

## 固相萃取-高效阴离子交换色谱-积分脉冲安培法 检测人体尿液中的异黄蝶呤

冯 蕾, 鄢爱平, 陈 林, 万益群\*

(南昌大学分析测试中心, 江西 南昌 330047)

**摘要** :建立了固相萃取-高效阴离子交换色谱-积分脉冲安培法(SPE-HPAEC-IPAD)测定人体尿液中异黄蝶呤的分析方法。尿液经ENVI-18与732型阳离子交换柱串联萃取后,除去了大量干扰物质。采用IonPac AS21分析柱(250 mm × 2 mm),以0.025 mol/L NaOH溶液为淋洗液,流速为0.40 mL/min,在优化的安培检测波形条件下,异黄蝶呤的质量浓度在0.005 ~ 0.200 mg/L范围内与峰面积呈良好的线性关系,相关系数为0.998 4,检出限为0.003 mg/L。健康人及癌症病人尿液在2 mg/L和5 mg/L两个添加水平的平均回收率在95.4% ~ 96.8%之间,相对标准偏差小于5%。此方法环保、快速、准确,可用于健康人与癌症病人尿液中异黄蝶呤的测定。

**关键词** :高效阴离子交换色谱;积分脉冲安培法;固相萃取;异黄蝶呤;人体尿液

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2010)04-0408-05

## Determination of isoxanthopterin in human urine by solid phase extraction-high performance anion-exchange chromatography coupled with integrated pulsed amperometric detection

FENG Lei, YAN Aiping, CHEN Lin, WAN Yiqun\*

(Center of Analysis and Testing, Nanchang University, Nanchang 330047, China)

**Abstract** : A sensitive, selective and environmental friendly method for the determination of isoxanthopterin in human urine by solid phase extraction (SPE)-high performance anion-exchange chromatography (HPAEC) with integrated pulsed amperometric detector has been developed. The tandem solid phase extraction was employed to purify isoxanthopterin from human urine. The separation of isoxanthopterin was carried out on an IonPac AS21 anion-exchange column with eluent of 0.025 mol/L NaOH at the flow rate of 0.40 mL/min. Under the optimized conditions, the detection limit for isoxanthopterin was 0.003 mg/L, and the linear range was 0.005 - 0.200 mg/L. The spiked recoveries ranging from 95.4% to 96.8% were obtained in the urine samples from healthy persons and cancer patients, and the relative standard deviation (RSD) was less than 5%. The present method was successfully applied to the determination of isoxanthopterin in urine from healthy individuals and cancer patients.

**Key words** : high performance anion-exchange chromatography (HPAEC); integrated pulsed amperometric detection (IPAD); solid phase extraction (SPE); isoxanthopterin; human urine

蝶呤类化合物是细胞代谢过程中的重要辅助因子,广泛地分布于许多生物体内,种类繁多,但含量极微<sup>[1]</sup>。蝶呤(pterin)、新蝶呤(neopterin)、生物蝶呤(biopterin)、黄蝶呤(xanthopterin)、异黄蝶呤(isoxanthopterin)和蝶呤-6-羧酸(pterin-6-carbox-

ylic acid)等是其中的主要几种。目前,对于蝶呤类化合物的研究,以新蝶呤的研究较为深入<sup>[2,3]</sup>。当免疫系统被癌症<sup>[4]</sup>、病毒感染<sup>[5,6]</sup>、免疫系统疾病<sup>[7]</sup>等激活后,人体体液中新蝶呤的代谢水平会发生改变。然而其他蝶呤类化合物的研究相对较少,但这

\* 通讯联系人:万益群,博士,教授,主要研究方向为生命化学及色谱分析。Tel: (0791)8321370, E-mail: yqwanoy@sina.com.

基金项目:国家自然科学基金项目(No. 20765002)和江西省自然科学基金项目(No. 0520057).

收稿日期:2009-11-18

些化合物也有可能与某些疾病相关<sup>[8-11]</sup>。异黄蝶呤在黄嘌呤脱氢酶的作用下由蝶呤产生<sup>[12]</sup>,由于其自身的物理化学性质,国内外对异黄蝶呤的研究尚未深入。

目前,对异黄蝶呤的分析测定主要采用高效液相色谱-荧光检测法(HPLC-FLD)<sup>[13-15]</sup>。由于蝶呤类化合物以不同氧化态存在于人体体液中,且只有高氧化态的蝶呤类化合物才具有较强的荧光响应,因此在测定之前通常需要对样品进行氧化处理,这对待测物的检测会造成一定影响。Han等<sup>[11]</sup>运用高效毛细管电泳-激光诱导荧光检测法(HPCE-LIF)对人体尿液中包括异黄蝶呤在内的蝶呤类化合物进行了分析检测,灵敏度得到了显著提高,但该方法同样采用了氧化步骤。以上两种方法均使用了有机溶剂,不但会对环境造成二次污染,同时也不利于操作人员的健康。Espinosa-Mansilla等<sup>[16]</sup>运用分光光度-偏小二乘法(PLS)对异黄蝶呤等蝶呤类化合物进行了分离,但未应用于实际样品的测定。

随着离子色谱(IEC)的发展,尤其是安培检测器的出现,其分析对象已经从水中常见阴、阳离子的检测,发展到极性有机化合物以及生物样品中糖、氨基酸、肽、蛋白质等的分析。高效阴离子交换色谱-积分脉冲安培法(HPAEC-IPAD)是近年来出现的测定糖和氨基酸的直接分析法。该方法无需衍生,操作方便,避免了衍生物不稳定,衍生反应的副产物及试剂本身的干扰等问题;实验不使用有毒的化学试剂和溶剂,有利于环境保护和操作人员的健康。目前已经应用于保健食品<sup>[17]</sup>、烟草<sup>[18]</sup>和液体调味品<sup>[19]</sup>等的分析测定,取得了很好的效果。然而还未见将HPAEC-IPAD应用于检测人体尿液中蝶呤类化合物的报道。

本文在系统地探讨异黄蝶呤色谱分离条件的基础上,对检测波形进行了优化,并将固相萃取(SPE)技术应用于样品前处理,成功地去除了大量干扰物质,建立了HPAEC-IPAD法测定人尿液中异黄蝶呤的分析方法。该方法具有灵敏度高、选择性好、对环境造成的二次污染小等特点,为进一步应用到临床疾病诊断作了方法学的初步探讨。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器、试剂与材料

ICS-2500型离子色谱仪(美国Dionex公司),包括GP50四元梯度泵、LC25色谱柱箱和ED50电化学检测器;安培检测池由金电极、Ag/AgCl(3 mol/L KCl)参比电极和包含池体的钛对电极组成;

色谱数据采集和处理采用Chemleon 6.8色谱工作站;SPE装置(美国Supelco公司);Milli-QS超纯水装置(美国Millipore公司);AP210电子天平(美国Ohaus公司)。

异黄蝶呤标准品(纯度大于97%,美国Sigma公司);NaOH(质量分数为50%,美国Fisher公司);氨基酸标准品(美国Fluka公司);其他试剂均为分析纯;实验用水电阻率为18.2 MΩ·cm。

Supelco ENVI-18 SPE小柱(500 mg/3 mL);Varian Bond Elute-SAX SPE小柱(500 mg/3 mL)。732型阳离子交换树脂(上海争光树脂厂)经碾磨过筛(60~100目),水洗至中性备用。依次用水、2 mol/L NaOH和2 mol/L HCl各浸泡8 h。取3 mL SPE小柱空柱(美国Supelco公司),并用2.0 mL处理好的树脂装柱,上下各垫一个聚乙烯筛板,压紧,无气泡,其上用1.0 mL水浸润,备用。717型阴离子交换树脂(上海争光树脂厂)经碾磨过筛(60~100目),水洗至澄清后依次用水、2 mol/L HCl和2 mol/L NaOH各浸泡8 h。其他处理步骤同上。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 标准溶液的配制

滴加数滴0.1 mol/L的NaOH溶液溶解,用超纯水稀释至刻度,摇匀,配制成100 mg/L异黄蝶呤标准储备液,并置于4℃冰箱内保存,使用时用超纯水稀释至所需浓度。

#### 1.2.2 色谱条件

淋洗液:0.025 mol/L NaOH;流速:0.40 mL/min;进样体积:25 μL;色谱柱:IonPac AG21保护柱(50 mm×2 mm),IonPac AS21分析柱(250 mm×2 mm);柱温:35℃;安培检测器检测波形见表1。

表 1 测定异黄蝶呤的 IPAD 检测器检测波形  
Table 1 Detection waveform of the IPAD detector for the determination of isoxanthopterin

Time/s	Potential (vs. Ag/AgCl)		Integration
	Symbol	Value/V	
0.00	E1	-0.50	
0.04		-0.50	
0.05	E2	-0.45	
0.21		-0.45	start
0.22	E3	0.30	
0.46		0.30	
0.47	E4	-0.45	
0.56		-0.45	end
0.57	E5	-2.00	
0.58		-2.00	
0.59	E6	0.60	
0.60		-0.50	

### 1.2.3 尿液前处理

准确量取 0.5 mL 人尿液,通过 ENVI-18 与 732 阳离子交换柱的串联柱,待尿液基本流出后,用 10 mL 超纯水淋洗,调节流速为 30 滴/min,淋洗液弃去。移去 ENVI-18 柱,用 20 mL 0.1 mol/L NaOH 洗脱 732 阳离子柱,调节流速为 30 滴/min,收集洗脱液于 25 mL 棕色容量瓶中,超纯水定容,取 25  $\mu$ L 进行色谱分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 淋洗液的选择

IEC 分离的机理主要是基于离子交换树脂上可离解的离子与淋洗液中具有相同电荷的溶质离子之间进行的可逆交换,因此淋洗液的浓度直接影响离子交换平衡和离子的保留。本实验选用 IonPac AS21 分析柱,考察了不同浓度的 NaOH 溶液对异黄蝶呤分离效果的影响。结果表明随着 NaOH 浓度逐渐增大,异黄蝶呤保留时间随之缩短。考虑到人体尿液成分复杂,异黄蝶呤出峰时间太早,易存在干扰,故采用 0.025 mol/L NaOH 为淋洗液,在排除共存物干扰的同时,尽可能缩短检测时间。

### 2.2 检测波形的优化

IPAD 法是一种新型的脉冲安培检测法,于 1989 年由 Welch 等<sup>[20]</sup>首先提出,并应用于氨基酸的检测。Clarke 等<sup>[21]</sup>通过对检测波形的优化克服了基线漂移,获得了良好的线性及重现性,并且降低了金工作电极的损耗。新的检测波形由 6 步组成,分为 3 个区,包括吸附/引发区、电流积分区和清洗/活化区,其中 E1 为吸附电位、E2 为引发电位、E3 和 E4 为检测电位、E5 为清洗电位、E6 为活化电位。本文中异黄蝶呤检测波形参照氨基酸检测的六电位脉冲波形<sup>[21]</sup>,对其中影响较大的电位进行优化。将 1 mg/L 的异黄蝶呤标准溶液在选定的色谱条件下进行分析测定,考察了吸附电位 E1、引发电位 E2 和检测电位 E3(如图 1 所示)对检测峰面积的影响。从实验结果可以看出:当 E1 在 -0.9 ~ -0.1 V 变化时,异黄蝶呤峰面积在 -0.5 V 达到最大值;当 E2 在 -0.45 ~ 0.1 V 变化时,异黄蝶呤峰面积逐渐减小;E3 从 0.1 V 增加到 0.3 V,异黄蝶呤峰面积逐渐增大,考虑到金电极氧化的限制,本实验 E3 最终选择 0.3 V。因此本文 E1、E2、E3 最终分别选择为 -0.5、-0.45、0.3 V。

### 2.3 干扰试验

本文分别考察了 1 000 倍于异黄蝶呤质量浓度(1 mg/L)的  $F^-$ 、 $Cl^-$ 、 $NO_2^-$ 、 $NO_3^-$ 、 $SO_4^{2-}$  等无机阴

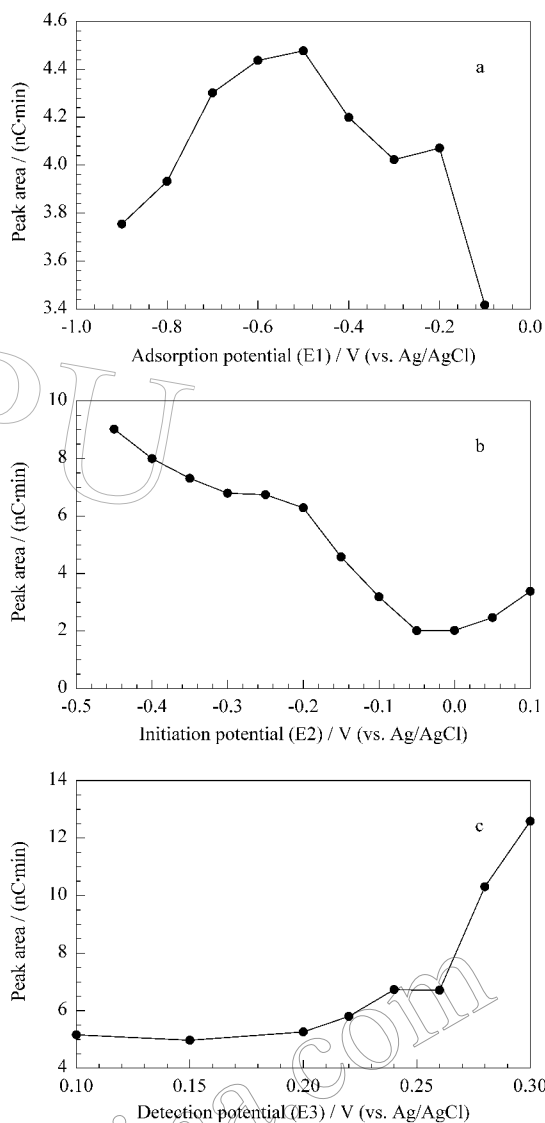


图 1 (a)吸附电位 E1、(b)引发电位 E2、(c)检测电位 E3 对异黄蝶呤峰面积的影响

Fig. 1 Effects of (a) E1, (b) E2 and (c) E3 on the peak area of isoxanthopterin

离子和尿素;100 倍的甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、半胱氨酸、苏氨酸、谷酰胺、天门冬酰胺等氨基酸,葡萄糖、半乳糖等小分子糖,乳酸、苹果酸等小分子酸;以及 10 倍的生物蝶呤、新蝶呤、黄蝶呤、蝶呤-6-羧酸、蝶呤、胆红素等尿液中可能存在的共存物质对异黄蝶呤检测的影响。实验结果显示,在已优化的实验条件下,以上物质对异黄蝶呤的分析没有影响。

### 2.4 样品前处理方法的选择

由于尿液基体复杂,本实验进一步研究采用固相萃取技术除去尿液中未知干扰物。选用 ENVI-18,可以成功地去除尿液中脂肪、蛋白质等有机物,但无法消除尿液中无机物、离子型化合物等对异黄蝶呤检测的影响。因此拟采用 SPE 柱串联的方式

对尿液进行净化处理。实验考察了以下 3 种串联方式的净化效果。

ENVI-18 与 Bond Elut SAX 串联:实验分别采用了 5、8、10、12、15 mL 的二次水淋洗串联柱,结果表明,在异黄蝶呤峰附近有很大的干扰峰出现(如图 2 所示),严重影响了异黄蝶呤的检测。由于异黄蝶呤和干扰物质均不被串联柱保留,无法通过 ENVI-18 与 Bond Elut SAX 串联柱分离,故此串联方式不适用于尿液样品前处理。

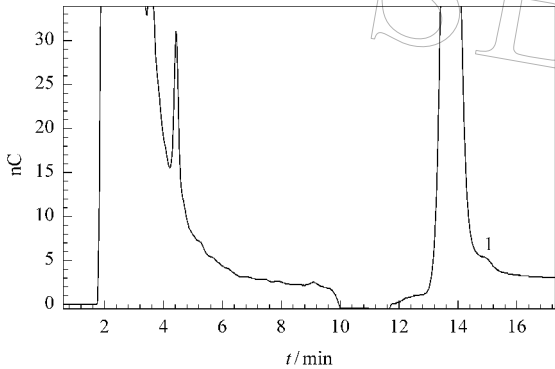


图 2 尿液经 ENVI-18 与 Bond Elut SAX 串联柱净化后的色谱图

Fig. 2 Chromatogram of urine from a human volunteer after cleanup procedure using ENVI-18 and Bond Elut SAX in combination

Eluent: 0.02 mol/L NaOH. Flow rate: 0.40 mL/min. Column temperature: 35 °C. Volume injected: 25  $\mu$ L. Detection: IPAD conditions as in Table 1.

1. isoxanthopterin.

ENVI-18 与 717 阴离子交换柱串联:实验分别采用了 0.01 mol/L HCl、0.05 mol/L HCl、0.01 mol/L NaOH、0.05 mol/L NaOH、0.1 mol/L NaOH、0.05 mol/L  $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$  等洗脱 717 阴离子交换柱,结果显示,干扰物质得到了很好的去除,但由于 717 阴离子交换柱对异黄蝶呤的保留能力较强,异黄蝶呤的回收率均小于 20%。

ENVI-18 与 732 阳离子交换柱串联:考察了不同洗脱剂对异黄蝶呤回收率的影响(见表 2)。结果表明,选用 0.10 mol/L NaOH 洗脱,在不影响异黄蝶呤检测的同时,洗脱效果最好。因此,实验选用 ENVI-18 与 732 阳离子交换柱串联的方式对尿液进行前处理。其尿液的分离色谱图如图 3 所示。

表 2 不同洗脱剂对异黄蝶呤加标(2 mg/L)回收率的影响( $n=5$ )

Table 2 Recoveries of urine samples spiked with 2 mg/L isoxanthopterin using various eluents ( $n=5$ )

Eluent	Recovery <sup>*</sup> /%
0.01 mol/L HCl	65.2 $\pm$ 3.9
0.03 mol/L HCl	77.2 $\pm$ 6.0
0.05 mol/L $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$	67.9 $\pm$ 5.5
0.05 mol/L NaOH	71.0 $\pm$ 4.8
0.10 mol/L NaOH	98.0 $\pm$ 4.3

\* Data are shown as mean  $\pm$  standard deviation ( $n=5$ ).

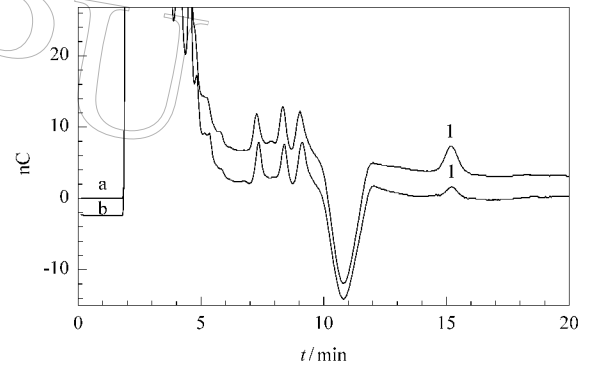


图 3 尿液经 ENVI-18 与 732 阳离子交换柱串联净化后的色谱图

Fig. 3 Chromatogram of urine from a human volunteer after cleanup procedure using ENVI-18 column and 732 cation-exchange column in combination

a. urine sample spiked with 2 mg/L isoxanthopterin standard solution; b. blank urine sample. The experimental conditions as in Fig. 2.

1. isoxanthopterin.

## 2.5 线性方程、线性范围及检出限

取适量的异黄蝶呤标准贮备液,分别稀释成 0.005、0.01、0.02、0.04、0.08、0.1、0.2 mg/L 的标准工作溶液,按选定的色谱条件进行分析,以峰面积对浓度作图。结果表明,峰面积( $A$ )与质量浓度( $C$ , mg/L)呈良好的线性关系,线性方程为  $A = 11.241C + 0.0519$ ,相关系数为 0.998 4,线性范围为 0.005 ~ 0.200 mg/L。根据信噪比( $S/N$ )为 3 计算,异黄蝶呤的检出限为 0.003 mg/L。

## 2.6 回收率与精密度试验

为验证方法的可行性,选取健康人和癌症病人尿液进行加标回收试验。样品经 1.2.3 节所述方法净化处理进行检测,计算异黄蝶呤在不同添加水平的回收率。实验结果(见表 3)显示,异黄蝶呤在健

表 3 健康人及癌症病人尿液加标回收结果和相对标准偏差( $n=6$ )

Table 3 Recoveries and relative standard deviations (RSDs) of isoxanthopterin determination in urine samples ( $n=6$ )

Urine sample	Background/(mg/L)	Added/(mg/L)	Found/(mg/L)	Recovery/%	RSD/%
Healthy persons	0.765	2.00	2.70	96.8	4.40
		5.00	5.55	95.7	3.83
Cancer patients	0.990	2.00	2.91	96.0	3.24
		5.00	5.76	95.4	2.46

康人及癌症病人尿液中两个添加水平的平均回收率在 95.4% ~ 96.8% 之间, 相对标准偏差小于 5%, 表明本方法测定结果准确可靠, 可用于实际尿液中异黄蝶呤的检测。

## 2.7 样品测定

应用所建立的分析方法, 对 10 个健康人尿液(由南昌大学志愿者提供)以及 10 个癌症病人尿液(由江西省肿瘤医院提供)进行分析。图 4 为 9 号尿液的色谱图。实验结果(见表 4)显示, 健康人尿液中异黄蝶呤含量在  $(0.228 \pm 0.012) \sim (0.738 \pm 0.046)$  mg/L 之间, 平均含量为 0.468 mg/L; 癌症病人尿液中异黄蝶呤浓度范围为  $(0.552 \pm 0.048) \sim (1.587 \pm 0.087)$  mg/L, 平均值为 0.951 mg/L。结果表明, 虽然健康人及癌症病人尿液中异黄蝶呤浓度范围有所重叠, 但癌症病人尿液中异黄蝶呤的平均含量大于健康人尿液中异黄蝶呤的平均含量。

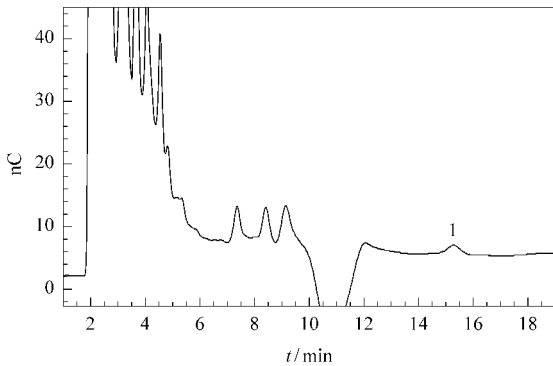


图 4 实际尿液(9号)的色谱图

Fig. 4 Chromatogram of urine from a human volunteer (No. 9).

The experimental conditions as in Fig. 2.

1. isoxanthopterin.

表 4 健康人及癌症病人尿液中异黄蝶呤分析结果( $n=5$ )

Table 4 Analysis of isoxanthopterin in human urine from healthy persons and cancer patients ( $n=5$ )

Sample No.	Isoxanthopterin/(mg/L)	Sample No.	Isoxanthopterin/(mg/L)
1	$0.286 \pm 0.034$	11	$0.765 \pm 0.067$
2	$0.361 \pm 0.043$	12	$1.132 \pm 0.063$
3	$0.374 \pm 0.046$	13	$1.295 \pm 0.035$
4	$0.483 \pm 0.140$	14	$1.587 \pm 0.087$
5	$0.228 \pm 0.012$	15	$1.224 \pm 0.098$
6	$0.668 \pm 0.078$	16	$0.637 \pm 0.035$
7	$0.681 \pm 0.049$	17	$0.552 \pm 0.048$
8	$0.588 \pm 0.039$	18	$0.569 \pm 0.047$
9	$0.738 \pm 0.046$	19	$0.839 \pm 0.053$
10	$0.270 \pm 0.015$	20	$0.912 \pm 0.061$

Data are shown as mean  $\pm$  standard deviation ( $n=5$ ).

Note: Samples 1 - 10 are healthy persons' urine samples; Samples 11 - 20 are cancer patients' urine samples.

## 3 结语

本文建立了 SPE-HPACE-IPAD 法测定人体尿液中异黄蝶呤的分析方法, 系统考察了 IPAD 检测器各电位对异黄蝶呤测定结果的影响, 并对色谱条件进行了优化, 使得异黄蝶呤具有较高的检测灵敏度。应用 SPE 技术对尿液进行净化处理, 除去了大量干扰物质, 结果令人满意。实验发现癌症病人尿液中异黄蝶呤含量和健康人相比存在差异, 这为今后深入研究异黄蝶呤和某些癌症的关联打下了一定基础。

## 参考文献:

- [1] Han F T, Huynh B H, Shi H L, et al. *Anal Chem*, 1999, 71(7): 1265
- [2] Hamerlinck F F V. *Exp Dermatol*, 1999, 8(3): 167
- [3] Jin X M. *Section of Immunology Foreign Medical Sciences* (金晓明. 国外医学免疫学分册), 1999, 22(6): 342
- [4] Melichar B, Solichova D, Freedman R S. *Intl J Gynecol Cancer*, 2006, 16(1): 240
- [5] Wirleitner B, Schroeks-nadel K, Winkler C, et al. *Mol Immunol*, 2005, 42(2): 183
- [6] Cao K Y, Wang M, Gao Y, et al. *J Infection*, 2006, 53(3): 152
- [7] Svoboda P, Ko S H, Cho B, et al. *Anal Biochem*, 2008, 383(2): 236
- [8] Zhang M J, Ding S J, Yi G. *Chinese Journal of Chromatography* (张名均, 丁世家, 易钢. 色谱), 2004, 22(4): 416
- [9] Wan Y Q, Tan T, Guo L. *Chinese Journal of Analysis Laboratory* (万益群, 谭婷, 郭岚. 分析实验室), 2007, 26(5): 8
- [10] Blau N, Erlandsen H. *Mol Genet Metab*, 2004, 82(2): 101
- [11] Vásquez-Vivar J. *Free Radical Bio Med*, 2009, 47(8): 1108
- [12] Blair J A. *Bio J*, 1958, 68: 385
- [13] Woolf J H, Nichol C A, Duch D S. *J Chromatogr*, 1983, 274: 398
- [14] Espinosa-Mansilla A, Durán-Merás I, Salinas F. *Chromatographia*, 2001, 53(9/10): 510
- [15] Durán-Merás I, Espinosa-Mansilla A, Rodríguez M J. *Anal Biochem*, 2005, 346(2): 201
- [16] Espinosa-Mansilla A, Durán-Merás I, Salinas F. *J Pharmaceut Biomed*, 1998, 17(8): 1325
- [17] Zhang S W, Zheng B, Zou X L, et al. *Chinese Journal of Chromatography* (张思维, 郑波, 邹晓丽, 等. 色谱), 2009, 27(1): 117
- [18] Pan Y Y, Cai Y Q, Mou S F, et al. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* (潘媛媛, 蔡亚岐, 牟世芬, 等. 分析化学), 2007, 35(12): 1761
- [19] Yu H, Ding Y S, Mou S F, et al. *J Chromatogr A*, 2002, 966(1/2): 89
- [20] Welch L E, LaCourse W R, Johnson D C, et al. *Anal Chem*, 1989, 61(6): 555
- [21] Clarke A P, Jandik P, Rocklin R D, et al. *Anal Chem*, 1999, 71(14): 2774