

· 药物分析和鉴定 ·

HPLC法测定血药浓度的样品预处理

第二军医大学药学院中心仪器室 戴富宝

血药浓度测定是研究临床药理及临床药理学领域中药物代谢动力学、血药浓度临床监测、药物生物利用度、新老药剂型研究和评价的重要手段。

血药浓度的测定方法很多，诸如放射性同位素法、光学分析（比色、紫外、火焰分光、原子吸收、荧光等方法）、层析法（薄层扫描、气相层析、高效液相层析等）、电化学分析法（离子选择电极、伏安法、催化极谱及阳极溶出法）、微生物法以及放射免疫测定法。

以上这些方法中、分光光度法以及气相色谱法存在一些缺点和局限，若代谢物与原药结构类似则吸光叠加不易区分，同时体液中的内源性杂质干扰大，往往使测定结果偏高；气相色谱法虽能分离结构类似的代谢产物和杂质，但带有 $-OH$ 、 $=NH$ 、 $-CONH$ 、 $COOH$ 等基团的极性药物和代谢产物的挥发性小，不易气化；若采用硅烷化衍生效法，操作繁冗，受到一定限制。而高效液相色谱法对样品的分离定量不受挥发度、热稳定性及分子量的影响，而且流动相的选择性比气相色谱大为增加，可从极性、粘度、pH值、离子强度、梯度洗脱等方面选择，选择余地大。检测器灵敏度高： $UV = 10^{-9}$ g/ml, $Fl = 10^{-12}$ g/ml, $EC = 10^{-14}$ g/ml。所以高效液相层析无论从灵敏度、线性关系、专一性、准确性和精密性、回收率等方面都比光学法、气相层析法好。放射免疫法灵敏度虽然很高，但此法需用标记化合物，价格昂贵，一般不常采用。

HPLC法测定血药浓度是一种较好的方法，具有较高的分离能力。1981年开始用此法研究人血浆中巴比妥的血药浓度。近年来在血药浓度的测定中，该法报道越来越多，约占上述方法的70%左右。HPLC法虽然分离能力强，但在体内测试血浆、血清、唾液、尿、组织等的样品就比较复杂，如不作样品前处理，血样注入柱子就会污染固定相，降低柱效和分离度，大大降低色谱柱的寿命。污染严重时，会导致柱子失去分离能力。因此血样的前处理是至关重要的，现将血样前处理的方法分述如下。

血液样品中去除蛋白质的方法

在治疗药物监测中，常用的样品有血液、尿液、唾液及脑脊液等。血液和脑脊液中蛋白质含量较高，有时可高达7%左右，如不除去会严重污染色谱柱影响分析结果。去除蛋白质方法有如下几种：

1. 蛋白质沉淀法：(1) 蛋白质沉淀法是加入有机溶剂使蛋白质变性而沉淀。甲醇、乙腈、丙酮、乙醇为常用的蛋白质沉淀剂。(2) 利用无机离子如酸性的磷钨酸、三氯醋酸、三氟醋酸、高氯酸等。这些酸性的阴离子和阳离子形式的蛋白质（在等电点酸侧时）形成不溶性的蛋白质而沉淀去除。(3) 利用Hg、Cu、Ag、Zn等金属阳离子和阴离子形式的蛋白质（在等电点碱侧时）形成不溶性重金属盐的络合物而沉淀。(4) 高浓度的中性盐如镁盐、硫酸铵、硫酸钠等可使蛋白质“盐析”而沉淀。这是由于加入高浓度的中性盐后可使蛋白质脱水。各种蛋

白沉淀剂的作用比较列于表1。

表1 各种蛋白沉淀剂的作用比较

试 剂 名 称	上 清 液 p H 值	每ml血浆所需蛋白沉淀剂的量(ml)及蛋白沉淀百分率(%)									
		0.2	0.4	0.6	0.8	1.0	1.5	2.0	3.0	4.0	
10% 三 氯 醋 酸	1.4~2.0	99.7	99.3	99.6	99.5	99.5	99.7	99.8	99.8	99.8	
6% 高 氯 酸	<1.5	35.4	98.3	98.9	99.1	99.1	99.2	99.2	99.1	99	
Na ₂ WO ₄ - H ₂ SO ₄	2.2~3.9	3.3	35.4	98.6	99.7	99.7	99.9	99.8	99.9	100	
5% 偏 磷 酸	1.6~2.7	39.8	95.7	98.1	98.3	98.3	98.5	98.4	98.2	98.1	
CuSO ₄ - Na ₂ WO ₄	5.7~7.3	36.5	56.1	78.1	87.1	97.5	99.8	99.9	100	100	
ZnSO ₄ - Ba(OH) ₂	6.6~8.3	45.6	80.7	93.5	89.2	93.3	97.0	93.3	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	9~19	1.5	7.4	33.6	71.0	96.2	99.1	99.4	99.2	99.1	
甲 醇	8.5~9.5	17.6	17.4	32.2	49.3	73.4	97.9	98.7	98.9	99.2	
乙 醇	9~10	10.1	11.2	41.7	74.8	91.4	96.3	98.3	99.1	99.3	
饱 和 硫 酸 铵	7.0~7.7	21.3	24	41	47.4	53.4	73.2	98.3			

2. 离子交换树脂法：离子交换树脂具有离子交换及可逆性吸附的特性。当样品经合适的离子交换树脂时，未解离的药物分子被吸附，而解离的药物分子则在树脂上作相应的离子交换，其它化合物包括蛋白质分子经过树脂间空隙直接滤过流出。最后将吸附在树脂上的药物用适当溶剂洗脱，达到分离蛋白质的目的。

药物在离子交换树脂上存在着分子型吸附和离子型的交换两种作用。分子型的吸附力与树脂的表面积有关。离子型的交换能力除与树脂的交换特性有关外，还与药物本身的解离程度有关。而药物解离度与药物的pKa和介质的pH有关。大多数药物为弱酸性或弱碱性，弱酸性药物可选用弱阴离子树脂，介质的pH > pKa时，离子型药物增加，提高了介离度，增加交换能力；对弱碱性则相反，可选用弱阳离子树脂，介质的pH < pKa时，离子型药物增加，提高了介离度，增加交换能力。

血样的取样量一般很少，所用的树脂柱可以自制，其大小形状如图1所示。使用时应注意样品通过树脂的流速，一般控制在10~15滴/分。

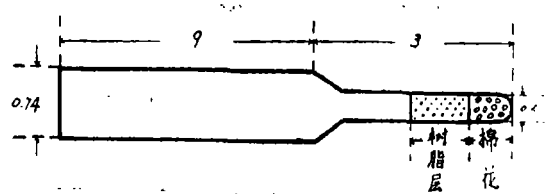


图1 树脂柱(单位: cm)

示例：血清中氨基酸含量测定时，去除蛋白质采用本法。将0.2ml 血清样品，用1 N HCl 调节pH至2~3，使氨基酸的氨基端解离增加，易于交换，加1 ml蒸馏水稀释。取100mg左右Amberdite CG-120 H⁺ 200目离子交换树脂充填于树脂柱中(见图1)，树脂柱先用蒸馏水洗涤一次，然后将上述酸化的血样过柱，此时蛋白质和其它杂质首先流出，氨基酸则吸附在树脂上，最后用0.4N NH₄OH 1 ml洗脱。收集其洗脱液吹干后，再用二硝基苯(DNP)、邻苯二甲醛(OPT)柱前衍生或用茚三酮柱后衍生，用荧光检测器检测。

3. 超滤膜法：超滤膜法是一种高分子材料做成的微孔膜，大小可根据截留蛋白质分子量大小来选择。当截留分子量控制在

25000~50000之时,可将血浆内99.5~99.8%的蛋白质除去,但对于小于上述分子量的物质能被滤过。处理水溶性药物和代谢产物时可用此法。因水溶性药物和代谢产物与血浆蛋白质结合不紧,因此可用超滤膜去除,滤出液经离心取澄清的超滤膜液进样,亲脂性药物及其代谢产物与蛋白结合较紧,可在酸性条件下用钨酸钠或三氯、三氟醋酸除去结合的蛋白,然后用有机溶剂提取后进样。超滤膜法不破坏样品中的组分,同时此法也较简便。其具体方法是将样品置于超滤膜中,用加压或真空以及离心的方法过滤,得到的滤液即可用于分析。国外milibore/Waters公司生产此种滤膜。国内上海医工院也有生产。

4. 有机溶剂提取法:血液样品中不但含有蛋白质,而且还含有大量的生物物质、无机盐、类脂以及其它的杂质。它们不但会影响色谱的分离和检出,还会影响检出灵敏度。有机溶剂提取的目的在于排除蛋白质及干扰物质,浓缩样品,提高检测灵敏度。因此样品的提取、分离、净化和浓缩对血样浓度的测定来说是很重要的。

药物可分为水溶性和脂溶性两大类。根据药物的不同性质选择提取、分离、净化和浓集的方式。常用的方法有有机溶剂提取法,根据提取原理的不同可分为液-液分配和离子对方法提取。液-液分配提取的原理是选择与水不相混合的有机溶剂提取。根据待测物的化学性质、溶剂极性、介质和pH以及提取溶媒的体积比例等,特别是根据样品的pKa与介质的pH,因在不同介质和有机溶媒中的分配系数决定于药物在两相中的分配比率,要使90%以上的药物以非离子形式被有机溶媒所提取,可按照Brodie的经典方法进行溶剂提取,即酸性药物先酸化,碱性药物先碱化,然后分别提取到与水不相溶的有机溶剂中。对碱性药物要求溶液中介质的pH值应该高于待测组分的pKa值1~2pH

值,对酸性药物则反之,其原因是非介离子形式比介离子形式更亲脂。

另外,有机溶媒的选择还可以根据极性相似的原则和药物在该溶媒中的溶解度大小(即分配系数)来适当选择,或用几种不同极性溶媒用不同体积比来提取待测物时,往往可以得到满意的效果。有时需用二元以上的溶媒提取效果会更好,如茶碱的提取用5%异丙醇氯仿溶液效果很好。

在药物监测中,由于血样中药物含量低,操作步骤力求简便,尽可能减少提取次数,增加溶剂的量,达到一次提取成功,提高回收率。例如提取血液中慢心律时,在试样中加入1N NaOH后,选择三种不同极性的有机溶媒比较提取率,结果乙醚的提取率最高,而二氯乙烷和氯仿提取率很低。另外溶剂与试样的体积比也有一定要求,只有在4:1时才能提取完全。

对一些电离度大的极性化合物(如季铵盐类)常常难以用有机溶媒提取,此时可用离子对方法提取。其方法是用适当的反离子与其试样中的离子形成离子对而被有机溶媒提取。如磺酸或羧酸阴离子能与阳离子染料或吩噻嗪类形成离子对复合物而被提取;有机铵离子能与阴离子如苦味酸盐、二苦胺、氯化物、硝酸盐或碘化物形成离子对复合物,如胆碱与二苦胺形成离子对后可以从水相(pH 11.5)提取到二氯甲烷中去。

也可以根据Herning描述的方法,将样品加5倍量的水,加数倍样品量有机溶剂,再加无水碳酸铵使其饱和,由于碳酸铵的盐析效果,再根据抽提化合物的理化性质调整pH,使许多特定的化合物抽提至有机溶剂中。

一些亲脂性药物,在一广泛的pH范围内(pH 2~12)保持非离子型和稳定的状态。要纯化这些药物,可以通过杂质化合物形成盐而被提取到水相中去的方法。这些药物首先在pH12时被提取到有机相中,此

时移去有机酸的阳离子盐；第二次提取在pH 2进行，此时将移去有机碱的阴离子盐。移去非极性杂质的方法通常是将药物溶介在一相对极性溶剂中并将非极性杂质提取到一非极性溶剂中。例如提取血浆和尿中微量(ng)的胆固醇类，为了去除脂肪酸和甘油三酸酯等杂质就是用此法。

5. 预柱法(Pre Column): 在HPLC分析柱前加预柱的方法来净化，预柱常用大颗粒填料(30—40 μ m)长3—5cm。pietta等在分析柱前接上一根Bondapak C18/Corasil预柱，用反相色谱法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等在分析柱前加一个C18保护柱，采用提取或冻干步骤即可进行鼠血清中全反式或13-顺式维生素A酸定量。加预柱可以延长分析柱的寿命，并在分析体液时可直接进样。

6. 柱切换技术：在分析色谱柱前加预柱只起净化而无浓集作用。生物体液中痕量组分的分析可采用联机痕量浓缩技术(柱切换技术)见图2。生物样品提取物可在分析柱前加浓缩柱，装在样品阀中代替回路管，在浓缩柱中反复进样，然后用反冲方式将样品入分析柱作分离测定。Kraak等用柱切换浓缩技术测定了血样中抗惊厥镇痛药匹拉米洞等，其检测痕量由80ng/cm³降到16ng/cm³，实验中注样50次未见柱效下降。Lankelma等用柱切换技术测定血浆中的吩噻嗪，检测限量为9 ppb。柱切换浓缩技术的关键在于选择浓缩柱的固定相和富集用的流动相。David等用RP-18柱(3 cm \times 4.6 mm)代替回路管作为浓缩柱，以0.5M的醋酸铵水溶液(pH5.1)为富集用的流动相，测定人血浆中的5-羟色胺，检出限量为1.1 Pg/ml。Wolfgang等用RP-8为浓缩柱，Rp-18为分析柱，测定血浆中氨基比林及其

主要代谢产物甲基氨基匹林。氨基安替匹林等回收率接近100%。柱切换痕量浓缩技术兼具净化、浓缩两种功效，缩短了总的分析时间，方法简单可靠，回收率甚高。检测限量低，装置全自动，分析过程很平稳。此法对分离测定极性大的代谢产物是十分可取的，有较大的发展前途。

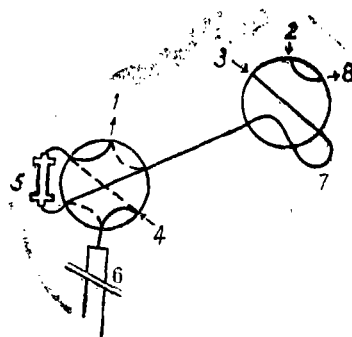


图2 柱切换仪器装置示意图

——示浓缩状态……示进样状态

1. 废液, 2. 注样, 3. 泵(溶剂) 4. 泵(洗脱液), 5. 浓缩柱, 6. 分析柱, 7. 回路管(1ml), 8. 废液

7. SEP-pak Cartridge 塑料短柱法：美国Waters生产的一种商品名为SEP-Pak Cartridge塑料短柱，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SEP-PakC18柱、SEP-Pak-CN柱、SEP-Pak 硅胶柱以及合成硅酸镁柱几种类型。可根据试样和溶剂的性质来选择。当样品溶于极性溶剂时，选用SEP-Pak C18柱，反之则选用SEP-Pak 硅胶柱。Pasco等用SEP-PakC18柱从血浆样品中提取抗血凝药华法令及其代谢物，测定100个血浆样品其回收率在95%以上。我院药理教研室用SEP-Pak C18柱提取西利宾(Silibin)降血脂药回收率均在95%左右。总之，这种柱在样品提取、净化较之传统的溶剂提取法具有步骤少、省溶剂、节省时间等优点，柱子用后弃去或再生利用。

(参考文献15篇略)