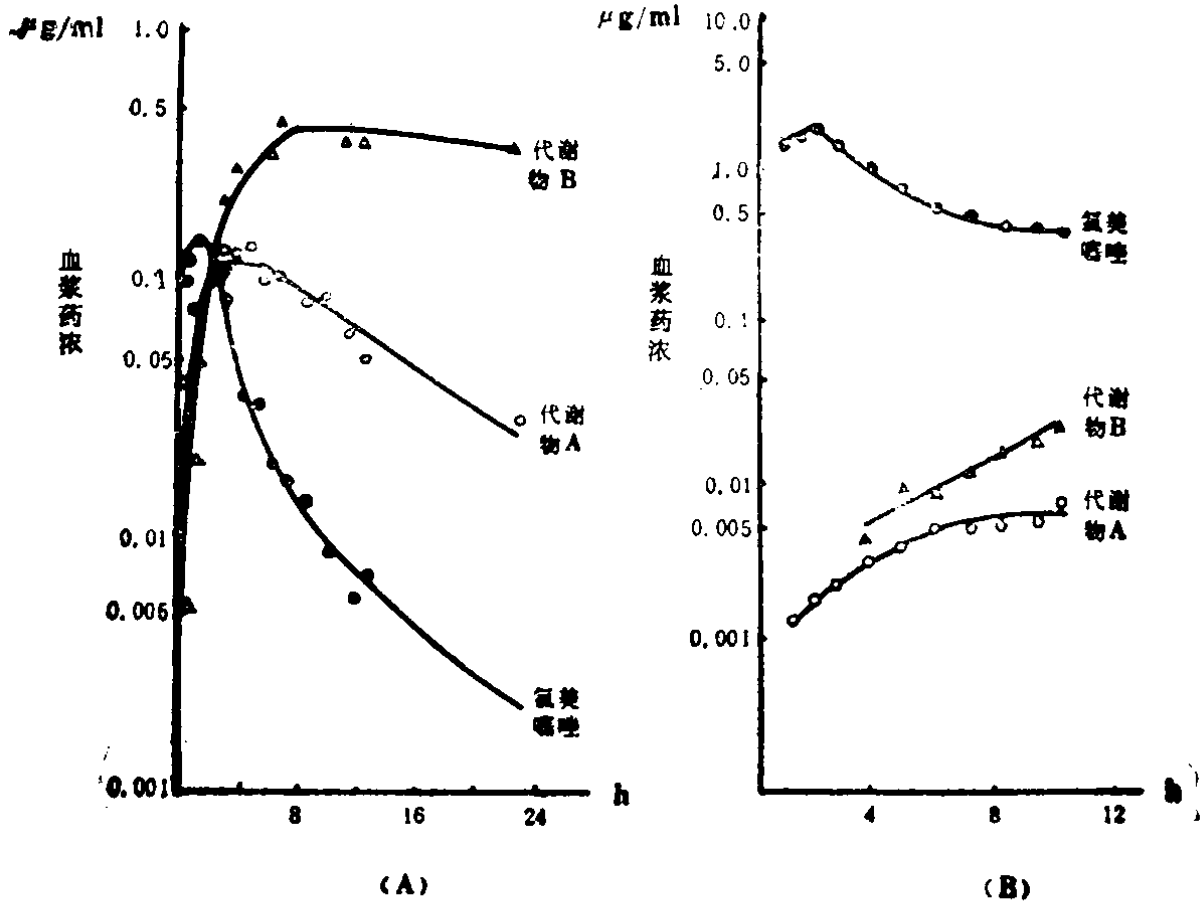


图 1-2 口服600mg氯美噻唑后的药-时曲线

(A)为年轻人;

(B)为老年人

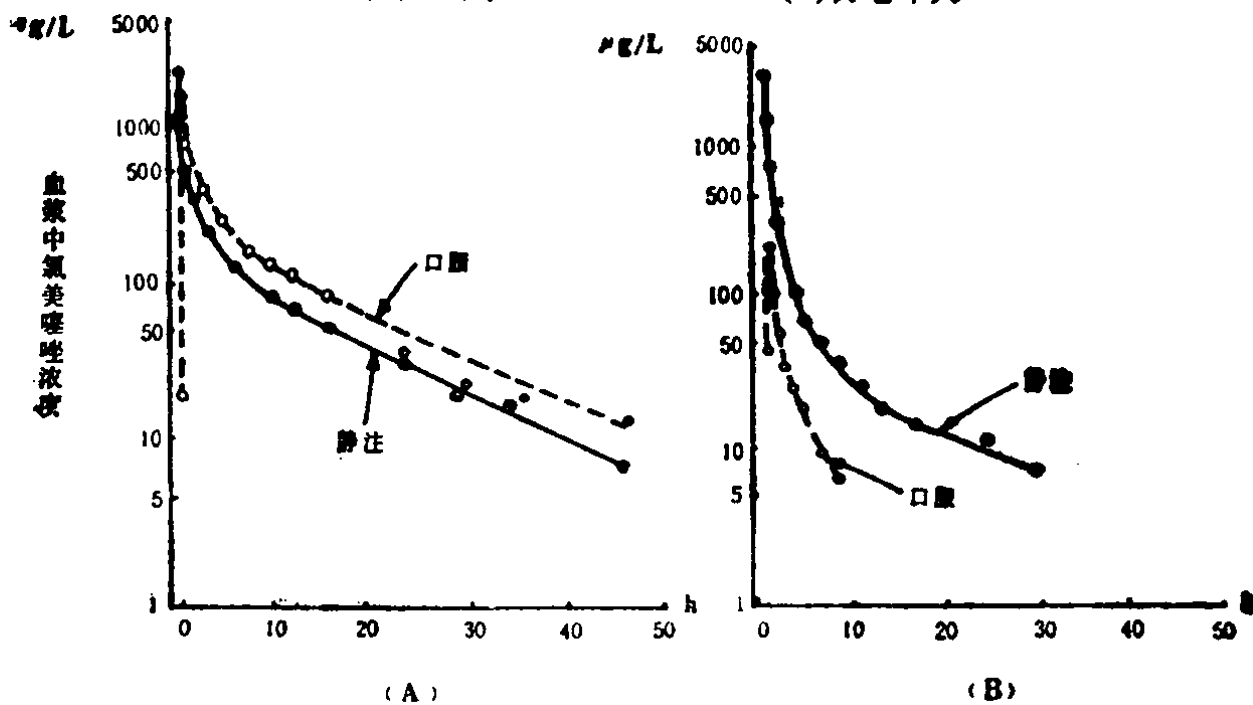


图 1-3 口服和静脉注射192mg氯美噻唑后的药-时曲线

(A)为肝硬化病人;

(B)为健康人

用药个体代谢有快型和慢型之分。这种先天药物代谢能力的差异，影响血药浓度并影响药物疗效。例如，因体内乙酰基转移酶活性差异，可将用药个体划分为乙酰化代谢快型和慢型^[3]，以异烟肼体内乙酰化代谢为例：当口服一定剂量的异烟肼之后，快型血中异烟肼浓度比慢型低，而乙酰异烟肼（代谢物）浓度却较高。又如，因氧化代谢酶（细胞色素 P-450 等）活性差异，也可将用药个体划分为氧化代谢快型和慢型^[4]。现以降压药异喹胍体内氧化代谢为例，有人定量地研究了血中和尿中异喹胍的浓度与站立时收缩压降低数值的关系，发现血药浓度同血压降低数值成正比，而快型血药浓度显著低于慢型^[5]。有人进一步研究证明：代谢快、慢型是由遗传型决定的，即受体细胞内染色体上一对等位基因控制^[6]。由于口服同量药物之后，代谢快型和慢型体内血药浓度有显著差异，从而影响药物疗效，并与药物毒性和副作用密切相关。因此，建立药物及其代谢物体内分析方法，研究药物体内代谢动力学有重大意义。

2. 外因

(1) 环境因素 如气候及其它环境条件改变有可能影响药物的体内过程。

(2) 药物或化学物质 同时使用的其它药物或由于环境污染而进入人体内的某些化学物质，可通过在体内的相互作用影响第二种药物的体内过程。对药物而言，这就是药物体内相互作用。如近年来发现组胺 H₂受体阻滞药西咪替丁为一种酶抑药物，当和某些药物同时使用时，能抑制后一种药物的氧化代谢，导致血药浓度增高。如西咪替丁与心得安合用时，能升高心得安的血药浓度，如图1-4^[7]。

除上述因素外，人体的昼夜节律对药物的作用或药物的