

阳性物质的冰醋酸,在实际采购工作中是很困难的。改进法Ⅱ既能避免试验的假阳性,灵敏度又不低于药典法;而且所配试剂稳定,不需要对阳性物质进行预测,因而为防止醋酸所致假阳性提供了有效可行的方法,作为蒸馏水  $\text{NO}_2^-$  与  $\text{NO}_3^-$  的检查方法具有一定的实用价值。

### 参考文献

- [1]周文孝. 蒸馏水  $\text{NO}_2^-$  与  $\text{NO}_3^-$  杂质检查假阳性结果的成因及防止. 中国药学杂志, 1995;30(2):109
- [2]南京药学院主编. 分析化学. 第1版, 北京:人民卫生出版社, 1981:49
- [3]中国医学科学院卫生研究所. 水质分析法. 第4版, 北京:人民卫生出版社, 1974:145~7
- [4]中国医学科学院卫生研究所. 生活饮用水水质检验方法. 第2版, 北京:人民卫生出版社, 1983:142~4

## 高效液相色谱法在体内药物分析中的应用

王晓丹

(佳木斯医学院药学系 佳木斯 154000)

用高效液相色谱法测定体内药物及其代谢产物,可为药物代谢动力学,临床药理学和毒理学等研究提供科学依据。体内药物分析最常用的体液是比较容易得到的血样(血浆、血清、全血)、尿样、唾液及组织液,特殊情况下也采用乳汁、泪液、胆汁、羊水、粪便等接近有关药物作用点的检体<sup>[1]</sup>。

### 一、血样中的药物浓度测定

血浆和血清是体内药物分析最常采用的样本,选用最多的是血浆,因为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密切相关,即血浆中的药浓可以反映药物在体内的状况<sup>[2]</sup>。

Marten 等<sup>[3]</sup>主张用 ODS 柱进行药物的代谢研究,因为药物经代谢后,一般代谢产物的极性比药物本身的极性大,在反相柱上比药物先流出。选择内标时,应使内标物的保留时间比药物的长些,不会干扰代谢产物的分离和测定。某些含氮化合物,还可采用反相离子对色谱法。

Kraak 等<sup>[4]</sup>用柱头浓缩法在 RP-8 反相柱上测定了血样中的抗惊厥药。血样经用高氯酸脱蛋白离心后取上清液注样,用 5ml 的进样圈,依次注入水 2ml,供试液 1ml 和水 2ml,药物保留在柱头,保留能力小的其它成

份被 2ml 水洗脱走,流动相继而洗脱药物,这样可以降低检出限量,注样 50 次,未见柱效下降。

Triebig 等<sup>[5]</sup>测定生物体液(血浆和脑脊液)中的氯霉素,试样置水浴中用高氯酸沉淀蛋白质,离心后取上清液注样,用 Nuclosil  $\text{C}_{18}$  柱,甲醇-水为流动相,254nm 检测波长,检测限量为 0.5mg/l 体液。注样 200 次,未见柱效下降。

Adnan 等<sup>[6]</sup>用  $\mu\text{BondapakC}_{18}$  柱,甲醇-水为流动相,250nm 检测波长,茶碱作为内标测定了血浆和尿中的开林,求得口服 60mg 的片剂,1h 后血浓度为 0.10~1.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,半衰期约为 1.5~5.6h,在体内的清除主要靠代谢。

祁广建<sup>[7]</sup>等测定血清中头孢唑啉浓度,试样加入高氯酸摇匀后,置超声波发生器中超声震荡 5min,取出后离心 10min,取上清液直接进样,用 Nuceleosil  $\text{C}_{18}$  色谱柱,以 MeOH/0.01M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (60:60v/v) 为流动相。回归方程的相关系数  $r$  为 0.9990 ( $n=6$ ),回收率为 94.39%, $\text{CV}=2.44\%$  ( $n=6$ ),检测波长为 254nm。

屈建等<sup>[8]</sup>用反相高效液相色谱法测定了血清中的茶碱,用 CLC-ODS 柱,含

0.02mol/L  $\text{Li}_2\text{SO}_4$  的甲醇-水(35:65v/v)为流动相,于 254nm 处检测,线性范围为 1~70 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,检出限为 0.1ng,日内和日间的变异系数不大于 3.5%,加样回收率为 99.16%, $\text{CV}=1.20\%$ ( $n=6$ )。

罗湘<sup>[9]</sup>等测定了人血清中盐酸劳卡尼浓度,以不锈钢分析柱(200mm $\times$ 5mmID),固定相为 YWGC<sub>18</sub>H<sub>37</sub>,5 $\mu\text{m}$  颗粒,流动相为甲醇-水-0.625mol/L 醋酸铵(86:13:1v/v),取地尔硫草(diltiazem)为内标物,紫外检测波长 226nm。血清最低检测浓度为 5 $\mu\text{g}/\text{L}$ 。在 200~800 $\mu\text{g}/\text{L}$  浓度范围内的线性良好  $r=0.9996$ 。平均回收率为 98.86%( $n=6$ )。

## 二、尿液药物浓度测定

尿药测定主要用于药物剂量回收研究,药物肾清除率和生物利用度等研究以及测定代谢类型等。

郑嘉烈等<sup>[10]</sup>用 244 型高效液相色谱仪配 420 型荧光检测器(8x)测定了人体尿液中的利凡诺含量,采用  $\mu\text{Bondapak C}_1$  3.8 $\times$ 300mm 柱,流动相为 80% 乙醇(AR),20% 水,水中含 0.04% 十二烷基磺酸钠用 0.01mol/L 硫酸调 pH 至 5。激发波长 420nm,发射波长 495nm。样品预处理:取尿样 10ml,加入乙醚 8.0ml,2mol/L NaOH 1ml,振荡放置后,准确量取乙醚层 4.0ml 于一具塞试管中,加 0.1 mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2ml,振荡弃去乙醚层,取 1 $\mu\text{l}$  于 HPLC 上分析,采用外标法,线性范围为 2.5~20ng/ml, $r=0.9992$ ,最低检出量,10<sup>-1</sup> ng,回收率为 99.5%( $n=6$ ); $\text{CV}=7.9\%$ ( $n=6$ )。

王科太等<sup>[11]</sup>用反相高效液相色谱法快速测定人尿中假尿嘧啶核苷,采用 YWG-C<sub>18</sub>10 $\mu\text{m}$ ,4 $\times$ 250mm 柱,流动相为 0.02mol/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,PH 为 3.45,检测波长为 254nm。预处理过程:尿样约 5ml 置 -20 $^\circ\text{C}$  下冷冻 24h 以上后解冻于 1700g 下离心 7min,分离上清液,采用标准加入法测定,相关系数  $r=$

0.9997,线性范围在 0.3~3nmol/10 $\mu\text{l}$  内良好,最低检测浓度为  $3\times 10^{-6}$ mol/L,回收率为 100.3%, $\text{CV}=0.9\%$ ( $n=6$ )。

## 三、其它样品中的应用

尤忠义等<sup>[12]</sup>测定了烧伤病人痂下组织中头孢噻甲羧肟,采用 YWGC<sub>18</sub>柱,流动相为  $\text{NH}_4\text{Ac}$ (0.06mol/L):甲醇=85:15(v/v),前处理过程:精称后匀浆,离心 30min,取上清液 0.5ml 于试管中,加入 0.5ml 甲醇。再加入 0.5ml 氢氯噻嗪甲醇液(内标 24 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ),混匀后离心 30min,取上清液进样。结果峰面积比(复达欣/氢氯噻嗪)与浓度呈良好的线性关系, $r$  值为 0.9993,最低检测量为 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,回收率为 90.15%, $\text{CV}=2.8\%$ ( $n=5$ )。

马小亚<sup>[13]</sup>用高效液相色谱法测定了人体唾液中的卡马西平,应用非那西汀为内标,甲醇-水(59:41v/v)为流动相,在 YWG-C<sub>18</sub>(化学键合相)柱上测定。样品用二氯甲烷一次提出,浓缩后进样,最低检测浓度为 0.025 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,线性范围为 0.25~15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ , $r$  浓度等等。

## 四、HPLC 测定体内药物方法改进

体内药物分析主要考虑的是试样的预处理和分析柱的选择。

试样的预处理在分析过程中起着很重要的作用,过去通常采用有机溶剂提取法<sup>[10]</sup>,操作手续较麻烦,回收率偏低<sup>[15]</sup>,美国 waters 公司<sup>[16]</sup>生产了一种商品名为 SEP-PAK cartridge 的短塑料柱,为生物样品的预处理提供了简便而有效的浓缩净化装置,SEP-PAK 柱分为 SBP-PAK C<sub>18</sub>柱和 SEP-PAK 硅胶合成硅酸镁柱两种类型,可根据试样和溶剂的性质来选择。当样品溶解于极性溶剂时,选用 SEP-PAK C<sub>18</sub>柱,反之则选用 SEP-PAK 硅胶柱。

Fasco 等<sup>[17]</sup>用 SEP-PAK C<sub>18</sub>柱从血浆样品中提取抗血浆药物华法令(Warfarin)及其代谢产物,测定了 100 个血浆样品,其回收

率在 95% 以上。孙定一等<sup>[18]</sup>用 SEP-PAK C<sub>18</sub>柱预处理血样,以 Bondapak C<sub>18</sub>柱分离测定血液中冬凌草甲素的含量,平均回收率达 85%。

还有一种在 HPLC 仪器的色谱柱前加预柱的方法来净化,预柱常用大颗粒填料(40 $\mu$ m),长 3~5cm。

Pietta 等<sup>[19]</sup>在色谱柱和进样器间插入一根 Bondapak C<sub>18</sub>预柱用反相色谱直接测定尿稀释液中的长春胺,其平均回收率为 99.8 $\pm$ 1.5%,精密密度为 $\pm$ 3.5%,各种尿样未出现干扰峰。Shelley 等<sup>[20]</sup>在色谱柱前附加一个 C<sub>18</sub>保护柱,无需提取或冻干步骤即可进行鼠血清中的全反式或 13-顺式维生素 A 酸定量。徐铭甫等<sup>[21]</sup>用反相色谱法以茶碱为内标测定人血中头孢他啶(CFZ)浓度时,采用 ODS-Hypersil 5 $\mu$ m $\phi$ 2.1 $\times$ 100mm 小孔径柱,预柱为 ODS-Hypersil 30 $\mu$ m $\phi$ 2.1 $\times$ 20mm;与二极管阵列检测器(DAD),以 2% 甲醇的 0.01mol/L 醋酸铵溶液(pH=3.5):甲酸(9:1)为流动相;测定波长为 254nm,参比波长分别为 550nm 和 295nm,此两个双波长组合分别用于 CFZ 和茶碱峰面积的定量,消除了干扰内标测定的血清中杂质的影响。同时对测定波长 254nm,参比波长 550nm 对数据进行外标法,计算结果显示外标法与内标法基本一致。张文板等<sup>[22]</sup>在测定头孢拉定血药浓度时,在分析柱:Zorbox ODS $\phi$ 4.6mm $\times$ 250mm 与进样器间加预柱 Zorbox ODS $\phi$ 4.6mm $\times$ 10mm,采用流动相为 HAc-NH<sub>4</sub>Ac(0.05mol/L)-甲醇-水(0.3:4:25:70.7, pH=4~5),检测波长为 254nm,其回归方程的线性关系良好,  $r=0.9986$ ,方法平均回收率为 107.73%,RSD 为 1.0%( $n=8$ )。

柱前预柱只起净化而无浓缩作用。生物体液中痕量组分的分析尚采用联机痕量浓缩技术—柱切换技术,生物样本提取物可在分析柱前加浓缩柱进行浓缩,以供在线处理一

些复杂样品。此法把浓缩柱安装在样品阀中代替回路管,在浓缩柱上反复进样,然后用反冲方法将样品注入分析柱分离测定。

Kraak 等<sup>[23]</sup>用柱切换技术测定了血样中的抗惊厥匹拉米酮等,检测限量由 80ng/cm<sup>3</sup> 降到 16ng/cm<sup>3</sup>,实验中注样 50 次未见柱效下降。Bankelma 等<sup>[24]</sup>用此技术测血浆中吩噻嗪,检测限量为 9ppb。郭联庆等<sup>[25]</sup>利用柱切换高效液相色谱法快速测定奎尼丁血药浓度,只需取微量血样作简单去蛋白处理就可直接进样分析,最低检测限为 0.65 $\mu$ mol/L,平均回收率 90%。此技术兼具净化、浓缩两种功能,缩短了总的分析时间。方法简便可靠,回收率高,检测限量低,装置全自动,分析过程平稳,对分离测定极性大的代谢产物十分可取,有较大的发展前途。

另外为了拆分对映异构体,采用柱前手性衍生化法测定异构体。

邱宗荫等<sup>[26]</sup>利用柱前衍生化反相高效液相色谱法拆分地佐西平对映异构体,用乙酰葡萄糖异硫氰酸酯(GITC)作柱前手性衍生化试剂。样品为血样,衍生化过程为:取样品 100 $\mu$ l 加入等体积 GITC 溶液和 2 $\mu$ l 三乙胺,混匀。室温放置 1h,然后取 5 $\mu$ l 反应液进样。柱子为 NOVA-Pak C<sub>18</sub>柱,流动相为甲醇-乙腈-水-三乙胺(26:26:47.5:0.5v/v);对映异构体达到了基线分离,在 0.005~0.2mg/ml 浓度范围内左旋和右旋地佐西平的浓度分别与其峰面积呈线性关系,回收率:左旋(-)100.5%,右旋(+ )97.6%。路红莉等<sup>[27]</sup>用高效液相色谱法拆分和测定大鼠血清中的氢化阿托酸[HTA],以 S-(-)-萘乙胺为衍生化试剂,基于样品与化学纯的胺类生成非对映异构体的酰胺,然后用 HPLC 进行分离测定,柱子为 Beckman 硅胶柱, Vlerasphere Analytical 5 $\mu$ m, 2.0mm $\phi$  $\times$ 150mm,流动相为:正己烷-乙酸乙酯(87:13),检测波长为 254nm,测得:R-(-)-HTA 的回归方程为  $y=64.94x-0.9370$ ,  $r=$

0.9997, 回收率为 92.84%, RSD 5.12% (n=5)。S-(+)-HTA:  $y = 68.07x - 0.9101$ ,  $r = 0.9997$ , 回收率 95.50%, RSD = 3.69% (n=5)。

#### 四、前景展望

高效液相色谱法将进一步向自动化, 智能化及联用技术上发展。

(一) 自动提取装置 分为液-液提取装置和液固提取装置。Tethnicon 公司的 FAST-LC 系列属于液-液提取, 对药物提取, 干燥, 再溶解及进样均自动化<sup>[28]</sup>, 或用溶剂洗净样品均自动化。Dupont 公司的 preb 系列和 varian 公司的 AASP 均属液-固提取装置, 两者对样品吸附、洗净, 除去杂质, 溶出药物和进样均自动进行。常用于血中药物的分析<sup>[29,30]</sup>。

(二) 用机器处理的自动化 1982 年美国开发了实验室机器人(LA 机器人), 现有 10 家以上公司在生产, 并有专著介绍<sup>[31]</sup>, 用 LA 机器人进行预处理的同时, 用微机控制可进行柱和流动相的交换调节<sup>[32]</sup>, 日本于 1984 年输入了 1 号机, 广泛应用于含量试验<sup>[33]</sup>, 稳定性观察<sup>[34]</sup>, 体液成分和体液中药物的分析<sup>[35-37]</sup>。为了将取得的庞大的实验数据整理和做成资料, 开发了数据处理系统。

(三) 新的 HPLC 检测器问世 检测器一直是液相色谱仪的最薄弱环节, Vaver 公司的改进型《蒸发光散射检测器》适用于表面活性剂, 碳水化合物等难挥发物质的测定<sup>[38]</sup>, Gynkotek Analytical 开发出一种新的光电二极管阵列检测器(VVD3205UV-vis)。只是目前价格还较高。

(四) 联用仪 目前 HPLC-UV, HPL-FTIR 联用仪已趋于成熟。近期高效液相色谱仪的发展主要是高效液相色谱和质谱联用仪即 HPLC-MS。

总之, 高效液相色谱的发展和完善必将给体内药物分析及整个分析测试手段带来一

个更广阔的天地。

#### 参考文献

- [1] 曾经译. 生物药物分析, 1990
- [2] 安登魁. 药物分析, 第三版
- [3] Marten TR, et al. Chromatographia, 13(3)
- [4] Kraak JC, et al. ibid, 1980; 13(11): 673
- [5] Triebig G, et al. Anal chem, 1979, 299, 271
- [6] Adnan El-Yazigi, et al. J Pharm Sci, 1980; 69(12): 1434
- [7] 祁广建等. 药物分析杂志, 1991; 11(2): 102
- [8] 屈建等. 药物分析杂志, 1991; 11(3): 152
- [9] 罗湘等. 药理学学报, 1995; 30(8): 605~9
- [10] 郑嘉烈等. 色谱, 1989; 7(5): 317~8
- [11] 王科太等. 色谱, 1992; 10(1): 48~9
- [12] 尤忠义等. 色谱, 1994; 12(2)
- [13] 马小亚. 药物分析杂志, 1991; 11(6): 1~2
- [14] 於东晖等. 药理学学报, 1995; 30(4): 286~90
- [15] Valfang V, et al. J chromatogr, 1982; 239: 475
- [16] Snyder LR, et al. Introduction to Modern Liquid Chromatography, 2ed, P<sub>728</sub>, New York, 1979
- [17] Fasco MJ, et al. J Lig chromatogr, 1979; 2: 265
- [18] 孙定一等. 第四次全国色谱学术报告会文集. 上海: 1983: 369
- [19] Pietta P, et al. J chromatogr, 1981; 210: 149
- [20] Shelley R, et al. J pharm Sci, 1982; 71: 262
- [21] 徐铭甫等. 药物分析杂志, 1992; 12(3): 131~3
- [22] 张文柏等. 药物分析杂志, 1992; 12(5)
- [23] Kraak J, et al. Chromatographia, 1980; 13: 673
- [24] Bankelma J, et al. J chromatogr, 1978; 149: 587
- [25] 郭联庆等. 药物分析杂志, 1993; 13(1)
- [26] 邱宗荫等. 药理学学报, 1995; 30(6): 454~6
- [27] 路红莉等. 药物分析杂志: 1993; 13(5)
- [28] Wal SVD, et al. Chin chem, 1981; 27: 1233
- [29] 坂本 丰, 他. 分析化学, 1986; 35: 225
- [30] Karnes H T, et al. J Liq chromatogr, 1988; 11: 489
- [31] Strimaitis J R, et al. "Advances in Laboratory Automation - Robotic 1987" (1987), (zymark corporation, Hopkinton)
- [32] Coher B L. ibid, 1987; 25: 202
- [33] 小池秀夫, 他. 医药品研究, 1987; 18: 676
- [34] 清水礼治, 他. 医药品研究, 1985; 16: 1124
- [35] Ko KKinien P, et al. J chromatographic Sci, 1987; 25: 680
- [36] Pirnchny JV, et al. ibid, 1987; 25: 181
- [37] Lunders Rc, et al. ibid, 1981; 25: 142
- [38] A light Scattering detector for liquid chromatography PB stockwell. Interlab, 1992; 2: 25~8