

文章编号:1001-5914(2009)03-0248-03

尿中高香草酸和香草扁桃酸的高效液相色谱测定法

张文静^{1,2}, 李杰¹, 张志虎², 邵华²

摘要:目的 建立一种能同时测定人尿液中高香草酸和香草扁桃酸含量的高效液相色谱荧光检测方法。方法 尿样经 0.45 μm 滤膜过滤后直接进样,经 ODS 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5.0 μm)室温分离,以甲醇-0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(体积比为 20:80)为流动相,流量为 1 ml/min,进样量为 10 μL,激发波长为 277 nm,发射波长为 320 nm。结果 分离测定过程在 15 min 之内完成,香草扁桃酸、高香草酸保留时间分别为 3.18、6.72 min。高香草酸检出限为 0.15 μg/ml,线性范围为 0~25 μg/ml,加标回收率为 84.53%~106.1%,相对标准偏差<3.44%。香草扁桃酸检出限为 0.13 μg/ml,线性范围为 0~20 μg/ml,加标回收率为 94.66%~107.3%,相对标准偏差<2.16%。结论 该方法各项指标均达到《生物材料分析方法的研制准则》的要求,能准确测定尿液中高香草酸和香草扁桃酸的含量。

关键词: 色谱法;液相;高香草酸;香草扁桃酸

中图分类号:O657.7

文献标识码:A

Simultaneous Determination of Homovanillia Acid and Vanillymandelic Acid in Human Urine by HPLC ZHANG Wen-jing, LI Jie, ZHANG Zhi-hu, et al. *School of Public Health, Shandong University, Ji'nan, Shandong 250012, China*

Abstract: Objective To establish an HPLC-FLD method for simultaneous determination of homovanillic acid (HVA) and vanilmandelic acid (VMA) in human urine. **Methods** After being filtered with 0.45 μm membrane, the samples of urine were injected directly into an ODS column(250 mm×4.6 mm, 5.0 μm) at the room temperature. The samples of urine were carried with the mobile phase comprised of methanol-0.1mol/L phosphate buffered solution (20:80,V/V). The flow rate was 1 ml/min, the injection volume was 10 μL, the detection was taken at λ_{ex}=277 nm, λ_{em}=320 nm. **Results** The determination was finished in 15 min, the retention time was 3.18 min for VMA and 6.72 min for HVA respectively. The detection limit of HVA was 0.15 μg/ml, the linear range was 0~25 μg/ml, the recovery rates were between 84.53%~106.1%, the relative standard deviation (RSD) <3.44%. The detection limit of VMA was 0.13 μg/ml, the linear range was 0~20 μg/ml, the recovery rate were between 94.66%~107.3%, RSD<2.16%. **Conclusion** This method can meet the requirements of Manufacture Criterion of Biomaterial Analytical Method and can be applicable to the determination of the two acids in human urine.

Key words: Chromatography, liquid; Homovanillic acid; Vanilmandelic acid

高香草酸(4-羟基-3-甲氧基苯乙酸, HVA)和香草扁桃酸(4-羟基-3-甲氧基扁桃酸, VMA)是神经递质——儿茶酚胺的主要代谢物。测定尿中 HVA 和 VMA 含量,主要用于评价体内儿茶酚胺的代谢水平,从而对与其相关的某些神经系统疾病做出诊断。有研究表明机体长期接触锰会导致职业性锰中毒的发生,以帕金森症为典型的临床表现^[1],尿液中 HVA 和 VMA 的含量可以用来评价机体锰中毒的情况^[2]。测定尿液中 HVA 和 VMA 的方法较多,如比色法、薄层色谱法以及电离子透入法^[3],这些方法都较费时,且不能定量测定尿液中的这两种酸;而气相色谱法则需要进行衍生化处理,方法较复杂,不适合批量样品的测定^[4]。近期的检测方法主要是高效液相色谱-电化学检测器法^[5],本研究选用常见的高效液相色谱-荧光检测器进行分离和鉴定。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Agilent 1100 型高效液相色谱仪,配有四元泵、在线真空脱气机、G1321A 型荧光检测器和自动进样器(美国 Agilent 公司);PLATISIL ODS 色谱柱,百万分之一的电子天平,旋涡混合器,抽

基金项目:国家“十一五”科技支撑项目(2006BAI06B02)

作者单位:1.山东大学公共卫生学院劳动卫生与环境卫生研究所(山东济南 250012);2. 山东省职业卫生与职业病防治研究院(山东济南 250062)

作者简介:张文静(1983—),女,硕士研究生,从事劳动卫生研究。

通讯作者:邵华, E-mail:china.shaohua@yahoo.com.cn

滤装置。高香草酸(纯度>98%,Sigma 公司),香草扁桃酸(纯度>99%,Fluka 公司),甲醇(色谱级),磷酸二氢钠(分析纯),磷酸氢二钠(分析纯),双蒸水。

1.2 实验方法

1.2.1 标准溶液的配制 用百万分之一的电子天平准确称取高香草酸、香草扁桃酸纯品各 0.050 00 g,用双蒸水定容至 50 ml,混匀,配制成 1.0 mg/ml 的标准储备液,保存于 4℃冰箱。

1.2.2 色谱条件 反相液相色谱柱 PLATISIL ODS (250 mm×4.6 mm, 粒径 5.0 μm);流动相如表 1。进样量为 10 μL;荧光检测激发波长为 277 nm,发射波长为 320 nm;柱温为室温。

表 1 流动相梯度表

时间(min)	流动相成分	体积比	流量(ml/min)
0~7.5	甲醇: 0.1 mol/L 的 PBS 缓冲液	20:80	1.0
7.5~8.5	甲醇		1.0
8.5~15	甲醇: 0.1 mol/L 的 PBS 缓冲液	20:80	1.0

1.2.3 样品的检测

1.2.3.1 样品的采集 采集锰接触工人的尿样不少于 50 ml,每份样品中加入 2 滴浓盐酸(浓度 35%)防腐。

1.2.3.2 样品的制备 取 1 ml 尿样,用 NaOH 溶液调节 pH 值至 7 左右,然后用针头式过滤器过滤(滤膜孔径 0.45 μm),滤液放入自动进样器小瓶,供分析。

1.2.3.3 标准曲线的绘制 分别取 1 mg/ml 的高香草酸标准液 0、5、10、50、100、250 μl , 用双蒸水定容至 10 ml, 标准曲线的测定点浓度分别为 0、0.5、1、5、10、25 $\mu\text{g/ml}$ 。分别取 1 mg/ml 的香草扁桃酸标准液 0、5、10、50、100、200 μl , 用双蒸水定容至 10 ml, 标准曲线的测定点浓度分别为 0、0.5、1、5、10、20 $\mu\text{g/ml}$ 。然后将试管中的液体转移到进样小瓶, 进行高效液相色谱(HPLC)分析, 每个浓度测定 3 次, 以 3 次测定值的平均响应值(峰面积)与相应的浓度绘制标准曲线。

1.2.3.4 样品的测定 取“1.2.3.1”中的样品液, 进行 HPLC 分析, 保留时间定性, 峰面积定量。

2 结果与讨论

2.1 色谱柱和检测器的选择

分别使用 C_{18} 、 C_8 、ODS、氨基柱进行分析, 比较峰形及出峰时间, 发现 ODS 柱分离效果好于其他色谱柱。选用紫外检测器, 发现峰形过小, 灵敏度太低, 以致无法检出, 根据文献[6], 得知此两种酸在正常人尿液中含量甚微, 故改用荧光检测器(FLD)。用 FLD 对二者进行扫描, 发现二者在激发波长和发射波长分别为 277 和 320 nm 处有最大吸收峰, 故定其为检测波长。

2.2 流动相的选择及优化

以甲醇和水做流动相, 不断调整二者比例, 尝试等度和梯度洗脱, 二者出峰时间较短, 均在 5 min 之内出峰, 无法完全分离; 后改用乙腈和水做流动相, 进行相应的尝试, 分离效果和峰形不如甲醇。改用甲醇、磷酸盐缓冲液(PBS)做流动相; 选用 0.1 mol/L、pH=5.6 的 PBS, 并不断调整 PBS 与甲醇的比例, 最终定位 PBS:甲醇体积比为 80:20。在此流动相下, 香草扁桃酸的出峰时间为 3.18 min, 高香草酸的出峰时间为 6.72 min。见图 1。

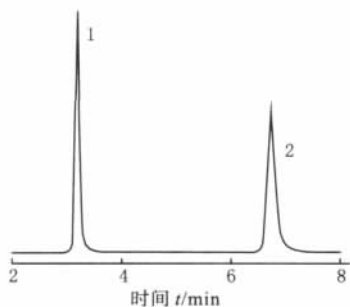


图 1 高香草酸和香草扁桃酸的标准色谱图

2.3 流动相的梯度改变

用上述流动相进行检测时, 完成一次测定大约需要 7.5 min。由于尿液中杂质较多, 7.5 min 后仍有较多其他成分被洗脱出来, 如在 7.5 min 后立即再次进样, 其他成分可干扰下一次的检测, 故在 7.5 min 之后调整流动相, 用 100% 甲醇冲洗色谱柱 1 min, 使其他成分快速洗脱出来, 之后仍调 PBS:甲醇体积比为 80:20, 柱压稳定后再次进样。实测样品色谱图如图 2。

2.4 标准曲线、检出限

高香草酸标准曲线回归方程为 $y=38.84x-5.23$, 相关系数为 0.999 87, 检出限为 0.15 $\mu\text{g/ml}$, 线性范围为 0~25 $\mu\text{g/ml}$ 。香草扁桃酸标准曲线回归方程为 $y=46.61x+2.68$, 相关系数为 0.999 97, 检出限为 0.13 $\mu\text{g/ml}$, 线性范围为 0~20 $\mu\text{g/ml}$ 。

2.5 精密度

选择测定方法线性范围内的高、中、低 3 个浓度, 高香草酸

分别为 25、10、5 $\mu\text{g/ml}$, 香草扁桃酸分别为 20、10、5 $\mu\text{g/ml}$ 。3 d 内同时进行 10 次重复测定。二者的相对标准偏差测试结果见表 2。

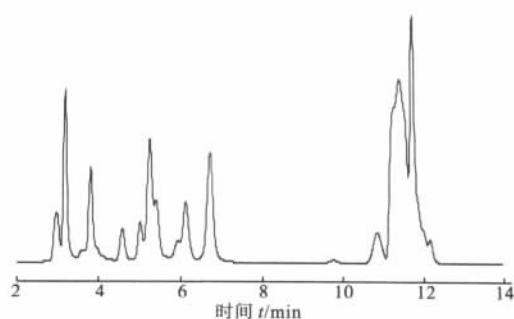


图 2 加标的尿样色谱图

表 2 HVA 和 VMA 的高效液相色谱测定法的精密度测试结果 ($n=10, \%$)

物质	25 $\mu\text{g/ml}$				10 $\mu\text{g/ml}$				5 $\mu\text{g/ml}$			
	1 d	2 d	3 d	组间	1 d	2 d	3 d	组间	1 d	2 d	3 d	组间
HVA	0.29	0.40	0.31	3.21	0.11	0.81	1.60	3.44	0.25	0.52	1.58	1.89
VMA	0.22	0.61	0.34	1.24	0.43	1.04	1.07	2.16	0.59	1.84	2.13	1.32

2.6 准确度测定

取本实验室健康人的混合尿, 加入 HVA、VMA 标准液, 终浓度分别为 20、10、5 $\mu\text{g/ml}$, 各测定 3 次, 由平均值计算加标回收率。HVA、VMA 高浓度的加标回收率分别为 102.4%、107.3%, 中浓度的加标回收率分别为 84.53%、96.94%, 低浓度的加标回收率分别为 106.1%、94.66%。

2.7 稳定性试验

取本实验室健康人的新鲜混合尿, 分为 6 组, 每组 10 份。每份均加入 HVA、VMA 标准液, 使二者浓度为 10 $\mu\text{g/ml}$ 。3 组保存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱, 3 组在室温下保存。冰箱内的 3 组采取 3 种不同浓度的酸化处理, 每组酸加入量分别为: 每 10 ml 尿液不加酸、加 1 滴浓盐酸(浓度为 35%)、加 2 滴浓盐酸。室温下的 3 组酸化处理同冰箱内的 3 组。6 组均在第 1、3、7、14、30 天测定, 每组均值与该组第 1 天测得的均值比较, 相对偏差在 10% 以内认为可保存。第 1 天 HVA、VMA 的峰面积均值为 379.4、422.8, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱条件下第 30 天 HVA、VMA 的峰面积均值为: 不加盐酸组为 370.4、413.8; 加 1 滴盐酸组为 373.3、411.6; 加 2 滴盐酸组为 375.8、421.6。相对偏差均在 10% 以内。结果提示, 尿样无论加 1 滴、2 滴或者不加盐酸, 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱下均至少可以保存 1 个月, 每 10 ml 尿样加 2 滴盐酸的相对偏差较小。可认为在色谱柱承受的酸度范围内, 酸度越大保存时间越久。

2.8 尿样检测

于 3 个车间共采集 79 件尿样。用高效液相色谱法进行尿肌酐的测定, 具体参考 WS/T 98—1996《尿中肌酐的高效液相色谱法》^[7]。采用以上处理和分析方法进行 HVA 和 VMA 的测定。结果以浓度与肌酐的比值来表示, 见表 3。

表 3 随机尿样中 HVA/Cr、VMA/Cr 的测定结果

		($\bar{x} \pm s, \mu\text{g/mg Cr}$)	
车间	样本数(件)	HVA/Cr	VMA/Cr
A	35	0.93 \pm 0.74	0.52 \pm 0.29
B	22	0.94 \pm 0.85	0.46 \pm 0.29
C	22	0.69 \pm 0.33	0.44 \pm 0.21

文章编号:1001-5914(2009)03-0250-03

水中痕量银的浊点萃取-火焰原子吸收光谱测定法

张旻杰,滕莉丽,饶美香

摘要:目的 建立浊点萃取-火焰原子吸收光谱测定水中痕量银的方法。方法 以二乙基二硫代磷酸(DDTP)为络合剂,以非离子型表面活性剂聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X-114)为萃取剂,富集、分离水中痕量银,采用火焰原子吸收光谱法进行检测。研究了溶液的酸度、络合剂、表面活性剂和甲醇浓度、平衡温度和时间、干扰离子对浊点萃取效果的影响。结果 在优化的实验条件(0.1 mol/L 的 DDTP 溶液 0.5 ml、50 g/L 的 Triton X-114 溶液 0.5 ml、1 mol/L 盐酸 5 ml、40 °C 加热 15 min)下,银在 0~100 ng/ml 浓度范围内线性关系良好,其线性回归方程为 $A=0.0058c_{Ag}+0.0016$, $r=0.999$,检出限为 0.83 ng/ml,平均回收率为 97.0%~105.0%, RSD 为 3.1%。5 000 倍的 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 、 NO_3^- 、 SO_4^{2-} 、 Cl^- ,1 000 倍的 Al^{3+} 、 Zn^{2+} ,500 倍的 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} ,100 倍的 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 对银的测定没有干扰。结论 该方法具有简单、准确、高效、高选择性、高灵敏度的特点,适用于环境水样中痕量银的测定。

关键词:水;浊点萃取;火焰原子吸收光谱法;银

中图分类号:0657.3

文献标识码:A

Determination of Trace Silver in Water Samples by Flame Atomic Absorption Spectrometry after Cloud Point Extraction
ZHANG Min-jie, TENG Li-li, RAO Mei-xiang. School of Chemistry and Life Science, Gannan Normal University, Ganzhou, Jiangxi 341000, China

Abstract: **Objective** To develop a new method for the determination of trace silver in water by flame atomic absorption (FAAS) after cloud point extraction. **Methods** Diethyldithiophosphate (DDTP) and triton X-114 were respectively used as the chelating agent and surfactant. The effects of experimental conditions such as acidity, concentration of chelating agent, surfactant and methanol, equilibration temperature and time, interference ion on cloud point extraction were investigated. **Results** Under the optimum condition, 0.5 ml of 0.1 mol/L DDTP solution, 0.5 ml of 50 g/L Triton X-114 and 5 ml of 1 mol/L hydrochloric acid were added and the volume was made up to 50 ml. The mixture was heated in a thermostatic bath at 40 °C for 15 min, the linear range of determination for silver was 0~100 ng/ml, the equation of linear regression was $A = 0.0058c_{Ag} + 0.0016$, $r = 0.999$. The detection limit was 0.83 ng/ml, the recovery rate was in the range of 97%~105%, and the relative standard deviation was 3.1% ($n=11$) for 20 ng/ml Ag. There was no significant interference for silver solution containing 5 000 times of K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , NO_3^- , SO_4^{2-} and Cl^- , 1 000 times of Al^{3+} and Zn^{2+} , 500 times of Fe^{2+} and Mn^{2+} , 100 times of Pb^{2+} and Cu^{2+} . **Conclusion** The method is rapid, accurate, simple and applicable to the determination of trace silver in water samples.

Key words: Water; Cloud point extraction; Flame atomic absorption spectrometry; Silver

银被广泛应用于冶炼、电镀和影印等行业,可通过呼吸、消化器官和皮肤进入人体,从而对健康产生危害。目前,测定银的方法主要有原子光谱法、分光光度法、化学滴定法和电化学分

析法等^[1]。浊点萃取是近年来出现的一种新的环保型液-液萃取技术,它不使用挥发性的有机溶剂,对环境不会产生污染。浊点萃取技术已被广泛用于痕量锰、铜、铅、镉、钴、镍等金属元素的测定^[2-6]。肖宇等^[7]报道了以 8-羟基喹啉为络合剂,用 Triton X-100 浊点萃取测定痕量银的方法,但用 Triton X-100 浊点萃取的浊点温度较高。笔者提出以二乙基二硫代磷酸(DDTP)为络合剂,采

基金项目:江西省自然科学基金资助项目(2007GZH0377)

作者单位:赣南师范学院化学与生命科学学院(江西 赣州 341000)

作者简介:张旻杰(1970-),男,讲师,从事环境分析化学研究。

3 小结

本实验样品前处理简单,样品稳定,保存时间长;方法灵敏度高、重现性好。完成一次样品分析需要 15 min,标准曲线线性良好。高香草酸的加标回收率为 84.53%~106.1%,相对标准偏差<3.44%,检出限为 0.15 μg/ml;香草扁桃酸的加标回收率为 94.66%~107.3%,相对标准偏差<2.16%,检出限为 0.13 μg/ml。满足《生物材料分析方法的研制准则(尿样及血样)》^[7]的要求,能快速准确地测定尿液中该两种酸的含量。

参考文献:

[1] Myers JE, Thompson ML, Ramushu S, et al. The nervous system effect of occupational exposure on workers in a South African manganese smelter[J]. Neurology Toxicology, 2003,24:885b-894b.

[2] Ai LB, Chua HH, New AL, et al. Urinary homovanillic acid and vanillylmandelic acid in workers exposed to manganese dust [J].

Biological Trace Element Research, 1998,64:89-99.

[3] Tsunoda M. Recent advances in methods for the analysis of catecholamines and their metabolites [J]. Anal Bioanal Chem, 2006,386:506-514.

[4] Fauler G, Leis HJ, Huber E, et al. Determination of homovanillic acid and vanillylmandelic acid in neuroblastoma screening by stable isotope dilution GC-MS [J]. Journal of Mass Spectrometry, 1997,32:507-514.

[5] Flottmann D, Hins J, Rettenmaier C, et al. Two-dimensional isotachopheresis for the analysis of homovanillic acid and vanillylmandelic acid in urine for cancer therapy monitoring [J]. Microchimica Acta, 2006,154:49-53.

[6] Tsunoda M. Recent advances in methods for the analysis of catecholamines and their metabolites [J]. Anal Bioanal Chem, 2006,386:506-514.

[7] 徐伯洪, 闫惠芳. 工作场所有害物质监测方法 [M]. 北京: 中国人民公安大学出版社, 2003:386-408.

(收稿日期:2008-10-28 修回日期:2008-12-30)

©1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net 本文编辑:杜宇欣)