

高效液相色谱在药学的应用概况和最近进展

张人福 宋晓园

江西省赣州市食品药品检验所,江西赣州 341000

[摘要] 高效液相色谱法是近年来逐渐兴起的一种高效而快速的分离与分析技术,是现代分离测试的重要方法。目前,高效液相色谱法已被广泛运用于各个领域。因其选择性好、灵敏度高、可准确分析微量组成、分析痕量样品等特点已成为医药学分析领域发展最快捷的分析技术。随着高效液相色谱法的普及,色谱仪也得到了相应的更新与改进,色谱仪也正朝着多样化、自动化、联用技术化等方向发展。本文通过对近十年来国内发表的具有代表性的相关文章进行分析、整理和归纳,综述了高效液相色谱技术在(中)药学、食品检测、保健品检测等研究领域中的应用和最新研究进展。

[关键词] 高效液相色谱;药学研究;进展

[中图分类号] R91

[文献标识码] A

[文章编号] 1674-4721(2013)07(c)-0015-03

The application and progress of high performance liquid chromatography in pharmaceutical

ZHANG Ren-fu SONG Xiao-yuan

Ganzhou Provincial Inspection for Food and Drug Control, Jiangxi Province, Ganzhou 341000, China

[Abstract] High performance liquid chromatography is developed in recent years, besides, high performance liquid chromatography method is recognized as fast and efficient separation and analysis technology. High performance liquid chromatographic method has been used in various fields widely because of its good selectivity, high sensitivity, accurate analysis of trace components, trace analysis of sample characteristics has become the most efficient medicine analysis technology in the field of medicine analysis. With the development of high performance liquid chromatography popularity, chromatography has been updated and improved, chromatograph is moving towards diversification, automation, hyphenated techniques of the direction of development. This article analyzes and sorts the representative articles published in China in recent years. Besides, the application and research progress of high performance liquid chromatography technology in the field of pharmacy, food inspection, and health care products detection has also been studied.

[Key words] High performance liquid chromatography; Pharmaceutical research; Progress

色谱法(chromatography)又称为色谱分析法、层析法,是一种分离和分析方法,在分析化学、有机化学、生物化学等领域有着非常广泛的应用。色谱法的作用机制为根据不同物质在不同相态下进行选择性分配,针对流动相对固定相中的混合物进行洗脱,不同的物质会以不同的速度以固定相移动,最终实现分离。本文所研究的高效液相色谱技术(high performance liquid chromatography, HPLC)全程依靠仪器完成。本文对 HPLC 的特点、类型并对其在药学领域中的应用进行了相关阐述。

1 HPLC 在中药学中的应用

中药学的研究是通过不同单味药与复方药的配伍方法及煎煮时间等来发掘中药中化学成分的变化规律与药理联系^[1-2]。在实际应用中,最为简捷有效的方法为选取长度足够的色谱柱,设置合适的时间以温和流动相进行洗脱^[3-4]。也有资料显示新式的毛细管电泳在中药成分的分析上表现出极大的优势,其规避了 HPLC 所有的柱床污染,冲洗方便,分辨率高,集 HPLC 与毛细管电泳优点于一体,利用了 HPLC 高效快速、高灵敏度的特点,使成分分析法更为完善,在中药学的研究领域发挥了重要的作用^[5]。

1.1 HPLC 在中药含量测定方面的运用

雷萍等^[6]采用 HPLC 分离测定了虫草产品中腺苷和虫草素的含量,选取 Acquityuplc C₁₈ 色谱柱,以乙腈-水流动

相进行洗脱,基本可在 4 min 内行基线分离,各组分的浓度与峰面积在 1~17.5 μg/ml 范围内线性良好。HPLC 在中药含量测定方面的研究不胜枚举,但均证明其具有一定的特异性^[7-8]。

1.2 HPLC 在中药代谢方面的运用

薛璟等^[9-10]使用大鼠为标本行体肠灌流实验,采用 HPLC 检测雷公藤甲素含量,研究不同吸收部位位于药物浓度对雷公藤甲素的吸收。实验结果表明各肠段吸收情况为:回肠<空肠<结肠<十二指肠,各肠段之间吸收量的差异与在不同质量浓度下肠道对雷公藤甲素的吸收的差异均无统计学意义($P > 0.05$)。

2 HPLC 在食品检测中的应用

2.1 HPLC 在食品添加剂检测中的应用

食品添加剂可以提升食品的色、香、味,延长食物的保质期,为日常生活带来了乐趣和方便。但是不合理地使用食品添加剂不仅降低食品质量,甚至损害人体健康,如苏丹红鸭蛋事件。目前我国对食品添加剂的使用种类、数量有着严格的限制,严禁添加危害人体健康的添加剂。

2.1.1 甜味剂 甜味剂可以使被添加食物的甜度增加。一般来说,人工添加的甜味剂都是没有营养的,最常用的有乙酰磺胺酸钾(安赛蜜)、环己氨基磺酸钠(甜蜜素)、糖精钠等,其中尤以低价格的糖精钠使用范围较广。少量添加甜

味剂对人体没有副作用,但是,添加过量将会危害人体健康。丁芳林等^[11]采用气、液相色谱联用技术,定量检测果冻等食品中安赛蜜、糖精钠和甜蜜素等甜味剂的含量,结果加样回收率为93.19%~100.90%,相对标准偏差(RSD)为1.05%~2.04%。这种气、液相色谱联用技术,不仅能够在短时间内对果冻中的甜味剂进行定性、定量分析,而且也适用于检测饮料中的甜味剂的含量。

2.1.2 防腐剂 防腐剂能够延长食物的保藏时间,有效阻止细菌等微生物的滋生。比较常用的防腐剂有山梨酸、苯甲酸和它们的钠盐等。当前,我国食品企业向食品中添加的防腐剂大都是人工合成的,使用过量会损害身体健康。赵质创等^[12]采用甲醇、氯化甲醇、水、80%甲醇和20%甲醇提取糕点中的防腐剂,提取液经C₁₈色谱柱进行分离,用甲醇-乙酸铵溶液进行梯度洗脱,在波长为220 nm处进行检测。检测结果表明,苯甲酸、山梨酸、脱氢乙酸、富马酸二甲酯这4种常见防腐剂完全分离开来,且分离效果良好,回收率为84%~106%,变异系数<4.54。该方法能够同时检测出4种防腐剂,相比于其他分离检测方法,步骤简单、操作简便,可以在日常的食品检测中广泛使用。

2.1.3 食用色素 食用色素属于色素的一种,可以改善食物的感官性质,使其颜色亮丽、诱人,增加人的食欲。依据其来源,食用色素可以分为两种:天然色素和人工色素,食品添加剂中大多使用的是人工合成的食用色素,过量食用人工色素会致癌。柠檬黄、苋菜红、胭脂红和日落黄是常用的人工色素。陈再洁等^[13]采用HPLC方法对饮料中的食用色素进行检测,同时分离出6种食用色素:柠檬黄、苋菜红、胭脂红、日落黄、亮蓝1和亮蓝2,且检出限较低,检测结果的准确度和精密度均较高,达到了日常食品中食用色素的检测要求。

2.2 HPLC在食品污染物检测中的应用

2.2.1 对食品中农药、兽药残留物的检测 食品中的农药、兽药残留物严重影响食品的安全性,残留量过大会引起癌变。农药易残留于植物食品中,而兽药易残留于动物食品中。要想提高人们的生活质量,就必须及时、精确检测出食品中的农药、兽药残留物,使人们吃到放心食物。无论是农药残留物,还是兽药残留物,都具有不稳定、难挥发的特征,而HPLC能有效定性、定量地分离、分析出这些化合物。目前,全世界应用比较广泛的新型农药是烟碱类杀虫剂,其中尤以啉虫脒为代表。尹建吉等^[14]建立了HPLC对蔬菜中的农药进行检测的方法,以西红柿为例,采用乙腈提取、盐析、氨基小柱(LC-NH₂)净化的样品处理方法,检测其中的啉虫脒含量,结果证实这种方法样品需要量少、回收效率高、相对标准偏差小,且方法简便,能准确地实现蔬菜样品的检测,足以满足常规农药残留物检测的需求。

邬晨阳等^[15]用HPLC对牛奶中的残留兽药进行了检测,结果表明此HPLC分析方法能同时测定牛奶中11种兽药的残留量,其中包含7种磺胺类药物和4种氟喹诺酮类药物,且灵敏度高、重现性好、准确度高,可满足动物源性食品中磺胺和氟喹诺酮类药物的残留分析,有很好的实际应用价值。

2.2.2 对食品微生物及其代谢产物的检测 食品在生产的过程中难免会产生微生物及其代谢产物,而其中相当一部分会损害人体健康,如寄生曲霉新陈代谢过程中产生的次

生代谢产物黄曲霉毒素能诱发癌症等,而以大米、玉米为主原料生产的食品,生产环节不当的话,极易产生黄曲霉毒素,威胁人们的身体健康。HPLC能根据微生物的化学结构和代谢产物的不同,检测食品中微生物的数量和对人体的危害程度。高志杰^[16]采用带有荧光检测器的HPLC对食品中容易出现的4种黄曲霉毒素AFB₁、AFB₂、AFG₁、AFG₂进行定性定量的检测。结果表明,4种黄曲霉毒素在0~100 μg/kg范围内线性关系良好,样品检出限低,能检测出0.05 μg/kg水平的黄曲霉毒素。该种检测方法不仅准确度高、灵敏性强,而且重复性好,适用于常规食品中对4种黄曲霉毒素含量的检测。

2.3 HPLC在转基因食物检测中的应用

目前,我国食品市场中流通着很多转基因食品,如:转基因大豆、转基因玉米、转基因水稻等,转基因食品已经广泛渗入我们的日常生活中。但是转基因食品并不是绝对安全的,一些学者认为转基因食品能增加人体对抗生素的耐药性,在人体内积累微量毒素可能引起变态反应,并且转基因食品的营养均衡可能被破坏。所以,需要建立一种能够检测转基因食品中的潜在危险的方法。HPLC除应用于常规食物的检测外,也可以应用于转基因食物检测中。蔗糖-果糖基转移酶能够转化甘蔗的果聚糖种类和含量,武媛丽等^[17]建立了HPLC测定果糖、葡萄糖、蔗糖及低聚果糖含量的方法,测定转基因甘蔗中的蔗果三糖、蔗果四糖和蔗果五糖3种低聚果糖来验证转移酶的转化情况。这种方法也可以蔗糖-果糖基转移酶的催化产物蔗果三糖(GF2)较为准确地检测甘蔗茎秆节间其他糖类的组分及含量,可以用于甘蔗中糖类的定性和定量检测,且该方法操作简便、成本较低、结果准确。

2.4 HPLC在化学合成药物分析检测中的应用

在化学合成药物的合成过程中有时需要对已合成的化合物进行分离分析,这时通常会考虑选用HPLC或者其他分析检测技术联用,既方便、快捷,灵敏度又高,大大提高了药物合成的速度,并且可以为药物后期的开发制订质量标准。

2.5 HPLC在药物代谢动力学研究中的应用

药物代谢动力学主要是定量研究药物在生物体内吸收、分布、代谢和排泄规律,并运用数学原理和方法阐述血药浓度随时间变化的规律的一门学科。在创新药物研制过程中,药物代谢动力学研究与药效学研究、毒理学研究处于同等重要的地位,已成为药物临床前研究和临床研究的重要组成部分。在药动学研究中通常要用到HPLC或与其他技术联用对药物在生物体内的吸收、分布、代谢进行分析检测,如HPLC-紫外检测法测定血浆多潘立酮^[18]、HPLC串联质谱法检测多潘立酮血浆浓度、HPLC固定化钨(Ⅴ)联吡啶-高锰酸钾化学发光法测定人血清中的雷尼替丁等。

3 HPLC在保健品检测中的应用

常凤启等^[19]用HPLC测定保健食品中大豆异黄酮指标,目前主要采用流动相的甲醇-水梯度洗脱法,对HPLC分离测定的条件进行优化,样品的分析与检测可在短时间内完成。该方法可同时分析多种大豆异黄酮成分,快捷精准、灵敏度高,尤其适用于测定保健品中大豆异黄酮成分。

(下转第18页)

于 TACE 组(70%)和 PEI 组(30%),3 组比较差异有统计学意义($P<0.05$)(表 1)。

表 1 3 组患者临床疗效的比较[n(%)]

组别	n	显效	有效	无效	总有效率(%)
TACE 组	40	14(35.0)	14(35.0)	12(30.0)	70
PEI 组	40	6(15.0)	6(15.0)	28(70.0)	30
TACE+PEI 组	40	18(45.0)	20(50.0)	2(5.0)	95

2.2 3 组患者治疗后生存率的比较

患者出院后,对 3 组患者进行跟踪随访,调查记录 3 组患者的 5 年生存率状况。发现 TACE+PEI 组患者的 5 年生存率状况明显优于 TACE 组和 PEI 组,3 组比较差异有统计学意义($P<0.05$)(表 2)。

表 2 3 组患者治疗后生存率的比较[n(%)]

组别	n	1 年	2 年	3 年	4 年	5 年
TACE 组	40	21(52.5)	12(30.0)	4(10.0)	1(2.5)	0(0.0)
PEI 组	40	24(60.0)	16(40.0)	12(30.0)	4(10)	3(7.5)
TACE+PEI 组	40	30(75.0)	2(5.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)
P 值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

3 讨论

原发性肝癌按病理学分型可分为肝细胞型肝癌、胆管细胞型肝癌及混合型肝癌。目前,临床中多项研究表明采用药物介入治疗,效果良好^[4-5]。介入治疗是通过导管将药物注入肝脏,直接作用于肿瘤的一种治疗方法。目前最多用于肝癌的治疗,包括肝动脉插管化疗栓塞或肝动脉插管

化疗灌注^[6]。有研究显示,采用 TACE 联合 PEI 对原发性肝癌患者进行治疗,效果良好^[7-8]。

本研究结果显示,TACE+PEI 组患者治疗的临床总效率为 95%,明显高于 TACE 组的 70%和 PEI 组的 30%,差异有统计学意义($P<0.05$);TACE+PEI 组患者的 5 年生存率状况明显优于 TACE 组和 PEI 组,差异有统计学意义($P<0.05$)。

综上所述,采用 TACE+PEI 联合介入治疗的治疗手段对原发性肝癌患者进行治疗,效果良好,值得临床推广应用。

[参考文献]

- [1] 毕晓霞,潘秀花,邹文慧,等.原发性肝癌肝动脉化疗栓塞术联合放疗 45 例疗效观察[J].中国当代医药,2010,17(17):36-38.
- [2] 胡可明,孙志先,张毅,等.肝动脉化疗栓塞联合经皮无水乙醇注射治疗原发性肝癌[J].中国现代医学杂志,2011,21(5):678-681.
- [3] 徐立涛,周振华,林钧华,等.肝动脉化疗栓塞联合血管内皮抑制素介入治疗原发性肝癌的疗效和安全性[J].肿瘤,2010,30(7):625-627.
- [4] 郭力红,张岁,刘英辉,等.原发性肝癌患者介入治疗前后血清肿瘤坏死因子- α 及白介素-10 水平[J].中国老年学杂志,2012,32(19):4147-4148.
- [5] 王少雷,李森,魏宏,等.奥沙利铂与吡喃阿霉素介入治疗原发性肝癌的比较研究[J].介入放射学杂志,2012,21(9):738-742.
- [6] 赵小龙,石永芳.134 例介入治疗的原发性肝癌患者生命质量分析[J].中国卫生统计,2011,28(5):565-567.
- [7] 王秀玲.原发性肝癌介入治疗 200 例围术期护理[J].齐鲁护理杂志,2009,15(6):47-48.
- [8] 钱利,袁芳.肝动脉化学栓塞治疗中晚期肝癌的疗效和护理[J].护士进修杂志,2009,24(12):1091-1092.

(收稿日期:2013-04-26 本文编辑:林利利)

(上接第 16 页)

4 结语

HPLC 以其高精确度、高灵敏度和高回收率、重复性好等优点独领食品检测技术的风骚,目前,HPLC 与其他技术的联用已成为药品和食品检测技术的发展趋势,也使得 HPLC 在药品和食品领域的应用范围更加广阔。

[参考文献]

- [1] 王淑静,毕建杰,柳洪洁,等.高效液相色谱使用中常见问题及对策[J].实验室研究与探索,2010,29(11):10-12.
- [2] 吴俊芳,张涛,李丽萍.高效液相色谱法测定氨咖黄敏胶囊的含量[J].药物鉴定,2011,20(4):33-34.
- [3] 孙川,冯俭,李煌.高效液相色谱法测定狼疮灵颗粒中芍药苷的含量[J].广州医药,2010,41(5):56-58.
- [4] 贾晓渊.生物化工原理[J].华西药学杂志,2000,14(2):123.
- [5] 中国医学科学院.常用中草药高效液相色谱分析[M].北京:科学出版社,1999:50.
- [6] 雷萍,黄志英,林森,等.虫草产品中腺苷和虫草素含量的测定[J].食用菌学报,2009,19(3):63-66.
- [7] 李发美,熊志立,鹿秀梅,等.中药质量控制的研究策略和色谱技术[J].色谱,2006,12(6):31-32.
- [8] 唐军,武为宝.超高效液相色谱法快速测定血栓通注射液中 5 种皂苷成分的含量[J].药物分析杂志,2008,28(1):97-99.
- [9] 薛璟,王宓,林新艳,等.UPLC 法测定复方南星止痛膏中马兜铃酸

A 的含量[J].南京中医药大学学报,2009,25(5):396-397.

- [10] 潘坚扬,杨俊,王齐,等.UPLC 法测定罗芙木根中的利血平含量[J].光谱实验室,2009,26(4):855-857.
- [11] 丁芳林,卢亚玲,陈波.HPLC-MS 联用测定果冻等食品中的 3 种甜味剂和苯甲酸[J].食品与机械,2008,24(4):111-114.
- [12] 赵质创,杨建英,姚庆伟,等.高效液相色谱法同时测定糕点中 4 种防腐剂[J].中国测试,2011,37(3):33.
- [13] 陈再洁,杨慧.HPLC 同时测定饮料中的 6 种食用色素[A].2011 年第四届国际食品安全高峰论坛论文集[C].2011:60-61.
- [14] 尹建吉,殷建忠,邵金良,等.高效液相色谱法检测几种蔬菜中啉虫脒农药残留[J].现代预防医学,2012,39(3):23.
- [15] 郭晨阳,韩小江.HPLC 法同时测定牛奶中 7 种磺胺类药物和 4 种氟喹诺酮类兽药[J].中国卫生检验杂志,2012,21(2):353-355.
- [16] 高志杰.HPLC 法同时测定食品中的 4 种黄曲霉毒素[J].中国卫生检验杂志,2007,17(10):1803-1804.
- [17] 武媛丽,杨本鹏,蔡文伟,等.利用高效液相色谱法测定转基因甘蔗中的低聚果糖[J].热带生物学报,2011,2(2):101-106.
- [18] 李柳,赵玲玲,周志凌,等.高效液相色谱串联质谱法检测多潘立酮血浆浓度[J].中南药学,2011,9(1):20-23.
- [19] 常凤启,秦振顺.保健食品中大豆异黄酮测定方法研究[J].中国卫生检验杂志,2009,14(4):430-432.

(收稿日期:2013-06-05 本文编辑:郭静娟)