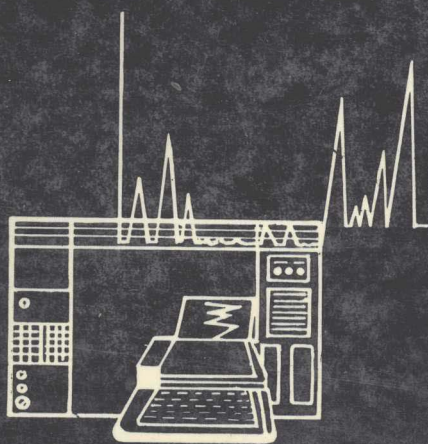
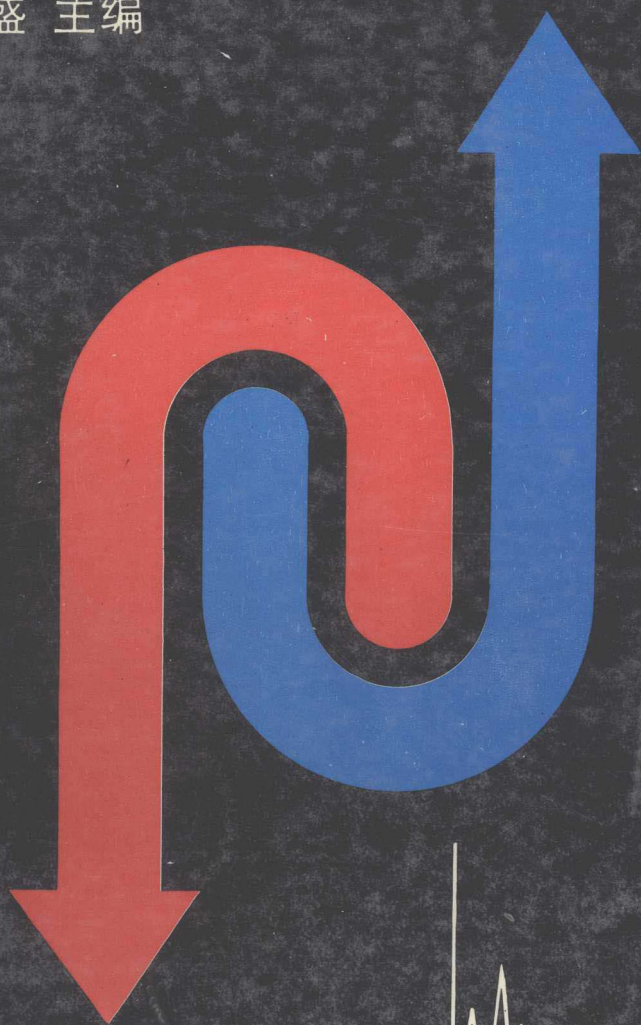


临床医药色谱分析

袁倚盛 主编



南京大学出版社

临床医药色谱分析

张增福 主编



临床医药色谱分析

袁 倚 盛 主编

南京大学出版社

1994 • 南京

内 容 简 介

本书分上、下两篇。上篇(临床生化色谱分析)介绍作者实验室中分析 40 多种生化物质的色谱法。下篇(临床药物色谱分析)介绍作者实验室中分析 80 多种体内药物的色谱法。作者论述了这些生化物质和药物的理化性质,生物化学通道,药物代谢途径,生理活性作用和药理作用,临床测定意义以及有关疾病的相关性。

作者回顾了测定这些生化物质和药物的体液浓度的各种方法,详细介绍了作者实验室中建立的色谱测定方法并列出了正常参考值。在每种物质的测定方法中,作者引用了大量参考文献,可供研究者参考。本书可供从事色谱分析尤其是临床医药色谱分析工作的中、高级技术人员使用。

临 床 医 药 色 谱 分 析

袁 倚 盛 主 编

*

南京大学出版社出版发行

(南京大学校内 邮政编码:210093)

淮阴市淮海印刷厂印刷

*

开本:787×1092 1/16 印张:21.5 字数:537 千

1994 年 5 月第 1 版 1994 年 5 月第 1 次印刷

印数:1—5000

ISBN7-305-02076-1/R·85

定价:13.50 元

主 编 袁倚盛

编写人员(以姓氏笔画为序)

许丹科
周继红

李 克
胡永狮

杨丽莉
赵飞浪

杨巷菁
袁倚盛

沈 敏
谭 力

目 录

上篇 临床生化色谱分析

氨基酸·····	(4)
3-甲基组氨酸·····	(13)
苯丙氨酸·····	(16)
肾上腺皮质激素·····	(18)
雌三醇·····	(36)
肌酐·····	(41)
伪尿核苷·····	(44)
儿茶酚胺·····	(49)
脂肪酸·····	(59)
甘油·····	(62)
胆固醇·····	(68)
过氧化脂质·····	(73)
唾液酸·····	(81)
胆汁酸·····	(87)
乳酸·····	(99)
草酸·····	(104)
尿酸·····	(109)
香草扁桃酸·····	(114)
高香草酸·····	(118)
五羟色胺·····	(121)
多胺·····	(124)

下篇 临床药物色谱分析

青霉素类·····	(133)
头孢菌素类·····	(140)
麦迪霉素·····	(144)
米卡霉素·····	(149)
乙酰螺旋霉素·····	(153)

氯霉素·····	(157)
氟喹诺酮抗生素·····	(161)
硝烟酯·····	(176)
利多卡因·····	(180)
美西律·····	(183)
普萘洛尔·····	(186)
乙胺碘呋酮·····	(191)
奎尼丁·····	(196)
美托洛尔·····	(203)
乙吗噻嗪·····	(209)
抗心绞痛药—钙拮抗剂·····	(211)
1. 硝苯地平	
2. 尼群地平	
3. 地尔硫	
硝酸异山梨酯·····	(223)
关附甲素·····	(227)
冰片、川芎嗪·····	(232)
苯二氮革类·····	(236)
吗啡·····	(244)
巴比妥类·····	(249)
茶碱·····	(253)
沙丁胺醇·····	(257)
博利康尼·····	(263)
速尿·····	(268)
氨基吡咪·····	(273)
布洛芬·····	(277)
双氯灭痛·····	(281)
伪麻黄碱·····	(285)
维生素 E·····	(291)
维甲酸·····	(296)
大黄·····	(302)
甜叶菊甙·····	(305)
有机磷·····	(309)
月桂氮革酮·····	(315)
附录	
附录 1 55 种中草药薄层色谱图·····	(318)
附录 2 液相色谱柱填料·····	(329)

上篇 临床生化色谱分析

液相色谱(含薄层色谱)和气相色谱是两种主要的色谱。经过近 90 年的发展,色谱理论、色谱技术和色谱装置已达到全新的阶段。分析各类物质的高效色谱柱、高灵敏度低噪音的各类检测器、高精度的输液泵等已日臻完善。仪器的微机化形成色谱专家系统,除了可以采集数据和处理数据外,还可以控制色谱条件,使色谱系统自始至终在最佳状态下工作。因此,色谱已成为化学家、生物家和医药学家不可缺少的工具。同时,色谱在临床检验中已发展成为一个重要的分支。应用色谱从分子学角度揭示了医学领域中的许多新问题,弄清了一些生理活性物质之间的相互关系和演变过程,为开展新医学研究和临床诊断提供了可靠的依据。

近十年来,我们根据临床和医学研究的需要,在国内率先解决了利用国产部件和设备组装适合临床推广应用的液相色谱仪器的难题,设计并制造了部分液相色谱仪的零部件,改变了完全依赖进口的状况;创建并付诸实现了一套生物样品预处理方法和色谱检测技术,并针对生物样品的特点,总结出样品中微量物质的提取、分离、纯化、富集技术,建立了如下的色谱方法:

- (1)尿、血中儿茶酚胺(NE、E、DA);
- (2)孕妇尿中雌三醇/肌酐比值;
- (3)尿中伪尿核苷/肌酐比值;
- (4)血中氨基酸;
- (5)尿中 3-甲基组氨酸;
- (6)尿中游离皮质醇、去氢异雄酮、雄烯二酮、睾酮、雄酮、去氧皮质酮和原胆烷醇酮;
- (7)血中游离胆固醇;
- (8)血及组织中过氧化脂质;
- (9)血中皮质醇、皮质酮;
- (10)血、尿中草酸;
- (11)尿酸/肌酐比值;
- (12)尿中香草扁桃酸;
- (13)尿中 5-羟色胺;
- (14)血、尿中多胺(尸胺、精胺、精脒);
- (15)血中游离脂肪酸(7 种);
- (16)血中甘油;
- (17)血中乳酸;
- (18)体液中有有机磷。

生物样品具有如下特点：(1)被测组分含量极微而采样量受到限制，大体积的样品会带来灾难性的杂质干扰。(2)干扰杂质含量高而成分复杂。(3)被测物质常出现同系物形式，或者是一系列的代谢产物。在进入色谱系统前要对生物样品进行预处理，除去干扰物质和对色谱系统具有致命性的“脏”物质。如果被测组分在 μmol 水平，而且与干扰成分的理化性质相差甚远，可用共沉淀法和液-液萃取法。共沉淀试剂包括：①有机试剂(甲醇、乙腈、氯仿和二氯甲烷等)；②酸、碱(三氯醋酸、高氯酸、氢氧化钡等)；③无机盐(硫酸盐、钨酸盐等)。若灵敏度足够，可取共沉淀的上清液直接进样。否则还需浓缩后再进样。液-液萃取可视被测组分的性质而定。首先，设法使被测组分转向于亲脂性质，如酸(碱)性组分或其盐加酸(碱)使成游离型，易于被有机溶剂提取。然后选能溶解被测组分而不与水相介质相溶的有机试剂提取。为了使待测样品更“干净”，有时需进一步反提。

一些含量极微的组分需要用特殊的方法提取。来源丰富的样品可用离子交换色谱和低压柱色谱预处理，能得到较“干净”的样品，但回收率较低，洗脱部分不易浓缩。70年代用气相色谱分析血中氨基酸，经离子交换收集到的部分比原血清体积扩大了近10倍，为提高检测量需加热吹干浓缩数小时，而后再衍生进样。不稳定的组分不能采用这种方法。

超滤法和固相提取法是比较好的方法。前者选用合适的超滤膜，截留住大分子的蛋白质，达到纯化样品的目的。后者用商品化的小柱，可使样品很“干净”且回收率高。上述两种方法的材料靠进口而且价格高，最好一次性使用，如活化后反复使用造成回收率不稳定。我们根据工作的需要，自行设计了提取小柱，每次仅需几分钱就可解决问题。

在线法提取样品是半自动化或自动化操作方法，生物样品(血、尿等)直接进入色谱系统，经过阀的切换送入分析柱中分离，干扰杂质在柱前已被洗脱，达到干扰杂质少而回收率高的要求。我们用此法首先分析了血中的儿茶酚胺。

免疫亲和法也是近年提倡的方法，待测组分与牛血清白蛋白共价交联的衍生物给动物免疫，产生抗-待测组分的免疫球蛋白，经纯化后接到葡聚糖柱上。含有待测组分的血清通过柱后待测组分接到柱上，杂质被洗脱，再用另一种洗脱液洗脱待测组分用于分析。这种方法对于与内源性物质相似的水溶性组分特别有用，但周期较长。

在色谱分析中样品的处理十分重要，因为体液中的蛋白质等杂质会给色谱系统造成不可逆的损害，而色谱的某些部件价格昂贵。

衍生技术能提高被测组分的灵敏度，改善分辨率。对液相色谱而言，利用被测组分的化学基团接上衍生试剂，使得无紫外吸收和荧光的组分具有紫外吸收和荧光。如氨基酸与邻苯二甲醛衍生，过氧化脂质与硫代巴比妥酸衍生，皮质醇，去氢异雄酮与2,4-二硝基苯肼衍生。对气相色谱而言，利用被测组分中的化学基团与衍生试剂反应生成极性小的衍生物，如羧基酯化，氨基、羟基酰化等。

色谱在临床检验方面的应用可以革新一些陈旧的、经典的检验方法。如我们开展的儿茶酚胺、氨基酸、皮质激素、脂肪酸等临床检验项目，改变了过去以混合物水平报告结果，现在都以各单个组分的结果报告，为临床提供了更有价值的诊断依据，为诊断学、治疗学、营养学以及临床用药、研究药效学和药代动力学、新药上市提供更广阔、更深入的研究工具。

色谱检验的优点还在于样品量少、手续简便、分析周期短。用比色法分析17-羟和17-酮、雌三醇和肌酐比值等都采用两种方法，且样品用量大，分析周期长。色谱分析一次进样就能获得各单个组分的结果。用色谱分析氨基酸仅20—30分钟就得到完整的氨基酸谱，比一

般方法缩短了 10 多倍时间。

色谱干扰少、灵敏度高。比色法分析过氧化脂质、雌三醇等因同系物的干扰,结果的误差大。色谱克服了这些缺点,而且往往可达到理想的灵敏度(pmol)。

用于临床检验的色谱检测器要灵敏度高、噪音小、特异性好。液相色谱常用检测器有紫外(μmol)、荧光(nmol)和电化学检测器(nmol—pmol)。电化学检测器是新发展起来的一种测定有电活性组分的检测器,采用修饰电极可以降低极化电压,提高灵敏度(如测血中草酸用钴酞菁修饰电极)。气相色谱常用的检测器有氢火焰(μmol —nmol)、电子捕获(nmol)、质量选择(nmol)和氮-磷检测器(nmol—pmol)。

色谱仪器的结构精细复杂,操作难度大,价格也昂贵,在定性方法上和生物样品预处理等方面都存在一定的难度,故推广、普及不易。经过广大色谱工作者的努力,我国色谱技术和色谱装置都有很大发展,近年来在临床检测方面也获得成功的应用。

氨基酸

Amino acid

一、概 述

人体内来源于动、植物蛋白质的氨基酸称“外源性氨基酸”，来源于体内蛋白质降解、代谢的氨基酸称“内源性氨基酸”。这两种来源的游离氨基酸供体内合成肽类或蛋白质，合成生理上重要的非蛋白含氮物质。氨基酸可以合成激素、叶啉、肌酸、生物碱等。氨基酸在体内代谢动态平衡如图 1 所示：^[1]

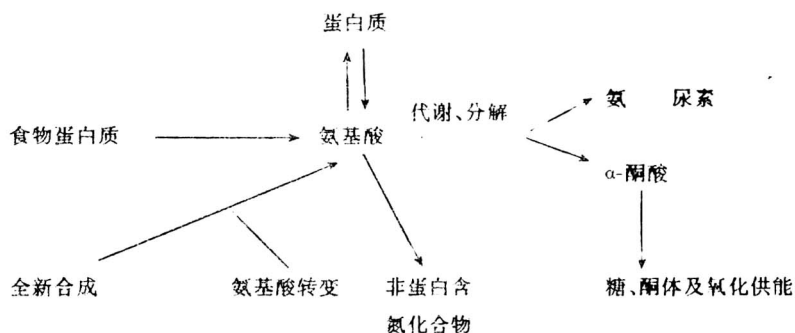
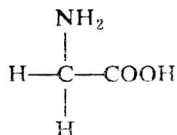


图 1 氨基酸代谢通道

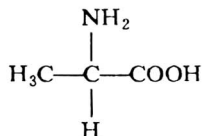
人体中的氨基酸都为 L- α 氨基酸(甘氨酸例外)，一般由 20 种氨基酸构成蛋白质，可分为七类：

1. 一氨基一羧基非极性中性疏水氨基酸

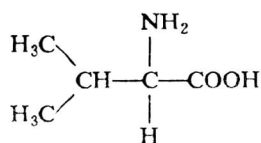
(1) 甘氨酸(glycine, Gly)



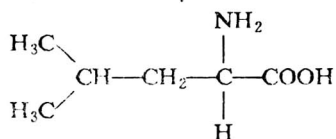
(2) 丙氨酸(alanine, Ala)



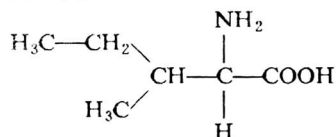
(3) 缬氨酸(valine, Val)



(4) 亮氨酸 (leucine, Leu)

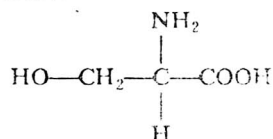


(5) 异亮氨酸 (isoleucine, Ile)

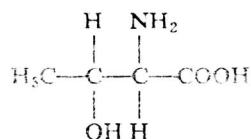


2. 带羟基极性中性亲水氨基酸

(6) 丝氨酸 (serine, Ser)

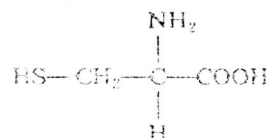


(7) 苏氨酸 (threonine, Thr)

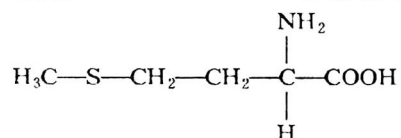


3. 含硫氨基酸

(8) 半胱氨酸 (cysteine, Cys), 极性中性亲水氨基酸

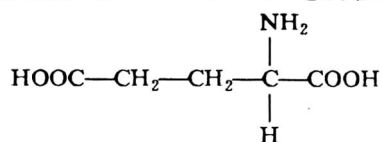


(9) 蛋氨酸 (methionine, Met), 非极性中性疏水氨基酸

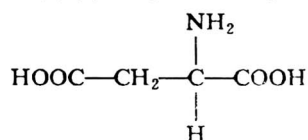


4. 一氨基二羟基及酰胺衍生物

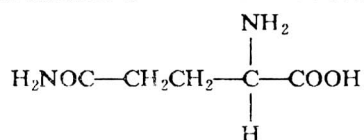
(10) 谷氨酸 (glutamate, Glu), 电荷极性亲水酸性氨基酸



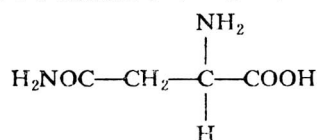
(11) 天冬氨酸 (aspartate, Asp), 电荷极性亲水酸性氨基酸



(12) 谷氨酰胺 (glutamine, Gln), 极性中性亲水氨基酸

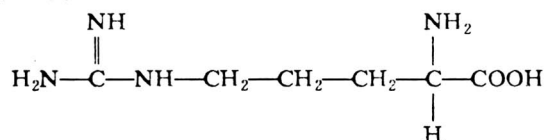


(13) 天冬氨酰胺 (asparagine, Asn), 极性中性亲水氨基酸

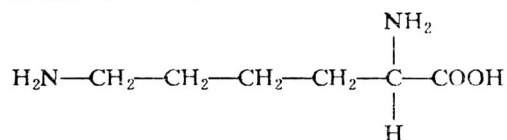


5. 二氨基一羧基氨基酸, 电荷极性亲水氨基酸

(14) 精氨酸 (arginine, Arg)

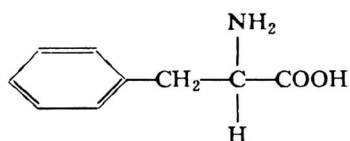


(15) 赖氨酸 (lysine, Lys)

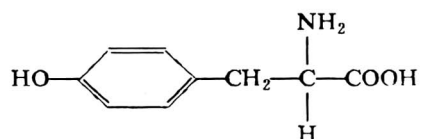


6. 芳香氨基酸

(16) 苯丙氨酸 (phenylalanine, Phe), 非极性中性疏水氨基酸

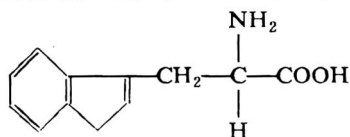


(17) 酪氨酸 (tyrosine, Tyr), 极性中性亲水氨基酸

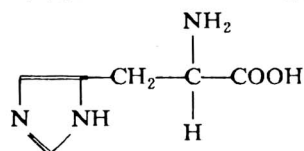


7. 杂环氨基酸

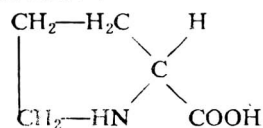
(18) 色氨酸 (tryptophane, Trp), 极性中性疏水氨基酸



(19) 组氨酸 (histidine, His), 电荷极性亲水碱性氨基酸

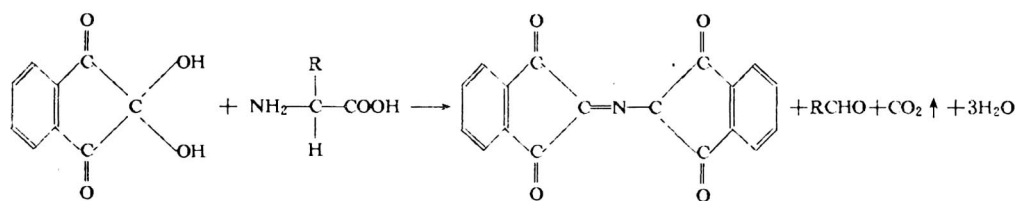


(20) 脯氨酸 (proline, Pro), 非极性中性疏水氨基酸



二、体液中氨基酸的分析

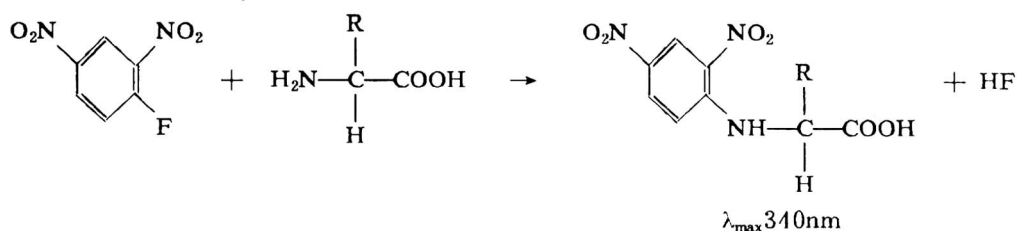
20 世纪初, 拉曼发现茚三酮能与氨基酸显蓝色反应^[2]。后有人用水合茚三酮与 α -氨基酸反应, 测定放出的 CO_2 , 计算氨基酸的总含量^[3]:



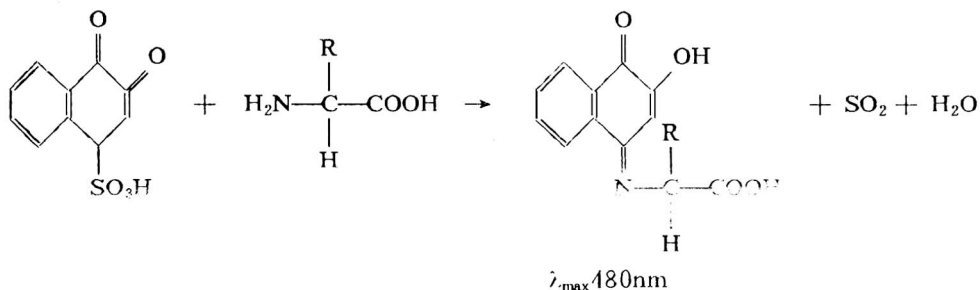
此法可用于定量测定经化学分离的个别氨基酸的含量, 但精确度不高, 多数仅能测混合

物的水平。也可用其它衍生试剂与 α -氨基酸反应,生成有特征吸收波长的衍生物。

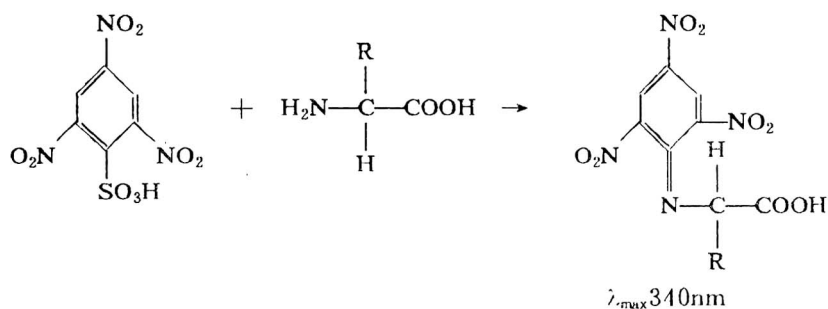
1. 1-氟-2,4-二硝基苯^[4]



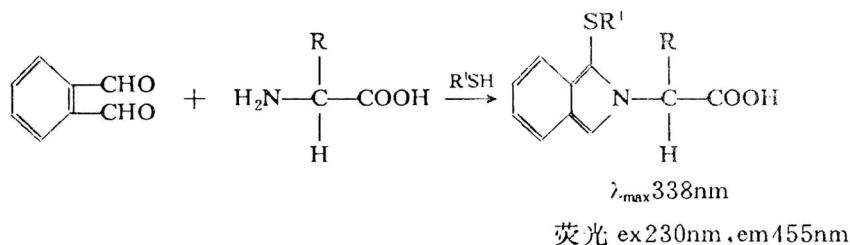
2. β -萘醌磺酸^[5]



3. 三硝基苯磺酸^[6]



4. 邻苯二甲醛(OPA)



个别氨基酸也可衍生化后进行比色反应,达到灵敏度高、专一性强的目的。如苯丙氨酸与水合茚三酮和铜离子(Cu^{2+})反应生成很强的荧光物质^[7],酪氨酸与1-亚硝基-2-萘酚和硝酸反应生成黄色物质^[8],胱氨酸先还原成半胱氨酸,然后再与 β -萘醌磺酸反应^[9]。其它还有酶法、微生物法和电泳等测定方法。^[10,11]

目前色谱技术已广泛应用于体液中的氨基酸分析。起初纸色谱^[12]和薄层色谱^[13]应用较多,继而发展用阳离子交换树脂柱作全自动分析,茚三酮或OPA作衍生试剂,紫外或荧光检测器检测。我院曾用气相色谱法检测20种血清氨基酸,采用三氟醋酸正丁酯衍生化的方法^[14]。

80年代以来相继发展了许多柱前衍生的高效液相色谱技术检测氨基酸。OPA为衍生试剂, C₁₈键合相柱反相梯度洗脱, 收到了很好的效果^[15,16]。全自动氨基酸分析仪的分析时间长, 程序死板, 不能轻易改动, 柱后衍生反应装置和全自动进样器价格昂贵, 操作繁琐, 不适宜于一般实验室使用。我们建立的测定体液中氨基酸的色谱法克服了上述缺点, 而且用国产部件嫁接到进口仪器上, 扩展了使用功能, 使方法的本身更具有灵活性^[17]。

色谱条件如下:

柱: ODS柱, 200×4.6mm, 7μm(大化所色谱开发中心)。

流动相: A. 四氢呋喃-甲醇-0.1mol/L 醋酸钠 (pH7.2) (5:95:900), 含 0.04mmol/L NaN₃。

B. 甲醇, 含 0.04mmol/L NaN₃。

梯度洗脱时间表: 0.40ml/min 时间(min)

1.00	溶剂	A:	95.0%	B:	5.0%
12.00	溶剂	A:	80.0%	B:	20.0%
17.00	溶剂	A:	60.0%	B:	40.0%
20.00	溶剂	A:	60.0%	B:	40.0%
22.00	溶剂	A:	45.0%	B:	55.0%
27.00	溶剂	A:	45.0%	B:	55.0%
29.00	溶剂	A:	0.0%	B:	100.0%
31.00	溶剂	A:	0.0%	B:	100.0%
32.00	溶剂	A:	100.0%	B:	0.0%

柱温 40℃

测定波长: UV338: 10nm; 参考波长: 390: 10nm

衍生试剂的配制, OPA 50mg 溶于 4.5ml 甲醇中, 加 50μl 巯基乙醇和 0.5ml 0.4mol/L 硼酸缓冲液 (pH10.2) 混合。用时取此液 50μl 与上述的 0.5ml 硼酸缓冲液混合备用。

生物样品制备: 取 200μl 体液 (血清等) 加 200μl 乙腈振荡混合, 离心, 取上清液 50μl 与配制好的衍生试剂混匀, 进样 20μl。

(1) 应用本法已为临床测定 16 种氨基酸, 线性范围在 17.0—1000.0μmol/L 之间, 相关系数 0.970—0.998, 最低检测限 15.0μmol/L。

(2) 以 Trp、Met、Val 和 Phe 四种氨基酸为代表, 测定准确度和重复性, 以峰面积计。日内 CV% 小于 7.0%, 日间 CV% 小于 9.0%。

(3) 按下列公式计算回收率:

$$\frac{(\text{本底} + \text{标准样}) - \text{本底}}{\text{标准样}} \times 100\%$$

所有氨基酸的回收率在 89—104% 之间。

(4) 氨基酸衍生物的稳定性试验: 所有的氨基酸衍生物在室温下 60 分钟内稳定, 通常在衍生反应后即可进样。

(5) 可选用任意规格的 ODS 柱作氨基酸分析, 但要适当改变梯度洗脱时间表。每次实验完毕, 要充分清洗管道和柱, 以防阻塞引起压力增高。每次分析前需 1—2 次空载梯度洗脱;

分析的样品和样品之间一般要有 5—10 分钟的间隙,以求色谱达到平衡。

(6)pH 被严格控制,流动相 pH 保持 7.2。生物样品仅能用中性的有机试剂沉淀蛋白,若用三氯醋酸等酸性试剂沉淀蛋白会降低检测灵敏度。

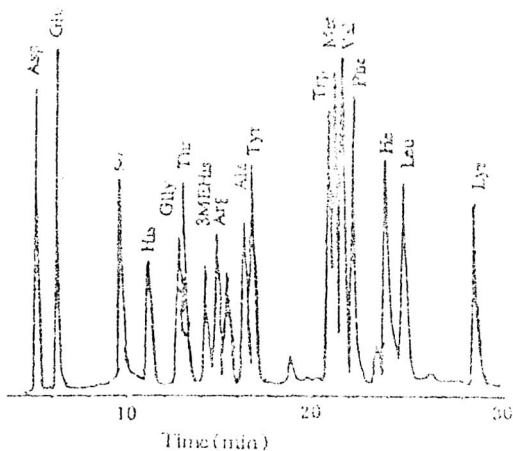


图 2 17 种氨基酸色谱图

应用本法测得的正常参考值如下(300 人),单位 $\mu\text{mol/L}$ 。

Asp	86.4 ± 11.8	Gly	361.3 ± 4.2	Tyr	244.6 ± 39.2
Phe	67.9 ± 13.8	Glu	55.8 ± 10.9	Thr	145.0 ± 14.2
Trp	62.5 ± 7.1	Ile	77.3 ± 9.5	Ser	154.0 ± 29.4
Arg	92.5 ± 13.6	Met	34.8 ± 7.6	Leu	190.8 ± 18.6
His	95.6 ± 23.4	Ala	90.2 ± 17.3	Val	289.2 ± 44.5
Lys	252.5 ± 92.8				

过去应用薄层色谱法定性分析氨基酸,但定量分析存在一定的困难。现在应用薄层色谱扫描仪可以定量分析氨基酸。使用瑞士产 GAMAG II 型薄层色谱扫描仪对人血清中 16 种氨基酸进行的定量测定,除 Leu 和 Ile 分不开之外,其它的氨基酸分离效果都好,而且费用较低。

层析板采用微晶纤维素与硅胶 G 混和(5 : 2),0.25%CMC(羟甲基纤维素)溶液调浆,薄层自动铺板器铺制。湿厚 300 μm ,面积 20 $\times$ 20cm。血样经去蛋白后直接点样于图 3 中所示 S 处,体积 30 μl ,在 1,2,3,4 处分别点上不同的标准品,作为外标。采用双向多重展开,先以酸性展开剂(正丁醇 : 异丙醇 : 甲酸 : 水 = 9 : 4 : 1.5 : 3, pH 1.8)沿图中 I 的方向反复展开二次。再以碱性展开剂(异丙醇 : 醋酸乙酯 : 丙酮 : 甲醇 : 另丁醇 : 26%氨水 : 水 = 9 : 3 : 3 : 1 : 1 : 3 : 3)沿图中 II 方向展一次,然后于 55 $^{\circ}\text{C}$ 鼓风干燥半小时。将干燥的层析板竖直插入盛有镉-茚三酮溶液的显色缸中,静置片刻,取出晾干,于 55 $^{\circ}\text{C}$ 鼓风烘烤 25 分钟,可见板上显出鲜红的斑点。从分离情况看,除 Leu 及 Ile 未能分开呈一个斑点外,其余均得到良好的分离。脯氨酸在 345nm,其余在 520nm 扫描得峰面积,由此计算定量结果。