

· 药物分析与鉴定 ·

体液中药物浓度测定与免疫分析

第二军医大学药理学系药物分析教研室 孔庆洪 贺卫东

一、体液中药物浓度测定的意义

测定体液内药物浓度与了解药物在体内代谢过程已是药物分析工作者面临的重要课题。体液中药物浓度测定对临床药物血浓度监测、药物代谢动力学研究与生物利用度测定都是非常重要的。

(一) 临床药物血浓度监测

有许多药物的治疗指数较低,甚至与中毒剂量很为接近,由于病人代谢、遗传或服其他药物的影响,使一般认为正常的治疗剂量亦可能起中毒反应,这主要原因是血浓度不同所造成。如苯妥因血药浓度超过 $20\mu\text{g/ml}$ 即发生眼球震颤,到 $30\mu\text{g/ml}$ 发生共济失调,到 $40\mu\text{g/ml}$ 即发生失常了。

其他如洋地黄毒甙,利多卡因,心得安等都有类似现象。因此在临床药理学领域里对若干重要药物进行血浓度监测,获得直接数据便于进行剂量与给药方案的调整就显得十分重要了。

(二) 药物代谢动力学研究

药物代谢动力学是研究药物的吸收、分布、代谢与消除在体内随时间变化的规律,测定有限的血药浓度数据后,根据药代动力学原理计算有关参数,即能基本掌握药物在体内的动态规律。如用测得的血浓度与相应的采血时间在半对数纸上作图,单室模型得到浓度对时间曲线是一条直线,而双室模型的浓度时间曲线是含二个直线相的曲线形态。

(三) 生物利用度的测定

生物利用度是用药物代谢动力学的方法科学地阐明药物或制剂被机体利用的速度和程度,作为评定制剂质量好坏的一个重要参数。

生物利用度可以应用正常人(或动物)在某一标准条件下给予等量的对照制剂和试验制剂后,根据二者测得的血浓度时间曲线下面积、尿药总量、或代谢物相比较的百分数来表示,不同药厂生产的制剂生物利用度不同,即使在同一药厂生产不同批号之间,其生物利用度也可能相差很大。

二、体液药物浓度测定方法

(一) 分析样本的采集

通过血浓度测定了解药物在体内吸收、分布、消除的全过程。求得药物在体内的代谢规律须在病人静脉给药或其他途径给药后,在一定时间内定时采集血样进行分析。大部份用血浆为分析样本,少数用血清与全血。无论用什么血样,须说明种类,并记录给药与采血时间。全血或血浆样品须加入肝素,枸橼酸,草酸盐等防止凝血。

对尿药浓度,由于药物的理化性质、如亲水性、脂溶性、 pK_a 等对肾排泄有极大差别。由于尿药浓度的变化,测定数据不稳定,应用较少。

唾液中药物浓度比在血浆药物浓度低得多,血浆中药物浓度与唾液中药物浓度仅少数药物证明有恒定关系,需要唾液pH稳定与高灵敏度的方法才有测定意义。

(二) 分析前样本的预处理

分析的样本有血浆、血清、全血、尿液、唾液等。每种样本都是一种复杂的样品。主药存在的浓度与内源性组份比是极低的，在待测物含量极低而干扰物极多的情况下，如何精制防止损失极为重要。预处理的方法可分为蛋白质除去法、提取法、结合物水解法、短柱层析处理法等。

预处理效果的指标是观察干扰物质已否除去，回收率是否稳定，与本底是否接近于溶剂空白。

1. 蛋白质除去法

血液中药物常与蛋白质结合，尤其在组织中药物可渗入细胞内，在分析前须将样本加热或加酸、加盐等使蛋白质变性后沉淀，然后进一步提取或直接取滤液分析。除去蛋白质的处理方法及结果综合如下(表1)。

表1 每毫升血浆中加入不同容积沉淀剂使蛋白质沉淀的沉淀百分率

沉淀剂(ml)	蛋白质沉淀%	沉淀剂(ml)	蛋白质沉淀%
10%三氯醋酸	1m1 99.5%	6%高氯酸	1m1 99.1%
10%钨酸钠		10%硫酸锌	
(0.67N H ₂ SO ₄)		(0.5N NaOH)	
1.5m1	99.7%	2m1	99.8%
乙腈	2m1 99.7%	丙酮	3m1 99.4%
甲醇	2m1 98.7%	乙醇	3m1 99.1%

2. 提取法

(1) 一次提取

根据药物不同性质选择pH，将药物用有机溶剂提出来。如巴比妥类药物在酸性中提取，有机碱性药物在碱性中提取，中性物质则在各种pH都能溶于有机溶剂。在提取时要注意：①pH选择；②溶剂性质；③有机溶剂与水溶液的体积比。

(2) 多次提取法

为使提取物纯化可用多次提取法。如碱性化合物在pH 9~13提到有机溶剂中，然后再用酸性溶液振摇，回提到水溶液，将此水溶液再行碱化，重新达到纯化目的。此外在第

二次用有机溶剂提取时可用小量体积，实际起了浓集作用。

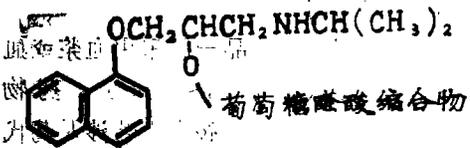
(3) 离子对提取法

许多季铵类药物，水溶性较大，在溶液中加入反离子即能用有机溶剂分离。如血浆中解痉药普鲁本辛⁽²⁾，取血浆3ml与0.1M HClO₄ 3ml，用二氯甲烷10ml提取，离心，即可达到分离目的。

3. 结合物的水解

在尿与血浆中，药物有时成结合的形式如葡萄糖甙或硫酸酯等存在。则在分析前须先行加热酸水解或酶水解后再行测定，但在加热水解法中须注意防止主药的分解。

此外可用酶水解法，利用酶将结合物水解后，再用有机溶剂提取测定，操作时间较长，但可避免因加酸加热使主药分解。例如心得安的主要代谢物为心得安葡萄糖醛酸缩合物(结构式如下)：



4. 短柱层析处理

层析柱约长5~10cm，内装不同填料，如XAD#2、硅藻土、硅胶ODS等，填料由100mg或200mg以至1~2gm。一般将样液上柱后，按规定条件操作，经简单步骤即能去除杂质，原药回收量大都在90%以上。

(1) XAD#2柱：

Amberlite XAD-2是非离子型大网孔吸附树脂，适用于疏水性化合物的分离层析。Mable, S.J.⁽³⁾应用XAD-2检出尿中滥用药物：称XAD-2约1g，装在塑料柱中，先加氯化铵液(pH10)湿润，然后取20ml尿液(含吗啡40~70µg/L)上柱，流速2.5ml/min，弃去洗出液；柱用氯化铵液10ml洗；加丙酮1ml，再用甲醇/氯仿1:3(V/V)20ml洗柱。每分钟2~3ml，

洗出液蒸干后加溶剂至一定量测定。

(2) 硅藻土柱

M·Werner⁽⁴⁾应用硅藻土柱作为血样本中分离小量药物方法如下：血清200 μ l加内标(5-甲基苯妥因80mg/100ml甲醇液)10 μ l与硅藻土140mg混匀装柱(100 \times 7mm)，用二氯甲烷2ml洗脱，洗液90 $^{\circ}$ C蒸干，加25 μ l二氯甲烷溶解残渣，用GLC法测定。

(3) C₁₈键合硅胶柱

C₁₈键合硅胶柱，国外有许多商品，如Seppak、Elutx、Extreclut等，按照产品规定条件操作，一般将样液上柱后，先用缓冲液洗去杂质，最后用有机溶剂洗出检测物，如Hyde, P. M.⁽⁵⁾应用C₁₈键合柱，用10ml药尿通过。先用10ml水洗除杂质，再用丙酮：二氯甲烷(1:1)3ml洗出检测药物测定。

表2 测定结果

XAD-2柱	硅藻土柱	C ₁₈ 键合硅胶柱
可待因88.9 \pm 4.16	苯巴比妥113%	安定90.1 \pm 0.9%
美沙酮99.2 \pm 4.16	氨甲酰氮草96%	苯妥因100.1 \pm 0.3%
度冷丁88.9 \pm 1.3	扑痫酮98%	苯巴比妥95.8 \pm 0.5%
异戊巴比妥89.2 \pm 1.2	苯妥因88%	美沙酮98.1 \pm 2.6%

三、血浆、血清或其他少量体液中药物提取分离的实验方法

血药浓度测定的样品一般采用血浆或血清，样品量较少(通常0.5~2ml)，药物含量较低，一次样本数量较多，若涉及药代动力学研究，一般要有10个以上样本，显然常规的提取方法是不能适应的。

实际上，常用10ml或15ml的带塞离心管，加入样本、缓冲液及3或5倍量提取溶剂后置水平振荡器或涡旋混合器上提取30秒至2分钟，离心(3000rpm)5分钟分层，然后用滴管转移或分取所需液层，纯化后低温浓缩或蒸干，全过程均在离心管内完成。若使用多次提取法，也可较容易地进行。另外，使用离心管提取克服了在常规提取时常遇见的乳化现象，不仅简化了操作，还具有省时、省力、节省有机溶剂和能一次完成多个样品的提取等优点，更重要地是减少了在提取过程中被测药物的损失。因此，这种方法在当今体内药物分析领域中已被广泛地应用。

四、分析方法的选择与制订

一般体内药物分析方法

(一)对已进入临床的体内药物浓度测定按下列步骤进行：

1. 收集资料了解药物性质、体内药物代谢情况、治疗血药浓度，选择方法灵敏度需与血药浓度水平相适应。

2. 用原纯药品或代谢物对照品制成水溶液，预试验确定浓度范围及最低检测量。

3. 药物加入血浆(血清、其他体液)进行样品预处理，观察是否能分离除去干扰物，然后测定多种浓度的回收量及精密度(N>5)计算平均值、标准差、及变异系数，一般变异系数应在5%左右；同时将同一样品连续几天测定日间误差，观察方法的稳定性。

4. 动物给药后测定

经药物加体液在体外试验证明方法可靠，才可进行动物试验，即由体外试验转变为体内试验。经动物给药后，有规律选择适当时间采血测定，血药浓度由高到低观察所建立的方法是否与代谢物不发生干扰，且是否正确反映药物在体内吸收分布消除的规律，如

所得结果较为满意,则表示所建立的方法确实适用于体内药物分析的条件了。

5. 健康人正常药代动力学参数测定

药物进入人体后,按着一定的模式在机体内进行吸收、分布、代谢、排泄。对大部分正常人来说,某种药物根据给药途径、剂量和时间测出血药浓度,计算各种药代动力学参数,如方法的专一性、灵敏度与精确度符合要求,则所得各种参数与国内外文献报导的结果应是基本一致的。

6. 病人体液药物浓度测定

经过上述试验证明所建立的方法符合体内药物分析的要求,才可能将此法用于治疗药物浓度的监测。

(二) 对新药的血药浓度测定

在药物试验阶段仅能停止在动物给药后药代动力学参数的测定,经药物临床试验通过后再进行正常人的药代动力学参数测定。

表3 测定方法的选择

方 法	检测 限度($10^{-9}g$)	分离能力 (选择性)
紫外分光光度法	100	+
荧光分光光度法	1	++
原子吸收光谱法	1	++
薄层扫描光密度法		
紫外检测器	10	++
荧光检测器	1	++
气相色谱法		
氢焰检测器	1	++
氮磷检测器	0.1	+++
电子捕获检测器	0.01	+++
质量碎片检测器	0.001	+++
高效液相色谱法		
紫外检测器	1	++
荧光检测器	0.1	+++
电化学检测器	0.01	+++
免疫法		
放射免疫分析	0.001	++
酶免疫分析	0.001	++
偏振荧光免疫分析	0.001	++

五、免疫分析技术

免疫分析法检出灵敏度比一般化学分析法高,方法快速,不需要复杂的前处理,专一性高,可以直接测定。现在已有许多体液中药物浓度测定用这种方法。

1. 放射免疫分析方法

放射性同位素与抗原结合制成标记抗原,标记抗原与未标记抗原同相应的抗体发生竞争性结合。未结合的抗原呈游离状态。如标记抗原的量与相应抗体量一定,则非标记抗原的浓度愈高,标记抗原与抗体结合的量就愈少(表4)。

所以不加或加进不同已知量的非标记抗原,测定游离的标记抗原与结合的标记抗原的放射性,就能得出一条标准曲线。

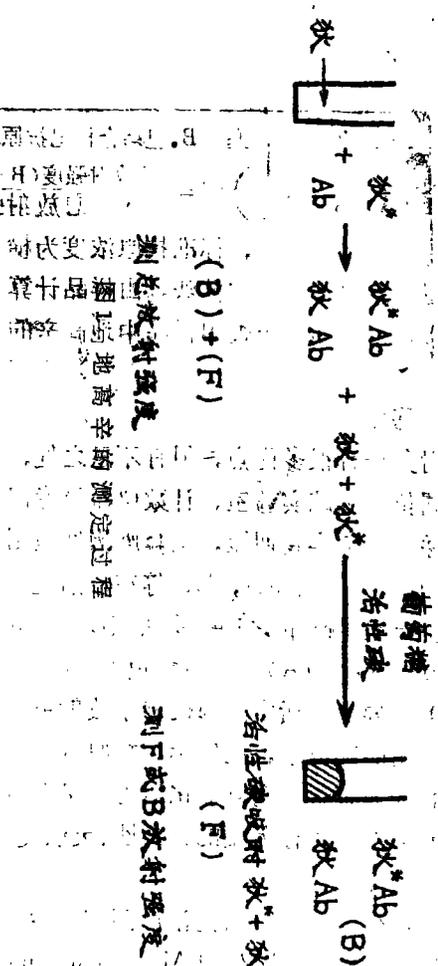


表4 标记抗原与抗体结合率

抗原	抗体	抗原抗体结合物	未结合	B/F	结合率B/B+F
OO	□ □	⊖ ⊖	O		
OO	□ □	⊖ ⊖	O	4/2 = 2	4/2 + 4 = 67%
OO					
OO					
OO	□ □	⊖ ⊖	O		
OO	□ □	⊖ X	O O	3/3 = 1	3/3 + 3 = 50%
XXOO					
XXOO	□ □	⊖ X	O O		
XXOO	□ □	⊖ X	O O	2/4 = 0.5	2/2 + 4 = 33%
XXOO					
XXOO			O O		
XXOO	□ □	⊖ X	O	1/5 = 0.2	1/6 = 17%
XXXX	□ □	X X	O O		
XXXX					

注: F.未结合标记抗原; B.已结合标记抗原; X.抗原(未标记); O.标记抗原。

$$\text{结合率} \left(\frac{B}{B+F} \right) \% = \frac{\text{总放射强度}(B+F) - \text{沉淀放射强度}(F)}{\text{总放射强度}(B+F)} \times 100\%$$

以结合率为纵座标, 标准抗原浓度为横座标作图, 即得一条标准曲线。由样品计算的结合率, 可从曲线上查出样品中地高辛的含量。

2. 酶免疫分析法

放射免疫有很多优点, 但有不足之处, 需要有同位素示踪实验室、计数仪器等专门设备, 并且试剂半衰期短, 试验废物处理困难等。1971年 Engvall, E. 等在放射免疫的基础上发展了酶标记免疫法 (Enzyme Immunoassay EIA), 用酶标记于抗原上, 即以高度特异催化活力的酶代替了放射免疫分析中应用的同位素, 使酶标记抗原 (或抗体) 复合物即有酶的高度催化活力, 又有特异的免疫活性。酶标免疫的特异性、灵敏度, 与放射免疫相近。

对于低分子药物的血药浓度测定, 主要用均相酶免疫法。此法又称EMIT (Enzyme

multiplied Immunassay Technique)

半抗原用化学方法在酶的活性中心附近结合, 成酶的标记半抗原, 当酶标记半抗原与相应的半抗原的抗体结合后, 由于扩大了空间位阻, 大分子底物难于接近酶的活性中心, 酶活力受阻; 但当有游离半抗原物质存在时, 酶标记半抗原与抗体的结合量即随游离半抗原的增加而减少, 酶的活力亦随之增加, 即酶活力与待测半抗原量相当 (反应原理如图2)。

标记酶与酶活力测定:

酶是催化剂, 能在低浓度下作用增加化学反应的速度根据单位时间底物减少或产物增加的量作酶活力测定的指标。用作标记的酶须纯度高, 活性高, 专一性强与抗原或抗体联接后仍保持酶活性。标记酶有下列几种

(表5):

苯妥因酶标化合物含6-磷酸葡萄糖脱氢

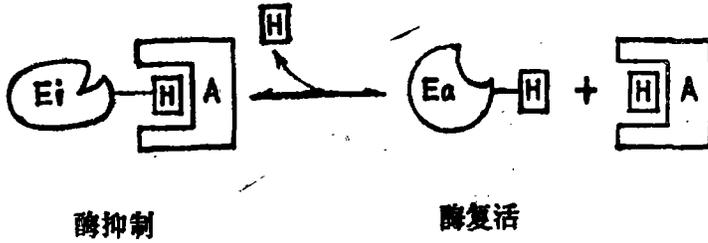


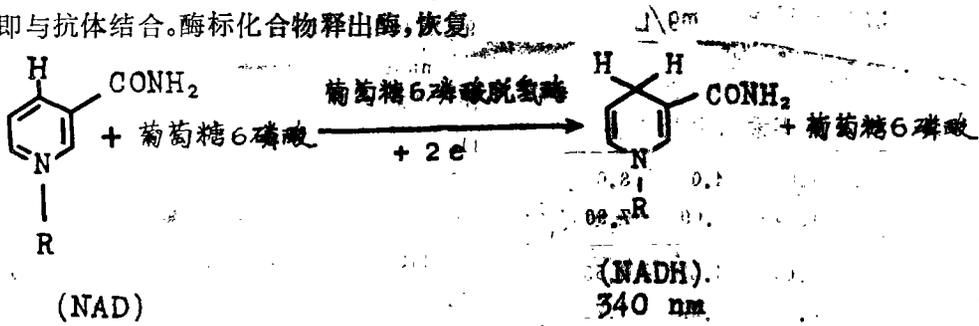
图2 反应原理

表5 标记酶种类

酶标药物	酶名称	底物	活性测定法
(7) 咖啡因	溶菌酶	Micrococcus Lysodeictius 细菌	细胞壁变化 450nm浊度测定
(8) 地高辛	葡萄糖6-磷酸脱氢酶	葡萄糖6-磷酸辅酶 NAD	生成NADH 340nm测定
(9) 甲状腺素	苹果酸酯脱氢酶	苹果酸辅酶NAD ⁺	生成NADH 340nm测定
(9) 黄体酮	β半乳糖苷酶	磷硝基苯 β-D半乳糖苷	磷硝基酚 405nm测定
(10) 可的松	过氧化酶	邻联茴香胺 + H ₂ O ₂	邻联茴香胺氧化物460nm测定

酶活性减低⁽¹¹⁾，底物为6-磷酸葡萄糖与辅酶I(NAD)，加入抗体后，样本中如有苯妥因即与抗体结合。酶标化合物释出酶，恢复

活性，在30℃时与底物作用后生成NADH，反应如下式：



NADH在340nm有吸收，此紫外吸收随反应而增加，控制一定时间测第二次吸收度，两次吸收度差值为ΔA，ΔA与苯妥因浓度成函数关系，根据ΔA即可计算苯妥因浓度。

3. 偏振荧光免疫法(EPIA, Fluorescence Polarization Immunoassay)⁽¹²⁾

应用异硫氰荧光素与药物制成荧光标记物，经偏振光激发放出偏振荧光，荧光偏振程度强弱与分子的转动速度有关。分子大，转

动慢，偏振荧光强；分子小，转动快，荧光弱。所以游离抗原荧光平面随机化，偏振荧光弱，抗原抗体结合物荧光平面转动慢，荧光强。

$$\text{偏振度} P = \frac{F_{//} - F_{\perp}}{F_{//} + F_{\perp}}$$

用标准药品配制成各种浓度，加入一定量荧光标记抗原与抗体后发生竞争反应，产生不同的荧光偏振度，根据偏振度大小与药物浓度绘成标准曲线即能计算药物浓度。

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)。

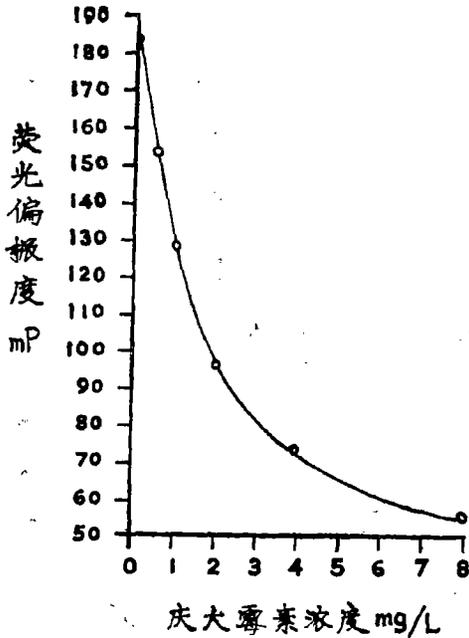


图3 庆大霉素标准曲线

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