



体内药物分析实验

实验一：人血浆中水杨酸

HPLC测定方法的建立



药物分析实验教学中心

沈阳药科大学



人血浆中水杨酸

HPLC测定方法的建立

■ 实验目的

1. 掌握体内药物分析生物样品前处理方法
2. 熟悉体内药物分析方法建立的一般步骤

沈阳药科大学



一、体内药物分析方法建立的一般步骤

- 分析方法设计
- 分析方法建立与验证
 - 建立方法
 - ◆ 色谱条件筛选——标准溶液
 - ◆ 分析条件优化——标准样品/实际样品
 - 验证方法
 - ◆ 确认方法可行性——QC样品/实际样品

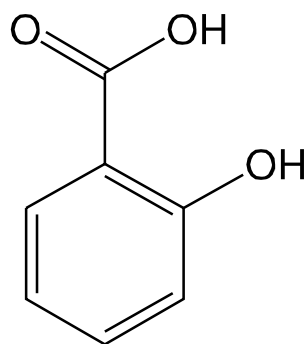
沈阳药科大学



二、人血浆中水杨酸HPLC测定方法建立

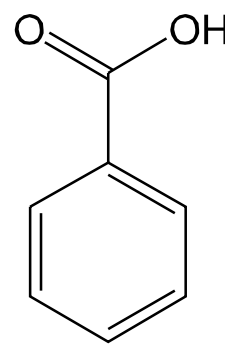
(一) 实验药品与生物介质

- 水杨酸对照品
- 苯甲酸(内标物质)
- 空白人血浆



$C_7H_6O_3=138.12$

CAS: 69-72-7



$C_7H_6O_2=122.12$

CAS: 65-85-0



沈阳药科大学



二、人血浆中水杨酸HPLC测定 方法建立

(二) 实验设备与器材

- 高效液相色谱仪
- 涡旋混合器
- 高速冷冻离心机(4℃, 12000r/p)
- 微量取液器(10~50 μ l; 0.1~0.5ml)
- EP离心管(1.5ml)

沈阳药科大学



二、人血浆中水杨酸HPLC测定 方法建立

(三) 色谱条件

- 色谱柱: ODS
- 流动相: 乙腈-0.5%磷酸 (30:70), 流速: 1ml/min
- 检测波长: 237nm

沈阳药科大学



二、人血浆中水杨酸HPLC测定 方法建立

(四) 血浆样品处理

- 精密吸取血浆样品(冰水解冻)200 μ l，置离心管中，精密加内标溶液10 μ l与乙腈20 μ l，涡旋混合20s
- 加0.5mol/L盐酸溶液100 μ l与乙腈400 μ l，涡旋混合1min，4 $^{\circ}$ C放置15min，4 $^{\circ}$ C离心(12000r/min)10min
- 上清液移至含有100mg氯化钠的离心管中，涡旋混合20s，4 $^{\circ}$ C放置10min，4 $^{\circ}$ C离心(12000r/min)10min，取上清液20 μ l进样

沈阳药科大学



二、人血浆中水杨酸HPLC测定方法建立

(五) 溶液的制备

- 系列标准溶液——精密称取水杨酸对照品100mg, 置100ml量瓶中, 用乙腈溶解并稀释至刻度, 摇匀; 精密吸取适量, 用乙腈定量稀释制成浓度为5.0, 10.0, 20.0, 50.0, 100, 200和500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的溶液, 即得
- 内标溶液——精密称取苯甲酸对照品10.0mg, 置100ml量瓶中, 用乙腈溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得

沈阳药科大学



三、人血浆中水杨酸HPLC测定 方法验证

(一) 特异性

- 分别取6份不同来源的空白血浆200 μ l，除以乙腈10 μ l替代内标溶液外，其余按“血浆样品处理”项下方法操作，记录色谱图(A)
- 取空白血浆200 μ l，除以定量下限附近浓度的水杨酸标准溶液20 μ l替代乙腈外，其余按“血浆样品处理”项下方法操作，记录色谱图(B)

沈阳药科大学



三、人血浆中水杨酸HPLC测定 方法验证

(一) 特异性

- 取口服给药后于分布相末期采集的血浆样品，照“血浆样品处理”项下方法操作，记录色谱图(C)
- ◆ 比较色谱图A、B和C，空白血浆和血浆样品中的内源性物质及其他非特定代谢产物应不干扰水杨酸和内标物的测定

沈阳药科大学



三、人血浆中水杨酸HPLC测定 方法验证

(二) 标准曲线与定量下限

- 空白血浆200 μ l数份，置离心管中，分别加入浓度为5.0, 10.0, 20.0, 50.0, 100, 200和500 μ g/ml的系列标准溶液20 μ l，制成相当于水杨酸浓度为0.50, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0和50.0 μ g/ml的系列标准血浆样品，照“血浆样品处理”项下，自“精密加入内标溶液10 μ l”起同法操作，记录色谱图

沈阳药科大学



三、人血浆中水杨酸HPLC测定 方法验证

(二) 标准曲线与定量下限

- ◆ 以水杨酸血浆浓度(c)为横坐标，水杨酸与内标物的峰面积比值(y)为纵坐标，用加权($w=1/c^2$)最小二乘法进行回归运算，求得的直线回归方程即为标准曲线；连续测定3天，标准曲线应稳定
- 照上述方法制备水杨酸血浆浓度为 $0.50\mu\text{g}/\text{ml}$ 的QC样品6份，同法操作；用标准曲线计算浓度，准确度应在 $\pm 20\%$ 以内，相对标准偏差 $\text{RSD} \leq 20\%$

沈阳药科大学



三、人血浆中水杨酸HPLC测定 方法验证

(三) 精密度与准确度

- 空白血浆200 μ l，照“标准曲线与定量下限”项下的方法制备并测定低、中、高3个浓度(水杨酸浓度分别1.0，5.0和40.0 μ g/ml)的QC样品各6份；连续测定3天，用随行标准曲线计算当天QC样品中水杨酸浓度，结果准确度(RE)与精密度(RSD)应符合要求
- ◆ 低浓度RE为 $\pm 20.0\%$ ，RSD $\leq 20.0\%$ ；
- ◆ 中、高浓度RE为 $\pm 15.0\%$ ，RSD $\leq 15.0\%$

沈阳药科大学



三、人血浆中水杨酸HPLC测定 方法验证

(四) 提取回收率

- 照“精密度与准确度”项下方法制备并测定低、中、高3浓度(水杨酸浓度1.0, 5.0和40.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$)的QC样品各6份, 记录峰面积 $A_{\text{低}(1\sim6)}$, $A_{\text{中}(1\sim6)}$, $A_{\text{高}(1\sim6)}$
- 取空白血浆200 μl , 自“加0.5mol/L盐酸溶液100 μl ”起, 照“血浆样品处理”项下方法操作, 上清液中加入相应浓度的标准溶液20 μl 和内标溶液10 μl 后进样, 记录相应峰面积, 计算3次测定的平均值 $B_{\text{低}}$, $B_{\text{中}}$, $B_{\text{高}}$

沈阳药科大学



三、人血浆中水杨酸HPLC测定 方法验证

(四) 提取回收率

- ◆ 回收率(%)=100A/B
- ◆ RSD ≤ 15.0%(20.0%)

沈阳药科大学



三、人血浆中水杨酸HPLC测定 方法验证

(五) 溶液稳定性

- 空白血浆200 μ l，照“精密度与准确度”项下方法制备并测定低、高2个浓度(水杨酸浓度为1.0和40.0 μ g/ml)的QC样品各6份；于室温放置8h后再次测定，记录的峰面积与初始值比较
- ◆ 相对误差 $\leq \pm 10.0\%$

沈阳药科大学



三、人血浆中水杨酸HPLC测定 方法验证

(六) 注意事项

- 离心要充分
- 处理后的样品不宜放置时间过长
- 进样前确认上清液澄清，如浑浊应再次离心后进样

沈阳药科大学



三、人血浆中水杨酸HPLC测定 方法验证

(七) 操作演示

[观看视频](#)



沈阳药科大学