

柱前衍生高效液相色谱-荧光检测法测定血浆中同型半胱氨酸

唐秀芳¹, 甄乾娜², 樊子勉¹, 冯成亚¹, 丁 敏^{1*}

(1. 重庆医科大学检验医学院, 临床检验诊断学教育部重点实验室, 重庆 400016;

2. 重庆医科大学附属第一医院内分泌内科, 重庆 400016)

摘要: 建立了一种柱前衍生高效液相色谱-荧光检测法用于测定血浆中同型半胱氨酸(Hcy)。使用三(2-羧乙基)膦盐酸盐(TCEP)为还原剂, *N*-(1-芴)马来酰亚胺(NPM)为衍生剂进行样品预处理, Agilent Hypersil C-18 柱(250 mm × 4.0 mm, 5 μm)进行分离, 流动相为 15 mmol/L 醋酸钠-乙腈-混合酸(300 mL 水中含 1 mL 醋酸和 1 mL 磷酸)混合溶液, 采用梯度洗脱, 荧光检测激发波长为 330 nm, 发射波长为 380 nm。Hcy 的回收率为(102.08 ± 4.94) %。线性范围为 0.500 ~ 100 μmol/L, 检出限(以信噪比为 3 计)为 0.016 μmol/L。日内与日间相对标准偏差均小于 5%。利用该方法对 7 例高血压患者和 7 例健康志愿者的血浆进行了测定, 结果表明两组间的 Hcy 含量存在显著的差异($p < 0.05$)。本方法简单、快速、灵敏、特异, 适用于血浆 Hcy 的临床定量测定。

关键词: 高效液相色谱; 荧光检测; 同型半胱氨酸; 血浆

中图分类号: O658

文献标识码: A

文章编号: 1000-8713(2012)06-0613-05

Determination of homocysteine in plasma by precolumn derivatization-high performance liquid chromatography with fluorescence detection

TANG Xiufang¹, ZHEN Qianna², FAN Zimian¹, FENG Chengya¹, DING Min^{1*}

(1. College of Laboratory Medicine, Chongqing Medical University, Key Laboratory of Clinical Laboratory

Diagnostics of Ministry of Education, Chongqing 400016, China; 2. Department of Endocrinology,

First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: A precolumn derivatization-high performance liquid chromatographic method for the determination of homocysteine (Hcy) in plasma was established. Tris(2-carboxyethyl) phosphine hydrochloride (TCEP) and *N*-(1-pyrenyl) maleimide (NPM) were used as the reduced reagent and derivatization reagent, respectively. The separation was carried out on an Agilent Hypersil C-18 column (250 mm × 4.0 mm, 5 μm) in gradient elution mode. The mobile phase consisted of A (15 mmol/L sodium acetate solution), B (acetonitrile) and C (300 mL water containing 1 mL acetic acid and 1 mL phosphoric acid). The eluate was monitored by the fluorescence detector at an excitation wavelength of 330 nm and an emission wavelength of 380 nm. The mean recovery of Hcy was (102.08 ± 4.94) %. The linear range was from 0.500 μmol/L to 100 μmol/L, with a detection limit of 0.016 μmol/L. The intra-day and inter-day relative standard deviations (RSDs) for Hcy were less than 5%. Seven plasma samples of patients with hypertension and seven plasma samples of healthy controls were tested, and the results demonstrated that the Hcy in the plasma from the hypertension group was significantly different from that of the control group ($p < 0.05$). The developed method is simple, fast, accurate, and suitable for clinical measurement.

Key words: high performance liquid chromatography (HPLC); fluorescence detection; homocysteine; plasma

* 通讯联系人: 丁 敏, 硕士, 教授, 研究方向为生物活性物质的分析方法研究. Tel: (023) 68485217, E-mail: dingmin@cqmu.edu.cn.

基金项目: 重庆市科委自然科学基金项目(No. CSTC2011JJA0225).

收稿日期: 2012-03-13

同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)是一种含硫氨基酸,为甲硫氨酸(methionine, Met)代谢过程中的重要中间产物。研究表明同型半胱氨酸与肾病、老年痴呆症、高血压等多种疾病有关,是导致心血管疾病的一个独立危险的致病因子^[1-4]。另有研究指出同型半胱氨酸是致癌的又一危险因子^[5]。因此定量监测血浆中 Hcy 浓度可为一些疾病的诊断、治疗及预防提供实验依据。目前检测 Hcy 的方法有气相色谱-质谱(GC-MS)联用法^[6]、荧光偏振免疫法(FPIA)^[7]、酶联免疫吸附测定法(ELISA)^[8]、循环酶法以及柱前衍生高效液相色谱(HPLC)-荧光检测法^[9]。HPLC 荧光检测法应用最

为广泛,是一种经典的检测方法。柱前衍生最常用的衍生剂是 7-氟苯咪唑-4-硫酸铵盐(SBD-F)^[10,11]。但因是弱反应剂,需要较高的反应温度和较长的反应时间,且对光不稳定,需避光操作,增加了操作的难度^[12]。本文建立了一种柱前衍生 HPLC 荧光检测法用于测定血浆中的 Hcy,选用 *N*-(1-芘)马来酰亚胺(NPM)为 Hcy 的衍生剂(见图 1)。NPM 是巯基的特异性衍生剂^[13],该衍生反应在室温下仅 10 min 便可完成,产生的荧光效率高且稳定,色谱峰形良好,是一种理想的硫醇物荧光衍生剂。本方法简便、快速、灵敏、特异,适用于血浆中 Hcy 的临床定量测定。

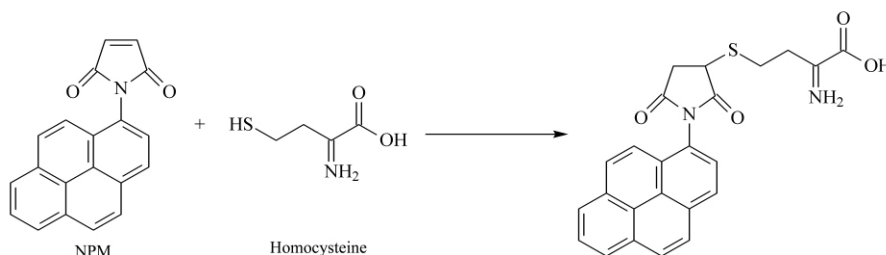


图 1 NPM 与同型半胱氨酸的反应

Fig. 1 Reaction scheme of *N*-(1-pyrenyl) maleimide (NPM) with homocysteine

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); HIMAC-ef 15 低温台式离心机(日立工机株式会社); FA1004A 电子天平(上海精天电子仪器有限公司); Millipore 超纯水过滤装置及 Millipore 真空泵(美国 Millipore 公司); SB-3200 超声波清洗器(上海必能信超声有限公司); DKZ-2 型电热恒温振荡水槽(上海一恒科技有限公司)。

Hcy、三(2-羧乙基)膦盐酸盐(TCEP)、NPM 购于美国 Sigma 公司; 甲醇、乙腈为色谱纯,购于美国 Tedia 公司; 醋酸钠、醋酸、磷酸均为国产分析纯。实验用水为经 Millipore 系统纯化得到。

标准液的配制: 配制 10 mmol/L Hcy 储备液,分装后置于 -20°C 下保存备用; 使用时取适量储备液,稀释成所需浓度的标准工作液。**还原剂的配制:** 100 g/L TCEP 用 25 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)配制,置于 4°C 下保存备用,使用时用 25 mmol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.4)稀释成 10 g/L。**衍生剂的配制:** 1 mmol/L NPM 乙腈溶液,置于 4°C 下保存备用。

1.2 样品采集与预处理

7 例高血压患者取自重庆医科大学附属第一医

院内分泌科,其中男 5 例、女 2 例,平均年龄(50 ± 7)岁,同时无肝、肾、肺、血液系统等疾病。19 例健康志愿者标本取自重庆医科大学附属第一医院体检健康者: 其中 7 例性别、年龄与高血压患者相匹配; 另 12 例中男 6 例、女 6 例,平均年龄(29 ± 2)岁。取空腹静脉血 2 mL 置于乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝管内,立即置于碎冰上,1 h 内于 4°C 、2 000 g 离心力下离心 15 min,分离血浆,置于 -20°C 冰箱内保存。本实验取得了重庆医科大学附属第一医院伦理学委员会和受试者的一致同意。

取 EDTA 抗凝血浆 100 μL ,加入 10 μL TCEP (10 g/L),涡旋混匀,于 37°C 水浴 10 min,再加入 400 μL NPM (1 mmol/L),边加边涡旋混匀,室温静置 10 min,于 4°C 、13 000 g 离心力下离心 10 min 以沉淀血浆中的蛋白质,取上清液 400 μL 加入 10 μL 50% (v/v) 醋酸,涡旋混匀,取 20 μL 进行 HPLC 分析。

1.3 HPLC 条件

色谱柱为 Agilent Hypersil C-18 柱(250 mm $\times$ 4.0 mm, 5 μm); 流动相 A 为 15 mmol/L 醋酸钠溶液, B 为乙腈, C 为混合酸溶液(300 mL 水中含 1 mL 醋酸和 1 mL 磷酸),溶液 A 和 C 使用前用 0.22 μm 的滤膜过滤并超声脱气; 柱温 25°C ; 荧光检测激发波长为 330 nm,发射波长为 380 nm。样本测

定前用流动相 A-B-C (20:60:20, v/v/v) 在 0.5 mL/min 流速下平衡色谱柱。梯度洗脱程序: 0.00 ~ 0.40 min, B-C (70:30, v/v), 流速为 0.5 mL/min; 0.41 ~ 3.00 min, A-B-C (28:60:12, v/v/v), 流速为 0.9 mL/min; 3.01 ~ 5.50 min, A-B-C (20:60:20, v/v/v), 流速为 0.5 mL/min; 5.51 ~ 8.00 min, A-B-C (20:60:20, v/v/v), 流速为 0.9 mL/min。分析时间为 8 min。

2 结果与讨论

2.1 HPLC 条件的确定

为了获得较好的分离度和峰形,本文分别对流动相添加成分、洗脱条件和流速进行了考察。参照文献^[4],在含醋酸、磷酸和乙腈的流动相中添加醋酸钠溶液能使 Hcy 的保留时间缩短。固定乙腈比例, Hcy 的保留时间随醋酸钠溶液比例的增加而缩短,但与其前的血浆内源物质峰逐渐重叠; Hcy 的保留时间随混合酸溶液比例的增加而延长,但与其后的血浆内源物质峰逐渐重叠。经过反复试验,综合考虑分离度和分析时间,本文采用梯度洗脱和变流速方式,实现了 Hcy 与其他内源性物质的有效分离,使 Hcy 的分离度大于 1.5,且单次样品分析时间仅需 8 min。

2.2 样品处理方法的优化

正常人血浆中约 2% 的 Hcy 为游离型, 20% ~ 30% 以 Hcy-Hcy 二聚体形式存在, 70% ~ 80% 以二硫键形式与清蛋白结合。目前总同型半胱氨酸为临床上公认评估疾病的指标,虽有文献报道游离型 Hcy 可能比总 Hcy 更能反映疾病状态,但无系统论证,且游离型 Hcy 含量低,易被氧化,准确定量较困难,不适合临床常规测定。本研究的目的是建立测定总 Hcy 的 HPLC 荧光检测方法。在测定总 Hcy 浓度时应将结合型还原为游离型,用于还原二硫化物的还原剂有二硫苏糖醇 (DTT)、三丁基氧磷 (TMP) 及 TCEP。其中 DTT 易与衍生剂反应,产生荧光杂质。TMP 特异还原硫醇物,但不易溶于水。本研究选用 TCEP 为还原剂, TCEP 易溶于水,稳定,还原效率高,用量超过完全还原二硫化物量少许即可^[5]。本研究取混合血浆,分别考察了还原剂量在 1、5、10、20、30、40 g/L 时对 Hcy 的还原情况,按 1.2 节方法操作,重复测定 3 次。发现还原剂质量浓度达 5 g/L 时 Hcy 衍生物的色谱峰峰面积趋于稳定。本实验对还原温度和还原时间进行了考察,发现在 37 °C 水浴 5 min 后, Hcy 衍生物峰面积趋于稳定。本实验最终选择还原剂质量浓度为 10 g/L,

还原温度为 37 °C,还原时间为 10 min。

本研究对衍生剂用量和衍生时间进行了考察,发现 100 μ L 血浆加 400 μ L 浓度为 1 mmol/L 的 NPM 乙腈溶液,既能使衍生反应充分,又能达到良好的去蛋白效果。对衍生时间的考察,固定其他样品处理条件,取混合血浆,经预处理后加入 NPM 衍生剂,分别在室温衍生 1、5、15、30、45 和 60 min,按 1.2 节方法操作,每个时间点重复测定 3 次。Hcy 衍生物峰面积测定结果依次为 (202.6 $\pm$ 6.4)、(675.7 $\pm$ 2.1)、(678.0 $\pm$ 1.0)、(682.7 $\pm$ 2.5)、(662.3 $\pm$ 7.5) 和 (668.3 $\pm$ 4.2) LU $\cdot$ s。结果表明,衍生时间在 5 到 60 min 之间, Hcy 色谱峰的峰面积基本保持不变。为了保证 Hcy 衍生化反应完全,本研究选择衍生化时间为 10 min。

2.3 方法学评价

2.3.1 标准曲线及检出限

在混合血浆中加入 Hcy 标准液,使其在血浆中的浓度分别为 0.500、1.00、5.00、10.0、25.0、50、100 μ mol/L。按 1.2 节方法操作。每一浓度样品重复测定 3 次。以扣除混合血浆中 Hcy 峰面积后增加的峰面积 (y) 对加入的 Hcy 的浓度 x (μ mol/L) 绘制标准曲线,得到线性方程为 $y = 83.773x - 6.5594$ ($r = 0.9997$)。结果显示 Hcy 在 0.5 ~ 100 μ mol/L 浓度范围内线性关系良好。最低检出限 (以信噪比为 3 计,即 $S/N = 3$) 为 0.0160 μ mol/L。

2.3.2 精密度和回收率

分别取含高、中、低浓度 Hcy 的血浆样本进行精密度测定,按 1.2 节方法操作。日内每个浓度水平重复测定 5 次,连续测定 5 天。日内相对标准偏差 (RSD) 在 2.2% 与 3.0% 之间,日间 RSD 在 1.6% 与 3.2% 之间,结果见表 1。在 90 μ L 健康人混合血浆中加入 10 μ L 高、中、低不同浓度的 Hcy 标准液,按 1.2 节方法操作进行回收率测定。平均回收率为 (102.08 $\pm$ 4.94) %,表明本方法准确可靠。

表 1 Hcy 的回收率和精密度 ($n = 5$)
Table 1 Recoveries and precisions of Hcy ($n = 5$)

Added/ (μ mol/L)	(Recovery $\pm$ SD) / %	Precision (RSD) / %	
		Intra-day	Inter-day
2.5	96.49 $\pm$ 4.17	2.9	1.6
5.0	103.89 $\pm$ 3.72	2.2	3.3
25	105.86 $\pm$ 4.30	3.0	3.2

SD: standard deviation. RSD: relative standard deviation.

2.3.3 稳定性

全血收集后,在去除血细胞前, Hcy 浓度随放置时间和温度的增加而增加。在室温中, Hcy 每小时约增加 10%^[6]。这种增加可通过立即离心去除血

细胞或将样品放置在碎冰直到离心而被阻止^[14]。本实验中取空腹静脉血后,立即置于碎冰上,并于 1 h 内离心分离血浆。样品处理后,将衍生物置于碎冰上,以 RSD 不超过 5% 为稳定性良好的标准。结果显示,Hcy 在 0 °C 下避光保存,24 h 内其峰面积无明显改变,具有良好的稳定性。

2.3.4 干扰实验

根据美国国家临床实验室标准委员会(NCCLS)制订的关于干扰试验的评价方案考察了胆红素和溶血对 Hcy 测定的影响。将胆红素标准品冻干粉溶于蒸馏水制成胆红素标准溶液,取健康人混合血浆 90 μL ,分别加入 10 μL 不同浓度的胆红素标准溶液,按 1.2 节方法操作,每一浓度重复测定 3 次。测定未加入胆红素标准溶液时血浆中 Hcy 的浓度($\bar{X}_C$)和加入胆红素标准溶液后血浆中 Hcy 的浓度($\bar{X}_T$)。干扰值为($\bar{X}_T - \bar{X}_C$),其值在 $\pm 1.96s$ (95% 可信限) 范围内为无显著干扰,其中 s 为本方法日内精密度中浓度的标准偏差($s = 0.299$)。正常人血浆中总胆红素的参考范围为 2 ~ 20 $\mu\text{mol/L}$ 。结果表明,血浆胆红素病理性增高对 Hcy 测定结果无影响(见表 2)。取正常人 EDTA 抗凝全血分成两份,一份在 -70 °C 和 37 °C 间反复冻融,镜下观察至全部溶血;另一份在 4 °C、2 000 g 离心力下离心,分离血浆。用血浆配制成 5%、10%、15%、30%、50% (v/v) 的溶血标本。按 1.2 节方法操作。每一浓度样品重复测定 3 次,见表 3。结果显示,10% 的溶血即可影响 Hcy 的测定,且 Hcy 测定结果随着溶血程度的增加而逐渐减小。

表 2 胆红素对 Hcy 浓度的影响($n=3$)

Table 2 Effect of bilirubin on the concentration of Hcy ($n=3$)

Added bilirubin / ($\mu\text{mol/L}$)	$c(\text{Hcy}) / (\mu\text{mol/L})$		1.96s
	$\bar{X}_T \pm \text{SD}$	$\bar{X}_T - \bar{X}_C$	
0	7.48 $\pm$ 0.25		0.586
20	8.03 $\pm$ 0.43	0.55	no effect
40	8.00 $\pm$ 0.19	0.52	no effect
80	7.44 $\pm$ 0.38	-0.04	no effect
160	7.59 $\pm$ 0.27	0.11	no effect
200	6.91 $\pm$ 0.14	-0.57	no effect
250	7.28 $\pm$ 0.12	-0.20	no effect
300	7.48 $\pm$ 0.35	0.00	no effect

s : the standard deviation of Hcy at middle concentration in intraday precision evaluation. $\bar{X}_C = 7.48 \mu\text{mol/L}$.

2.4 实际样品测定

应用本文建立的方法分别测定了 7 例高血压患者和 19 例健康志愿者血浆中 Hcy 的浓度,色谱图如图 2 所示。Hcy 测定结果在高血压组为(12.40 $\pm$

2.89) $\mu\text{mol/L}$,在年龄、性别与高血压匹配的健康对照组为(8.25 $\pm$ 2.53) $\mu\text{mol/L}$,在年龄为(29 $\pm$ 2) 岁的健康志愿者为(5.07 $\pm$ 0.93) $\mu\text{mol/L}$ 。高血压组的 Hcy 高于健康对照组,而健康对照组间平均年龄为(50 $\pm$ 7) 岁的高于平均年龄为(29 $\pm$ 2) 岁的。方差分析显示,三者间的差异具有统计学意义($p < 0.05$)。提示高血压患者的 Hcy 代谢发生了紊乱,且健康者不同年龄间 Hcy 也具有显著差异,因此在使用 Hcy 来对疾病进行诊断、治疗和预防时应建立相应年龄段的正常参考值范围。

表 3 溶血对 Hcy 浓度的影响($n=3$)

Table 3 Effect of hemolysis on the concentration of Hcy ($n=3$)

Hemolysis degree / %	$c(\text{Hcy}) / (\mu\text{mol/L})$		1.96s
	$\bar{X}_T \pm \text{SD}$	$\bar{X}_T - \bar{X}_C$	
0	9.79 $\pm$ 0.27		0.586
5	9.60 $\pm$ 0.33	-0.19	no effect
10	8.95 $\pm$ 0.38	-0.84	effect
15	8.95 $\pm$ 0.26	-0.84	effect
30	8.92 $\pm$ 0.42	-0.87	effect
50	7.69 $\pm$ 0.60	-2.10	effect

s : the standard deviation of Hcy at middle concentration in intraday precision evaluation. $\bar{X}_C = 9.79 \mu\text{mol/L}$.

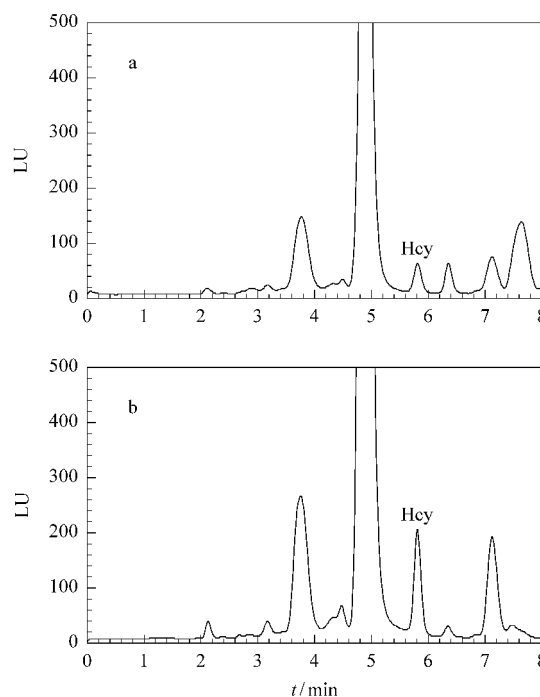


图 2 (a) 健康人血浆和 (b) 高血压患者血浆的色谱图

Fig. 2 Chromatograms of (a) the plasma of a healthy control and (b) the plasma of a patient with hypertension

3 结论

在参考文献的基础上在色谱流动相中添加了醋酸钠溶液,并采用梯度洗脱缩短了分析时间。样品

处理过程中去蛋白和衍生同时进行,减少了操作步骤。本方法简便,快捷,线性相关性好,准确度高,具有较高的实用价值,可用于血浆 Hcy 的科研和临床定量测定。

参考文献:

- [1] Castillo R F, de la Rosa R J E, Duran S R, et al. Int J Nephrol Urol, 2010, 2(4): 561
- [2] Herrmann W, Obeid R. Clin Chem Lab Med, 2011, 49(3): 435
- [3] Lian S G, Zheng W. Medical Journal of West China (练世刚, 郑薇. 西部医学), 2011, 23(12): 2351
- [4] Jakubowski H. J Physiol Pharmacol, 2008, 59(Suppl 9): 155
- [5] Sun C F, Haven T R, Wu T L, et al. Clin Chim Acta, 2002, 321: 55
- [6] Sigit J I, Hages M, Brensing K A, et al. Clin Chem Lab Med, 2001, 39(8): 681
- [7] Shipchandler M T, Moore E G. Clin Chem, 1995, 41(7): 991
- [8] Frantzen F, Faaren A L, Alfheim I, et al. Clin Chem, 1998, 44(2): 311
- [9] McMenamin M E, Himmelfarb J, Nolin T D. J Chromatogr B, 2009, 877: 3274
- [10] Kralikova M, Melounova J, Crha I, et al. J Assist Reprod Genet, 2011, 28: 863
- [11] Cevasco G, Piatek A M, Scapolla C, et al. J Chromatogr A, 2010, 1217: 2158
- [12] Krijt J, Vaeková M, Kožich V. Clin Chem, 2001, 47(10): 1821
- [13] Winters R A, Zukowski J, Ercal N, et al. Anal Biochem, 1995, 227: 14
- [14] Ercal N, Yang P, Aykin N. J Chromatogr B, 2001, 753: 287
- [15] Nurk E, Tell G S, Nygard O, et al. J Nutr, 2001, 131: 1214
- [16] Rasmussen K, Møller J, Lyngbak M. Clin Chem, 1999, 45(10): 1850