

高效液相色谱法在医学领域中的应用

刘 华 赵琼蕊

(上海第一医学院附属中山医院内科实验室)

高效液相色谱法 (HPLC) 问世不久就被应用于医学领域的某些研究工作。近年来, 随着各种高效能色谱柱的出现和多元溶剂梯度洗脱的完善, 使得 HPLC 对人体内的许多具有重要生理意义的多组物质常能同时测定。再加上检测器和生化技术的发展以及样品预处理方法的改进, 分析的灵敏度也明显提高。HPLC 已经成为并将继续作为医学领域研究工作中的非常有效的仪器分析方法。本文就这方面的应用情况作一概述。

蛋白质(1, 2): HPLC 分析蛋白质的速度比经典的色谱方法快10倍以上。根据蛋白质的基本性质, 如分子量大小、电荷性、亲水性程度和生物亲和性, 可选用凝胶过滤或渗透色谱、阳离子或阴离子交换色谱、反相色谱和亲和色谱。目前市场上已有供蛋白质分析用的系列色谱柱。

血红蛋白是由血红素与珠蛋白结合而成。以往用电泳法可发现六种, 用 HPLC 法可发现有更多的组分, 其中一些小峰为糖基化血红蛋白(2)。如测定 H_{1A} 可反映糖尿病的病情控制情况。比血糖和糖耐量试验更为敏感。可用阴离子交换色谱分析, 流动相 A 为 0.02 摩尔的三羟甲基胺基甲烷和醋酸缓冲液 (pH 8.0) + 0.01% 氰化钾, 流动相 B 为 A 液中再加入 0.05 摩尔的醋酸钠。梯度洗脱 0~100% 20 分钟, 流量 2.5 毫升/分, 在紫外 414nm 处检测。也可用反相色谱分析, 测定新生儿体内的胎儿型血红蛋白 (H_{bF}), 对异常血红蛋白血症分类(1)。

肽(3, 4): 以往常用低压, 弱离子交换的色谱法分析肽类。近 5 年来, 反相 HPLC 已可成功地应用于分析许多肽, 并可测定生物体内的多肽, 这有助于我们观察蛋白质和肽的合成或降解过程(3)。Wehr 利用反相 HPLC 分析了一些亲水性和轻度疏水性的肽, 包括生长抑素、胰岛素、胰高糖素等。同时观察了不同固定相和流动相对肽的色谱行为的影响。结果显示, 各种化学键合相对肽的亲亲和度的顺序为 $C_{18} >$ 己基 $>$ 氨基, C_{18} 的选择性

也优于苯基和己基。各种流动相中以低 pH 的缓冲溶液和高离子强度的烯丙基铵或胺为较好, 如四甲基氯化铵或三乙胺。因其可参与各种交互作用, 如可和流动相中的负电荷溶质形成中性的离子对, 或可分配入固定相, 导致动态的阳离子交换。在分析时流动相的选择应根据肽链的长度, 亲水性, 各种氨基酸残基的特性等(4)。

氨基酸(5, 6): 氨基酸在生物体内的含氮物质的代谢, 蛋白质的合成和更新中占重要地位。近年来采用 HPLC 分析氨基酸的报告日渐增多。这一方法比经典的氨基酸自动分析仪分析速度更快, 灵敏度更高。所用的衍生试剂为磷苯二甲醛和巯基乙醇, 这一反应可在水相中完成, 反应时间仅需几分钟, 生成的氨基酸衍生物的极性比氨基酸小, 荧光量子效率高, 化学效应强, 是适合反相 HPLC 分析的理想的衍生反应方法。Turnell 报道用 HPLC 法可在 40 分钟内同时测定 31 种氨基酸 (包括三个内标物), 分析方法回收率平均为 $101\% \pm 2.3\%$ (SD), 分析氨基酸的检测限可达 38fmol 用于分析血清及尿液中的氨基酸含量, 其结果较为理想。所用分析柱为 150×4.6 毫米, $5\mu\text{m}$ 球形 ODS 填料, 流动相为水、丙酸钠、乙腈、二甲基亚砜等, 采用梯度洗脱(5)。另有作者采用 Zorbax C_8 高效柱分析这一氨基酸衍生物, 所用流动相为甲醇, 醋酸钾缓冲液和少量四氢呋喃, 也可梯度洗脱, 可于 15 分钟内同时分离和测定 20 种标准氨基酸的磷苯二甲醛衍生物(6)。HPLC 分析氨基酸还可用异硫氰酸苯酯衍生法和丹磺酰衍生法, 但这两种方法的反应步骤较为复杂, 干扰因素较多。

糖(7~9): 过去分析糖常用的示差检测器灵敏度和选择性均不理想。HPLC 用于糖的分析时亦可把糖转变成一些衍生物, 然后进行正相或反相色谱分析, 以紫外和荧光检测。最近有作者报道反相 HPLC 分析丹磺酰衍生物, 这一衍生反应在 20 分钟内即可完成。检测限为 $2-5\text{pmol}$, 回收率接近

100%，定量结果准确。这一方法同时测定甘露糖、核糖、半乳糖、岩藻糖等15种糖。色谱柱为 C_{18} 型，流动相为乙腈、醋酸钠等(7)。HPLC还可用于分析低聚糖，Hounsell用了几个色谱条件（正相和反相均有）同时分析了含有中性和氨基糖的9种还原型低聚糖(9)。糖的组分和低聚糖的测定可用于糖蛋白和糖脂中糖链的结构分析，帮助我们了解其在细胞分化和细胞间识别机构中的作用，并可早期发现细胞癌变时糖链的变化，这对于肿瘤的防治均具有重要意义。

脂肪酸(10~12)：将饱和或不饱和脂肪酸与1%草酰氯的苯溶液混合，70℃反应30分钟后脂肪酸可定量地转变为酸性氯化物，再和 α -萘胺反应15分钟(30℃)形成的萘胺衍生物在280~290nm处有强烈的紫外吸收。这一衍生物可用反相HPLC分析， C_{18} 型色谱柱，流动相为甲醇：水=81：19，流量2毫升/分，定量分析结果的变异系数为0.5~4.1%，回收率为94~106%之间(11)。另有作者用反相HPLC分析了4-溴化甲基-7-乙酰氧基香豆素脂肪酸衍生物。这一方法可于70分钟内同时分析人体血浆中的 $C_{6:0}$ ~ $C_{18:0}$ 的18种游离脂肪酸。色谱柱为Lichrosorb RP-18型，流动相为甲醇、磷酸缓冲液和乙腈，梯度洗脱，所需血浆量仅为10微升，定量范围为5~1000pmol，回收率在90%以上，定量分析的变异系数小于5%(12)。

胆汁酸(13~15)：近年来的研究发现许多肝胆系统疾病和肠道疾病均有胆汁酸代谢紊乱。与此相应，胆汁酸的测定方法也有迅速发展。HPLC可在60多分钟内同时测定游离胆酸，甘氨酸结合胆酸、牛磺结合胆酸共15种之多。这一方法采用固相化酶技术。通过色谱分离的胆汁酸进入荧光检测器之前先与NAD溶液混合，然后共同进入检测系统。检测系统中3- α 羟化固醇脱氢酶固相化柱，与胆汁酸反应生成定量的NAPH，最终以荧光检测器定量，色谱柱为Jasco Bilepak，流动相A为乙腈：10mM的磷酸二氢钾=40：60，流动相B为乙腈：30mM的磷酸二氢钾=20：80，梯度洗脱B0%~100%，64分钟，流量1毫升/分。荧光激发波长365nm，发射波长465nm检测，柱温25℃。这一方法的灵敏度为3~9毫微克，回收率在88%以上，在50~200毫微克范围内线性关系良好。由于3- α 羟化固醇脱氢酶柱可反复使用，使操作简化，重现性提高，成本低廉。这一方法可用于测定血或尿液中的胆汁酸成份(13,14)。还可用另一荧光衍生法，所

用试剂为溴乙酰苈，色谱柱为 C_{18} ，乙腈、甲醇和水阶梯型梯度洗脱，可同时测定血清或胆汁中的游离和结合胆酸(15)。

激素(16~18)：用HPLC分析生理体液中的肾上腺皮质激素也获得了满意的结果。这些激素是中性和非极性物质，一般先要用二氯甲烷抽提去除酸性和碱性物质。色谱柱为硅胶柱，流动相多用二氯甲烷、乙醇和水溶液进行梯度洗脱，可于50分钟内同时测13种肾上腺皮质激素，如脱氧皮质酮、肾上腺雄酮和地塞米松等(16)。也有作者介绍在正相分析分离后用放免测定方法定量。色谱柱为Diol250×4.6毫米，流动相为正己烷和异丙醇，梯度洗脱。这一方法灵敏度较高，仅需1毫升血清样品就可同时分析15种激素，如孕酮、醛固酮和考的松等(17)。这些方法为人体激素合成障碍和一些内分泌疾病的诊治提供了精确的生化诊断方法(18)。

核苷酸(19~21)：HPLC可定量测定脱氧核糖核酸和核糖核酸中的核苷和核苷酸。Reiss报道采用Partisil 10SAX 径向加压柱，磷酸盐和氯化钠缓冲液梯度洗脱分析人体组织中的核苷酸。这一方法可在26分钟内同时测定20种核苷酸，肝组织的样品量仅需500微克即可(19)。HPLC也非常适合于分析转运核糖核酸中的修饰后核苷酸，一次分析可分离和定量测定许多种核苷酸。正常人和癌症患者尿液中有经过修饰的核苷酸存在，这些核苷酸不能重新利用，因此如尿液中含量增多是修饰过程增加和转运核糖核酸转运率升高的表现，可作为肿瘤的生物标记。色谱条件为反相型。流动相为0.01mol的磷酸二氢铵和甲醇，紫外254nm检测。最近还有作者报道了以反相HPLC分析血清和尿液中各种环核苷酸、核苷酸和核苷。着重研究了与嘧啶和嘌呤代谢有关的物质，并综合分析了样品制备（如从细胞和生理体液中提取），色谱洗脱的特征和分析条件的选择以及定量分析的注意点(20, 21)。

胺类(22~26)：研究中枢神经系统功能的工作要求能够测定作为神经递质的单胺、前体氨基酸和其代谢产物。HPLC辅以电化学检测器可同时测定儿茶酚胺、吲哚胺，其前体氨基酸和代谢产物，如肾上腺素、多巴胺、酪氨酸、5羟色胺、5羟吲哚乙酸、色氨酸等共计20多种，色谱柱为Nucleosil 7C₁₈ 250×4毫米，所用流动相中有磷酸钠缓冲液和柠檬酸缓冲液，可用于组织和体液样品的分析(22)。分析方法还可自动化，30分钟内同时测定14种与儿茶酚胺和吲哚胺代谢有关的物质，其灵敏

度为500fmol(23)。5-羟色胺和5-羟吲哚乙酸在纯水
中的保留能力很强,只有当流动相中加入有机溶剂
如甲醇后才会洗脱,这一特性有利于前柱富集。前
柱富集法测定在5微微克/毫升~5微微克/毫升范围
内是线性的,检测灵敏度为1.5微微克/毫升(26)。

HPLC加上磷苯二甲醛和β巯基乙醇柱后衍生
法可测定生理体液中的多胺类物质,如精胺、腐
胺、尸胺、精脘,可用CK-10型阳离子交换树脂,
(平均颗粒度 11.5μm)以柠檬酸钠和氯化钠梯度
洗脱。定量测定的变异系数为4.4%以内。最小检
测量分别为7.9, 7.1, 6.0, 10nmol,回收率分别为94,
88, 93和91%。可用于一些癌症患者的辅助诊断,
对尿毒症等其他一些疾病的病情观察也有一定的帮
助(24、25)。

同工酶(2, 27): 血清同工酶的定量测定可用各
种电泳方法,如聚丙烯酰胺圆盘电泳或板电泳,但其
定量的精确度较差。由于近年来的 HPLC 色谱柱
对水溶性的高分子物质吸附很少,同时又具有高度
的分离效能,因此,已被用于乳酸脱氢酶、肌酸磷酸
激酶、亮氨酸氨基肽酶、碱性磷酸酶和γ-谷氨酰转
肽酶等多种同工酶的测定。可用阴离子交换色谱柱
(IEX525QAE),或用凝胶渗透色谱柱(TSK5000
PW),洗脱液可选用三羟甲基胺基甲烷—盐酸缓
冲液和氯化钠液,梯度洗脱,在20分钟的分析中,
GPC 法测出碱性磷酸酶有3个组分。亮氨酸基肽
酶有4个组分,γ-谷氨酰转肽酶有4个组分。阴离
子交换色谱法碱性磷酸酶至少有6种成份,亮氨酸
氨基肽酶有3种成份,γ-谷氨酰转肽酶至少有5种
成份。三种同工酶的回收率分别为84.8%,113%和
107%,变异系数分别为1.85%,2.14%和1.54%。
与化学测定方法的相关系数分别为0.99, 0.98和近
于1.00。定量范围为10~1000毫单位/毫升。所需
血清样品仅10微升(27)。

胆红素(28,29): 伴黄疸的各种不同疾病常需测
定胆红素以辅助诊断和观察疗效。目前临床上所用
的重氮化反应法是根据直接或间接反应来判断结合
胆红素和游离胆红素,但这一反应的特异性并不
强。HPLC 是一种非常理想的分离血浆中结合或游
离胆红素的方法。测定黄疸患者血中的胆红素可发
现游离胆红素,胆红素单葡萄糖醛酸酯、胆红素双葡
萄醛酸酯以及与白蛋白紧密结合的胆红素(28)。另
外还可区分光敏性胆红素和非光敏性胆红素。胆红
素的直接分析有一定困难,主要是由于结合胆红素
吸附到沉淀的血清蛋白上,在用有机溶剂抽提时极

性结合胆红素难以抽提。将胆红素的单或双葡萄糖
醛酸酯转变成相应的单和双甲基酯(碱性水解),可
解决这一问题。与胆红素一样,这些甲基酯衍生物
是非极性的,容易抽入氯仿,反应的得率大约
97%(29)。

HPLC分析灵敏度优于TLC,分离和定量均
更好。胆红素和其单或双甲基酯可由正相色谱分
析,硅胶5μm柱,430nm检测,含1%乙醇的氯仿
/醋酸 199/1(V/V)作流动相,也可采用梯度洗脱
氯仿:醋酸(99:1),8分钟后至氯仿/甲醇/醋酸为
197/2/1,持续6分钟。

可在15分钟内同时分析β-胡萝卜素和所有形式
的胆红素单或甲基酯异构体共9种,血清样品只需
0.6毫升,天内变异系数小于5%,天间小于8%(29)。

特异性地测定胆红素的各个组成是否有助于肝
胆系疾病的鉴别诊断以及作为肝细胞功能异常的敏
感指标,尚待临床进一步验证。

维生素(30~32): 各种脂溶性或水溶性维生素
的测定也有很重要的临床意义。曾有作者报告用离
子对色谱法测定体液和组织中的维生素B₆,可将
维生素B₆的三个互变型均分离出来,然后分别定
量(30)。测定维生素C可先用抗坏血酸氧化酶将其
氧化,生成的脱氢抗坏血酸再和磷苯二甲胺反应,生
成噻恶啉衍生物,最后以反相HPLC分析,荧光检
测,可测至血中为0.2μmol/L的维生素C,回收率
为97%(31)。最近出现的双电极电化学检测器可把
被分析物质的构型改变,增加了电化学检测器的灵
敏度和/或选择性。可用于分析维生素K,第一个
电极使维生素K氧化,第二个电极使其还原。还原
产物可在相当低的电压下进行检测,基线漂移减少,
灵敏度提高(32)。

卟啉(33~35): 卟啉是一类具有多种功能的化
合物,是多种酶和一些细胞色素的关键结构。以往
卟啉的定量是用溶剂抽提法,样品用量大,费时
多,只能将卟啉大致分成二大组,尿卟啉和粪卟
啉,不够精确。

分析尿和粪中的卟啉的羟化甲基酯可用正相或
反相色谱,但反相色谱拖尾严重,正相色谱的结果
非常满意,等度洗脱已获很好的分离。20分钟分析
9种卟啉,以含四丁基磷酸铵盐作为离子对试剂的
流动相,可分析血中游离酸性卟啉。用HPLC法
还可分析I和III型尿卟啉、粪卟啉异构体(35)。

也可用10微升全血,加入红细胞消化和卟啉溶
解试剂,离心沉淀后即可直接注入。反相色谱,乙

睛: 丁基磷酸铵盐缓冲液 (66/34), 流量 2 毫升/分, 温度 50℃, 荧光激发 400nm, 发射 560nm 测定红细胞卟啉。ZPPIX, PPIX 尿卟啉和粪卟啉可一次同时分析。血色素不干扰分析, 不需样品抽提。

药物(36~39): HPLC 可测定许多种药物, 是药代动力学研究的最重要的分析手段。目前 HPLC 测定药物已朝同时测定多种药物的方向发展, 如 Visser 报道了同时测定 10 多种抗忧郁药及其部分代谢产物, 如阿密替林, 丙咪嗪、氯丙咪嗪等(36)。Wad 报道同时测定 11 种抗癫痫药, 包括咖啡因、苯巴比妥、美索因等(37)。在药物分析中, 应对未知药物和代谢产物进行较为深入和全面的光学性质的研究, 如采用二极管阵列紫外可见分光光度计作为检测器可提供多波长信息和光谱特征, 可改善色谱峰的鉴定能力, 迅速选定单波长检测的最佳条件, 评价色谱峰的纯度。有作者报道采用这一检测器可在 20 分钟内同时分析 13 种药物, 包括阿斯匹林、吗啡、非那西汀、海洛因和多虑平。这一系统结合样品的保留时间和光谱性质进行峰的鉴定, 显示了高分离效能与高信息检测结合的优越性(38, 39)。

总之, HPLC 可分析人体内的许多物质, 尤其是对多组分的物质常可一次同时测定。并且具有样品用量微、分析速度快等优点。可以预言, HPLC 的分析法将被更广泛地应用于医学领域的各项研究工作。近年来, 国内的广大色谱工作者也开展了许多工作, 如蛋白质、肽、氨基酸、脂肪酸、胆汁酸、糖类、脂溶性维生素 A、D、E 和 K, 卟啉、黄曲霉素、单胺和多胺, 甾体激素, 各种药物等多方面的研究工作, 取得了令人可喜的结果(40)。为基础医学的研究和临床医学的应用提供了许多新的可靠的方法。

参 考 文 献

{ 1 } 藤泽桂子, 他, 临床病理, 32, 439(1984).
 { 2 } P. M. Kabra et al., "Liquid Chromatography in Clinical Analysis". Humana, Clifton, New Jersey, P. 323, 1981.
 { 3 } P. S. L. Janssen et al., J. Chromatogr. Sci., 22, 234(1984).
 { 4 } C. J. Wher et al., J. Chromatogr. Sci., 20, 114(1982).
 { 5 } D. J. Turnell et al., Clin. Chem., 28, 527(1982).
 { 6 } S. J. Price et al., Chromatographia, 18, 62, (1984).
 { 7 } K. Mopper et al., J. Chromatogr., 256, 27(1983).
 { 8 } S. Honda, Anal. Biochem., 140, 1(1984).

{ 9 } E. F. Hounsell et al., J. L. C., 7, 661(1984).
 { 10 } K. G. Allen et al., J. Chromatogr., 309, 83(1984).
 { 11 } M. Ikeda et al., J. Chromatogr., 272, 251(1983).
 { 12 } H. Tsuchiya et al., J. Chromatogr., 309, 43(1984).
 { 13 } 奥山澄彦, 他, 临床病理, 28(增刊)15, 1980.
 { 14 } , 上村大辅, 化学の領域, 增刊 133 号, 129, 1981.
 { 15 } S. Kamada et al., J. Chromatogr., 272, 29(1983).
 { 16 } 喜多知子, 他, 临床病理, 29, 662(1981).
 { 17 } G. Fibs et al., J. Chromatogr., 310, 386(1984).
 { 18 } G. D. Agostino, J. Chromatogr., 305, 13(1984).
 { 19 } P. D. Reiss et al., Anal. Biochem., 140, 162(1984).
 { 20 } W. Robert et al., J. L. C., 5, 2041(1982).
 { 21 } M. Zakara et al., J. Chromatogr., 226, 267(1981).
 { 22 } K. Oka et al., J. Chromatogr., 308, 43(1984).
 { 23 } W. A. Hunt et al., Anal. Biochem., 135, 269(1983).
 { 24 } 新保宽, 他, 临床病理, 特集 59 号, 29(1984).
 { 25 } T. Takagi et al., J. Chromatogr., 272, 279(1983).
 { 26 } P. M. Kabra et al., "Liquid Chromatography in Clinical Analysis", Humana, Clifton, New Jersey, P. 253, 1981.
 { 27 } 松本宏治郎, 临床病理, 29, 929(1981).
 { 28 } C. K. Lim, J. L. C., 5, 305(1982).
 { 29 } P. M. Kabra et al., "Liquid Chromatography in Clinical Analysis", Humana, Clifton, New Jersey, P. 355, 1981.
 { 30 } J. A. Pierotti et al., J. Chromatogr., 306, 377(1984).
 { 31 } A. J. Speek et al., J. Chromatogr., 305, 53(1984).
 { 32 } Y. Haroon J. Chromatogr. Sci., 22, 89(1984).
 { 33 } H. D. Meyer et al., Chromatographia, 16, 190(1982).
 { 34 } 菰田泰夫, 他, 化学の領域, 增刊 133 号, 139(1981).
 { 35 } P. M. Kabra et al., "Liquid Chromatography in Clinical Analysis" Humana, Clifton, New Jersey, P. 381, 1981.
 { 36 } T. Visser et al., J. Chromatogr., 309, 81(1984).
 { 37 } N. Wad et al., J. Chromatogr., 305, 127(1984).
 { 38 } A. Weber et al., J. Chromatogr. Sci. 22, 239(1984).
 { 39 } F. Overzet et al., J. Chromatogr., 267, 329(1983).
 { 40 } 第四次全国色谱学术报告会文集, 1983年 6 月, 上海。