DOI:10.16016/j.1000-5404.1983.02.021

讲 座

高效液相色谱在血浓监测中应用基础

徐传福

（第二附属医院 药局）

高效液相色谱（High Performance Liquid Chromatography简称HPLC）又称高压或高速液相色谱，是六十年代末发展起来的一种以高压液体为流动相的分离分析技术。由于它具有高效能、高速度、高灵敏度等特点，故在许多领域内都得到广泛的应用。在已知大约300万种以上的化合物中，适宜作为气相色谱分析对象的仅占20%左右，而其余的240万种以上的化合物，均属挥发性低、热稳定性差、分子量大的聚合物或高分子化合物及离子型化合物，均可用高效液相色谱法进行分离分析。在临床药物分析中，许多药物在体液中的有效浓度已降低到ng/ml水平，采用高效液相色谱法监测体液中药物浓度已日趋广泛。

药物进入体内，借助于血循环到达作用部位，当药物浓度聚集到一定量后，即表现出应有的药理效应。药物剂量、血药浓度及药理效应之间存在着紧密的关系，临床上监测许多药物的血浓度，对选择最佳治疗剂量及指导临床用药是有益的。

一、血药浓度与药理效应间的关系

血药浓度是指用各种方式给药后，未经分解或代谢的原药在血浆或血清中的浓度。药物在体内的分布是有明显的选择性，在组织中分布或在作用部位与受体的结合，是一种可逆的生理生化过程，它符合质量作用定律的，并处于动态平衡之中。也就是说，每种药物按其特定的型式分布于血液及组织中，它包括游离原药和血清蛋白相结合的原药。这种型式又随时间和剂量在发生变化。如苯妥英钠、奎尼丁等等药物，在血浆中发生蛋白结合，则必须考虑结合型和游离型药物之间的平衡，以及游离型药物扩散进入组织分布时所发生的影响。

药物与受体结合的方式是属于化学性的。大多数药物的这种结合，是通过范德华键、氢键、离子键等结合方式来实现的。因此，其作用是可逆的。

$$R + D \underset{K_2}{\overset{K_1}{\rightleftharpoons}} RD \longrightarrow E$$

受体　药物　受体-药物　药理效应

K_1及K_2分别表示吸附和解吸附速率常数。

受体周围的药物浓度及单位容积内受体总数，决定了被占领的受体总数。被占领受体越多，则药理作用越强。当全部受体被占领时，药理作用达到最大程度。由此可见，药理效应E应与〔RD〕的浓度成正比。又因〔RD〕的浓度又与R和D的数量密切相关，则药物所占领受体

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

部位与游离型的药物浓度成正比。药物与组织成分的结合，大多数为可逆的。组织与血液间仍保持动态平衡关系。如地高辛在多数人的血清和心肌中浓度比为1/40～1/50，而在不同时间和不同血药浓度时，这个比值变化不大。因此测定血药浓度也可以反映组织中药物的浓度。而且不论组织结合程度如何，大多数药物的血药浓度可以作为药物与受体结合程度的指标。因而根据监测药物的血药浓度，便可推测组织中分布或与受体相结合的药物浓度。

二、血药浓度监测的临床意义

药物剂量和药理作用强度之间的关系，存在着很大的个体差异（如年龄、性别、体表面积等等），并为很多因素所影响。大多数药物的常用剂量，对某些病人可能疗效较差，而对另一些病人又可能导致药物中毒，治疗上真正满意者为数不多。例如，通常认为每天服300 mg苯妥英钠可以控制癫痫。但某医院200例门诊患者，测定血药浓度结果表明，服上述剂量苯妥英钠后只有28·5%的病人，血药浓度为10～20 mg/L，是该药治疗血浓度，病人能控制发作；有60%的病人，达不到治疗血浓度而无治疗效果；有11·5%的病人，血药浓度超过20 mg/L，临床出现中毒现象。事实说明要维持苯妥英钠的血药浓度在治疗范围以内，对有的病人应增大服药剂量，有的则应减小服药剂量，以达治疗目的。又如美国麻省总医院66～68年中，服用地高辛中毒病人占13·9%，74年对作了血药浓度监护者统计，中毒病人下降到5·9%。通过血药浓度的监护，调整临床用药剂量，避免中毒现象发生。特别对于治疗血药浓度范围狭小；剂量小、毒性大的药物进行血药浓度监护更有必要。最近美国肯塔基大学附院，住院病人作常规监护的药物就有十七种之多。主要是庆大霉素、苯妥英钠、地高辛、茶碱等五种（占全数80～85%），其它尚有普鲁卡因胺、苯巴比妥、锂、水扬酸、洋地黄毒甙等。此外，有肾脏病影响排泄；肝脏病影响代谢；胃病影响吸收；病人接受多种药物治疗而有中毒危险的，任何药物均应进行血药浓度监护。

除此以外，对于许多药物治疗剂量多少，疗效好坏，治疗时间长短，毒性影响等，都与药物在体内的吸收、分布、代谢、排泄，也就是所谓药物的动力学和药物的生物利用度有密切关系。这些都必须借助于“血药浓度”这个重要参数加以研究，从而指导药物评价及临床合理用药。

三、测定血药浓度的基本要求

1．药物在生物体中一般以原药存在，也有经去甲基化、羟基化或形成硫酸盐、葡萄糖醛酸甙缀合物而进行代谢，这些代谢产物多数不具药理活性，而少数却具有药理活性（如心得安、保泰松等）。也有些原药无药理活性，其代谢产物才具有活性（如醋氨酚、乙酰氨基苯、丙咪嗪等）。我们须要监测的血药浓度是有药理活性的原药及其代谢产物。所以在测定血药浓度的同时，必须进行原药及有活性的代谢产物的分离。非活性代谢产物予以除去。

2．血药浓度一般包括游离原药、血清蛋白结合的原药、有治疗活性的代谢产物，应分别予以表示。

许多药物可与血清蛋白大量结合，结合部分即无药理活性。目前所采用的测定技术，多数是测定血液中药物总的含量。由于药物与蛋白的结合是可逆的，结合率相当恒定，所以测定血中药物的总含量，也就可以表示出有效的游离型药物的浓度。但对于低蛋白血症、尿毒症患者均属例外，必须测定血清中游离药物的浓度。

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3．必须掌握服药时间及采血时间。其目的在于充分了解血药浓度变化的全过程。一般血管外给药方式，在给药后 1 ～ 2 小时内药物开始吸收及分布，随后血药浓度达到高峰，继之逐渐排除。静脉注射后的瞬时血药浓度和作用强度之间尚缺乏关系。

4．必须估计到药物的血浓度对作用点强弱与周围组织功能的敏感程度、药物被转运的机制、同时服用其它药物以及病理状态等都有关系。例如当心脏病患者同时患有血钾过低、血钙过高、酸碱平衡紊乱、甲状腺功能减退、血氧过低、心肌缺血或心力衰竭中一种或一种以上疾病时，则地高辛的有效血浓度往往过高。

5．目前应用于临床实验室监测血药浓度的方法很多，有生物法、电化学法、分光法、荧光法、薄层扫描法、气相色谱法、液相色谱法、放射免疫法、酶免疫法等等，根据待测血中药物的理化性质如亲脂性、亲水性、酸碱性、挥发性、吸收光谱性、氧化还原性、稳定性等，以及检出限量，选择具有专一性、准确性、重现性的血药浓度测定方法。

四、高效液相色谱法（HPLC）的基本概念

HPLC是利用物质在固定相和流动相之间相互作用的差别，而引起物质的差速迁移，将复杂的混合物分离成单一组分的一种方法。依据被测组分与标准对照品的相对保留时间进行定性，用色谱图中组分的色谱峰面积大小进行定量。HPLC常用的四种分离类型是：液固吸附色谱、液液分配色谱、离子交换色谱、凝胶色谱。其分离方法原理见图 1 。

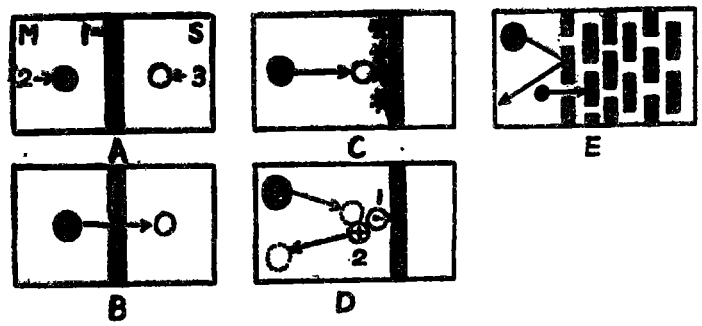


图1　四种色谱分离方法原理模型

A—M流动相，S固定相。1 两相分界面，2 被分析样品的分子，3 样品分子经过传质过程后的位置。B—液液分配色谱。C—液固吸附色谱。D—离子交换色谱，1 固定电荷，2 反离子。E—凝胶色谱。

液固吸附色谱（C）中被分离的样品分子在吸附剂表面的活性中心产生吸附与脱附过程，被分离物质不进入吸附剂内。常用微粒型硅胶为固定相分离非极性或弱极性的有机物，以有机溶剂为流动相（如已烷、二氯甲烷等）。为了解决色谱峰的拖尾问题，流动相中可以加入少量的水或极性溶剂（如甲醇）以去活性。通过改变流动相的溶剂强度，可以改变被测物质的保留值而达到良好的分离。

液液分配色谱（B）中，流动相与固定相之间应互不相溶，两者之间有一明显的分界面。样品溶于流动相后，在色谱柱内经过分界面进入到固定相中，这种分配现象与溶液萃取的机

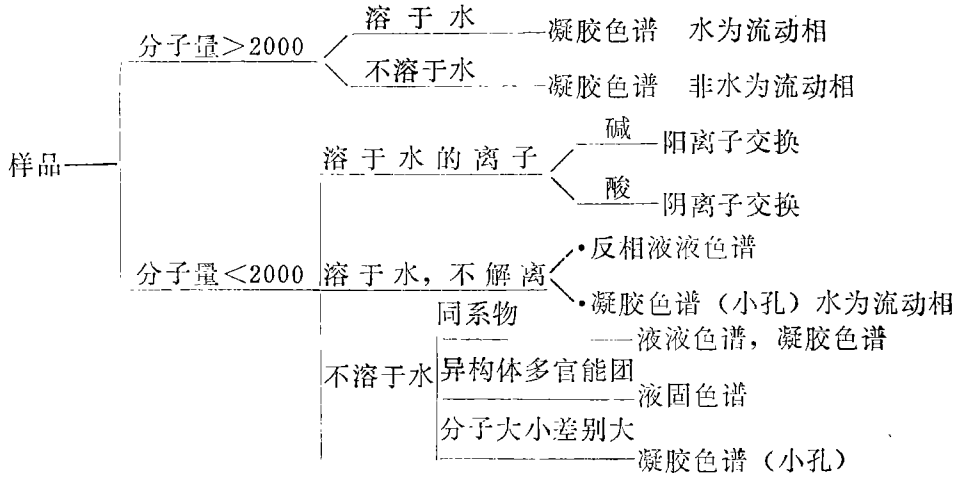
?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

理相似。液液分配色谱又分为正相色谱和反相色谱两类。正相色谱是以极性填料为固定相，以非极性溶剂为流动相。反相色谱是以非极性填料为固定相，以极性溶剂为流动相。正相色谱常用符合HPLC要求的（如纯度、粒子细度）硅胶；流动相为非极性溶剂。根据药物或代谢产物吸附、解吸的不同性质而达到分离。由此方式出来的色谱峰，其极性由小到大排列。反相色谱常用的是化学键合相固定液，十八烷基三氯硅烷固定相（ODS，μ-BondapakC18，<10μ粒度）是经常使用的一种化学键合相；流动相一般以水为基础，再加上不同浓度的可互溶的有机溶剂（如甲醇、乙腈、四氢呋喃等），根据药物在固定相和流动相间的分配过程，有时也混有吸附、解吸过程，而达到分离。洗脱的色谱峰次序是按极性递减排列。对于离子型或可解离的溶质，改变流动相的pH值，能够改变分离的选择性。

离子交换色谱（D）用来分离能在溶液中解离成正或负的带电离子的样品。固定相是惰性网状结构，其上带固定电荷，溶剂中被溶解的样品如具有与反向缓冲离子相同的电荷，便可完成分离。填料颗粒表面具有离子交换基团，也可以是键合相的季胺型的用于分离阴离子，磺酸基用于分离阳离子。弱交换剂上分别键合氨基或羟基。适当调节流动相的离子强度或缓冲液的pH值，，可获得良好的分离效果。

凝胶色谱（E）又称排斥色谱，固定相通常是化学惰性的空间栅格网状结构，颗粒内部的空隙充满了不动的流动相，被分离物质的分子经过孔穴渗进或扩散进去后再返回流动相中。如果控制孔穴的尺寸就可以按分子的大小进行选择性的分离。如果分子的截面积超过了孔穴的最大尺寸则不能渗入，这时大分子在柱内停留的时间，就是它经过固定相颗粒外面的时间。这样就按分子量从大到小的次序先后流出柱子。

HPLC分离类型的选择



一台高效液相色谱仪，最基本的结构应包括：用于传送流动相的输液泵、注样装置、充满了填料的色谱柱、检测器（可见-紫外检测器、荧光检测器、示差折光检测器等）、记录

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

仪。有的还带有微处理机。见图 2。

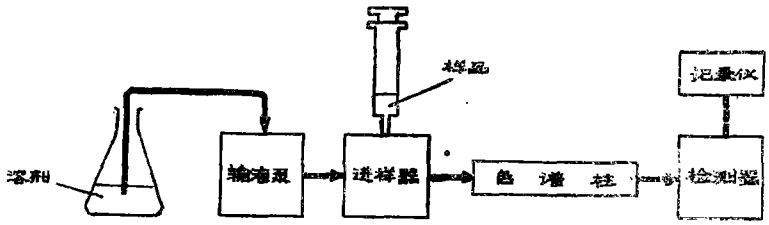


图2 HPLC在血药浓度监测中应用

五、HPLC在血药浓度监测中的应用

"Drug Level monitoring" 一书中，从近代大量资料中列选了75种典型药物监测的生化样品来看，应用 HPLC 来测定的就达70%。可见它在血药浓度监测方面占有最主要的地位。特别对一些高沸点药物、热不稳定药物及取样量不能太大的情况下（如小儿血药浓度的测定），不需做甲基衍生物，就可直接分离测定。本法所显示的快速、灵敏是符合血药浓度监测所要求的。

血药浓度测定主要考虑供试液的预处理及分析柱的选择。

1。供试液的预处理：

血药浓度测定的样品一般采用血浆及血清两种。（全血加肝素等抗凝后，离心分离细胞等，上清液为血浆。全血不加抗凝剂，让其凝结，离心分离上清液为血清）常用抗凝剂有肝素和Ca^{++}结合剂（如EDTA）等，抗凝剂的选择，可以影响检测结果，目前临床实验室多采用血清为血样。

为了使血样中干扰成份尽可能少，血样在检测前，先要去掉生物样品中的蛋白质。水溶性的药物和代谢产物与血浆蛋白结合不紧，用超滤膜脱蛋白，经离心，直接可取澄清的超滤液注样；亲脂性药物及其代谢产物，与蛋白结合较牢，在酸性条件下，用有机溶剂提取后注样。为了进一步分离代谢产物或内原性杂质，可将药物提取到有机溶剂中，然后进行分离或直接检测。许多有机碱、有机酸及中性药物，提取时与 pH 值有关。酸性药物如有机酸、巴比妥类，能在酸性溶剂中被提取到有机层；碱性药物如胺及生物碱类，能在碱性溶剂中被提取到有机层；中性药物如酰胺类，氯丙嗪等，可在任何 pH 的溶剂中被提取。用乙醚-丙酮、氯仿-丙酮、甲苯-醚、二氯甲烷、醚、醋酸乙酯、已烷等在pH3～7.5时，可从血浆样品中提取很多药物。

由于提取过程中，引入了较多的溶剂，故提取液需经浓缩处理，一般在尖底试管中，50℃水浴上，以干燥氮气或空气流在液面上徐徐赶去溶剂至所需体积，或将溶剂除尽，再加入一定溶剂 50～100ul，然后进样。有时因提取液中杂质较多，则需回提之后，再提入有机层中，以达纯化目的。当选择的检测方法需用内标时，则在提取前，先将内标加入试样，与欲测原药一起被提取，以抵消因提取操作中所引入的误差。

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2. 分析柱的选择：

根据待测血样中药物的理化性质，选择适宜的色谱方法、色谱柱及色谱条件。但就血药浓度监测而言，采用液液分配色谱及离子交换色谱为多，尤其以反相色谱应用较多。常用硅烷型化学键合相（如ODS）柱，因为它有较长的使用寿命，适应性广，所用流动相大都价廉易得，并且容易纯化。应用ODS柱进行药物代谢研究，因为药物代谢后，一般代谢产物的极性比药物本身极性大，在反相柱上比药物先流出。

目前应用HPLC检测血药浓度的有醋氨酚、6-氨基已酸、巴比妥类、氯霉素、利眠宁、氯丙嗪、安妥明、可卡因、安定、阿霉素、5-FU、庆大霉素、氢化考的松、消炎痛、异烟肼、利多卡因、6-MP、吗啡、呋喃吡啶、保泰松、苯妥英钠、心得安、磺胺类、四环素、茶碱等等。应用示例请参考有关文献，这里就不一一列举。

《新医学文摘（卡片）放射学分册》即将出版发行

经卫生部批准、《新医学文摘(卡片)》编辑部编辑、人民卫生出版社出版一套文摘，文摘摘录原版杂志近半年内专业文献，按照临床实用为主，兼顾教学和科研需要的原则，分类筛选摘译，并按科学方法分类，一文、一题、一卡，便于检索，便于分类保存。本卡片资料新、传递快、语种多、选题适用、摘译准确、适于高、中级医务人员阅读参考。本分册为双月刊，以X线诊断和治疗为主，由第三军医大学王其源教授主编，并得到邹仲、陈官玺、吴恩惠、颜小琼、陈英洁、曹来宾、陈星荣、陈凡、刘子江等专家教授大力支持。本分册1984年1月创刊，每期32张卡片，0.32元，全年1.92元，全国邮局公开发行，请向当地邮局订阅，编辑组设重庆第三军医大学三院，联系人巫北海。

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net