

[研究快报]

毛细管电泳间接电致化学发光灵敏检测去甲肾上腺素及其在尿样分析中的应用

刘彦明, 曹俊涛, 郑艳丽

(信阳师范学院化学化工学院, 信阳 464000)

关键词 毛细管电泳; 间接电致化学发光检测; 糖尿病肾病患者; 去甲肾上腺素; 尿样分析

中图分类号 O657

文献标识码 A24

文章编号 0251-0790(2008)01-0081-02

去甲肾上腺素(NE)、脱氧肾上腺素和异丙肾上腺素作为药物在临床上具有重要意义. 脱氧肾上腺素和异丙肾上腺素可用于治疗支气管哮喘和休克等疾病. NE也是一种重要的神经递质, 其在人体内的含量高低对于疾病的诊断与治疗有重要的参考价值. 常用的分析方法为高效液相色谱^[1]和流动注射分析^[2]. 近年来, 毛细管电泳(CE)已被广泛应用于尿样、血清及单细胞等生物样品的分析^[3~5]. 利用CE分离分析上述物质所用到的检测方法有激光诱导荧光光谱^[6]、紫外-可见光谱^[7]、电化学^[8]、化学发光^[9]和电致化学发光(ECL)^[10]等. 其中采用化学发光法检测具有灵敏度高和无须外加光源及背景低等优点, 其与CE的结合已被广泛应用于多个领域^[11]. 三联吡啶钌[Ru(bpy)₃²⁺]电化学发光检测灵敏度高, 已被应用于CE(CE-ECL)中^[12]. CE-ECL具有高分离效率和高灵敏度的优点. 本文基于上述3种肾上腺素对三联吡啶钌-三丙胺发光体系具有强烈抑制的特性, 建立了一种毛细管电泳分离-间接电致化学发光(CE-IECL)灵敏检测NE、脱氧肾上腺素和异丙肾上腺素的新方法, 并将该方法成功地应用于人尿样分析. 结果表明, 糖尿病肾病患者尿样中的NE含量显著比健康人的高.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂 MPI-A型毛细管电泳电化学发光检测仪(西安瑞迈分析仪器有限公司), 石英毛细管(55 cm × 50 μm, i. d., 河北永年瑞洋色谱器件公司). NE、脱氧肾上腺素及异丙肾上腺素(美国Sigma公司)、联吡啶钌纯品(美国Alfa Aesar公司)、三丙胺(TPA, 美国Aldrich公司)均为分析纯; 18.2 MΩ·cm超纯水(台湾艾柯-成都康宁实验专用纯水设备厂)用于配制所有溶液; 健康者尿样取自信阳师范学院志愿者, 糖尿病肾病患者尿样由信阳市中心医院提供. 均取晨尿.

1.2 实验过程 尿样处理按照文献[1]方法进行. 处理过的尿样在分析前用0.22 μm膜过滤.

2 结果与讨论

2.1 条件优化 为得到有效分离和灵敏检测, 对分离和检测条件进行了优化. 以20 mmol/L NaH₂PO₄-K₂HPO₄ (pH = 8.0), 0.6 mmol/L TPA和4 mmol/L SDS为电泳缓冲溶液, 50 mmol/L NaH₂PO₄-K₂HPO₄ (pH = 8.5)及0.6 mmol/L

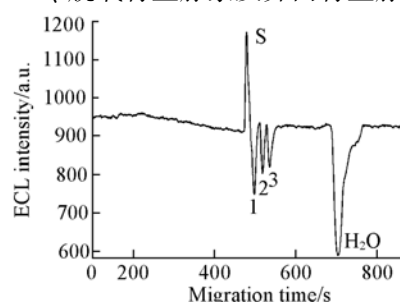


Fig. 1 Electropherogram of standard solution consisting of synephrine (peak 1, 0.5 μmol/L), NE (peak 2, 0.5 μmol/L) and isoproterenol (peak 3, 0.8 μmol/L)

S: system peak. Conditions: 20 mmol/L PBS (pH 8.0), running buffer containing 0.6 mmol/L TPA and 4 mmol/L SDS; electrokinetic injection: 10 s × 10 kV; separation voltage: 9 kV; ECL solution: 50 mmol/L PBS added with 0.6 mmol/L Ru(bpy)₃²⁺ at pH 8.5; detection potential: 1.20 V.

收稿日期: 2007-10-08.

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 20575056)及河南省高校创新人才培养工程项目(批准号: 2005126)资助.

联系人简介: 刘彦明, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事毛细管电泳和生物分析研究. E-mail: Liuym9518@sina.com

$\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ 为柱端检测池 (ECL) 溶液, 每实验 2 h 更新 ECL 溶液. 分离电压 9 kV, 电动进样电压 10 kV, 时间 10 s, 检测电位 1.20 V. 毛细管使用前依次用 0.1 mol/L NaOH、水和电泳缓冲溶液各洗涤 5 min. 在优化条件下 9 min 内实现了 3 种物质的良好分离, 结果见图 1. NE、脱氧肾上腺素和异丙肾上腺素的线性范围分别为 0.07 ~ 20, 0.02 ~ 10 和 0.2 ~ 50 $\mu\text{mol/L}$. 检出限分别为 2.6×10^{-8} , 6.6×10^{-9} 和 8.4×10^{-8} mol/L ($S/N = 3$). 迁移时间和峰面积的相对标准偏差 (RSD) 分别小于 1.3% 和 4.4%.

2.2 人尿样的实际测定 对健康人 (10 例) 和糖尿病肾病患者 (10 例) 尿样经预处理后进行 CE-ECL 分析. 在所研究的 3 种肾上腺素中仅分离检测到 NE. 对 20 例尿样的检测结果表明, NE 在糖尿病肾病患者尿样中的平均含量为 0.41 $\mu\text{mol/L}$, 明显高于健康人的平均值 (0.24 $\mu\text{mol/L}$). 对实际样品分析的迁移时间和峰面积的 RSD 分别小于 2.1% 和 8.3%, 回收率在 76.5% ~ 87.3% 之间.

参 考 文 献

- [1] WU Yu-Ming (吴予明), CHANG Ai-Wu (常爱武), ZHANG Hong-Quan (张洪权), *et al.*. *Chin. J. Health Laboratory Technol.* (中国卫生检验杂志) [J], 2000, **10**(5): 526—528
- [2] Li F., Pang Y. Q., Cui H., *et al.*. *Talanta* [J], 2003, **59**: 627—636
- [3] LIU Yan-Ming (刘彦明), MU Hai-Bei (穆海贝), WANG Cheng-Quan (王成全), *et al.*. *Chem. J. Chinese Universities* (高等学校化学学报) [J], 2006, **27**(7): 1242—1244
- [4] FANG Huai-Fang (方怀防), ZENG Zhao-Rui (曾昭睿), LIU Lan (刘岚), *et al.*. *Chem. J. Chinese Universities* (高等学校化学学报) [J], 2006, **27**(5): 856—858
- [5] ZHAO Shu-Lin (赵书林), SHEN Jiang-Shan (沈江珊). *Chem. J. Chinese Universities* (高等学校化学学报) [J], 2005, **26**(9): 1613—1617
- [6] Du M., Flanigan V., Ma Y. F.. *Electrophoresis* [J], 2004, **25**: 1496—1502
- [7] Wei S. L., Song G. Q., Lin J. M.. *J. Chromatogr. A* [J], 2005, **1098**: 166—171
- [8] HU Shen (胡深), PANG Dai-Wen (庞代文), CHENG Jie-Ke (程介克), *et al.*. *Chin. J. Anal. Chem.* (分析化学) [J], 1998, **26**(6): 752—756
- [9] Liu Y. M., Wang C. Q., Cao J. T., *et al.*. *Electrophoresis* [J], 2007, **28**: 1937—1941
- [10] Kang J. Z., Yin X. B., Wang E. K., *et al.*. *Electrophoresis* [J], 2005, **26**: 1732—1736
- [11] Huang X. Y., Ren J. C.. *Trends Anal. Chem.* [J], 2006, **25**: 155—166
- [12] Liu J. F., Yan J. L., Wang E. K., *et al.*. *Anal. Chem.* [J], 2003, **75**: 3637—3642

Sensitive Determination of Norepinephrine by Capillary Electrophoresis with Indirect Electrochemiluminescence Detection and Its Application to Analysis of Human Urine

LIU Yan-Ming*, CAO Jun-Tao, ZHENG Yan-Li

(College of Chemistry and Chemical Engineering, Xinyang Normal University, Xinyang 464000, China)

Abstract A new method for sensitive and rapid indirect electrochemiluminescence (IECL) detection of norepinephrine (NE), synephrine, and isoproterenol with capillary electrophoresis (CE) was developed. IECL detection is based on their quenching effects on $\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$ /tripropylamine (TPA) system. Under the optimum conditions, the detection limits ($S/N = 3$) were 2.6×10^{-8} mol/L for NE, 6.6×10^{-9} mol/L for synephrine, and 8.4×10^{-8} mol/L for isoproterenol. The RSD of migration time and peak area were less than 1.3% and 4.4%, respectively. The proposed method was successfully applied to the analysis of NE in the urine samples of 10 healthy people and 10 diabetic nephropathy patients. The results indicate that the content of NE in diabetic nephropathy patients is much higher than that in healthy people.

Keywords Capillary electrophoresis; Indirect electrochemiluminescence detection; Diabetic nephropathy patient; Norepinephrine; Urine sample analysis (Ed.: A, G)