第 1 章　体内药物分析概述

第 1 节　　体内药物分析的重要性及与其他学科的关系

一、体内药物分析的重要性

为了达到药物在临床上的使用安全、合理和有效，人们越来越要求了解和提供药物在体内的更多信息，即需要对药物及其制剂的体内吸收、分布、代谢和排泄过程、作用机制及药物效应进行研究，因而促使药物动力学、生物药剂学、临床药理学等一些新兴边缘学科的发展与建立。这些新兴学科的研究内容都涉及到体内药物浓度与机体药理效应的相互关联、药物本身及其体内代谢物的命运与历程。因此也促使体内药物分析迅速成为一门独立的新兴学科。

近年来，随着临床药理学、生物医学和分子生物学等方面研究的进展，以及现代分离分析技术的应用，进一步认识了药物在体内的作用规律。认为药物在体内的药理作用强度，一方面取决于体细胞上药物受体接触的药物本身的化学结构及其浓度；另一方面取决于受体对药物的敏感性。通过体内药物分析的现代分离、分析定量手段，可获得药物在体内的各种药物动力学参数和吸收、分布、代谢和排泄信息等；获得药物在体液或组织中的有效浓度，科学地评价药物及其制剂在体内过程中的内在质量；根据血药浓度设计给药方案，以便更好地解决药物使用过程的个体差异，使临床用药趋向于更加安全、合理和有效。因此，在 1979 年的《治疗药物监护》杂志创刊号中指出：“ 历史必将证明体液中药物浓度的定量技术是药理学最大进展之一。 ”不言而喻，临床药理学的深入研究与发展，离不开体内药物分析的现代分离、分析的定量技术，离不开体液或组织中药物分布数量的定量测定。

二、体内药物分析与其他学科的关系

体内药物分析是随着药物动力学、生物药剂学、临床药理学及临床医学等学科的发展而兴起的。体内药物分析兴起与发展的同时又促进了这些新兴边缘学科的发展，因此它们之间的关系是非常密切的。

(一)与药物动力学及生物药剂学的关系

药物动力学是研究药物及其代谢物在体内的吸收、分布、代谢和排泄等过程的量-时变化或血药浓度随时间变化的动态规律的一门新学科。利用体内药物分析技术，定量地测定血药浓度或尿药浓度，根据动力学原理和数学分析方法，求出一系列动力学参数和药物制剂的生物利用度参数，以更科学的方法来评价药物及其制剂的内在质量，对指导临床合理用药，确保临床用药的安全性和有效性等方面具有重要意义。

(二)与临床药理学的关系

临床药理学是近年来获得飞速发展的一门新兴学科，重点研究药效学、毒副反应的性质和机制，以及药物相互作用机制等。由于临床药理学是研究人体和药物之间的相互作用关系与规律，因此需研究药物进入体内对人体生理与生化机能影响和临床效应，以及药物的作用原理；研究药物在正常人与患者体内的吸收、分布、代谢和排泄规律；研究药物可能发生的毒副反应、过敏和继发性反应等。这些研究的基础需要了解药物在体内各种体液和组织中存在的数量与质量。因此，准确测定人体内药物分布、存在的数量与质量，仍是体内药物分析学科研究的重点。

需要全本请访问 www.ertongbook.com

（三）与治疗药物浓度监测及临床药物治疗学的关系

在临床药学研究过程中发现，有许多药物的治疗指数很窄，其中毒剂量与治疗剂量之比小于 10 再加上药物的个体差异，给这些药物的临床应用造成极大的困难，不是达不到预期的治疗效果，就是因用量过大引起毒副反应。例如强心药地高辛，因其治疗剂量与中毒剂量范围很小，个体差异又较大，故在给药剂量方面应注意因人而异，且需在用药期间严密观察病情变化，灵活调整剂量。为进一步提高这些药物的临床治疗有效水平，目前最科学的给药方案是通过血药浓度监测，实现给药方案个体化，使血药浓度维持在安全、有效的水平。由此可见，临床药物治疗学的研究与开展，需要血药浓度监测，而血药浓度数据的获得，则需要体内药物分析的现代分离分析技术。

第 2 节　体内药物分析的对象、任务与特点

一、体内药物分析的对象

体内药物分析，是通过分析手段了解药物在体内数量与质量的变化，获得各种药物动力学参数、代谢的方式和途径等信息。从而有助于药物生产、实验、研究和临床等各个方面，对研究的药物作出正确的估计与评价。因此，凡是体内药物到达之处，如各种体液、器官、组织和排泄物等，都是体内药物分析的对象，其中血液为最常用的生物样品。因为血药浓度与药理作用密切相关，以血药浓度对时间建立的药-时曲线，是研究药物吸收、分布、代谢和排泄以及影响药物体内过程各种因素的重要手段，也是衡量或评价药物内在质量的重要指标之一。除血液之外，还有尿液、唾液、胆汁、淋巴液、脑脊液、乳汁、汗液、性腺分泌液和粪便等也是分析的对象。

在新药研究过程中，临床前的药理、毒理实验及其体内过程的研究，首先要在动物身上进行。因此，体内药物分析的对象不仅是人体，而且还包括动物。

二、体内药物分析的任务

体内药物分析是随药物动力学、临床药学及临床药理学的深入研究而迅速发展起来的。因而，首要任务是为这些学科的深入研究提供准确、灵敏、可靠的分析方法。随着体内药物分析这一新兴学科自身的迅速发展，其任务也包括分析方法学的研究。因此，体内药物分析的任务目前可归结为：

（1）进行体内各种体液、组织、器官和排出物中药物及其代谢物的分离测定。

（2）进行新测定方法的研究、开发，以供 5 项临床常规测定之用。

（3）进行分析质量管理工作，提高测定技术和效率，以便获得快速、准确、可靠的测定结果。

（4）进行方法学研究，及时为相关学科的研究提供合理的、最佳分析条件与方法，估计、评定各种方法能达到的灵敏、专属和准确的程度。探讨各种方法应用于体内药物分析中有规律性的问题，以便使本学科迅速发展。

（5）参与相关学科研究中对获得的分析结果的阐明工作，使所获得的测定数据更有助于说明问题。

三、体内药物分析的特点

与常规药物分析相比，体内药物分析在选择性、灵敏度和分析对象等方面都有许多差异。原料药物在质量控制时，首先做真伪鉴别、纯度检查，最后测定含量。制剂与复方制剂分析，不但要考虑赋型剂对药物测定的干扰，而且需要考虑各种药物之间的相互干扰，因此

需用具有较高选择性和专属性的分析方法进行测定。与原料药物和制剂分析相比，生物样品更为复杂，微量药物分布在大量生物介质之中，样品中含有大量内源性干扰杂质，随样品种类和疾病情况不同有所不同，而且很多药物在体内经过代谢可产生结构和性质完全不同的多种代谢物。因此，使微量药物及其代谢物从生物介质中的分离和分析非常困难，对分析方法的选择性和灵敏度要求更高。

综上所述，体内药物分析具有如下特点：

（1）样品量少，不易重新获得。样品中被测定的药物及其代谢物浓度很低，因此当被测组分被分离提取之后，常采取浓集方法，以富集、净化被测组分。

（2）样品复杂，干扰杂质多。体液和组织中的内源性物质不仅能与药物及其代谢物结合，而且还常干扰测定。因此，样品要经过分离、纯化后才能准确地测定。

（3）供临床用药监护的检测分析方法，要求简便、快速、准确，以便迅速为临床提供设计合理的用药方案及中毒解救措施。

（4）实验室应拥有多种仪器设备，可进行多项分析工作。

（5）工作量大，测定数据的处理和阐明有时不太容易。因此，需要相关学科的参与。

第 3 节　体内药物分析样品的种类与储存

一、样品的种类

体内药物分析最常用而且易获得的分析样品种类有：血样、尿样、唾液和粪便。但在一些特定的情况下也可采用乳汁、泪液、脊髓液、胆汁、羊水以及各种组织作为分析的样品。

（一）血样

在体内药物分析中最常采用的血样为全血、血浆和血清，其中选用最多的是血浆。因为当药物进入体内达到稳定状态时，血浆中药物的浓度与药物在作用点的浓度紧密相关，可以反映药物在体内靶器官的状况，能真正代表体循环中的血药浓度，才能供作计算有关药物动力学参数之用。因此，直接抽取动脉血或自心脏取血样是最理想的方法，但这一方法仅适用于动物实验研究，目前使用较多的方法是自静脉采血。

血浆的取得是在加肝素、枸橼酸、草酸盐等抗凝剂的全血经离心后分取，其量约为全血量的一半。实际工作中制备血浆时最常用的抗凝剂为肝素，它是一种含硫酸盐的粘多糖，常用其钠盐、钾盐，它能阻止凝血酶原转化为凝血酶，从而抑制纤维蛋白原形成纤维蛋白。一般 1ml 的全血需加 0.1～0.2mg 的肝素，加入血样后立即轻轻旋摇，但勿太猛烈，以免导致血细胞破裂。

血清则是由血液中纤维蛋白原等影响下，引起血液凝结而析出的澄清黄色液体，经离心其量约为全血量的 30%～50% 。在室温高时，血凝过程进行得很快，宜在血凝后半小时内分离血清。当室温低时，血凝过程较慢，可将血液置 37℃ 温度下加速血清析出。

全血也应加入抗凝剂混匀，防止凝血。对大多数药物来说血浆浓度与红细胞中的浓度成正比，所以测定全血也不能提供更多的数据。由于全血的净化较血浆和血清麻烦，特别是溶血后，血色素等可能会给测定带来影响。

血样取样次数与时间间隔的选择，应随测定目的不同而有所差异。例如药物动力学参数的测定，需测绘药物在体内的药-时曲线。应根据动力学曲线模型、给药方式来确定取样次数与时间间隔，要在曲线首尾及峰值附近或浓度较大处取样。药物动力学参数测定中常用的

取样次数见示意图 1-1。

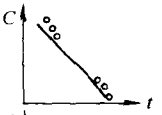
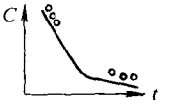
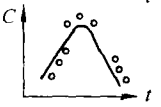
模型类型	给药方式	采样次数示意（圆点处）	模型类型	给药方式	采样次数示意（圆点处）
单室	静注		双室	静注	
单室	血管外给药		双室	血管外给药	

图 1-1　药物动力学测定中采样次数示意图

如测定血药浓度，进行治疗药物浓度监测，则取样时需在血中药物浓度达到稳态后才有意义。一般情况下需要连续给药，经过 6 个半衰期，血药浓度达到稳态。由于每种药物生物半衰期不同，到达稳态的时间不同，所以服药或注射后采血测定时间也不同。

（二）尿 样

尿药测定主要用于药物剂量回收，药物肾清除率、药物体内代谢及生物利用度研究，也可用于乙酰化代谢和氧化代谢快、慢型测定等。体内药物消除主要是通过尿液，以药物原形或代谢物及其缀合物形式排出体外。因尿药浓度较高，通常变化较大，所以应测定一定时间内排入尿中药物的总量，这就需要测定在规定时间内的尿液体积及尿药浓度。由于尿药浓度改变不直接反映血药浓度，加上尿液排出过程中，不仅包括肾小球的滤过，还包括肾小管的重新吸收，这样就使得尿液与血液中药物浓度的相关性很不理想。受试者肾功能正常与否将影响药物的排泄，这些都对测定结果的阐明带来较大的困难。

尿中药物大多呈缀合状态。药物经第二阶段代谢后与体内某些内源性物质如葡萄糖醛酸结合或与药物本身的某些代谢物结合，然后排入尿中。所以为了测定尿液中药物总量，无论是直接测定或萃取分离之前，都需要将缀合的药物游离。有些药物仅需要较温和的条件即可使之游离，但有的则需要较剧烈的方法。有些不稳定的药物则可采用酶解方法。

尿样的优点：在所有体液样品中，尿样最容易获得，并且样品量大，取样次数可增加，内含药物浓度高。因健康人尿液中不含蛋白质，不需进行去除蛋白处理，所以常用作药物体内代谢研究的首选样品。

（三）唾 液

用唾液作为药浓监测及药物动力学研究的报道逐渐增多，唾液中的药物浓度通常与血浆浓度相关，即可用唾液中药物的浓度来反应血浆药物浓度。应用唾液作为体液样品有很多优点，首先是样品容易获得，取样是非伤害性的，采样不受时间、地点的限制，病人无不快感觉，极易为儿童接受。有些药物，如地高辛、苯妥英钠和茶碱等，在唾液中的浓度与血浆中游离的或未与蛋白结合的药物浓度相等。可从唾液药物浓度推定血浆中游离药物浓度，具有实际应用价值，已引起人们的注意。许多用于血浆药物浓度的测定方法，只需稍加改进或不改进即可直接用于唾液中药物浓度测定。进入唾液中药物的量与血液中药物在生理 pH 值（7.4）下电离度的程度以及蛋白结合程度有关，非电离的药物在唾液中的浓度高些。但有些与蛋白结合百分率较高的药物，其在唾液中的浓度比血浆浓度低得多，需要高灵敏度的方法才能进行准确地测定。

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，在口腔内并合

成混合唾液。唾液的 pH值约为 6.9±0.5 ，日分泌量约为 1～1.5L，个体差异较大，同一个人日内与日间也有变动，各腺体分泌的唾液组成也会有相当差别。此外还受有无刺激，刺激类型、强度、持续时间、年龄、性别、疾病与药物等因素的影响。

唾液的采样一般是在漱口后 15分钟，收集口内自然流出或舌在口腔内搅动后流出的混合唾液，然后用 2000～3000r/min 离心 15分钟，小心吸取上清液，然后作进一步分离、净化处理后即可供测定用。

二、样品的储存

为了避免样品中被测药物发生分解或产生其他化学变化，取样后最好立即进行分析测定。但在实际工作中常需将收集到的样品冷藏、冰冻，临用前再融化并放至室温后使用。

血浆和血清都需要在采血后及时分离。若不及时分离，血凝后冰冻保存，则因冰冻时引起细胞溶解，而阻碍血浆或血清的分出，同时因溶血而影响药物浓度变化。

尿液主要成分是水、尿素及盐类，是很好的细菌生长液，因此应在取样后立即制定。实际工作中若需收集 24小时或更长时间的尿样，而不能立即测定时，则应置于 4℃冰箱内冷藏。如需在室温保存，则应在采样后的尿液立即加入少量防腐剂甲苯或氯仿。

生物样品中的一些不稳定的药物，易受血浆酪酶水解的影响，当收集好样品之后应立即加入酪酶抑制剂氟化钠，防止药物分解。

生物样品在采样、贮存与分析测定过程中都要与器皿接触。因此，应注意在各个环节中可能造成样品的损失或污染，以免将因污染引入的杂质判定为药物新的代谢物。

第 4 节　　生物样品测定前的处理方法

一、生物样品处理方法选择的一般原则

生物样品是否需要进行纯化处理，以及对纯化程度的要求，一般取决于生物样品中所含杂质的情况和使用的测定方法。在进行体内药物及其代谢物测定时，除了少数情况下可取样品直接测定，如用反相高效液相色谱法可将含药物的尿液直接进样；用放射免疫法测定血清中药物浓度时，可用分离后得到的血浆或血清直接测定。对大多数样品通常在最后一步测定之前，需要采取适当方法进行样品的预处理。如含有药物的组织、器官等样品，不经处理则不能测定；微量药物存在于大量生物介质中，若直接进行测定，内源性杂质可能产生干扰，药物浓度太低将会达不到仪器灵敏度要求。因此，生物样品中的药物必须经过分离、纯化与浓集，必要时还需对待测组分进行化学改性处理，从而为最后测定创造良好的条件。

生物样品处理涉及很多方面，其方法的选择应依据以下几个方面。

(一)待测药物的理化性质

生物样品的处理与测定方法均依赖于待测药物及其代谢物的理化性质，首先是待测药物的酸碱性、溶解性与挥发性等理化参数。这些将涉及到药物的提取分离性质和是否挥发损失，以及能否采用气相色谱法测定。待测药物的光谱特性及官能团的性质均涉及到分析仪器与测定方法的选择；而待测药物的化学稳定性也涉及到样品处理条件的选择。

(二)待测药物测定的目的与浓度范围

生物样品中药物测定的目的不同，样品处理的要求也不同。如对急性中毒病例，则要求快速鉴定病人所服的药物种类，应在尽可能短的时间内测得其浓度的情况，以便及时抢救病人。因此，对样品处理与浓度精度的要求可粗放些；再如测定生物样品中的药物及其代谢物，要求药物及其代谢物从缀合物中释放出来，并在不同 pH值介质中分离提取，这样对样

需要全本请访问 www.ertongbook.com

品处理的要求高一些。

由于待测药物在生物样品中浓度相差悬殊，如地高辛治疗血药浓度为 1～2ng/ml，而水杨酸盐治疗血药浓度为 150～300μg/ml，两者相差万倍以上。因此，对浓度大的生物样品的处理要求稍低一点，而对浓度越小的生物样品的处理则要求愈高一些。

（三）生物样品处理与分析方法的选择

生物样品处理和纯化净化的程度与所用分析测定方法的专属性、分离能力以及检测系统有密切关系。反映生物样品处理步骤与分析测定方法相互关系，详见图 1-2。

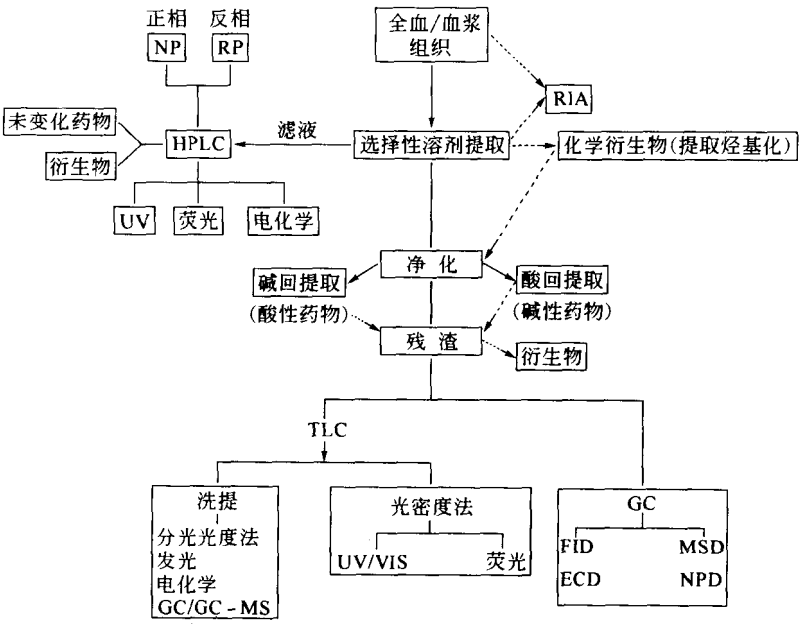


图 1-2 样品处理步骤与分析方法的选择

二、生物样品中蛋白质的处理

在测定体液血浆、血清、全血和组织匀浆等生物样品中药物及其代谢物时，首先要将生物样品中的蛋白除去，使与蛋白质结合的药物释放出来，以便准确地测定药物及其代谢物的浓度。目前有很多除去蛋白质的方法，下面重点介绍几种常用的方法。

（一）加入可与水混溶的有机溶剂及中性盐

最常用的能与水混溶的有机溶剂如乙醇、甲醇、丙酮和乙腈，中性盐如硫酸铵、硫酸钠和氯化钠等。当它们过量存在时，能使蛋白质脱水后沉淀下来，其中性盐的浓溶液能使蛋白质胶体脱水，并中和其电荷，使蛋白质失去胶体性而沉淀下来，使与蛋白质结合状态的药物及其代谢物释放出来。然后将其离心，即可获得含有药物及其代谢物的上层澄清液。利用这种方法除去蛋白质后的样品，一般可用于色谱法直接进样分析测定。

蛋白质的沉淀效率与介质 pH 值及加入沉淀剂的体积有关，在一定 pH 值范围内，各种蛋白质沉淀剂加入的体积与蛋白质沉淀的百分率的关系详见表 1-1。

(二)加入酸性沉淀剂

常用的酸性沉淀剂有三氯醋酸、高氯酸、磷酸、铂酸、磷钨酸、磷铜酸、水杨酸、钨酸、苦味酸及偏磷酸等。它们的作用机制是使蛋白质分子的阳离子形成不溶性盐而沉淀，其条件是 pH 值要低于蛋白质的等电点。加入这些沉淀剂之后，立即形成白色沉淀，离心后可

得澄明的上清液。

表 1-1 各种蛋白沉淀的相对效率

沉淀剂	上清液 pH 值①	每一容积血浆加入的沉淀剂容积								
		0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.5	2.0	3.0	4.0
10g/L 三氯乙酸	1.0～2.0	99.7	99.3	99.6	99.5	99.5	99.7	99.8	99.8	99.8
6g/L $HClO_4$	<1.5(2.0)	35.4	98.3	98.9	99.1	99.1	99.2	99.1	99.1	99.0
钨酸盐-H_2SO_4	2.2～3.9 (6.5,7.0)	3.3	35.4	98.6	99.7	99.7	99.9	99.8	99.9	100.0
5g/L HPO_3	1.6～2.7(4.8)	39.8	95.7	98.1	98.3	98.3	98.5	98.4	98.2	98.1
$CuSO_4$-Na_2WO_4	5.7～7.3(8.0)	36.5	56.1	78.1	87.1	97.5	99.8	99.9	100.0	100.0
$ZnSO_4$-NaOH	6.5～7.5(8.0)	41.1	91.5	93.0	92.7	94.2	97.1	99.3	98.8	99.6
$ZnSO_4$-$Ba(OH)_2$	6.6～8.3(8.7)	45.6	80.7	93.5	89.2	93.3	97.0	99.3	99.6	99.8
乙腈	8.5～9.5	13.4	14.8	45.8	88.1	97.2	99.4	99.7	99.8	99.8
丙酮	9～10	1.5	7.4	33.6	71.0	96.2	99.1	99.4	99.2	99.3
甲醇	8.5～9.5	17.6	17.4	32.2	49.3	73.4	97.9	98.7	98.9	99.2
饱和$(NH_4)_2SO_4$	7.0～7.7	21.3	24.0	41.0	47.4	53.4	73.2	98.3	—②	—②

①括号中 pH 值为每容积血浆加沉剂 0.2 容积时上清液 pH 值；在钨酸盐-H_2SO_4 中为 0.4 容积时的上清液 pH 值。

② 样品浑浊，妨碍准确测定。

（三）组织的酶消化法

最常用的蛋白水解酶是枯草菌溶素，它不仅可使组织酶解，并可使药物释放出。此法比较简便，一般先将待测组织加缓冲液及酶，在一定温度下培育，随后用玻璃棉过滤，得澄清滤液，即可供药物提取之用。

酶消化法的优点：由于酶解是在平稳的条件下进行，可避免某些药物在酸水解及较高温度时降解；可显著改善对蛋白结合率强的那些药物的回收率；酶消化液直接用有机溶剂提取不产生乳化现象；采用高效液相色谱进行检测时，一般无需过多的净化操作。

三、生物样品中药物及其代谢物的萃取

生物样品中待测药物及其代谢物常用的萃取方法有：液-液萃取法和固相萃取法。

（一）液-液萃取

液-液萃取法是应用最多的分离、净化方法，其原因是：

（1）可将被测药物及其代谢物自大量共存物中分离出来，避免杂质对测定的干扰。

（2）该法简单、快速、经济适用，可使萃取液直接蒸去溶剂使待测组分浓集，以增加测定的灵敏度。

（3）很多组分经过萃取后可获得 90％以上的回收率，对生物样品中的药物及其代谢物进行多次萃取，也能获得较高的回收率。

在体内药物分析中，无论是药物浓度监测或者是药物动力学研究，所分析测定的样品数量较多，一般只进行一次萃取，尽管一次萃取药物及其代谢物的萃取回收率不太高，就一般生物药物分析的基本要求而言，萃取率不低于 50％即可。现将实际工作中常用的萃取溶剂列于表 1-2，以供参考。

溶剂提取时，水相的最佳 pH 值的选择与药物的 pK_a 值有关。从理论计算来说，对碱性药物的最佳 pH 值要高于 pK_a 值 1～2pH 单位；对酸性药物来说则要低于 pK_a 值 1～2pH 单位。在实际工作中的一般提取原则是碱性药物在碱性 pH 介质中提取，而酸性药物在酸性 pH 介质中提取。这样就可使得 90％药物以非电离形式存在，易被溶剂提取。为保持溶液

pH值的稳定，在溶剂萃取多采用缓冲溶液，这样可维持提取效率的重现性。

表 1-2　液-液萃取常用的有机溶剂

溶　剂	T_m/℃	备　注	溶　剂	T_m/℃	备　注
正己烷	69	低闪点	乙酸戊酯	149	
环己烷	81		氯仿	61	肝脏毒性，有致癌作用
四氯化碳	77	肝脏毒性	1,2-二氯乙烷	83	肝脏毒性
苯	80	有致癌作用	甲基异丁酮	116	
甲苯	111		乙酸乙酯	77	
二己丙醇醚	68	低闪点，含过氧化氢	正丁酮	118	
乙醚	35	低闪点，含过氧化氢			

在液-液萃取中尽可能采用极性的溶剂，这样既可得到合适的回收率，又使干扰杂质的提取量减至最小。但有时为了克服极性小的碳氢化合物溶剂提取能力弱和减小药物在容器表面上的吸附损失，常在碳氢化合物溶剂中加少量醇类。如庚烷加 1%乙醇后，在 pH 值为 10.2 时有较高的提取能力；也有用在环己烷中加 2%异戊醇或加 2%丁醇来增加其提取能力。

大量样品萃取时通常用分液漏斗，按照一般萃取操作进行。但在临床药物浓度监测及药物动力学研究中，通常用萃取试管。在实际工作中多采用有标准磨口玻璃塞的离心管作为萃取试管，使用时将体液样品、缓冲液和萃取溶剂置试管内，再将试管放在旋涡混合器上旋涡混合进行液-液萃取。

萃取后试管内有机相和水相会有轻微乳化现象，一般应将试管置离心机内离心，使水相和有机相完全分离开。若需要下层液体，可将毛细吸管尖端伸入上液层，通过玻璃水泵将上层液体吸走。

萃取过程中有机溶剂的用量是很重要的。一般有机溶剂与水相容积比为 1∶1 或 2∶1，但要根据被测药物的溶解度和后一步使用的分析测定方法来考虑。

（二）固相萃取

固相萃取是利用液相与固定相之间对萃取化合物的选择性分配系数不同，将被分析的化合物从各种化合物的混合物中分离出来。固相萃取法是在固相和液相之间进行的，故又称为液-固萃取法。

从水相中分离出待测药物，通常以柱分离的方式进行操作。目前比较广泛使用的固定相是 XAD-2 树脂，其次是活性炭、氧化铝、硅胶和硅藻土等，它们对药物通常是起吸附作用。固相萃取也是一种可以选择性地从复杂的生物介质中，将药物及其代谢物分离出来的方法，获得较纯药物可供下一步分析测定。该法特别适用于生物体液中一些极性大的药物及其代谢物的分离，也适用于某些两性药物的分离。因为极性大的或两性药物采用液-液萃取方法不易被萃取出来。

固相萃取法通常以柱分离的方式进行操作，这类柱分为两类。一类柱常使用亲水性填充物，可捕集全部样品并阻留在柱上。样品全部吸附在固定相颗粒表面，形成一薄层，采用一种与水相混溶的有机溶剂即可洗脱待测的药物；另一类柱常用疏水性或离子交换树脂作为填充物，这种疏水柱可从样品中吸附亲脂性药物，然后用有机溶剂将药物洗脱分离。离子交换柱适用于极性大、可电离的药物。此外，大孔网格树脂及各种葡聚糖凝胶等，在药物和代谢物的分离中使用也日趋广泛。

四、生物样品中待测组分的浓集

生物样品在萃取过程中，不仅待测组分得到纯化，而且还有可能被初步浓集。在实际工作中，微量待测组分往往分布于较大体积的萃取溶剂中，不能直接供气相色谱和高效液相色

谱测定，因此必须采取相应措施，使被测组分浓集。实际工作中常用的浓集方法有两种：一种方法是用尽量少的萃取液，使被测组分萃取到小体积溶剂中，然后直接吸取适量进样分析测定；另一种采用挥去溶剂的方法，但应避免直接加热浓缩，因为直接加热可能破坏被测组分或引起被测组分挥发损失。挥去萃取溶剂常用的方法是将萃取液置离心试管中，缓缓通人气体，一般可通人压缩空气，遇氧不稳定的组分可改用氮气。

对热稳定的被测组分，为加快溶剂的挥发可将离心试管置一定温度的水浴中；对热不稳定或易随气流挥发的被测组分，可采用减压法挥去溶剂，可将萃取液的离心试管置玻璃真空干燥器内缓缓抽气，减压下使溶剂挥干。

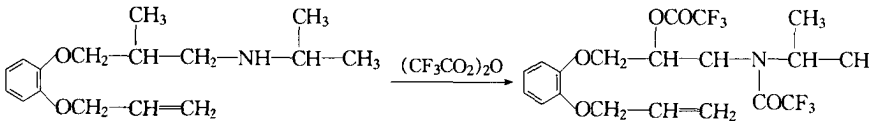
五、生物样品中待测组分的衍生化

大多数生物样品经过适当预处理或经萃取浓集之后即可供测定。但有些药物采用色谱法测定时，必须先经过衍生化反应制备成衍生物后才能进行测定。目前衍生化处理在气相色谱法中应用最普遍，在高效液相色谱法中有时也采用柱前或柱后衍生化。当用荧光法测定生物样品中不具备天然荧光的药物及其代谢物时，也可使用荧光试剂进行衍生化后测定；当测定生物样品中药物左旋体和右旋体的浓度时，可加入不对称试剂使外消旋混合物衍生化为非对映异构体，然后采用适当方法测定。

以气相色谱法测定生物样品的药物为例，重点介绍几种常用的衍生化反应：

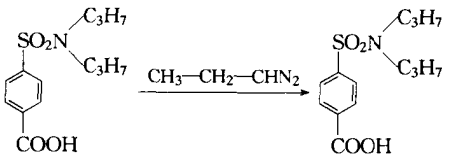
（一）酰化

凡是分子结构中含一NH_2、—OH的药物，可用酰氯和酸酐进行衍生化，生成酰基衍生物。一般被酰化后的药物具有更高的挥发性，并且易被检测器检测。例如心得平可与三氟乙酸酐作用，生成二乙酰化衍生物，其挥发性增加，更易被检测器检测 、其反应如下：

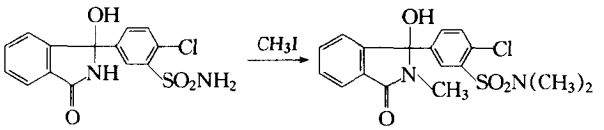


（二）烷基化

采用烷基化制备衍生物的方法较多，有碱催化烷基化法、用重氮烷烃类烷基化法提取烷基化法和快速烷基化法。如重氮丙烷用于丙磺舒衍生物的制备，其反应如下：

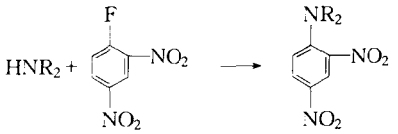


再如氯哩酮与碘甲烷反应生成甲基衍生物， 其反应如下：



（三）芳香化

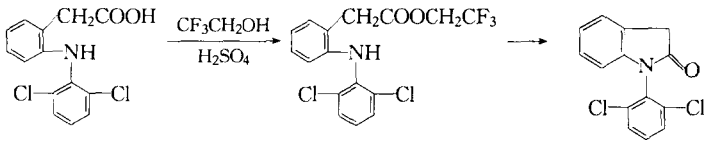
凡是分子结构中含有伯胺、仲胺或酚类结构的药物，通常可与卤代苯，如2-硝基氟苯形成2,4-二硝基苯基的衍生物，生成的芳香烃衍生物比酰化物更稳定。制备成芳香烃衍生物后，用气相色谱法测定的药物有苯丙胺、苯佐卡因、麻黄素、卡因和甲苯磺丁脲等。其反应可用下列通式表示：



（四）酯化

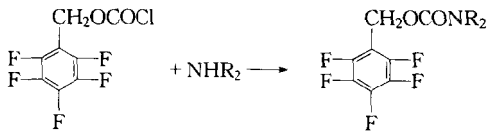
1. 酸催化酯化

本法适用于羧酸类药物的衍生化，是在无机强酸存在下，使用醇类衍生化试剂进行酯化。例如双氯芬酸在硫酸存在下与三氟乙醇作用生成环合产物适合用气相色谱法测定。其反应过程如下：



2. 氨基甲酸酯化

叔胺类药物可与五氟苄基氯代甲酸作用生成氨基甲酸酯衍生物。此法用于丙米嗪三甲丙米嗪及吗啡的衍生化。其反应通式如下：

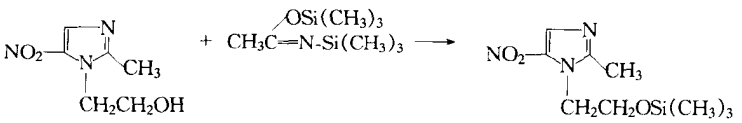


3. 甲酯化

一些药物能和二甲基甲酰胺-二甲乙缩醛反应生成挥发性很强的甲酯衍生物，适用于气相色谱测定。例如阿氯芬酸、消炎痛及磺胺类药物等，均可发生挥发性的甲酯衍生物。

（五）硅烷化

本法常用于具有—OH、 >NH 及—COOH 等极性基团药物的衍生化。硅烷化反应得到的衍生物具有一定的热稳定性和挥发性，并且有操作简便、反应快速等特点。目前常用的硅烷化试剂是双-(三甲基硅烷基)-乙酰胺。它可与甲硝唑、奋乃静、氯霉素及先锋霉素 Ⅵ等药物生成硅烷化衍生物。其中与甲硝唑的反应如下：



参 考 文 献

1 安登魁．现代药物分析选论．北京：中国医药科技出版社， 2001

2 曾经泽．生物药物分析．北京：北京医科大学中国协和医科大学联合出版社， 1998

3 刘文英．药物分析．第 4 版．北京：人民卫生出版社，1999

4 姚彤炜．体内药物分析．杭州：浙江大学出版社，2000

5 邓树海．药物动力学——理论与实践．北京：人民卫生出版社，1998

6 李发梅．医药高效液相色谱．北京：人民卫生出版社．1999

（张君仁）

第 2 章　体内药物分析方法的设计与评价

第 1 节　体内药物分析的方法

生物样品经处理后，需选择适当的分析方法进行测定。目前可供生物样品药物及其代谢物检测的分析方法很多，归纳起来主要有以下五类。

一、光谱分析法

光谱分析法是体内药物分析中应用较早的一种方法，主要包括比色法，紫外分光光度法和荧光分光光度法。20 世纪 80 年代以前，光谱分析法约占应用血药浓度测定方法总数的三分之一。80 年代以后，随着色谱法的飞速发展，使光谱法在体内药物分析中的应用逐渐减少，退出主角地位。由于光谱法具有操作简便，快速等优点，因此，目前光谱法在体内药物分析中仍占有一定的地位。

（一）比色法

比色法灵敏度不高，通常只能测定出 1μg/ml 浓度以上的样品。但该法具有快速，简便，对仪器要求不高等特点。只要采用具有选择性的显色剂和反应条件，可不经分离提取等步骤，直接用血药浓度监测及人群代谢分行测定。

（二）紫外分光光度法

分光光度法的灵敏度较比色法高，适用于测定具有紫外吸收的药物，方法简单，仪器要求也不高。但用于测定含药浓度低的样品时，也受到一定的限制。如测定体液中药物浓度时，亦可能受体液中内源性杂质的干扰和影响。因此，本法在体内药物分析中也受到灵敏度和专一性的限制。但采用一些光谱分析技术，如用差示分光光度法，导数分光光度法，双波长和三波长分光光度法等，可适当提高方法的灵敏度和选择性，也可消除杂质的干扰，因此，该法目前仍用于一些生物样品中的药物检测。

（三）荧光分光光度法

荧光分光光度法的灵敏度比紫外-可见分光光度法的灵敏度高，最高可达到 10^{-12}g/ml，虽然有荧光的物质数量不多，但体内许多重要的生化物质、药物及其代谢物或致癌物都有荧光现象。由于荧光衍生物试剂的使用，进一步扩大了荧光分光光度法的应用，因此该法在体内药物分析和药物动力学研究中得到广泛的应用。

二、色谱法

色谱法包括 TLC（薄层色谱法）、GC（气相色谱法）、HPLC （高效液相色谱法）已广泛应用于各个领域，成为多组分混合物最重要的分离分析方法。其中 HPLC 法在体内药物分析中应用最多，其次 GC 法，而 TLC 法在体内药物分析中的应用较少。

（一）HPLC 法

HPLC 法在体内药物分析中的应用已大大超过其他分析方法，成为体内药物分析中应用最广泛的技术之一。与 GC 法相比，它具有以下优点：

（1）适用范围广，可在室温下进行检测。对于挥发性低的，热稳定性差的，分子量大的以及离子型化合物等均可测定。

需要全本请访问 www.ertongbook.com

（2）样品预处理简单，可不经萃取和衍生化处理直接测定极性大的水溶性药物，特别适合生物样品的测定。

（3）分离效率高，流动相选择范围广，仪器自动化程度高。

（4）检测器多是针对整分子的光谱特征进行检测的，专一性较高。检测方法多采用非破坏性的，流出组分可回收，可用以样品的制备。

（二）GC 法

GC 法是最先兴起的具有分离和分析两种功能的测定技术，在药物分析和体内药物分析中曾得到较广泛的应用。由于 HPLC 法的发展，尤其是 RP-HPLC （反相-高效液相色谱法）的广泛应用，使 GC法的应用相对减少。其原因是 GC法本身具有一些缺点，应用时常受被测组分的挥发性和热稳定性等方面的限制。用 GC 测定药物是一般需要在 120℃以上柱温条件下进行，因此不适合用于遇热不稳定和极性大或挥发性差的药物，不适合用于生物样品的测定。因而影响该法在体内药物分析中的广泛应用。

三、毛细管电泳法[1]

毛细管电泳法（CE），又称高效毛细管电泳法（HPCE），是 20 世纪末发展起来的一种高效、快速的分析技术。HPCE 是以高电压电场为驱动动力，以毛细管为分离通道，依据样品中个组分之间淌度和分配系数的不同而实现分离的一类液相分离技术。近年来 HPCE 发展十分迅速，已在化学、生命科学和药学等领域得到广泛的应用。由于该法具有高效、快速、灵敏、进样少、信息量大、运行成本低、易于自动化等优点。因此使其在体内药物分析及其代谢的检测中得到广泛的应用。根据 HPCE 法的分离模式的不同，HPCE 又分为：毛细管区带电泳、胶束电动毛细管色谱、毛细管凝胶电泳、毛细管等电聚焦、毛细管等速电泳和毛细管电色谱法。上述这些方法近几年来在体内药物分析中均得到不同程度应用。

四、免疫分析法

免疫分析的基本原理是利用抗原-抗体的特异反应，来测定体内药物的含量。该法也是体内药物分析中常用的一种方法，并具有灵敏度高、专一性强、操作简便、快速等优点，因此在临床治疗药浓检测和生化检验中广泛应用。免疫分析主要包括放射免疫分析、酶免疫分析和荧光免疫分析。

五、同位素法[2]

随着同位素技术和检测方法的发展，以及将同位素技术与其他分析法相结合，同位素技术已成为体内药物分析的一种重要手段。在同位素分析中应用稳定性同位素标记药物，用放射性强度表示标记药物量，用体液中的放射强度表示体液药物浓度。利用放射性同位素标记药物和其他分析方法相结合建立的同位素稀释分析法，是研究体内药物代谢和药物动力学的一种有效手段，在新药研究过程中得到进一步的应用。

体内药物分析方法的选择，一般要根据药物的结构、理化性质、体内药物浓度大小、干扰成分的多少、样品的预处理方法、实验条件和目的等因素进行综合考虑，方可选择出可供生物样品中药物及其代谢物含量测定的分析方法。

第 2 节　体内药物分析方法设计与建立

体内药物分析方法的设计与建立，随着各学科的迅猛发展，其内容也在不断增加。因此建立一个可靠的分析方法，是体内药物分析研究的重要内容之一。它对药物分析工作者和从事临床药学研究人员来说，都具有十分重要的意义。本节简单介绍有关体内药物分析方法设

计与建立的基本思路。

一、体内药物分析方法设计的主要依据

（一）明确分析方法设计的目的要求

随着临床药学、临床药理学研究工作的深入发展，对体内药物分析的方法提出更高的要求。例如分析测定药物在体内的药-时过程时，在方法的设计或建立上不必强调简便、快速，但要注意整个测定范围内样品浓度变化较大这一因素。若设计或建立测定血药浓度的方法供临床药物监护之用，测定要注意方法的简便、快速和适用于批量样品测定。再如设计的方法供药物动力的研究，要注意是否要求测定原形药物或同时测定其代谢物时，则设计建立的方法一般要求分离能力和专属性强。

（二）调研文献了解待测药物的特性

对已报道药物的测定，应系统探索，综览前人的文献，从中获得前人已解决和尚在的问题，同时获得待测药物的详细理化特性及其在体内的代谢情况，为新法的设计与建立提供理论依据。由于体内药物分析方法影响因素较多，文献报道的方法一般不易完全重现，因此文献报道的方法只可供借鉴，切勿死搬硬套，应与测定目的要求中所要解决的问题结合起来，设计建立具有创新的方法。

对于目前尚无文献报道新药品的测定，可先根据新药的化学结构，理化特性，在体内存在的状态及其代谢情况，同时结合要解决的实际问题，参考相同类型药物的文献资料，设计建立全新的分析方法。

（三）仪器设备与实验室条件

实验室的仪器设备和条件，对于分析方法的设计与建立十分重要。首先要根据实验室现有的仪器设备和可能获得的装备条件加以考虑，然后考虑目前国内外相关实验室可能提供的仪器设备，设计可能的分析法。

二、体内药物分析方法设计与建立的一般步骤

根据测定的目的要求，结合药物的化学结构、理化特性和体内存在状态，参考同类药物的文献资料。先拟定出初步的分析方法，然后进行一系列的实验工作，以选择最合适的实验条件，进一步验证所拟定的分析方法是否适应实际样品的检测，通常包括体外试验和体内实样品的检测，其一般步骤如下。

（一）以纯品进行测定

取一定量待测药物或代谢物的纯品，按所拟定的分析方法进行体外测定，求得待测药物浓度与仪器响应值之间的关系；浓度线性范围；最佳测定浓度；仪器检测的灵敏度及测定的最佳条件等。

（二）以处理过的空白样品进行测定

对待测样本的空白生物样品，按所拟定的方法进行前处理，然后根据拟定的方法测其空白值（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，应力求将空白值降到最低。例如，在色谱分析中要求去除体内样品中内源性杂质峰，对无法消除的内源性杂质峰，应设法使杂质峰从待测物的色谱区域内移开。

在体内药物分析中，能否取得良好的样品空白实验效果，是决定分析方法实际可行性的重要环节，必须设法解决好，否则将无法进行样品的测定。

（三）回收率的测定

1．以水代替空白样品添加标准品测定

以水代替空白生物样品，并添加一定量标准品后，按拟定的分析方法进行前处理后测定，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、溶液 pH 值、挥发浓缩等条件进行选择和考察。

2. 以空白样品添加标准品测定

于待测药物或代谢物的空白生物样品中，添加一定量后按拟定的分析方法进行测定，求得样品回收率数据，建立标准曲线或回归方程。若采用色谱法测定，多采用内标法进行定量测定，因此应首先选择合适的内标物，然后进行回收率的测定。回收率的高低是检验生物样品对测定干扰影响的程度，一般回收率越高则干扰就越小。

(四)体内实际样品测定

一般情况下，当待测药物或代谢物的体外试验结果比较理想时，即可进行体内实际样品测定。但要指出的是，以上步骤只是生物样品实际测定前的准备工作，不能完全确定是否适用于实际样品的测定。因药物在体内的变化是复杂的，如不注意药物代谢和蛋白结合情况，用体外建立的方法，进行体内实际样品测定时往往会失败，甚至导致错误结论。因此在设计方法时强调对药物体内过程要有一定程度的了解，以便选择避免干扰和适合样品实际情况的分析方法。当对设计方法有疑虑时，也可采用专属性强、已证明适用于体内实际样品测定的方法作为对照测定，并以此来检验所建立方法的实际可行性。

总之，体内药物分析方法的建立，应力求周密、细致、简单以期获得可靠的、符合实际的测定结果。

第 3 节　体内药物分析方法的评价

与其他分析方法相比，对体内药物分析方法的可行性和可靠性，需要应用若干标准来进行方法学的考察与评价，有相同之处也有特殊的要求。在实际工作中评价一个体内药物分析方法的优劣，一般常用精密度、准确度、灵敏度、专属性或选择性及可测浓度范围等指标进行考察。

一、准确度[3]

准确度（accuracy）是考察和评价分析方法的最基本要点之一。它是表示测定结果与真值的符合程度。由于不可能绝对地确知样品的“真值”，因而常用回收率数值反映测定的准确程度，也可通过与其他已建立的分析方法，进行比较的办法来加以反映。

回收率是指将已知量的药物纯品加到空白生物基质（如空白血浆、血清）中，经过一系列的前处理、测定，所测得的药物量与加入量之比值的百分率。一般回收率数值越接近 100%，准确程度越好。但因生物样品组分复杂，药物含量低，前处理步骤多时就很难达到高的回收率。对一种分析方法来说，更重要的是每次测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。回收率根据测定方法不同又可分为绝对回收率和方法回收率[4]。

(一)绝对回收率

绝对回收率又称为萃取回收率或提取回收率，它反映了一种方法的萃取效率，与生物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。现以色谱为例说明绝对回收率的求算过程。分别取一定量被测药物标准品两份，其中一份加到空白样品中，按设定方法处理、进样测定，测得色谱峰面积为 $A_{测}$，另一份用纯品溶剂溶解并稀释使其浓度与第一份处理后浓度一致，进样测得色谱峰面积为 $A_{真}$，其回收率为：

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

绝对回收率应考察高、中、低三个浓度，高浓度在标准曲线的上限附近，低浓度选择在定量限附近，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}～10^{-9}g，绝对回收率若能达到 50%～80%，应该是令人满意的。

色谱分析中采用内标法测定含量，分别取相同量的药物标准品和内标物质两份，其中一份加到空白样品中，按设定方法处理，测得药物和内标峰面积，求出它们的比值 $R_{测} = A_{药}/A_{内}$。另一份用纯溶剂溶液进样，测得药物和内标峰面积，计算其比值。然后根据下式求出回收率：

$$回收率(\%) = R_{测}/R_{真} \times 100\%$$

在内标法中，要求药物与内标物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。

（二）方法回收率

取一系列浓度的药物标准品加到空白体液中，按设定的分析方法测定，根据标准品浓度及相应的测定信号值绘制标准曲线、进行回归求出回归方程，然后取高、中、低浓度的药物标准品加到空白体液中，按标准曲线制备方法同法测定，每个浓度至少平行测定 5 份，测得信号值代入回归方程，求得相应的测定值。测得量与加入量比较，即得方法回收率，除定量限外，各浓度点测得的平均值偏离实际加入量应少于 15%，定量限这一点应小于 20%。

回收率测定时，不管采用哪种方法，要求添加的药物量必须与实际测量相近；必须与实际存在的状态相似；必须同时做空白试验。否则测得结果不可靠，因此报道一个方法的回收率时，必须说明添加量。

二、精密度[4]

精密度（precision）是指同一均质样品的测定结果与平均值的偏离程度，或者说多次测定结果彼此符合的程度，它表示分析方法的可重复性。它有多种表示方法，在体内药物分析中常用以下方法表示。

（一）标准差

标准差（standard deviation，SD或S）的计算公式为

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (X_i - \bar{X})^2}{n-1}}$$

（二）相对标准差

相对标准差（relative standard deviation，RSD）也称变异系数（coefficient of variation，CV）的计算公式为

$$RSD = CV = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100\%$$

精密度测定通常采用高、中、低三种浓度进行测定，高浓度选择在标准曲线的上限附近，低浓度选择在定量限附近，中间选一个浓度。测定时每种浓度的样品应重复测定 3～5 次，按上式计算测定结果的标准差和相对标准差。在定量限外各浓度点 RSD 不应大于 15%，最低定量限这一点不应大于 20%。

生物样品分析时，常用 RSD 表示精密度，并可分为日内（或批内）精密度和日间（或批间）精密度。

日内（或批内）精密度是考察分析方法在短期内测定方法的变异情况，凡是在同一天内将样品多次测定所计算出的精密度称为日间精密度；凡在同一批内样品多次测定所计算出的精密度称为批内精密度。所谓“批内”是指测定时使用同批试剂、同一条标准曲线等主要相同条件下完成的分析测定。

日间（或批间）精密度是考察分析方法在不同时间测定结果的变异情况。由于体内药物分析面临样品数量多，测定持续时间长，往往在同一天或同一批内不能完成，因此样品测定时使用的仪器性能、试剂、标准曲线及环境条件等都可能发生微小的变化，从而导致分析结果的变异增大。因此，考察分析方法的精密度时，还应考察日间或批间精密度。测定时可使用日内（或批内）精密度测定时，所使用的高、中、低三种浓度样品，在同一周内不同日（或不同批）分别测定 3～5 次，然后计算出 RSD。

三、灵敏度

灵敏度（sensitivity）是指一种分析方法可检出有关化合物的最小量，常用以下三种表示方法。

（一）检测限

检测限（limit of detection，LOD）是指分析方法能够从背景信号中区分出药物时，所需样品中药物的最低浓度。通常以被测信号和背景噪音比（简称信噪比） 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／单位质量）。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。

（二）定量限

定量限（limit of quantification，LOQ）是指在保证具有一定可靠性前提下，分析方法能定量测定出样品中药物的最低量。它与检测限的不同在于定量限规定的最低测得量应该符合一定的精密度和准确度的要求。在体内药物分析中，通常以标准曲线的最低浓度点作为定量限。也可以 S/N＝10或空白背景响应值的标准差乘以 10 作为估计值，再通过试验确定。

在体内药物分析中，进行药物制剂人体生物利用度和生物等效性测定时，对 LOQ 的要求至少能满足测定 3～5 个半衰期时样品中药物浓度，或 C_{max} 的 1/10～1/20 时的药物浓度。

（三）最低检测浓度

最低检测浓度多指可进行定量测定的某一药物的最低浓度，它与样品体积大小有关，可由以下公式求得：

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

上述表示灵敏度的方法均指仪器的灵敏度，即进入仪器的最低绝对量或最低浓度。如果仪器的灵敏度相同，而生物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。因此要提高检测方法的灵敏度，除了选择高灵敏度的仪器外，还可采取提高进样量、降低仪器噪音；提高样品的浓缩程度或降低样品稀释度；消除干扰、降低空白值等措施。

四、分析方法的专属性

分析方法的专属性（specificity）又称选择性（selectivity），通常是指样品中含有其他共存物质时，分析方法能够准确、专一地测定出药物的能力。即测得的响应值应该是属于被测物所特有的，否则就易受干扰。考察一种分析方法是否专属应着重考虑以下几个方面：

1. 代谢产物是否会干扰原形药物测得的响应值，可利用给药数次后病人的尿液来进行试验。

2. 生物样品中内源性物质的干扰，可通过对生物样品的净化处理的方法消除。

3. 用于临床药物监测的方法，要考虑同时服用其他药物的干扰。当其他药物干扰被测药物时，就要改用具有分离能力或专属性强的分析方法。

专属性的测定以色谱法为例，通常取空白样品，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、内标物的保留时间处不应有大的干扰，任何有大的干扰的空白应舍去，需重新改变拟订的方法，以消除干扰。在报告专属性时，至少要提供空白生物样品色谱图，空白生物样品加标准品或内标物色谱图及服药后生物样品的色谱图。

五、线性范围

线性范围（linear range）是指一种分析方法的精密度、准确度都符合要求的试验结果成线性时供试物浓度的变化范围。在体内药物分析中，通常是将药物标准品加入空白体液中，制备标准系列，按拟定分析方法处理、测定，然后绘制标准曲线，或计算回归方程，求出相关系数和浓度范围。

标准曲线的制备以色谱法为例，一般由一个空白，一个空白样品加内标和 5～8 个浓度的标准系列组成，要求覆盖实际的样品浓度范围，包括 LOQ。空白和空白加内标不用标准曲线的绘制，仅作为对干扰的考察。标准曲线的线性程度目前仍广泛采用相关系数（r）表示，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。标准曲线应覆盖样品可能的浓度范围，对于含量测定要求一般浓度上限为样品最高浓度的 120%，下限为样品最低浓度的 80%，但应高于 LOQ。

六、稳定性

稳定性（stability）是指药物的稳定性，它是贮存条件，药物的化学性质、空白生物样品和容器系统的函数。在实际工作中，首先要考察药物标准溶液的稳定性，其次考察药物在生物样品中的稳定性。药物在生物样品中的稳定性包括：在室温条件下的稳定性要超过在冷冻条件下的稳定性；反复冷冻一解冻条件下的稳定性的考察。

1. 短期室温条件下稳定性考察

通常取高、低浓度各 3 份于室温下放置 4～24 小时，在不同时间间隔取样，进行分析测定，测得结果均与 0小时的进行比较。

2. 长期低温条件下稳定性考察

长期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要的时间周期。贮存温度一般为 －20℃，如果需要也可在 －70℃贮存。要求高、低浓度至少分别测定 3次，测得结果分别与第一天测得相应浓度的结果进行比较。

3. 冷冻一解冻稳定性考察

取高、低浓度样品至少各 3份，于 －20℃贮存 24 小时，取出置室温放置使自然解冻，当融解完全后，取样进行分析测定，然后再把样品放回冷冻状态保持 12～24 小时，如此解冻一冷冻重复循环两次以上，分别比较各次分析测定的结果。

另外，药物与内标的贮存溶液的稳定性的考察，一般应在室温条件下进行 6小时内的稳定性考察。然后将其冷藏或冷冻 7～14 天或恰当周期后进行测定，测得结果与新鲜配制溶液的测得结果进行比较。

七、方法的相关性

对同一种样品，用已证明有相当专属性的分析方法与新建立的分析方法同时进行测定，然后比较两种分析方法测得结果的相关程度。通常用相关系数 γ 表示，可以计算出相关系

需要全本请访问 www.ertongbook.com