

毛细管电泳-电致化学发光法测定人尿中脯氨酸和羟脯氨酸

薛 静 梁 恒* 李 甜 武亚艳

(西安交通大学生物医学信息工程教育部重点实验室,分离科学研究所,西安 710049)

摘 要 采用毛细管电泳-联吡啶钉电致化学发光法检测了人尿中的脯氨酸和羟脯氨酸。讨论了联吡啶钉浓度、检测电位、磷酸盐缓冲液浓度和 pH 值、进样电压和进样时间等实验条件对脯氨酸和羟脯氨酸分离检测的影响。在优化实验条件下,脯氨酸和羟脯氨酸分别在 0.008 ~ 2 和 0.01 ~ 2 mmol/L 范围内呈良好线性(相关系数 0.997);检出限浓度分别为 2 和 4 $\mu\text{mol/L}$ 。测定了人尿中游离脯氨酸和羟脯氨酸以及两者总浓度,回收率 96.4% ~ 99.7%。

关键词 脯氨酸,羟脯氨酸,毛细管电泳,电致化学发光,联吡啶钉

1 引 言

胶原蛋白中常含有丰富的脯氨酸(Pro)和羟脯氨酸(Hyp),其中 Hyp 几乎为胶原蛋白所特有。在胶原蛋白代谢中,Pro 通过羟基化形成 Hyp,胶原蛋白降解释放的 Hyp 从尿中排泄^[1]。尿 Hyp 已作为人体胶原蛋白代谢的生化指标。人体液 Pro 和 Hyp 含量变化与多种疾病有关,如骨病^[2]、癌症^[3]和慢性尿毒症^[4]等,因而同时检测尿 Pro 和 Hyp 具有重要的临床诊断价值。尿 Pro 和 Hyp 以游离态和结合态两种形式存在,可直接测定尿中游离 Pro 和 Hyp。通过样品处理、水解尿蛋白后,还可测定尿中游离态和水解的 Pro 和 Hyp(简称为总 Pro 和 Hyp),这有助于为全面诊断病情提供参考。传统检测 Pro 和 Hyp 的方法有气相色谱法(GC)^[5]和液相色谱法(HPLC)^[6],但存在耗时、成本高和色谱柱易污染等缺点。

毛细管电泳(CE)分离-联吡啶钉 $[\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}]$ 电致化学发光(ECL)检测是近年来发展的一种新方法(简称 CE-ECL)。Harvey 在 1929 年首次成功地观察到了碱性水溶液中鲁米诺的 ECL,但直到 1987 年才发现 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -烷基胺的 ECL 强度与胺的结构有关,并开始用于分析化学^[7];1997 年 Sweedler 等^[8]最早把 CE 与 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ -ECL 结合检测了 β -受体阻断剂。近年,Liu 等^[9,10]在 CE-ECL 接口、整体仪器开发和应用方面做许多创新性工作。该法不仅具有 CE 的快速高效分离、样品用量少等特点,又发挥了 ECL 高选择性、高灵敏的优点,已成功应用于一些胺类药物^[8-10]和氨基酸^[11,12]等生化物质的检测。

本实验通过优化 ECL 检测和 CE 分离条件,建立了 CE-ECL 分离检测人尿中游离和总 Pro 与 Hyp 的新方法。人尿中 Pro 和 Hyp 的 CE-ECL 方法的检出限 4 $\mu\text{mol/L}$ 和线性范围 0.01 ~ 2 mmol/L,明显优于 GC^[5]和 HPLC^[1,6]文献方法。人尿检测回收率为 96.4% ~ 99.7%。实验表明:其它多种氨基酸对该方法无干扰,这证明了 CE 分离的高效性和 ECL 检测的灵敏性。

2 实验部分

2.1 仪器与操作

MPI-A 型多参数化学分析测试系统(西安瑞迈电子科技有限公司)。CE 高压电源 0 ~ 25 kV,未涂层石英毛细管(25 μm i. d.、350 μm o. d.、50 cm)(河北永年光导纤维厂),每次使用前用 0.1 mol/L NaOH 冲洗毛细管 20 min,去离子水冲洗 10 min,10 mmol/L 磷酸盐缓冲液冲洗 10 min。溶液进入毛细管前须用 0.22 μm 醋酸纤维素膜过滤,采用 10 kV \times 10 s 电驱动进样,分离电压 20 kV。电化学检测采用三电极系统:工作电极为直径 500 μm 铂盘电极,参比电极为 Ag/AgCl 电极,辅助电极为铂电极(电极均为本实验室自制);使用前铂盘电极用 0.3 μm Al_2O_3 粉末抛光,用水洗净后在显微镜下将其放置在正

对毛细管出口末端处,调节两者距离约 75 μm 。ECL 反应在约 400 μL 的 ECL 池中进行,其结构与文献 [9] 中设计的相同。实验前 ECL 池中充满 5 mmol/L $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 和 50 mmol/L 磷酸盐缓冲液 350 μL ,每实验 3 h 更换新鲜 ECL 溶液,每两星期取出工作电极用 0.3 μm Al_2O_3 粉末重新抛光,以保持实验重复性;光电倍增管的电压设置为 +800V。用 PHS-25 型酸度计(上海虹益仪器厂)测定磷酸盐缓冲液 pH 值。

2.2 试剂

联吡啶钌纯品(美国 Aldrich 公司);色谱纯乙腈(美国 Tedia 公司);L-脯氨酸、L-羟脯氨酸、L-甘氨酸、L-精氨酸、L-蛋氨酸、L-苯丙氨酸、L-缬氨酸、L-色氨酸、L-组氨酸均为生化纯(中国医药集团上海化学试剂公司),磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、三氯乙酸和盐酸等试剂为分析纯(西安化学试剂厂)。L-脯氨酸、L-羟脯氨酸标准品分别用二次蒸馏水溶解,浓度为 10 mmol/L,用 0.22 μm 醋酸纤维素膜过滤, -20 $^{\circ}\text{C}$ 储存备用。

2.3 实验方法

(1)测定人尿中游离 Pro 和 Hyp:取人新鲜尿样 500 μL 于 1.5 mL 离心管中,加入 500 μL 浓度 1 g/mL 三氯乙酸充分震荡 5 min,使尿蛋白沉淀,再 10,000 r/min 离心 10 min,取上清液过滤膜后直接测定。(2)测定人尿中总 Pro 和 Hyp:取 1 mL 人新鲜尿样于 5 mL 刻度试管中,加入 1 mL 浓 HCl 后在 150 $^{\circ}\text{C}$ 下水解 1 h,冷却后用 4 mol/L NaOH 溶液调至中性。水解液在 3000 r/min 下离心 5 min,取上清液,并置于 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中氮气吹干。残余物用 1 mL 水溶解,过滤膜后直接测定。

3 结果与讨论

3.1 优化 ECL 检测

ECL 检测池中的 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 浓度和磷酸盐缓冲液的浓度对 ECL 强度有很大的影响。实验证明,当 $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 浓度为 5 mmol/L,磷酸盐缓冲液为 50 mmol/L 时,Pro 和 Hyp 有满意的 ECL 强度和最大信噪比。施加在工作电极上的检测电位是影响 ECL 强度的一个重要因素。检测电位在 1.05 ~ 1.35 V (vs. Ag/AgCl) 范围内变化,相应 Pro 和 Hyp 的 ECL 强度如图 1 所示,可见在 1.18 V 左右,Pro 和 Hyp 的 ECL 强度都接近或者达到最大值。综合考虑,选择 1.18 V 为测定 Pro 和 Hyp 的最佳检测电位。

当缓冲液 pH 在 4.5 ~ 9.5 范围内变化时,Pro 和 Hyp 的 ECL 强度也随之显著变化,如图 2 所示。在 pH 7.0 时,Pro 和 Hyp 的 ECL 强度都达到了最高峰,之后随着 pH 升高,ECL 强度快速下降。因此,选择 ECL 池中缓冲溶液 pH 为 7.0。

3.2 优化分离条件

在 CE-ECL 体系中,在毛细管内壁状况、尺寸和进样方式等条件确定时,分离缓冲液的 pH 和浓度是影响 CE 分离的主要因素。经在 pH 4.5 ~ 9.5 范围内考察分离缓冲液 pH 对 Pro 和 Hyp 分离的影响,发现当 pH 小于 8.0 时,Pro 和 Hyp 完全没有分开,谱图上只出现一个电泳峰。当 pH 为 8.0 时,Pro 和 Hyp 开始分离,但分离度(R_s)仅为 1.0,尚未完全分开。当 pH 值达到 8.5, R_s 为 1.5,Pro 和 Hyp 已达到基线分离。随着 pH 值继续增大, R_s 也随之增大。但与此同时 Hyp 的 ECL 强度也明显下降,Pro 的 ECL 强度也有所降低。在 pH 9.0 时,Hyp 的 ECL 强度降到仅为 pH 8.5 时的一半左右,这可能是由于 ECL 反应发生在工作电极周围,当从毛细管流出的溶液和 ECL 池中的缓冲液 pH 值不一致时,会引起工作电极周围的局部区域溶液 pH 值明显变化,使电致化学发光反应不在最佳的 pH 值发生,从而造成 ECL 强度降低。为兼顾 ECL 强度和 R_s 2 个因素,本实验选择 pH 8.5 的分离缓冲液。除分离缓冲液 pH 值外,分离缓冲液浓度对 ECL 强度也有相似的影响。分离缓冲液浓度在 10 ~ 30 mmol/L 范围内,随着浓度增大, R_s 也增大,同时 ECL 强度明显降低。综合考虑,最适分离缓冲液浓度为 10 mmol/L。

一般而言,采用电驱动进样时,在相对过载进样量附近,较小的进样时间和进样电压会有较高的柱效和 R_s ,但 ECL 强度会有所下降。当进样时间在 2 ~ 10s 内增加,或者进样电压在 2 ~ 10 kV 内增加时, R_s 稍有下降,而 ECL 强度则近乎线性增加。因此,实验选择进样条件为 10 kV \times 10 s。

因 Pro 和 Hyp 的淌度相近,实验在分离缓冲液中加入乙腈以改善分离效果。结果表明,乙腈的加入显著地增加了 Pro 和 Hyp 电泳淌度的差异,提高了 CE 分离 Pro 和 Hyp 两组分的 R_s ,但分离时间延长,

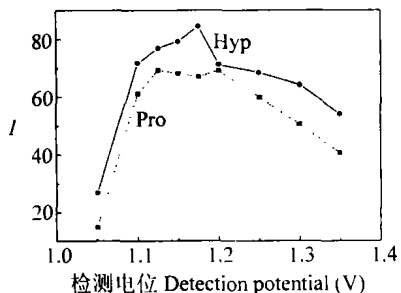


图1 检测电位对电致化学发光强度的影响

Fig. 1 The effect of detection potential on electrochemiluminescence (ECL) intensity

样品(sample): 0.2 mmol/L 脯氨酸和羟脯氨酸(proline (Pro) and hydroxyproline (Hyp));电驱动进样(electrokinetic injection): 10 kV × 10 s;分离缓冲液(separation buffer): 10 mmol/L pH 8.5 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer);分离电压(separation voltage): 20 kV;检测池中(in ECL cell): 5 mmol/L Ru(bpy)₃²⁺, 50 mmol/L pH 7.0 磷酸盐缓冲液(phosphate buffer)。

并造成 ECL 强度有所降低(见图 3)。另外,实验发现,乙腈的体积分数过大会使峰形发生改变。本实验选择乙腈体积分数为 10%。

3.3 线性范围、精密度和检出限

在优化的分离和检测条件下,Pro 和 Hyp 的 CE-ECL 线性范围、相关系数和检出限($S/N=3$)分别为:Pro 0.008 ~ 2 mmol/L, 0.997, 2 μmol/L; Hyp, 0.01 ~ 2 mmol/L, 0.998, 4 μmol/L。对 0.2 mmol/L 的 Pro 和 Hyp 的标准混合液连续 9 次测定,峰高的 RSD 为 3.6%,迁移时间 RSD 为 2.1%。

3.4 干扰实验

研究人尿中常见的共存氨基酸的干扰情况,结果表明:对于 0.2 mmol/L 的 Pro 和 Hyp 标准混合液,基于电致化学发光检测的高选择性,100 倍的 L-甘氨酸、L-色氨酸在本实验条件下无响应,故不会造成干扰。基于毛细管电泳的高效分离特点,L-精氨酸、L-组氨酸的出峰时间与 Pro 和 Hyp 的出峰时间相差较大,因而,10 倍的 L-蛋氨酸,5 倍的 L-缬氨酸和 5 倍 L-苯丙氨酸不干扰本测定。由于人尿中这些物质的含量均低于允许量,因此上述多种氨基酸不干扰 Pro 和 Hyp 的测定。

3.5 样品测定

人尿样经 2.3 节所述方法处理后进行测定,得到 CE-ECL 谱图(如图 4)。样品测定后在其中添加适量 Pro 和 Hyp 的标准液进行回收实验。样品的回收率在 96.4% ~ 99.7%,令人满意。检测结果见表 1。

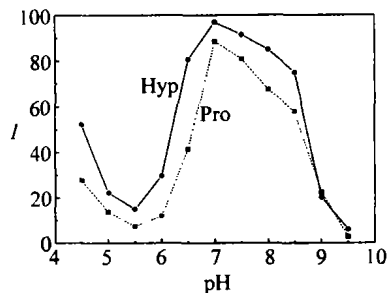


图2 检测池中磷酸盐缓冲液 pH 对电致化学发光强度的影响

Fig. 2 The effect of pH of the phosphate buffer in ECL cell on ECL intensity

检测电位(detection potential): 1.18 V;其余条件同图 1 (other conditions as in Fig. 1)。

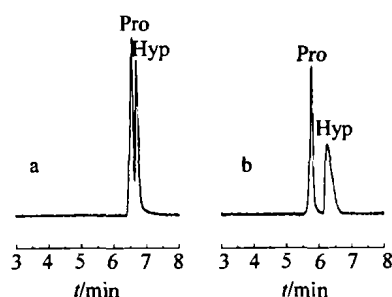


图3 脯氨酸和羟脯氨酸标准混合液的 CE-ECL 图

Fig. 3 Electropherograms of the solution mixed with standard proline (Pro) and hydroxyproline (Hyp)

乙腈体积分数(volume fraction of acetonitrile): a. 0; b. 10%。分离缓冲液(separation buffer) pH 8.5; ECL 缓冲液(ECL buffer) pH 7.0。其余条件同图 2 (other conditions as in Fig. 2)。

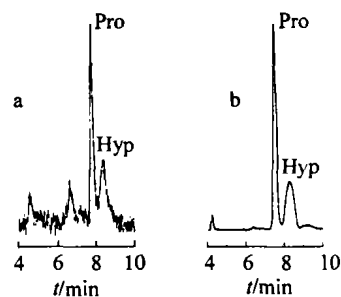


图4 人尿中脯氨酸和羟脯氨酸的 CE-ECL 图

Fig. 4 Electropherograms of Pro and Hyp in human urine

a. 游离脯氨酸和羟脯氨酸(free Pro and Hyp); b. 总脯氨酸和羟脯氨酸(total Pro and Hyp)。实验条件同图 3b (conditions as in Fig. 3b)。

表1 尿样的检测结果和回收率($n=5$)Table 1 Determination results and recovery rates of the urine samples ($n=5$)

分析物 Analyte	样品浓度 Sample concentration (mmol/L)	加入浓度 Added ($\mu\text{mol/L}$)	回收率 Recovery (%)	分析物 Analyte	样品浓度 Sample concentration (mmol/L)	加入浓度 Added ($\mu\text{mol/L}$)	回收率 Recovery (%)
尿(游离) Urine(free)	Pro 13.7	10	97.2	尿(总) Urine(total)	Pro 552	500	96.4
	Hyp 26.0	20	99.7		Hyp 205	200	98.5

References

- Inoue H, Kohashi K, Tsuruta T. *Anal. Chim. Acta*, **1998**, 365: 219 ~ 226
- Nishino H, Tanaka T, Shiroishi K, Sato S, Naruse Y, Kagamimori S. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **1991**, 47: 609 ~ 616
- Niell H B, Neely C L, Palmieri G M, McDonald M W. *Cancer*, **1983**, 52: 1442 ~ 1446
- Dubovský J, Dubovská E, Pacovský V, Hrba J. *Clin. Chim. Acta*, **1968**, 19: 387 ~ 390
- Kataoka H, Nabeshima N, Nagao K, Makita M. *Clin. Chim. Acta*, **1993**, 214: 13 ~ 20
- Inoue H, Iguchi H, Kono A, Tsuruta Y. *J. Chromatogr. B*, **1999**, 724: 221 ~ 230
- Chen Xi(陈曦), Wang Xiaoru(王小如), Huang Benli(黄本立). *Chinese J. Anal. Chem.* (分析化学), **1998**, 26(6): 770 ~ 778
- Forbes G A, Nieman T A, Sweedler J V. *Anal. Chim. Acta*, **1997**, 347: 289 ~ 293
- Liu J F, Cao W D, Qiu H B, Sun X H, Yang X R, Wang E K. *Clin. Chem.*, **2002**, 48: 1049 ~ 1058
- Liu J F, Yang X R, Wang E K. *Electrophoresis*, **2003**, 24: 3131 ~ 3138
- Wang X, Bobbitt D R. *Anal. Chim. Acta*, **1999**, 383: 213 ~ 22
- Chiang M T, Whang C W. *J. Chromatogr. A*, **2001**, 934: 59 ~ 66

Determination of Proline and Hydroxyproline in Human Urine with Capillary Electrophoresis-Electrochemiluminescence

Xue Jing, Liang Heng*, Li Tian, Wu Yayan

(Key Laboratory of Biomedical Information Engineering of Ministry of Education, Separation Science Institute, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049)

Abstract A method of capillary electrophoresis (CE) with tris (2,2'-bipyridyl) ruthenium (II) electrochemiluminescence (ECL) detection has been applied to the simultaneous determination of proline (Pro) and hydroxyproline (Hyp) in human urine. Under optimized conditions, such as detection potential at 1.18 V, electrokinetic injection at 10 kV for 10 s, separation voltage at 20 kV, 10 mmol/L separation buffer with pH 8.5, 5 mmol/L $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ and 50 mmol/L phosphate buffer with pH 7.0 in the ECL cell, the linear ranges were 0.008 ~ 2 mmol/L for Pro with a correlation coefficient of 0.997, and 0.01 ~ 2 mmol/L for Hyp with a correlation coefficient of 0.998. Detection limits for Pro and Hyp were 2 and 4 $\mu\text{mol/L}$ respectively. When the method was applied to determine free and total Pro and Hyp in human urine, the recoveries were between 96.4% and 99.7%, respectively.

Keywords Proline, hydroxyproline, capillary electrophoresis, electrochemiluminescence, tris (2,2'-bipyridyl) ruthenium (II)

(Received 11 May 2004; accepted 21 September 2004)