

用镱离子和邻苯二酚紫定性定量检测 人体尿液和血清中的无机磷酸根

阴彩霞, 霍方俊, 杨 频

(山西大学分子科学研究所, 化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 太原 030006)

摘要 用摩尔比为 2:1 的 YbCl_3 和邻苯二酚紫, 在 $\text{pH} = 7.0$ 的 HEPES 缓冲溶液中, 定性、定量检测人体尿液和血清中的无机磷酸根. 随着尿液或经过处理后血清液的加入, 在 UV-Vis 吸收光谱上, 由 623 nm 的最大吸收峰逐渐向 444 nm 的最大吸收峰转移, 同时体系的颜色由蓝变黄. 该体系对尿液和血清中的无机磷酸根相对其它成分显示了很好的选择性. 测得健康人尿液和血清中无机磷酸根的平均含量分别为 23.25 和 1.14 mmol/L, 测定结果与无机磷酸根正常释放基本吻合.

关键词 无机磷酸根; 尿液; 血清; 邻苯二酚紫(PV); 三氯化镱; 紫外-可见光谱

中图分类号 O657.32 **文献标识码** A **文章编号** 0251-0790(2006)10-1849-04

磷酸根参与许多重要的生物矿化过程, 诸如骨骼的形成以及肾结石起源这些病理过程, 因此其在生物液体中的检测非常重要^[1]. 已有人研究尿结石和肾结石形成的因素^[2~5], 结果表明, 尿液中含有过多的无机磷酸根是形成尿结石和肾结石的原因之一. 虽然许多仪器方法已用于检测尿液中的无机磷酸根^[6~9], 但在临床样品中检测尿液中的无机磷酸根时, 离子色谱等仪器只有较窄的线性范围. 由于直接测量浓度太高, 这些检测仪器需要对试样进行广泛的人工稀释, 才能使测量结果准确. 因此开展直接检测尿液中的无机磷酸根是一个挑战性的任务.

在临床上, 检测血清中的无机磷酸根作为常规血样分析的一个部分. 在人体血清中标准的无机磷酸根的浓度范围是 0.81 ~ 2.26 mmol/L^[10]. 个体血清中含有反常高的无机磷酸根可确定为高磷酸盐过多, 这表明其有急性的或慢性的肾衰竭, 而血清中无机磷酸根含量低的个体将因血磷酸盐过少而引发软骨病、甲状腺机能亢进等疾病^[11].

我们研究发现了一种简单、灵敏的在水溶液中检测无机磷酸根的探针, 这种体系由在 $\text{pH} = 7.0$ 的 HEPES 缓冲溶液中加入摩尔比为 2:1 的 YbCl_3 和邻苯二酚紫组成^[12]. 人体尿液和血清中的无机磷酸根的浓度与生理和病理密切相关^[13], 以往用于检测血清中无机磷酸根的比色法, 有的基于磷钼酸进一步还原为杂聚钼蓝^[14~16], 有的基于直接的测定亚钼和亚钒磷钼酸^[17,18], 或者基于磷钼酸和碱性染料的配合物^[19]. 这些方法存在钼酸盐还原受轻微的 pH 变化影响, 配合物形成的速率受蛋白浓度的严重影响, 需要的 pH 值将导致有机磷的水解等严重的缺陷, 这样都会导致测得的无机磷酸根的浓度偏高^[20]. 本文应用此体系定性、定量地检测人体尿液和血清中的无机磷酸根, 该方法不仅克服了窄的线性范围, 而且避免了以上局限性, 具有低的分析价格、高的选择性、稳定性和长寿性. 由于其显著的优点, 适合于临床使用, 而且有望取代钼试剂.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Hewlett Packard HP-8453 型紫外分光光度计; 贝克曼酸度计; 微量进样口和微量进样枪; PO-120 石英比色皿; Amicon Model 8010 超滤器; 截留分子量为 10 000 的 PM-10 超滤膜; TGL-16B 高速台式离

收稿日期: 2006-02-24.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 30470408)资助.

联系人简介: 杨 频(1933 年出生), 男, 教授, 博士生导师, 从事生物无机化学研究. E-mail: yangpin@sxu.edu.cn

心机; N₂ 气.

HEPES 为 Sigma 产品, 邻苯二酚紫(上海化学试剂三厂), 氧化镱购于中国稀土研究所, Na₂HPO₄ 购于北京化学试剂厂, YbCl₃ 用氧化镱和质量分数为 37% 的浓盐酸加热制备, 所有的溶液用去离子水配制, 人尿从健康的自愿者收集并于 4 °C 保存, 取健康人血样通过离心得到血清, 再经过超过滤得到待测的血清液.

1.2 实验过程

光谱法: PV-HEPES-YbCl₃ 体系, 通过紫外-可见光谱定性、定量检测尿液和血清中的无机磷酸根. 比色皿中盛有含 PV (50.00 μmol/L) 和 YbCl₃ (100.00 μmol/L) 的浓度为 10.00 mmol/L, pH = 7.0 的 HEPES 缓冲溶液, 把所收集的某一健康人的尿液或血液经过离心和超过滤得到的血清液, 逐渐加到此比色皿内, 同时在紫外-可见分光光度仪上检测, 发现体系在 623 nm 处的吸收逐渐减弱, 而在 444 nm 处的吸收逐渐增强, 直到这种变化不再发生时停止加样. 重复实验 3 次以上, 即可求得尿液和血清中无机磷酸根的含量.

2 结果与讨论

2.1 紫外光谱图

图 1(A) 为在含有 PV (50.00 μmol/L), YbCl₃ (100.00 μmol/L) 的浓度为 10.00 mmol/L, pH = 7.0 的 HEPES 缓冲溶液中逐渐加入某一健康人的尿样时, 随着尿样的加入, 体系在 623 nm 处的吸收逐渐减弱, 而在 444 nm 处的吸收逐渐增强, 直到加入的尿样为 20.00 μL 时, 这种变化不再发生, 重复 3 次试验, 按照公式: $c(\text{PO}_4^{3-}) = [\text{Yb}^{3+}] \times 2/V_{\text{尿液}}$ 可以计算出该尿液中无机磷酸根的浓度为 10.00 mmol/L. 同样, 向上述的体系中加入处理后的某一健康人的血清液 [图 1(B)], 当加入的样尿体积达到 140.00 μL 时, 类似的紫外-可见光谱的吸收峰不再发生变化, 同时根据公式 $c(\text{PO}_4^{3-}) = [\text{Yb}^{3+}] \times 2/V_{\text{血清}}$ 计算出该血清中无机磷酸根的浓度为 0.95 mmol/L (取平均值).

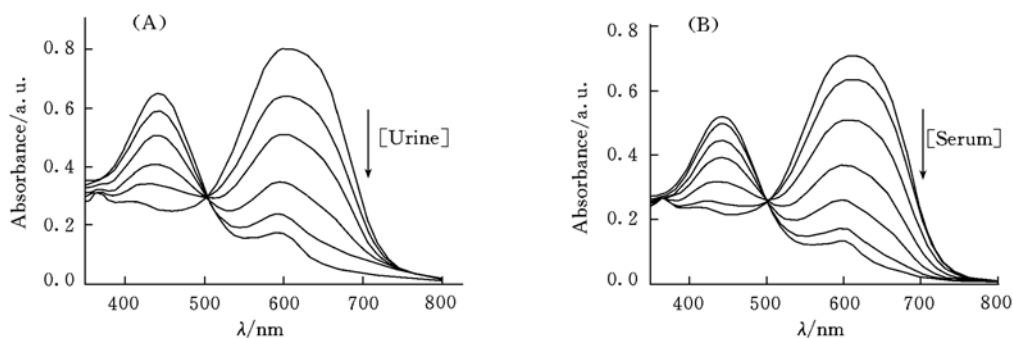


Fig. 1 UV-Vis spectra of PV-HEPES-Yb³⁺ with V = 0—20.00 μL into which the urine from adult was added (A) and PV-HEPES-Yb³⁺ with V = 0—140.00 μL into which the serum was added (B)

2.2 选择性

PV-HEPES-YbCl₃ 对磷酸根相对其它阴离子如 Cl⁻, SO₄²⁻, CH₃COO⁻, HCO₃⁻ 和 ClO₄⁻ 等显示了很好的选择性^[12]. 尿液和血清中除了含有上述离子外, 还含有如肌氨酸酐、糖、钙、草酸盐、二价等物种和过渡离子螯合物等多种成分. 为研究这些成分是否会干扰无机磷酸根的测定, 在 2 mL 的 HEPES 缓冲溶液中分别加入 10.00 μL 尿样和 10.00 μL 血清, 在 λ = 350 ~ 1 000 nm 处, 未见到任何吸收. 表明在测定的紫外吸收波长范围内, 没有来自尿液和血清中组分的吸收峰. 因此, 可以断定在研究的波长范围内, 吸收峰的变化完全来自测定过程, 而没有其它效应的累加和干扰.

为了进一步证实尿液和血清中许多阴离子和过渡金属离子螯合物不干扰无机磷酸根的测定, 排除铁离子和其它阳离子干扰测定的可能性, 把稍过量的 YbCl₃ 加入到磷酸根的溶液中, 立即生成沉淀, 通过离心、移液获得清晰的溶液, 然后将清液逐渐加入到 PV-HEPES-YbCl₃ 中, 发现无论加入的量多少, 在波长 λ = 400 ~ 800 nm 内, 紫外吸收峰的强度和溶液的颜色都没有任何变化, 即未检测到磷酸根. 此

实验充分证明 YbCl_3 可以彻底去除磷酸根. 同样, 将稍过量的 YbCl_3 加到已经测定磷酸根含量的尿液和血清液中, 通过离心和移液, 得到处理后的尿样和血清液, 将处理后的尿样和血清液分别加到 PV-HEPES- YbCl_3 体系中, 在波长 $\lambda = 400 \sim 800 \text{ nm}$ 内, 紫外吸收峰的强度没有变化, 同时, 体系的颜色也始终没有任何变化. 表明此体系中检测到的是无机磷酸根, 而不是其它的阴离子. 另外, 将足够的没有除去磷酸根的尿样和血清液加入到 PV-HEPES 中, 在波长 $\lambda = 400 \sim 800 \text{ nm}$ 内, 未发现吸收峰强度和溶液颜色的变化, 说明阳离子未干扰测定.

以上结果均排除了尿液和血清液中的其它成分, 其中包括阴、阳离子干扰测定无机磷酸根的可能性, 说明所研究的体系在测定尿液和血清中的无机磷酸根时选择性很好.

2.3 线性和检测极限

尽管有许多仪器方法可用于检测尿液和血清中的无机磷酸根, 但在临床样品的分析和检测中, 离子色谱等仪器存在窄的线性范围的缺点. 然而, 我们对尿液 ($0 \sim 70.00 \text{ mmol/L}$) 和血清 ($0.50 \sim 2.50 \text{ mmol/L}$) 的测量方法却很好地遵循了朗伯-比尔定律, 其线性相关系数分别为 0.999 76 和 0.999 95 (图 2).

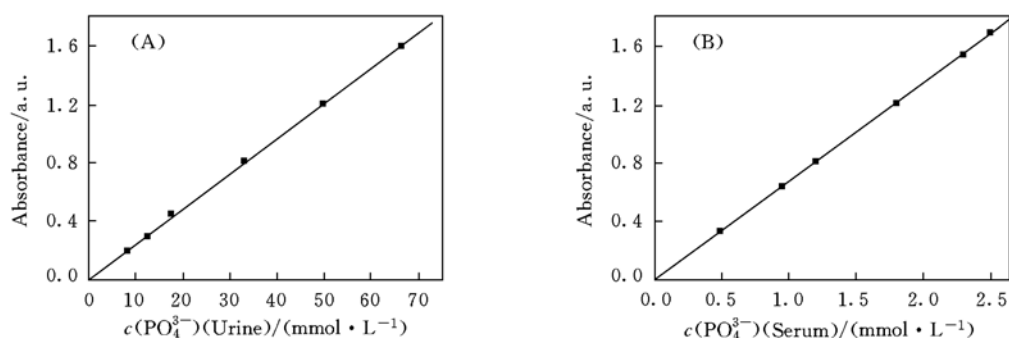


Fig. 2 The working curves for urine (A) and serum (B) measurements plotted with the absorbance values against various concentrations of urine ($0-70.00 \text{ mmol/L}$) and serum ($0-2.50 \text{ mmol/L}$)

2.4 方法的准确性

为了证实该方法的准确性, 采用医院现有的标准程序 (钼蓝检测磷酸根) 与本实验方法作对照, 得到了一致的结果. 表 1 是两种方法对照的结果, 表 1 的结果证明该方法准确可行.

Table 1 Comparison results of the method in this paper with the method (molybdenum blue assay for phosphate)

Numbers of urine sample	Inorganic phosphorus from molybdenum blue assay/ $(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	Inorganic phosphorus from our method/ $(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	Numbers of urine sample	Inorganic phosphorus from molybdenum blue assay/ $(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	Inorganic phosphorus from our method/ $(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$
1 (Urine)	17.73	17.85	4 (Serum)	1.35	1.34
2 (Urine)	17.54	17.54	5 (Serum)	0.93	0.95
3 (Urine)	8.27	8.33			

回收实验结果列于表 2 中. 计算得到的回收值令人满意, 表明该方法是准确的.

Table 2 Recovery of phosphate in samples

Sample	Added (inorganic phosphorus)/ $(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	Found (inorganic phosphorus)/ $(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	Recovery (%)	Sample	Added (inorganic phosphorus)/ $(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	Found (inorganic phosphorus)/ $(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$	Recovery (%)
Urine 1	—	14.30		Urine 3	5.200	15.10	99.2
	5.20	19.30	99.0	Serum 1	—	1.11	
Urine 2	—	12.40			0.600	1.73	102.0
	5.20	17.60	99.3	Serum 2	—	1.48	
Urine 3	—	9.98			0.600	2.02	95.9

参 考 文 献

- [2] Pierratos A. E. , Khalaff P. T. , Cheng K. *et al.* . J. Urol. [J], 1994, **151**: 571—574
- [3] Martin X. , Smith L. H. , Werness P. G. . Kidney Int. [J], 1984, **25**(6): 948—952
- [4] Abdel-Halim R. E. , Al-Sibaai A. , Baghlaif A. O. . Scand. J. Urol. Nephrol. [J], 1993, **27**: 155—162
- [5] Abdul-Halim R. , Hardy M. J. . Saudi. Med. J. [J], 1986, **7**: 394—401
- [6] Lozano-Chaves E. , Hernandez-Artiga M. P. , Munoz-Leyva A. . Microchim. Acta [J], 1994, **116**: 91—99
- [7] Classen A. , Miersch W. D. , Hesse A. J. . Clin. Chem. Clin. Biochem. [J], 1990, **28**: 91—94
- [8] Koshiishi I. , Imanari T. . Anal. Sci. [J], 1985, **1**: 253—256
- [9] Rhemrev-Boom M. M. . J. Chromatogr. A. [J], 1994, **680**: 675—684
- [10] Ender D. B. , Rude R. K. ; Burtis C. A. . Ashwood E. R. Eds. ; Mineral and Bone Metabolism, In Tietz Textbook of Clinical Chemistry [M], Philadelphia P. A: Saunders W. B. Company, 1999: 1406—1408, 1439—1440
- [11] Tobey S. L, Anslyn E. V. . Org. Lett. [J], 2003, **5**(12): 2027—2029
- [12] Yin C. X. , Huo F. J. , Yang P. *et al.* . Chem. Commun. [J], 2004: 934—935
- [13] Politi L. , Chiaraluce R. , Consalvi V. *et al.* . Clinica Chimica Acta [J], 1989, **184**: 155—166
- [14] Fiske C. H. , Subbarow Y. J. . Biol. Chem. [J], 1925, **66**: 375—400
- [15] Lowry O. H. , Lopez J. A. J. . Biol. Chem. [J], 1946, **182**: 421—428
- [16] Bartles P. C. , Roijers A. F. M. . Clin. Chim. Acta [J], 1975, **61**: 153—154
- [17] Daly J. A. , Ertingshausen G. . Clin. Chem. [J], 1972, **18**: 263—265
- [18] Adador E. , Urban J. . Clin. Chem. [J], 1972, **18**: 601—604
- [19] Fogg A. G. , Soleymanloo S. , Burns D. T. . Anal. Chim. Acta [J], 1977, **88**: 197—200
- [20] Endres B. D. , Rude R. K. ; Burtis C. A. , Ashwood E. R. Eds. Mineral, Bone Metabolism. Tietz Textbook of Clinical Chemistry [M], Philadelphia: Saunders W. B. Co. , 1994: 1887—1973

Qualitative and Quantitative Determination of Inorganic Phosphate from Human Urine and Serum by Yb(III) Ion and Pyrocatechol Violet

YIN Cai-Xia, HUO Fang-Jun, YANG Pin*

(Key Laboratory of Chemical Biology of Molecular Engineering of Education Ministry,
Institute of Molecular Science, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract Phosphate is involved in a number of important biomineralization processes such as bone formation as well as pathological processes such as the genesis of renal stones. Consequently, its determination in biological fluids is important. The determination of free phosphate ion in human urine and serum is very important, since they have diagnostic value in some clinical cases. Here we report a simple and sensitive method to determine phosphate in urine and serum. This new ensemble was prepared by adding ytterbium chloride and pyrocatechol violet in a 2:1 molar ratio in aqueous solution of 10 mmol/L HEPES buffer at pH = 7.0. With the addition of urine or serum sample, in UV-Vis absorption spectra the maximum absorption peak gradually shifts from 623 nm to 444 nm and the ensemble results in a change of color from blue to yellow. The ensemble exhibits an excellent selectivity for phosphate over other constituents of urine and serum. Mean urine and serum phosphate concentrations found in healthy individual are 23.25 and 1.14 mmol/L respectively. The detection results are basically consistent with those of normal excretion of phosphate.

Keywords Phosphate; Urine; Serum; Pyrocatechol violet-PV; YbCl₃; UV-Vis spectra

(Ed.: S, I)