

10):1-36.

[19] DI RENZO G C, MELIN P, BERARDI A, et al. Intrapartum GBS screening and antibiotic prophylaxis; a European consensus conference[J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2015, 28 (7):766-782.

[20] 中华医学会妇产科学分会产科学组. 孕前和孕期保健指南 (第 1 版)[J]. 中华妇产科杂志, 2011, 46(2):150-153.

[21] 杨小兰, 李娟, 李伟强, 等. 围产期孕妇感染 B 群链球菌对母婴预后的临床影响研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(20):4698-4700.

[22] RANDIS T M, POLIN R A. Early-onset group B Streptococcal sepsis; new recommendations from the Centres for Disease Control and Prevention[J]. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2012, 97(4):291-294.

[23] MATSUI H, KIMURA J, HIGASHIDE M, et al. Immuno-

• 综 述 •

chromatographic detection of the group B streptococcus antigen from enrichment cultures[J]. Clin Vaccine Immunol, 2013, 20(9):1381-1387.

[24] 郑雪艳, 韦红. 实时荧光定量聚合酶链反应检测妊娠晚期孕妇和新生儿 B 族溶血性链球菌价值的系统评价和 Meta 分析[J]. 中国循证儿科杂志, 2015, 10(3):187-192.

[25] 王丽, 叶巍, 马杰. 实时荧光 PCR 技术和细菌培养法检测妊娠晚期孕妇定植 B 群链球菌临床分析[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(16):2220-2221.

[26] MONEY D, ALLEN V M. Society of obstetrician and gynaecologists of Canada. the prevention of early-onset neonatal group B streptococcal disease[J]. J Obstet Gynaecol Can, 2013, 35(10):939-951.

(收稿日期:2017-12-20 修回日期:2018-02-25)

高效液相色谱法在不同疾病研究中的应用*

陈 优, 夏 妍 综述, 张淑云[△] 审校
(哈尔滨医科大学附属第二医院科研实验中心, 黑龙江哈尔滨 150086)

摘 要: 高效液相色谱法(HPLC)是一种在液相柱色谱技术的基础上, 引入气相色谱理论发展而来的先进的快速分离技术。该方法与传统检测方法相比, 具有分离效率高、分离周期短、操作简便和检测灵敏度高的特点, 适合于实验室研究和临床常规检测, 在临床疾病的研究中有着广泛的应用。本文对 HPLC 的相关知识、新方法及技术进行了简要介绍, 并且对其在临床消化内科、内分泌科、心血管科、重症创伤科、感染科及肿瘤科疾病研究中的应用进行了综述。

关键词: 高效液相色谱法; 临床疾病; 应用

DOI: 10. 3969/j. issn. 1673-4130. 2018. 16. 029 **中图法分类号:** R446. 1

文章编号: 1673-4130(2018)16-2040-03 **文献标识码:** A

高效液相色谱法(HPLC)是一种以液相柱色谱技术为基础, 引入气相色谱理论发展而来的快速分离技术。随着质谱分析技术的快速发展, HPLC 已经实现与其他技术的联合应用, 为解决复杂组成物质的结构分析提供了新思路, 在医学实验研究与临床常规检测方面, 有着广泛的应用。本文对 HPLC 法的相关知识、新技术及其在不同临床疾病研究中的应用进行了综述。

1 HPLC 的萌芽及发展史

早在古罗马时代, 人们就已经采用将含有混合色素的溶液滴在 1 块布上, 利用随着溶液的扩散, 出现同心圆的方法来分析燃料和色素了, 这是最早的液相色谱分离技术。而色谱法真正的建立是在 1903 年, 由俄国植物化学家茨维特首次提出, 1906 年他将一植物色素的石油醚溶液从 1 根主要装有碳酸钙吸附剂的玻璃管上端加入, 沿管滤下, 后用纯石油醚淋洗, 结果按照不同色素的吸附顺序在管内观察到它们像光谱一样的相应色带, 定义为色谱图^[1]。1941 年, 马丁和辛格建立了液液

分配色谱方法, 他们应用 1 根装满硅胶微粒的色谱柱, 成功地将乙酰氨基酸混合物进行了分离。1944 年, 康斯坦因和马丁建立了纸色谱法。1952 年, 马丁和辛格成功分离了脂肪酸和脂肪胺系列, 发明了气液色谱法, 建立了塔板理论^[2-3]。这一系列色谱技术理论的发展都为 HPLC 的问世奠定了扎实的基础。

2 HPLC 的新技术及其应用

近年来, 随着质谱分析技术的快速发展及为解决日益复杂的分析任务, HPLC 已实现与其他技术的联用, 在解决复杂组成物质的结构分析中, 成为强有力的工具^[4]。

2.1 HPLC-蒸发光检测技术 这项新技术可对紫外线末端吸收或者对无紫外线吸收的有机化合物进行灵敏检测, 并且弥补了传统检测器易受到温度波动和溶剂成分影响的缺点, 可用于药品的检验。

2.2 高压液相色谱-质谱联用技术 高效液相色谱-质谱联用技术(LC-MS)是以 HPLC 为分离方法, 以质谱

* 基金项目: 黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12521186); 黑龙江省卫计委科研课题(2017-085)。
[△] 通信作者, E-mail: 13214501198@163. com。
本文引用格式: 陈优, 夏妍, 张淑云. 高效液相色谱法在不同疾病研究中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(16): 2040-2042.

为鉴定工具的一种新兴的分离检测技术。LC-MS 的原理是将 HPLC 对具有复杂成分的待测品的高效率分离能力与质谱具有的特异度高、灵敏度强及能够提供相对分子质量与结构信息的优点结合起来,该技术发展迅速,在生物化学、食品环境和临床检测等许多领域得到了广泛应用,是一种强有力的分离分析技术。

2.3 快速高效液相色谱技术 快速高效液相色谱技术与传统的高压液相色谱技术相比,可以使药物分析过程进入高效和高通量的阶段,从而缩短分析时间、节省溶剂、降低污染。虽然目前此方法还不能取代 HPLC,但是相信其在药品检验方面的应用会更加广泛。此外,还有应用于血浆蛋白谱检测的凝胶渗透色谱-HPLC^[5],用于人体体液检测的毛细血管电泳-质谱联用技术^[6],以及基于结构数据库和 HPLC 的软件开发,用于物化预测和色谱模拟^[7]。

3 HPLC 在疾病研究中的应用

3.1 HPLC 在消化系统疾病中的应用 肝硬化作为乙肝-肝硬化-肝癌三部曲中的一环,受到广泛关注。李丽玲等^[8]利用 LC-MS 分析了肝硬化患者与健康体检人群血清中微量胆汁酸亚组分的含量差异,并探讨了其在肝硬化患者中的诊断价值。利用 LC-MS 能够同时检测待测标本中的 15 种氨基酸组分,并且该方法结果准确可靠,其定量检测的特点可以满足临床疾病诊断的需求;利用该方法检测肝硬化患者血清,能够在早期发现胆汁酸代谢谱异常,提示与胆汁酸代谢相关的肝脏合成代谢功能异常,为研究胆汁酸在肝硬化病程中的生理作用提供了一定的研究基础。此外,还有研究者应用反相 HPLC 测定肝硬化患者血清中结合胆汁酸的含量,结果表明,该方法可以满足结合胆汁酸测定的需要,有助于肝硬化的临床诊断和治疗。

3.2 HPLC 在内分泌疾病中的应用 糖化血红蛋白(HbA1c)是反映糖尿病患者血糖总体控制情况的指标,对糖尿病慢性并发症的早发现有重要的意义。当 HbA1c 高于正常值,代表血糖控制不佳,是糖尿病慢性并发症发生、发展的重要危险因素。HbA1c 作为反映患者近 8~12 周的平均血糖控制情况,在临床上被广泛应用于糖尿病筛查、诊断及治疗效果评价。目前检测 HbA1c 的方法很多,有 HPLC、亲和层析法、电泳法和免疫法等。有研究采用新近使用的 HPLC 和临床上使用较为广泛的免疫比浊法同时检测全血 HbA1c,并对结果进行比较分析,通过比较 2 种方法检测 HbA1c 结果的准确性来探讨 2 种方法的临床应用价值^[9]。HPLC 法是检测 HbA1c 的金标准。HPLC 法测定 HbA1c 采用微柱法离子交换层析和梯度洗脱技术可全自动分离血红蛋白的变异体和亚型,所有操作自动化且简便,可满足于临床大批量样本的检测工作。免疫比浊法检测 HbA1c 可使用全自动生化分析仪,可排除变异血红蛋白的干扰,但是待测品需要人工预先进行溶血处理,操作较为复杂,不适用于临床大量样本的检测^[10-11]。可见,HPLC 在内分泌疾病的诊治中提供了精确的生化诊断方法。

3.3 HPLC 在心血管疾病中的应用 肾素-血管紧张素-醛固酮系统(RAS)在高血压病程中起着重要作用,其中血管紧张素 II 是主要的效应分子。血管紧张素转化酶抑制剂(ACEI)的生理作用是抑制血管紧张素 I 转化为血管紧张素 II,从而达到降血压的作用。有研究应用 HPLC 在体外快速测定降血压肽的 ACEI 活性^[12],该方法对马尿酸的回收率为 93.23%~100.25%。研究表面,HPLC 具有检测效率高、操作简便、准确性高等优点,为降血压药物的开发提供了操作简便可靠的检测方法。此外,用于治疗高血压及充血性心力衰竭的比索洛尔,有研究应用 HPLC 来测定其在人体血浆中的浓度,并验证该方法是敏感和准确的^[13]。

3.4 HPLC 在重症创伤中的应用 近来研究表明,谷氨酰胺(Gln)在重症创伤阶段参与调节许多有关细胞防御、代谢及创伤应答信号转导等基因的表达,对细胞修复和免疫调节有着重要的作用。因此,应用检验手段对创伤状态下患者血中 Gln 含量的评估是非常必要的。有研究发现,HPLC 能够有效检测出肠内制剂中 Gln 的含量^[14],结果准确可靠。此外,对于治疗重症创伤后的患者出现抑郁等不稳定的精神状态的药物帕罗西丁,应用反向 HPLC 可以精确测定其在纯剂型和片剂型中的含量^[15-16]。

3.5 HPLC 在感染性疾病中的应用 万古霉素是一种糖肽类窄谱抗菌药物,对革兰阳性菌有强大的杀菌作用,是治疗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)、表皮葡萄球菌和肠球菌所致感染的主要药物,也是儿童重症感染患者常用的抗菌药物之一。目前,临床常用于测定其血药浓度的方法有 HPLC、酶放大免疫法和微生物法。有研究分别用这 3 种方法测定某医院儿童患者血清中万古霉素的血药浓度,研究结果显示,3 种方法均能较好地评价样本中万古霉素血药浓度,且测得结果具有良好的相关性^[17-18],但对于低浓度待测样本的测定,HPLC 较其他 2 种方法的准确性更高。此外,HPLC 还可快速、准确地测定人血浆中莫西沙星的浓度,且该方法灵敏度高,重现性好^[19]。

3.6 HPLC 在肿瘤疾病中的应用 在肿瘤的治疗过程中,放化疗的广泛应用经常会引起 DNA 损伤,而人体 DNA 的损伤会产生一系列的 DNA 损伤应答(DDR),包括 DNA 损伤检测点信号传导、DNA 修复及细胞周期检测等。机体通过这些 DDR 来保证遗传的准确性。基因组的内在不稳定性及过度依赖 DDR 使得靶向 DDR 信号通路的药物开发刻不容缓。细胞周期检测点激酶 1(CHK1)是参与 DNA 损伤检测点信号传导的重要物质,已经被证实参与诱导放化疗后的细胞 DNA 复制损伤或停滞^[20]。SRA737 是一种口服的活性小分子 CHK1 抑制剂,其通过对 CHK1 的抑制作用能够大幅度增加肿瘤细胞对抗肿瘤药物的敏感性。可惜的是,至今为止还没有可靠的方法来定量检测人血浆中的 SRA737。国外有研究首次应用 LC-MS/MS 方法定量检测人血浆中的 SRA737,该方

法具有血浆样本用量少、检测速度快、敏感性及准确性高的优点,即使在临床试验阶段给予低剂量药物的患者血浆中也可以实现定量检测。目前,该方法在临床试验阶段中,已经成功地应用于患者血浆样本中 SRA737 的定量检测^[21]。

此外,在急性早幼粒细胞白血病患者中,高效液相色谱-氰化物发生-原子荧光(HPLC-HG-AFS)方法可用于患者血浆和血细胞中砷的测定^[22-23]。在 T-淋巴细胞白血病的治疗中,反向 HPLC 可用于患者血浆中奈拉滨和原始细胞的测定和药代动力学研究^[24]。

4 结 论

总之,HPLC 是色谱科学中一个有着悠久历史又极富生命力的分支,基于其独特的分离机制,并且具有样本用量少、分析速度快等优点,HPLC 被广泛应用于临床疾病的研究中,为临床医学研究提供了可靠的分析方法。

参考文献

- [1] 李宏为,赵叶,海娟,等. 浅谈高效液相色谱在液相检验中的应用[J]. 中国保健营养,2016,26(13):446.
- [2] CHEM A. Practical HPLC Method Development[J]. Carbohydrate Polymers,1997,16(3):338-338.
- [3] SINGH R. HPLC method development and validation- an overview[J]. J Pharm Edu Res,2013,4(1):26-33.
- [4] 卢昇. 高效液相色谱法简介及其在药品检验中的应用[J]. 大科技,2017(10):321-322.
- [5] YOKOYAMA S. Gel permeation HPLC analysis validates a classical spherical space-filling model for lipoprotein structure opening future potential of the technology[J]. J Oleo Sci,2016,65(4):263-264.
- [6] IADAROLA P, FUMAGALLI M, BARDONI A M, et al. Recent applications of CE- and HPLC-MS in the analysis of human fluids[J]. Electrophoresis,2016,37(1):212-230.
- [7] WANG L, ZHENG J, GONG X, et al. Efficient HPLC method development using structure-based database search, physico-chemical prediction and chromatographic simulation[J]. J Pharm Biomed Anal,2015,104:49-54.
- [8] 李丽玲,许闪闪,沈丹丹. 肝硬化患者血清胆汁酸代谢物谱的检测分析[J]. 中国热带医学,2017,17(7):718-721.
- [9] ALLEYN C R, LAFFEL L, VOLKENING L K, et al. Comparison of longitudinal point-of-care and high-performance liquid chromatography HbA1c measurements in a multi-centre trial[J]. Diabetic Medicine,2011,28(12):1525-1529.
- [10] KHAN M A H, BIOCHEMISTRY D O, COLLEGE E M, et al. Measurements of HbA1c by high performance liquid chromatography in D-10 analyzer and Immunological method by Beckman coulter AU480 system; a comparative study[J]. J Enam Med College,2012,2(2):62-66.
- [11] 张超强,赖春苗,张力球,等. 高效液相色谱法与全自动免

- 疫比浊法测定 HbA1c 的临床应用研究[J]. 中国医学创新,2016,13(12):35-38.
- [12] 李洪影,杨楠,李贵和,等. 高效液相-荧光光谱法测定人血浆中富马酸比索洛尔浓度[J]. 中国医院药学杂志,2013,33(23):1937-1939.
- [13] 谷福根,郝朵. 高效液相色谱-荧光法测定大鼠血浆中富马酸比索洛尔的浓度及药物动力学[J]. 中南药学,2014,12(6):528-531.
- [14] 梁建伟,陈蕾,曹丽萍,等. 反相高效液相色谱法测定烧伤病人血浆中谷氨酰胺含量[J]. 河北医药,2003,25(8):566-567.
- [15] LATHA Y B M, SANKAR D G. A novel RP-HPLC method for determination of lisinopril (LP) in pure and pharmaceutical formulation[J]. Asian J Res Chem,2015,8(1):27-29.
- [16] HASAN N. Novel RP-HPLC method for simultaneous determination of prazosin and NSAIDs in bulk, pharmaceutical formulations and human serum [J]. World J Pharm Res,2015,4(7):27-29.
- [17] 莫晓乡,周家福. 三种方法测定万古霉素血药浓度比较分析[J]. 儿科药学杂志,2017,23(7):42-44.
- [18] JR T M. Highlights from clinical practice guidelines by the infectious diseases society of America for the treatment of methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections in adults and children [J]. Infect Dis Clin Pract,2011,19(19):207-209.
- [19] WANG N, ZHU L, ZHAO X, et al. Improved HPLC method for the determination of moxifloxacin in application to a pharmacokinetics study in patients with infectious diseases[J]. Isrn Pharmacol,2013,2013(26):462918.
- [20] KOH S B, COURTIN A, BOYCE R J, et al. CHK1 inhibition synergizes with gemcitabine initially by destabilizing the DNA replication apparatus[J]. Cancer Res,2015,75(17):3583-3595.
- [21] ZANGARINI M, BERRY P, SLUDDEN J, et al. Development and validation of a LC-MS/MS method for the quantification of the checkpoint kinase 1 inhibitor SRA737 in human plasma[J]. Bioanalysis,2017,9(13):1001-1010.
- [22] GUO M, WANG W, HAI X, et al. HPLC-HG-AFS determination of arsenic species in acute promyelocytic leukemia (APL) plasma and blood cells. [J]. J Pharm Biomed Anal,2017,145:356.
- [23] FARIAS S S, LONDONIO A, QUINTERO C, et al. On-line speciation and quantification of four arsenical species in rice samples collected in Argentina using a HPLC-HG-AFS coupling[J]. Microchem J,2015,120:34-39.
- [24] 沈卫阳,刘云鹏,胡陈夷,等. RP-HPLC 法同时测定白血病患者血浆中奈拉滨及其代谢物[J]. 药学与临床研究,2016,24(2):117-120.

(收稿日期:2017-12-29 修回日期:2018-03-06)