

· 论著 ·

小儿尿液中的新蝶呤及生物蝶呤检测方法优化*

陈雪静^{1,*} 韩 婷¹ 马艳茹¹ 徐 蕊¹ 姜盼盼² 黄嘉雯³

1. 内蒙古巴彦淖尔市临河区妇幼保健院 (内蒙古 巴彦淖尔市 015000)

2. 深圳罕见病代谢组学精准医学工程研究中心 (广东 深圳 518107)

3. 深圳爱湾医学检验实验室 (广东 深圳 518107)

【摘要】目的 基于高效液相色谱法(HPLC)同时检测小儿尿液中新蝶呤(N, CAS No:2009-64-5)和生物蝶呤(B, CAS:22150-76-1)的含量并探究KI-I氧化的条件。**方法** 采用KI-I2法氧化原型新蝶呤及生物蝶呤,在激发波长为350 nm,发射波长460 nm下使用HPLC进行检测,其中色谱柱选用Kromasil EternityXT C18(4.6*250mm, 5 μ m),流动相为甲醇:水(10:90)。**结果** 新蝶呤及生物蝶呤的线性均在0.9999以上,检测范围为新蝶呤:0.00625mg/mL~1.0mg/mL,生物蝶呤:0.00675 mg/mL~1.08 mg/mL,加标回收率在92.18%~98.24%。氧化过程中,普通实验室的光照对实验无明显的影响,氧化前不酸化尿液会造成测量的N、B值减小。**结论** 使用优化方法检测小儿尿液中的新蝶呤、生物蝶呤与尿肌酐的含量比值,并通过计算B%(百分比),有助于高苯丙氨酸的鉴别分型,对患儿的治疗及预防发病具有重要意义。

【关键词】 高效液相色谱法; 新蝶呤; 生物蝶呤**【中图分类号】** R744**【文献标识码】** A**【基金项目】** 深圳市科技创新委员会基础研究学科布局项目(JCYJ20180507183428877), 深圳市工程研究中心(工程实验室)组建项目(F-2020-Z99-502615)

DOI:10.3969/j.issn.1009-3257.2023.02.041

Optimization of Detection Methods for Neopterin and Biopterin in Children's Urine

CHEN Xue-jing^{1,*}, HAN Ting¹, MA Yan-ru¹, XU Rui¹, JIANG Pan-pan², HUANG Jia-wen³.

1. Maternal and Child Health Hospital of Linhe District, Bayannur City 015000, Inner Mongolia, China

2. Shenzhen Rare Disease Engineering Research Center of Metabolomics in Precision Medicine, Shenzhen 518107, Guangdong Province, China

3. Shenzhen Aone Medical Laboratory, Shenzhen 518107, Guangdong Province, China

Abstract: Objective The content of neopterin (N) and biopterin (B) in children's urine was simultaneously detected by High Performance Liquid Chromatography, and the conditions of KI-I oxidation were investigated at the same time. **Methods** The prototype neopterin and biopterin were oxidized by KI-I2 method and detected at excitation wavelength 350nm and emission wavelength 460nm. The column was selected Kromasil EternityXT C18 (4.6*250mm, 5 μ m), and the mobile phase was methanol: water (10:90). **Results** The linearity of neopterin and biopterin was above 0.9999. The detection range was 0.00625mg/mL~1.0mg/mL for neopterin and 0.00675mg/mL~1.08mg/mL for biopterin. The recovery rate was 92.18%-98.24%. The light of the general laboratory has no obvious effect on the experiment during the oxidation process, and the measured N and B values will be reduced if the urine is not acidified before oxidation. **Conclusion** Using this method to detect the content ratio of neopterin, biopterin and urinary creatinine in children, and by calculating B%. It is helpful to identify the type of hyperphenylalanine. This method is accurate and feasible, which is of great significance for differentiating the classification of hyperphenylalaninemia and for the treatment and prevention of disease onset in children.

Keyword: High Performance Liquid Chromatography; Neopterin; Biopterin

苯丙酮尿症(HPA)是一种常染色体隐性遗传病,主要是由于苯丙氨酸羟化酶(PAH)及其辅酶四氢蝶呤(BH4)缺乏导致,前者缺失称之为经典型PKU,后者的缺失为四氢蝶呤缺乏症(BH4D)^[1]。6-丙酮酰四氢蝶呤合成酶(PTPS)缺失是导致四氢蝶呤缺乏症的主要原因,约占BH4D的60%^[2]。尿中新蝶呤、生物蝶呤及生物蝶呤的百分比是诊断6-丙酮酰四氢蝶呤合成酶是否缺失的关键指标^[3]。目前尿液前处理方法主要有两种,一是用酸性碘化钾将还原态的BH4、BH2氧化为N和B,二是用MnO₂进行氧化^[4-5]。本文主要用酸性碘化钾进行氧化,该方法操作简单,具有高灵敏度,高准确度,适用于检测小儿尿液中的新蝶呤和生物蝶呤。

1 实验

1.1 仪器试剂 仪器: 岛津LC-20A配合荧光检测器(日本SHIMADZU公司); RL-821型旋涡振荡混合器(北京八方世纪科技有限公司); 1730QT型超声波清洗器(北京科玺世纪科技有限公司); Dragonlab移液枪(可调范围: 20~200 μ L、100~1000 μ L, EPPENDORF 中国有限公司); AUX320岛津分析天平(日本SHIMADZU公司)。

试剂: 新蝶呤标准品(CAS No:2009-64-5)、生物蝶呤标准品(CAS:22150-76-1)、氢氧化钠(分析纯,天津致远化学试剂有限公司); 盐酸(优级纯,湖南凯信公司); 碘化钾(上海安谱实验科技有限

公司); 碘单质(上海安谱实验科技有限公司); 抗坏血酸(永华化学科技(江苏)有限公司); 实验用水使用Milli-Q纯水系统(美国Milli-pore公司)制备。

1.2 色谱条件 色谱柱: Kromasil EternityXT C18色谱柱(4.6mm*250mm, 5 μ m); 流动相: 甲醇:水(10:90); 流速: 1.0~4.0 min, 总流速为0.6mL/min; 4.01~11.0min, 总流速为1.0mL/min; 11.01~20min, 总流速为0.6mL/min; 检测器: 激发波长350nm, 发射波长460nm; 柱温: 22 $^{\circ}$ C; 进样量: 20 μ L。

1.3 溶液配制 0.1mol/L NaOH溶液: 准确称量0.100g氢氧化钠固体于烧杯中, 溶解后转移至25 mL容量瓶, 混匀配成0.1mol/L溶液。6.0mol/L HCl溶液: 准确吸取10mL盐酸(体积分数是36.0%~38.0%), 用超纯水定容至20mL, 混匀配制成6.0mol/L溶液。0.1mol/L盐酸: 取200 μ L 6mol/L盐酸溶液加水定容到12 mL, 0.05mol/L I₂-KI溶液: 将2.6g KI溶解于50mL水中, 然后加入0.325g I₂单质充分溶解。0.05 mol/L抗坏血酸: 称取0.44g固体粉末溶解于50mL水中。

标准溶液的配制: 分别精密称取新蝶呤对照品10mg, 生物蝶呤对照品5mg于25mL容量瓶中, 用0.1mol/L氢氧化钠溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得到400 μ g/mL的新蝶呤储备液和200 μ g/mL的生物蝶呤储备液, 置-4 $^{\circ}$ C的冰箱保存。取一定量的新蝶呤和生物蝶呤配制成混合标准液(新蝶呤16.0 μ g/mL, 生物蝶呤17.28 μ g/mL)。

【第一作者】陈雪静, 女, 副主任检验师, 主要研究方向: 临床细胞与分子遗传。E-mail: chenxuejing_lh@163.com

【通讯作者】

1.4 实验方法

1.4.1 标准曲线的绘制 将1.3中混合的标准溶液，按照等比例稀释方式，用0.1 mol/L盐酸稀释成以下浓度：新蝶呤：1.0，0.5，0.2，0.1，0.05，0.025，0.0125，0.00625 $\mu\text{g/mL}$ ；生物蝶呤：1.08，0.54，0.216，0.108，0.054，0.027，0.0135，0.00675 $\mu\text{g/mL}$ 。依次进样，以峰面积对浓度做线性回归方程，分别得到新蝶呤和生物蝶呤的标准曲线。

1.4.2 样品的预处理 取原尿样品1mL，置于10mL试管中，加入6mol/L盐酸75 μL ，使pH为1~2，加入0.05mol/L I₂-KI溶液1mL，暗处室温放置30min，滴加0.05mol/L抗坏血酸还原液1mL，用水定容至5mL，摇匀，过微孔滤器，取20 μL 进样分析。

2 结果

2.1 线性范围与检出限 按照1.4.1配制标准曲线，新蝶呤在0.00625-1.00 $\mu\text{g/mL}$ 内线性良好，线性回归方程为： $Y=1 \times 10^{-7} X - 40274$ ，相关系数： $r=0.9999$ ；生物蝶呤在0.00675-1.08 $\mu\text{g/mL}$ 内线性良好，线性回归方程为： $Y=1 \times 10^{-7} X - 58688$ ，相关系数： $r=0.9999$ 。

2.2 回收率

2.2.1 批内精密 加入一定体积及浓度的混标，使新蝶呤的浓度分别

为0.0125，0.1，0.5 $\mu\text{g/mL}$ ，生物蝶呤的浓度分别为0.0135，0.108，0.54 $\mu\text{g/mL}$ ，探究样品在3个浓度下的批内精密度。由表1可见，新蝶呤和生物蝶呤的批内精密度在94.35%~101.96%， $RSD < 6\%$ 。

2.2.2 批间精密度 加入一定体积及浓度的混标，使新蝶呤的浓度分别为0.0125，0.1，0.5 $\mu\text{g/mL}$ ，生物蝶呤的浓度分别为0.0135，0.108，0.54 $\mu\text{g/mL}$ ，连续测试4day，考察批间精密度。

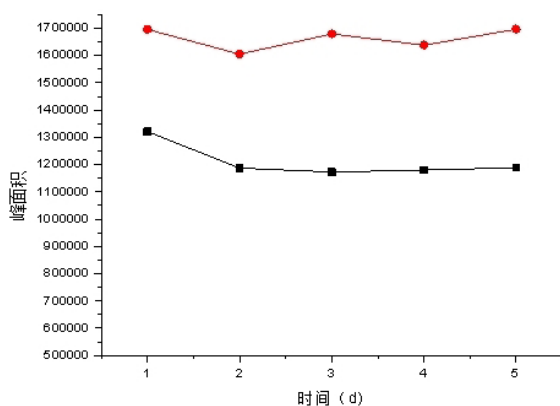
2.3 样品的稳定性 按照样品前处理方法平行处理3份样本，置于15℃保存，连续进样5day，探究样品的稳定性。样品的稳定性结果如图1，新蝶呤和生物蝶呤峰面积随放置时间延长而下降，且这种下降关系并不是同步的。因此，当天处理的样本最好在当天完成目标物测定。

表1 新蝶呤和生物蝶呤批内精密度(n=3)

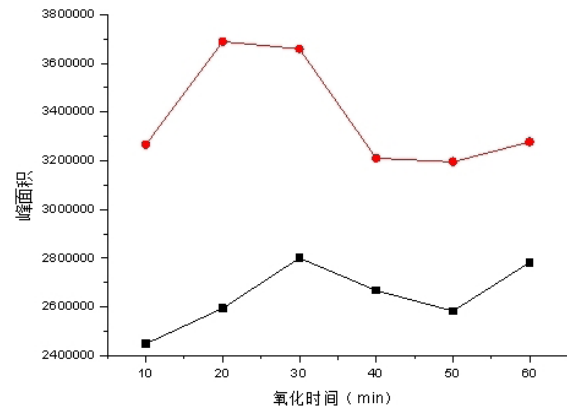
	加标浓度($\mu\text{g/mL}$)	测得浓度($\mu\text{g/mL}$)			平均浓度($\mu\text{g/mL}$)	回收率(%)	RSD(%)
		1	2	3			
新蝶呤	0.0125	0.725	0.715	0.77	0.737	101.96	3.98
	0.1	0.815	0.810	0.785	0.803	99.18	2.00
	0.5	1.155	1.120	1.150	1.142	94.35	1.66
生物蝶呤	0.0135	0.765	0.795	0.825	0.795	98.74	3.77
	0.108	0.815	0.890	0.895	0.867	96.33	5.17
	0.54	1.330	1.280	1.200	1.270	95.37	5.16

表2 新蝶呤和生物蝶呤批间精密度(n=3)

	加标浓度($\mu\text{g/mL}$)	测得浓度($\mu\text{g/mL}$)				平均浓度($\mu\text{g/mL}$)	RSD(%)	回收率(%)
		第1天	第2天	第3天	第4天			
新蝶呤	0	0.775	0.710	0.760	0.715	0.740	4.38	—
	0.0125	0.755	0.737	0.722	0.693	0.727	3.61	96.61
	0.1	0.800	0.803	0.777	0.807	0.797	1.69	94.88
	0.5	1.165	1.142	1.118	1.145	1.143	1.69	92.18
生物蝶呤	0	0.815	0.792	0.800	0.793	0.800	1.33	—
	0.0135	0.800	0.795	0.807	0.787	0.797	1.06	97.97
	0.108	0.932	0.867	0.930	0.840	0.892	5.17	98.24
	0.54	1.348	1.270	1.278	1.268	1.291	2.96	96.34



1



2

图1 样品稳定性的探究(a为新蝶呤，b为生物蝶呤)。图2 峰面积随氧化时间变化情况(a为新蝶呤，b为生物蝶呤)。

3 讨论

3.1 液相方法的选择优化

3.1.1 流速的选择与优化 分别使用不同的流速进样探究最优方式。方法包括：恒流速0.6mL/min、0.7mL/min、0.8mL/min、0.9mL/min、1.0mL/min；变流速(流速为0.6mL/min，出峰位

置流速为1.0mL/min)。比较各方法谱图显示采用变流速的方法进样，新蝶呤和生物蝶呤出峰效果最佳。

3.1.2 柱温的选择与优化 样品中目标物与杂质的分离度对物质的定量分析有很大影响。柱温影响分离度，故探究柱温对样品分离情况影响。方法包括：通过选择不同温度条件进行探究，对比各谱图

中目标峰与杂质峰分离情况。发现在22℃时,样品中的新蝶呤及生物蝶呤与杂质峰能达到最好的分离效果,故柱温选择22℃。

3.2 样品前处理条件优化

3.2.1 前处理方法的比较 尿液中的成分相对复杂,实验中为了确保准确性,对尿液进行两种前处理:(1)取原尿样品1mL,置于10mL试管中,加入6mol/L盐酸75μL,使pH为1~2,加入0.05mol/L I₂-KI溶液1mL,暗处室温放置30min,滴加0.05mol/L抗坏血酸还原液1mL,用水定容至5mL,摇匀,过微孔滤器,取20μL进样分析。(2)取原尿样品500μL,加入50μL 1mol/L HCl,再加入10mg MnO₂,离心过滤,测肌酐浓度,并以0.1mol/L HCl稀释,使肌酐浓度在20-30mg/L,取20μL进样分析。结果:与方法(2)相比,方法(1)的峰分离度较好、回收率高,且操作比较简单,故采用方法(1)进行样本前处理。

3.2.2 氧化时间的选择 实验探究 10min、20min、30min、40min、50min、60min的氧化时间对检测新蝶呤和生物蝶呤的影响。结果如图2,发现较其他时间相比,氧化时间在30min时,新蝶呤和生物蝶呤峰面积较大,氧化比较完全。

3.2.3 酸性的影响 新蝶呤和生物蝶呤通常以氧化态和还原态的形式存在,在酸性环境中比较稳定^[6-7],Slazyk等^[8]等报道,生物蝶呤在酸性条件下回收率会升高。故探究实验中加盐酸与不加盐酸对两种蝶呤的影响。对照组正常加入6mol/L的盐酸对尿液进行酸化,再进行氧化;而实验组则不加盐酸,直接进行氧化,结果显示,与加入了盐酸的对照组相比,未加盐酸条件下的新蝶呤和生物蝶呤含量降低一半左右。

3.2.4 光照的影响 新蝶呤、生物蝶呤在光照条件下易分解,孟英韬等^[9]提出,取新蝶呤、生物蝶呤等样品混合液,用正午太阳光光照30 min,新蝶呤、生物蝶呤全消失,且新蝶呤前出现一大峰。为防止实验中光照对尿蝶呤中新蝶呤和生物蝶呤含量的影响。把实验分为两组,实验组放在实验室强光的地方氧化,对照组放置暗处氧化,测过结果显示两组测得的新蝶呤和生物蝶呤无明显的差异。故普通的实验光照对本实验无明显的影响。

4 结 论

本文建立了高效液相色谱-荧光检测法同时测定以尿滤纸片形式为检测样本中新蝶呤和生物蝶呤的含量,并通过分别计算新蝶呤、生物蝶呤与尿肌酐的浓度比值,以及B%,可有效的鉴别出BH4缺乏症患者。基于优化色谱条件和实验条件,该方法灵敏度高、选择性强、分析时间短,且稳定性、精密度和加标回收率都符合分析要求;此外,本实验的检测样本相对于原尿液来说,运输更方便,保存时间更长,制作简单,前处理简便,结果较好,可在短时间内测定大批量样品,适用于临床检测,为尿蝶呤谱分析提供了新的检测方法,形成一套能够在临床上应用的标准操作流程,对鉴别HPA分型和患儿的治疗及预防发病具有重要意义。

参考文献

- [1] 白波,沈明,张相林,等. 高效液相色谱法-荧光检测法在小儿尿蝶呤分析中的新应用[J]. 药物分析杂志, 2007, 27 (7): 1033-1038.
- [2] 沈明,喻唯民,杨凌,等. 四氢蝶呤缺乏症的临床研究[J]. 中日友好医院学报, 2002, 16 (1): 8-10.
- [3] 叶军,邱文娟,韩连书,等. 四氢生物蝶呤缺乏症鉴别诊断的进展及发病率调查[J]. 中国预防医学杂志, 2009, 42 (2): 128-132.
- [4] 崔盼盼,万益群. 高效液相色谱法-荧光检测器法同时测定人体尿液中的多种蝶呤类化合物[J]. 分析科学学报, 2011, 27 (1): 21-25.
- [5] 付桂香,白波,沈明,等. HPLC法在小儿尿蝶呤和生物蝶呤检测中的应用[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30 (2): 164-168.
- [6] 张名均,丁世家,易刚. 高效液相色谱法同时测定尿中新蝶呤和生物蝶呤[J]. 色谱, 2004, 4 (22): 416-419.
- [7] Yokoyama K, Tajima M, Yoshida, et al. Nephrol Dial Transplant, 2002, 3 (2): 1032.
- [8] Slazyk W E, Spierto F W. Liquid-chromatographic measurement of biopterin and neopterin in serum and urine[J]. Clin Chem, 1990, 36 (7): 1364.
- [9] 孟英韬,宋力,单忠敏,等. 反相HPLC测定尿样蝶呤物质的研究[C]//第十二次全国色谱学术报告会论文集, 1999: 23-24.

(收稿日期: 2022-10-22)

(校对编辑: 何镇喜)

(上接第 75 页)

参考文献

- [1] 刘雪来,王文博,杨晓峰,等. 水分离腹壁缝合器辅助单孔腹腔镜腹股沟斜疝内环结扎术[J]. 中国微创外科杂志, 2019, 19 (5): 415-417.
- [2] 徐晓青,杨广承. 单孔腹腔镜下应用小儿活动拉钩与下腹壁小切口治疗小儿腹股沟斜疝疗效及并发症比较[J]. 河北医学, 2019, 25 (11): 1843-1846.
- [3] 曹海波,刘振勇,邱宇. 日间模式下单孔完全腹膜外高位结扎治疗小儿腹股沟斜疝 127例[J]. 中国现代普通外科进展, 2019, 22 (11): 902-904.
- [4] 张静,翟佳琪,尚培中等. 二步法腹壁穿刺行腹腔镜手术与开放手术治疗小儿腹股沟斜疝对比分析[J]. 河北北方学院学报: 自然科学版, 2020, 36 (12): 10-13, 17.
- [5] 倪博然,赵进喜,黄为钧,等. 基于视觉模拟评分法探究中医临床疗效评价新方法[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36 (1): 288-292.
- [6] 李伟,孔维杰,邢冰琛,等. 腹股沟斜疝患者行腹腔镜经腹膜外修补术学习曲线分析[J]. 临床和实验医学杂志, 2021, 20 (12): 1279-1282.

- [7] 高鹏,刘雪来,张旭光,等. 开放和腹腔镜下经皮腹膜外疝环闭合术治疗儿童腹股沟斜疝对肠黏膜屏障功能的影响[J]. 中国微创外科杂志, 2019, 19 (9): 830-833.
- [8] 李珂,张铤,段守兴,等. 快速康复外科护理在小儿腹股沟斜疝围手术期中管理的应用[J]. 护理管理杂志, 2019, 19 (11): 824-827.
- [9] 曹志清,石俊,童璐,等. 腹腔镜与开腹手术治疗新生儿嵌顿性腹股沟斜疝的比较[J]. 中国微创外科杂志, 2019, 19 (12): 1079-1083.
- [10] 李凯江,张凌志. 腹腔镜手术治疗小儿腹股沟疝的效果及并发症发生率调查分析[J]. 临床研究, 2021, 29 (10): 84-86.

(收稿日期: 2022-07-08)

(校对编辑: 朱丹丹)