

## 高效液相色谱法同时测定血清中的犬尿氨酸和色氨酸

王 瑞, 唐爱国

(中南大学湘雅二医院检验科, 湖南 长沙 410011)

**摘要** :建立了一种能同时检测血清中的犬尿氨酸(kynurenine, Kyn)和色氨酸(tryptophan, Trp)的高效液相色谱-紫外检测法。采用的色谱柱为Symmetry Shield RP-C18柱(150 mm × 3.9 mm i. d., 5 μm),流动相为15 mmol/L乙酸钠-乙酸溶液(含2.7%乙腈, pH 3.6),流速为1.0 mL/min,紫外检测波长为225 nm。血清标本经5.0%(体积分数)高氯酸溶液去除蛋白质后取上清液直接进样分析测定。研究结果表明, Kyn保留时间为3.5 min,线性范围为0.098 ~ 49 μmol/L,最低检出浓度为0.02 μmol/L,回收率为90.82% ~ 93.45%; Trp保留时间为8.1 min,线性范围为4.9 ~ 490 μmol/L,最低检出浓度为0.20 μmol/L,回收率为95.51% ~ 98.67%。Kyn和Trp日内、日间测定的相对标准偏差均小于4%,苯丙氨酸、酪氨酸、5-羟色胺和犬尿喹啉酸等物质对该法均无干扰。该方法简便、快速、稳定、可行,可应用于临床和科研工作。

**关键词** :高效液相色谱法;紫外检测;色氨酸;犬尿氨酸;血清

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2006)02-0140-04 栏目类别 :研究论文

## Simultaneous Determination of Kynurenine and Tryptophan in Serum by High Performance Liquid Chromatography

WANG Rui, TANG Aiguo

(Department of Clinical Laboratory, the Second Xiangya Hospital,  
Central South University, Changsha 410011, China)

**Abstract** : A method was established for the simultaneous determination of kynurenine (Kyn) and tryptophan (Trp) in serum by high performance liquid chromatography-ultraviolet detection (HPLC-UV). It employed a Symmetry Shield RP-C18 column (150 mm × 3.9 mm i. d., 5 μm) and a mobile phase of 15 mmol/L sodium acetate-acetic acid solution containing 2.7% (v/v) acetonitrile (pH 3.6) at a flow rate of 1.0 mL/min. The ultraviolet detector was operated at 225 nm. Serum samples were first precipitated with a 5.0% perchloric acid solution, then centrifuged to remove protein residue and finally analyzed by HPLC. The retention time of Kyn was 3.5 min, the linear range of the method was from 0.098 to 49 μmol/L, and the detection limit was 0.02 μmol/L. The recoveries of Kyn were from 90.82% to 93.45%, the intraday and interday variations were 2.37% and 3.66%, respectively. The retention time of Trp was 8.1 min, the linear range of the method was from 4.9 to 490 μmol/L, and the detection limit was 0.20 μmol/L. The recoveries of Trp were from 95.51% to 98.67%, the intraday and interday variations were 1.50% and 2.65%, respectively. The method is simple, fast, accurate, and suitable for routine analysis.

**Key words** : high performance liquid chromatography (HPLC); ultraviolet detection (UV); tryptophan; kynurenine; serum

色氨酸(tryptophan, Trp)是人体必需氨基酸之一,除了能在人体内合成蛋白质外,还可在肝、肾、脑等组织中代谢为多种生物活性分子。在哺乳动物中,摄入的Trp绝大多数经犬尿氨酸代谢途径代谢,即Trp在吲哚胺-2,3-双加氧酶(indoleamine-2,3-

dioxygenase, IDO)的催化下合成重要的中间代谢产物犬尿氨酸(kynurenine, Kyn)。当机体处于细胞免疫激活状态时,T细胞释放的γ-干扰素可活化多种细胞中的IDO。研究表明,Kyn、Trp与肾脏疾病、神经精神疾病、异常妊娠等<sup>[1-3]</sup>的发生发展密切

收稿日期 2005-04-30

第一作者:王 瑞,女,硕士研究生,E-mail:wangrui19791121@163.com.

通讯联系人:唐爱国,男,教授,硕士生导师,Tel(0731)5550258,E-mail:aiguotang@yahoo.com.cn.

基金项目:湖南省医药卫生科研计划课题(C2005019)和湖南省科技计划项目课题(05sk3026).

相关, Kyn 与 Trp 在血清中的含量之比是反映人体内免疫状态的敏感指标。因此, 定量分析血清中的 Kyn 和 Trp 可为相关疾患的诊断治疗和基础研究提供重要依据。

目前, 国内外科研人员主要应用高效液相色谱法检测 Kyn 和 Trp。由于 Kyn 本身不能产生荧光, 高效液相色谱-荧光检测法( HPLC-FLD )一般采用柱后衍生法<sup>[4]</sup>, 操作较为复杂, 应用较少。国外用 HPLC 同时测定血清中的 Kyn 和 Trp 需荧光和紫外检测器联合应用<sup>[5]</sup>, 操作较复杂, 实验室条件要求较高。国内易咏红等<sup>[6]</sup>报道用高效液相色谱-紫外检测法( HPLC-UV )同时检测血清中的 Kyn 和 Trp, 但该方法灵敏度较低, 在 Trp 负荷试验时才能检测到 Kyn, 因而无法测定正常人血清中的 Kyn 含量。陈凤英等<sup>[7]</sup>建立的 HPLC-UV 法可测定孕妇体内升高的 Kyn 含量, 但未同时测定 Trp, 也未见测定正常人血清中 Kyn 的报道。本研究在参考国内外相关研究的基础上建立了同时测定血清中 Kyn 和 Trp 的高效液相色谱-紫外检测法, 方法灵敏度高, 可用于测定正常人血清中 Kyn 的含量。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

仪器: Waters PC800 型高效液相色谱仪, 包括 510 色谱泵、486 紫外检测器、PC800 数据处理系统; Rheodyne 7725 手动进样器(带 20  $\mu\text{L}$  进样环)。0.45  $\mu\text{m}$  滤膜及其抽滤器( Millipore 公司), Milli-Q 纯水器( Millipore 公司), DU Series 600 紫外-可见分光仪(美国 Beckman 公司); TGLL-18 台式高速冷冻离心机(江苏太仓医疗器械厂)。

试剂: Kyn、Trp、5-羟色胺( 5-HT )、犬尿喹啉酸( KYNA )、苯丙氨酸( Phe )、酪氨酸( Tyr )和肌酐( Cr )均购自 Sigma 公司; 乙腈、甲醇均为色谱纯(美国 Tedia 公司); 磷酸二氢钾、乙酸钠、乙酸等均为国产分析纯, 高氯酸为国产优级纯。配制试剂用水均为 Milli-Q 纯水器处理的超纯水。

### 1.2 色谱条件

色谱柱: Symmetry Shield RP-C18 柱( 150 mm  $\times$  3.9 mm i. d., 5  $\mu\text{m}$ , Waters 公司); 流动相: 15 mmol/L 乙酸钠-乙酸溶液(含体积分数(下同)为 2.7% 的乙腈, pH 3.6); 流速: 1.0 mL/min; 紫外检测波长 225 nm, 进样量 20  $\mu\text{L}$ , 室温下测定。

### 1.3 试剂的配制

#### 1.3.1 应用试剂的配制

蛋白质沉淀剂: 用超纯水分别配制体积分数为 5.0% 的高氯酸溶液。

流动相: 准确吸取冰乙酸溶液、乙腈溶液, 称取乙酸钠晶体加水制成 15 mmol/L 乙酸钠-乙酸溶液(含 2.7% 乙腈), 再用 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤, 使用前超声脱气 30 min。

干扰样品溶液: 用体积分数为 2.5% 的高氯酸溶液分别配制一定浓度的 Phe, Tyr, 5-HT, KYNA 和 Cr 的标准溶液。

#### 1.3.2 标准溶液的配制

准确称取 Kyn 10.8 mg、Trp 10.0 mg, 分别用体积分数为 2.5% 的高氯酸溶液溶解并稀释至 10.0 mL, 混匀, 制成 1.960 mmol/L Kyn 标准储备液和 4.900 mmol/L Trp 标准储备液, 分装后置于  $-30^{\circ}\text{C}$  冰箱中备用。使用前分别取两种标准储备液加超纯水配成混合标准工作液(含 Kyn 1.96  $\mu\text{mol/L}$ , Trp 24.5  $\mu\text{mol/L}$ )。

#### 1.4 样品的收集与处理

血清样品的收集: 取研究对象空腹(上午 8 ~ 9 时)静脉血 2 mL, 置于洁净的促凝管内, 采血后 30 min 内于常温下以 3 000 r/min 的速率分离血清(若不能及时测定则需置于  $-30^{\circ}\text{C}$  冰箱内保存)。

血清标本的预处理: 取 1 份血清于塑料离心管内, 加入等体积的 5.0% 高氯酸溶液, 加盖后于旋涡混匀器上混匀 0.5 ~ 1 min, 室温下放置 10 ~ 15 min 以充分沉淀血清中的蛋白质, 然后以 10 000 r/min 的速率离心 10 min, 取上清液 20  $\mu\text{L}$  进样分析。

混合血清的制备: 随机选取 5 名研究对象的血清, 置于一大试管中混匀, 分装后于  $-30^{\circ}\text{C}$  冰箱中保存, 用于精密度和回收率的测定。

#### 1.5 犬尿氨酸、色氨酸的定性和定量分析

Kyn、Trp 均采用峰保留值比较法和叠加法进行定性分析, 用外标法测定峰面积进行定量分析, 数据处理均由 PC800 色谱工作站完成。本实验所有定量结果均用平均值  $\pm$  标准差( mean  $\pm$  SD )表示。

血清中 Kyn 的浓度(  $\mu\text{mol/L}$  ) =

$$\frac{\text{血清中 Kyn 的峰面积}}{\text{标准液中 Kyn 的峰面积}} \times \text{标准液中 Kyn 的浓度} \times 2$$

血清中 Trp 的浓度参照上式计算。

## 2 结果与讨论

### 2.1 分离条件的选择与优化

#### 2.1.1 检测波长的选择

用流动相稀释一定浓度的 Trp 与 Kyn 标准溶液, 以流动相空白调零, 经 DU Series 600 紫外-可见分光仪在 200 ~ 400 nm 内扫描。结果显示: Kyn 在 225 nm 处有灵敏的响应, Trp 的最佳响应在 221 nm 处。由于血清中 Kyn 含量明显低于 Trp, 且 Trp 在

225 nm 处仍有较好的灵敏度,因此选择 225 nm 作为紫外检测波长。

### 2.1.2 流动相的选择

分别以流动相 I (2 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 含 10% (体积分数,下同)甲醇)、流动相 II (0.1 mol/L 乙酸钠,含 2.5%乙腈)、流动相 III (15 mmol/L 乙酸钠-乙酸,含 2.7%乙腈)对同一份混合标准工作液各测定 5 次,求其平均值(见表 1)。表 1 的结果表明,采用流动相 I 时,虽然分析速度快(约 5 min),但 Kyn 峰面积响应值较低;采用流动相 II 时,Kyn 和 Trp 的峰面积响应值均较低;采用流动相 III 时,Kyn 和 Trp 的峰面积响应值均较高。由于血清中 Kyn 的含量较低,故选 15 mmol/L 乙酸钠-乙酸(含 2.7%乙腈)组成本研究工作所用的流动相体系。

表 1 不同流动相对 Kyn 和 Trp 测定的影响 (n = 5)

Table 1 Effect of different mobile phases on determination of Kyn and Trp (n = 5)

Mobile phase <sup>1)</sup>	Kyn		Trp	
	t <sub>R</sub> /min	peak area/(μV·s)	t <sub>R</sub> /min	peak area/(μV·s)
I	2.43	2.180 × 10 <sup>4</sup>	4.50	3.227 × 10 <sup>5</sup>
II	3.79	2.365 × 10 <sup>4</sup>	8.60	2.414 × 10 <sup>5</sup>
III	3.50	3.734 × 10 <sup>4</sup>	8.10	4.232 × 10 <sup>5</sup>

1) Mobile phase I : 2 mmol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> solution containing 10% (v/v) methanol; mobile phase II : 0.1 mol/L sodium acetate solution containing 2.5% (v/v) acetonitrile; mobile phase III : 15 mmol/L sodium acetate-acetic acid solution containing 2.7% (v/v) acetonitrile.

### 2.1.3 流动相中有机溶剂的含量对保留时间的影响

配制含有不同体积分数(2.0%、2.7%、4.0%、6.0%、8.0%)乙腈的流动相,以混合标准工作液作为样品进行分析,结果如图 1 所示。随着乙腈体积分数的增加,Trp 和 Kyn 的峰保留时间相应缩短;乙腈体积分数为 8.0% 时,Trp 和 Kyn 分离欠佳;乙腈体积分数为 2.0% 时,二者可较好地分离,但分析时间显著延长;乙腈体积分数为 2.7% 时,二者在 10 min 内可以较好地分离。

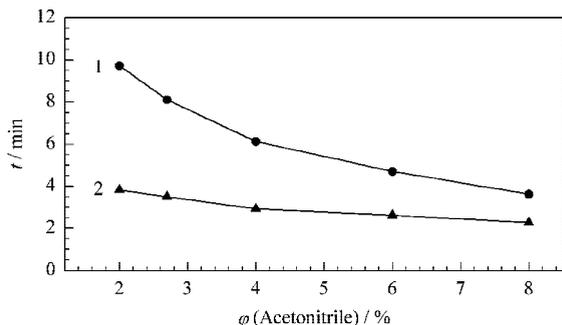


图 1 流动相中有机溶剂的含量对保留时间的影响  
Fig.1 Effect of the content of organic solvent in the mobile phase on retention time

1. Trp ; 2. Kyn.

### 2.1.4 流速对分离的影响

分别以流速 0.5、0.8、1.0、1.2 和 1.5 mL/min 进行实验,结果见图 2。实验表明,随着流速的加快,Kyn 和 Trp 的保留时间明显缩短,但峰面积也相应地减小,色谱系统的后压加大;而流速为 0.5 和 0.8 mL/min 时分析时间太长。为了得到合适的分析时间和响应值,实验选用的流速为 1.0 mL/min。

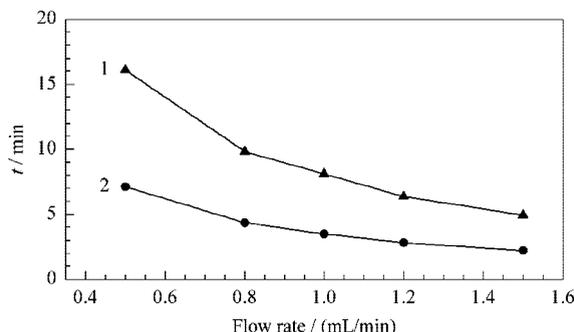


图 2 流速对保留时间的影响

Fig.2 Effect of flow rate on retention time

1. Trp ; 2. Kyn.

## 2.2 方法学的评价

### 2.2.1 标准品和血清样品的色谱分离图

混合标准工作液、血清样品分别按“1.4”节方法处理,然后各取 20 μL 进样测定。图 3-a、b 分别是混合标准工作液和正常人血清样品的色谱分离图。Kyn 和 Trp 保留时间分别为 3.50 和 8.10 min,二者分离良好。

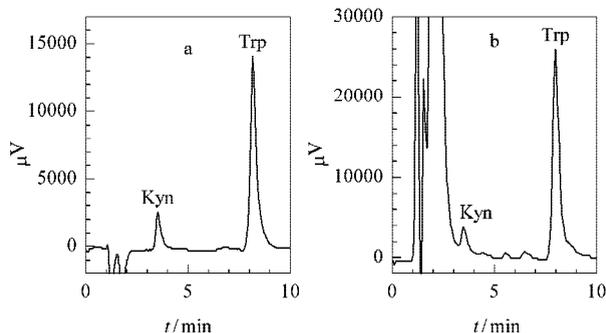


图 3 (a)混合标准工作液和(b)正常人血清样品的色谱图

Fig.3 Chromatograms of (a) standards and (b) a normal serum sample

Conditions : Symmetry Shield RP-C18 column (150 mm × 3.9 mm i. d., 5 μm); mobile phase, 15 mmol/L sodium acetate-acetic acid solution (pH 3.6) containing 2.7% (v/v) acetonitrile; flow rate, 1.0 mL/min; detection wavelength, 225 nm; injection volume, 20 μL.

### 2.2.2 标准曲线和检测限

取 Trp 与 Kyn 标准储备液,用超纯水配制系列浓度的混合标准工作液(Kyn 浓度为 0.002 ~ 100 μmol/L,Trp 浓度为 0.01 ~ 1000 μmol/L),每个样品进样 3 次,取其平均值用最小二乘法进行相关与

回归分析,结果见表 2。其中,  $Y$  为峰面积 ( $\mu V \cdot s$ ),  $X$  为被分析物的进样浓度 ( $\mu mol/L$ )。以流动相为空白,按信噪比为 3 确定检测限。由表 2 可看出:二者的峰面积与进样浓度线性关系良好,线性范围宽,最低检测限低,灵敏度高。

表 2 Kyn 和 Trp 的回归分析结果及其检测限

Table 2 Regression analysis and detection limits of Kyn and Trp

Component	Regression equation <sup>1)</sup>	$r$	Linear range/ ( $\mu mol/L$ )	Detection limit <sup>2)</sup> / ( $\mu mol/L$ )
Kyn	$Y = -5550 + 20387X$	0.9995	0.098 - 49	0.02
Trp	$Y = -4206 + 16232X$	0.9997	4.9 - 490	0.20

1)  $X$ : concentration,  $\mu mol/L$ ;  $Y$ : peak area,  $\mu V \cdot s$ .

2) Detection limits were determined based on signal to noise ratio of 3 ( $S/N = 3$ ).

### 2.2.3 精密度试验

在“1.2”节的色谱条件下,取混合血清样品进行日间和日内精密度试验,结果见表 3。

表 3 Kyn 和 Trp 的日内和日间测定的精密度 ( $n = 20$ )

Table 3 Precisions of intraday and interday determination of Kyn and Trp ( $n = 20$ )

Component	Intraday		Interday	
	(mean $\pm$ SD)/ ( $\mu mol/L$ )	RSD/ %	(mean $\pm$ SD)/ ( $\mu mol/L$ )	RSD/ %
Kyn	3.65 $\pm$ 0.09	2.37	3.61 $\pm$ 0.13	3.66
Trp	35.86 $\pm$ 0.54	1.50	36.54 $\pm$ 0.97	2.65

### 2.2.4 回收率试验

取混合血清样品 1.6 mL 平均分为 4 组,每组 3 份。第 1 组每份加入 0.1 mL 水作为基础样品;后 3 组每份分别加入高、中、低浓度的混合标准工作液 0.1 mL;每组 3 份样品按“1.4”节和“1.2”节所述处理及测定,取其平均值计算回收率,结果见表 4。

表 4 Kyn 和 Trp 的回收率 ( $n = 3$ )

Table 4 Recoveries of Kyn and Trp ( $n = 3$ )

Component	Added/ ( $\mu mol/L$ )	Found/ ( $\mu mol/L$ )	Recovery/ %	RSD/ %
Kyn	0.98	0.89	90.82	3.5
	1.96	1.79	91.32	2.2
	4.90	4.58	93.45	2.6
Trp	4.90	4.68	95.51	2.4
	49.00	47.31	96.55	2.7
	98.00	96.27	98.67	3.9

### 2.2.5 干扰实验

为了探讨人体内一些也有紫外吸收的物质是否干扰 Kyn 和 Trp 的测定,分别取 Phe, Tyr, KYNA, 5-HT, Cr 配成一定浓度的 Kyn 和 Trp 的混合标准溶液,分别进样分析,结果表明这些物质对本法均无干扰(见表 5)。

表 5 干扰实验结果

Table 5 Results of interference test

Component	$\alpha$ (Component)/( $\mu mol/L$ )	Retention time/min
Cr	53.5	1.42
Tyr	55.0	2.13
Phe	1220.0	2.32
Kyn	1.96	3.50
5-HT	56.7	5.83
Trp	24.5	8.10
KYNA	13.2	11.28

## 3 结语

建立了同时测定血清中 Kyn 和 Trp 的高效液相色谱-紫外检测法,并可间接评价目前免疫学研究所关注的 IDO 的酶活性。结果表明,该法操作简单、快速,灵敏度高,方法的精密度、准确度满足分析要求,可用于 Kyn 和 Trp 含量的测定。该方法的建立为相关疾病的诊治、病情监测等提供了可以借鉴的分析方法。

### 参考文献:

- [1] Maneglier B, Rogez-Kreuz C, Cordonnier P, Therond P, Advenier C, Dormont D, Clayette P, Spreux-Varoquaux O. Clin Chem, 2004, 50(11): 2166
- [2] Andrzejewska-Buczko J, Pawlak D, Tankiewicz A, Matys T, Buczko W. Med Sci Monit, 2001, 7(4): 742
- [3] Schwarcz R, Rassoulpour A, Wu H Q, Medoff D, Tamminga C A, Roberts R C. Biol Psychiatry, 2001, 50(7): 521
- [4] Mawatari K, Iinuma F, Watanabe M. J Chromatogr, 1989, 488(2): 349
- [5] Laich A, Neurauter G, Widner B, Fuchs D. Clin Chem, 2002, 48(3): 579
- [6] Yi Yonghong, Zhao Qihua, Liao Weiping, Lu Xuefen. Academic Journal of Guangzhou Medical College (易咏红, 赵绮华, 廖卫平, 陆雪芬. 广州医学院学报), 1998, 26(5): 45
- [7] Chen Fengying, Zhang Lixing. Chinese Journal of Hospital Pharmacy (陈凤英, 章力行. 中国医院药学杂志), 2003, 23(3): 188