

多羟基化合物化学发光分析新体系的研究 ——尿液中尿酸的测定

封满良 黄玉文 章竹君*

(陕西师范大学化学系 西安 710062)

摘要 本文首次提出使用 luminol- $K_7[Cu(IO_6)_2]$ -KOH 化学发光体系,结合流动注射技术进行多羟基化合物的测定.方法基于多羟基化合物能增强 luminol 与 $K_7[Cu(IO_6)_2]$ 反应产生的化学发光,且浓度与增强作用的大小呈线性关系.利用该法进行尿酸的测定,发现尿酸在 $2 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-6}$ g/mL 浓度范围内与化学发光强度呈线性关系,检出限为 7.2×10^{-9} g/mL,相对标准偏差为 2.04%.

关键词 流动注射,化学发光,尿酸,二高碘酸合铜(III)酸钾

尿酸为体内核酸中嘌呤的代谢终产物,其含量与体内核酸的分解代谢速度、肾的排泄功能和食物中核酸的含量有关,血中或尿中尿酸含量的升高可作为诊断痛风病、慢性白血病、多发性骨髓瘤、真性红细胞增多症等疾病的主要指标^[1].已报道的测定尿酸的主要方法有酶分析法^[2,3]、分光光度法^[4]、荧光法^[5]、电化学分析法^[6]、色谱法^[7]和动力学分析法^[8]等,近几年来,化学发光检测手段与流动注射技术相结合,以其简便快速、灵敏度高的优势进入临床分析领域,并得到了迅猛的发展.用这种方法测定尿酸也有报道^[9,10].本文提出一种新的化学发光体系,即 luminol- $K_7[Cu(IO_6)_2]$ -KOH 化学发光体系,结合流动注射技术用于测定低浓度的尿酸.该法不仅成本低廉、试剂消耗少,而且简单快速、灵敏度高,为尿酸的测定提供了一种新的思路.

1 实验

1.1 仪器与试剂

ND-15 交流可逆电动机(上海仪表电机厂),六通阀,化学发光检测仪(自制),XWT-204 台式记录仪.由上述各部件组成流动注射化学发光分析仪,其结构原理见图 1. LS-50 发光光度计(美国 PE 公司).

luminol(Sigma)储备液 2.5×10^{-2} mol/L,用 0.1 mol/L NaOH 溶液配制; $K_7[Cu(IO_6)_2]$ 储备液 0.01 mol/L;尿酸标准液 1×10^{-3} g/mL;KOH 储备液 2 mol/L.实验所用试剂均为分析纯,水为去离子水.

1.2 实验方法

1.2.1 $K_7[Cu(IO_6)_2]$ 的合成及标定^[11] 称取 0.23g 高碘酸钾、0.125g 五水合硫酸铜、0.14g 过二硫酸钾、0.8g 氢氧化钾与 30mL 水共煮沸至得澄清的棕色溶液,冷却并稀释至 50mL.取

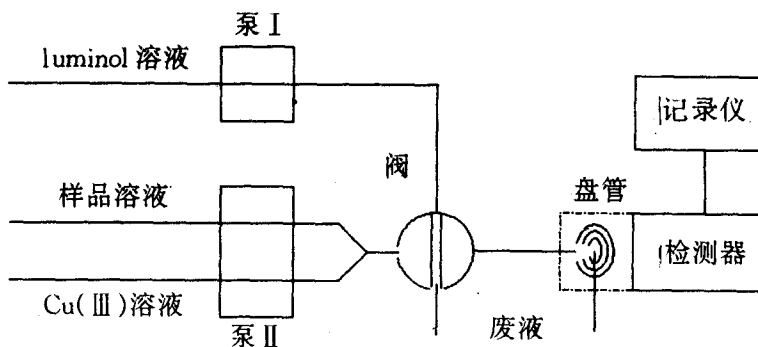


图1 化学发光分析仪简图

0.30mL 0.1%的葡萄糖溶液于锥形瓶中,加入 30mL 水与三粒纯氢氧化钾,从微量滴定管中用上述 $K_7[Cu(IO_6)_2]$ 溶液滴定至绿色能稳定 1min 以上。

1.2.2 化学发光测定 开启仪器,预热至数字显示稳定,启动蠕动泵 I, II, $K_7[Cu(IO_6)_2]$ 与样品溶液或水被泵 II 泵入且混合后进入六通阀作为载流,泵 I 将发光试剂 luminol 泵入六通阀后停泵,待载流稳定流动 1min 后转动六通阀,将 luminol 定量注入载流溶液中并被携带至透明的反应盘管,记录产生的化学发光强度值。每次测定样品前都要先测定空白值,信号值与空白值的差值作为发光强度信号(I_{CL})。

2 结果与讨论

2.1 化学发光光谱与化学发光的机理

在 LS-50 上测定该体系的化学发光光谱,发现单纯 $K_7[Cu(IO_6)_2]$ 同 luminol 反应的化学发光光谱及 $K_7[Cu(IO_6)_2]$ - 尿酸混合物同 luminol 反应的化学发光光谱的最大发射波长均在 425nm(图 2)。加入不同浓度的尿酸溶液后,峰值有不同程度的升高,但最大发射波长不变。说明发光是由 $K_7[Cu(IO_6)_2]$ 氧化 luminol 所生成的激发态 3-氨基邻苯二甲酸根离子回到基态时产生的。向 $K_7[Cu(IO_6)_2]$ - luminol 中加入 Cu^{2+} 离子,发光信号明显增强,说明尿酸对化学发光的增强作用可能缘于它与 $K_7[Cu(IO_6)_2]$ 反应产生了 Cu^{2+} 离子。luminol 与 $K_7[Cu(IO_6)_2]$ 反应虽也可产生 Cu^{2+} 离子,但在形成 Cu^{2+} 的同时消耗了一部分 luminol,而当有尿酸存在时,尿酸先与 $K_7[Cu(IO_6)_2]$ 反应产生 Cu^{2+} ,此混合物与 luminol 混合时,由于 Cu^{2+} 的催化作用,使化学发光强度增强。尿酸量越多产生的 Cu^{2+} 也越多,化学发光强度就越强。

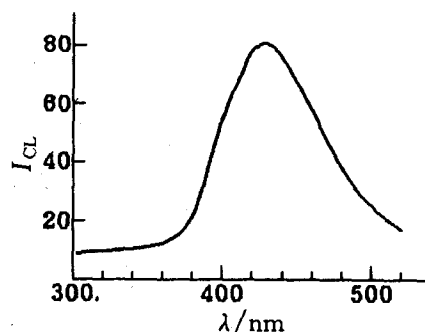


图2 化学发光光谱

2.2 注入试剂的选择

从实验可知 luminol 与 $K_7[Cu(IO_6)_2]$ 反应产生化学发光,尿酸能增强产生的化学发光强度,但尿酸单独与任何一种反应试剂混合均不产生发光信号。若采用传统的流动注射技术,以两种反应试剂的混合液作为载流而注入被测样品,基线不稳定,势必会影响灵敏度和精密性。若注入一种反应试剂,而把样品与另一反应试剂的混合溶液作为载流,则不仅解决了上述问

题,还可以节省试剂,提高灵敏度.我们分别把 luminol, $K_7[Cu(IO_6)_2]$ 作为注入试剂,试验不同的注入试剂对发光强度的影响,发现注入 luminol 效果较好.

2.3 介质浓度的影响

由于钠离子与 $[Cu(IO_6)_2]^{7-}$ 能生成沉淀,故 KOH 是此体系较为适宜的缓冲介质.实验采取固定 $K_7[Cu(IO_6)_2]$ 工作液中 KOH 的量 (0.04mol/L),同步改变 luminol 和样品溶液中 KOH 的加入量,来考察 KOH 浓度对化学发光强度的影响,并将这种方法选出的 KOH 浓度作为本体系的最适介质浓度.

从图 3 可知,在 KOH 浓度为 0.08mol/L 时发光强度值最大,大于这一浓度时发光强度开始下降,KOH 浓度大于 0.1mol/L 后虽然信号变化减小但空白值增强,信噪比下降,测定精密度较差,所以选择 0.08mol/L 的 KOH 作为介质.

2.4 luminol 浓度的影响

luminol 作为发光试剂,它的浓度对化学发光强度有着很大的影响.当固定尿酸浓度为 $1 \times 10^{-6}\text{g/mL}$ 时,考察了 luminol 浓度对化学发光反应的影响.结果显示随着 luminol 浓度的增大,空白值和信号值也增大.当 luminol 浓度在大于 $2 \times 10^{-5}\text{mol/L}$ 后,发光强度的增长趋势减缓.从节约试剂、保持空白适中考虑,我们选择 luminol 浓度为 $2 \times 10^{-5}\text{mol/L}$.

2.5 $K_7[Cu(IO_6)_2]$ 浓度的影响

$K_7[Cu(IO_6)_2]$ 的浓度不仅影响发光强度,同时也影响校准曲线,为了综合考察其影响,在固定尿酸浓度为 2×10^{-7} 和 $1 \times 10^{-6}\text{mol/L}$ 时,分别考察 $K_7[Cu(IO_6)_2]$ 对本体系化学发光强度的影响,结果如图 4 所示.

从图 4 可以看出,在高样品浓度时发光强度随 $[Cu(IO_6)_2]^{7-}$ 离子浓度的增大而增大,在 $[Cu(IO_6)_2]^{7-}$ 离子浓度大于 $4 \times 10^{-4}\text{mol/L}$ 之后增长减缓;在低样品浓度时,当 $[Cu(IO_6)_2]^{7-}$ 离子浓度大于 $4 \times 10^{-4}\text{mol/L}$ 后,分析信号逐渐降低.这说明尿酸与 $K_7[Cu(IO_6)_2]$ 发生了反应,在 $K_7[Cu(IO_6)_2]$ 浓度较低时,随着 $K_7[Cu(IO_6)_2]$ 浓度升高,它与尿酸反应产生的 Cu^{2+} 浓度也升高,同时,为下一步与 luminol 反应保留的 $K_7[Cu(IO_6)_2]$ 的量也升高,因此化学发光强度逐渐升高,当 $K_7[Cu(IO_6)_2]$ 浓度升高到一定程度后,再增加其浓度也不会增加体系中 Cu^{2+} 的量,而高浓度的 $K_7[Cu(IO_6)_2]$ 又对化学发光产生自吸收,故化学发光强度的增加趋缓,甚至降低.据此选择 $K_7[Cu(IO_6)_2]$ 浓度为 $4 \times 10^{-4}\text{mol/L}$.

2.6 $K_7[Cu(IO_6)_2]$ 的稳定性

游离的三价铜离子通常不稳定,而它与阴离子形成的配合物较稳定.在实验过程中发现

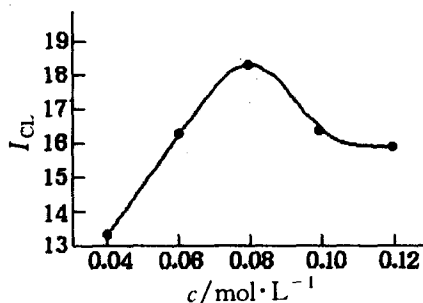


图 3 KOH 浓度影响曲线

luminol: $2 \times 10^{-5}\text{mol/L}$,
 $K_7[Cu(IO_6)_2]$: $4 \times 10^{-4}\text{mol/L}$

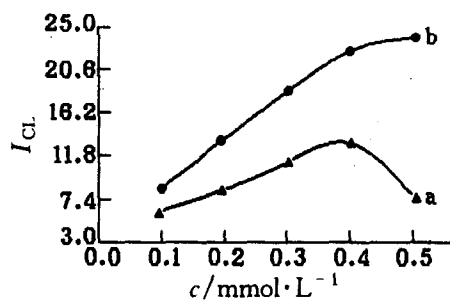


图 4 $K_7[Cu(IO_6)_2]$ 的浓度影响曲线

luminol: $2 \times 10^{-5}\text{mol/L}$, KOH: 0.08mol/L ,
 尿酸浓度: a— $2 \times 10^{-7}\text{mol/L}$, b— $1 \times 10^{-6}\text{mol/L}$

$[\text{Cu}(\text{IO}_6)_2]^{7-}$ 离子浓度较小时, 它的稳定性较差, 发光强度随试液放置时间的延长而降低. 而在较高浓度时它较为稳定. 在 luminol 浓度为 $2 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$, 尿酸标准液浓度为 $1 \times 10^{-6} \text{ g/mL}$, 介质 KOH 浓度为 0.08 mol/L 时, 以发光强度为依据考察了 $\text{K}_7[\text{Cu}(\text{IO}_6)_2]$ 浓度在 $4 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ 时的稳定性, 发现发光强度在 2h 内大致保持不变, 基本上能满足分析的要求.

2.7 干扰

在尿酸标准液浓度为 $1 \times 10^{-6} \text{ g/mL}$ 时进行了干扰的测定, 发现 100 倍的 Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Ce^{4+} 不干扰; Cu^{2+} 产生正干扰, 且随着 Cu^{2+} 浓度的增大干扰也越大; Cr^{3+} 产生正干扰, Co^{2+} 产生负干扰, 但改变 Cr^{3+} 和 Co^{2+} 的浓度, 影响程度几乎一样; 同数量级的抗坏血酸有很强的正干扰, 在实验过程中可用 Fe^{3+} 消除; 一些多胺类亦产生负干扰.

2.8 工作曲线

在不同浓度数量级分别绘制工作曲线, 发现尿酸浓度在 $2 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-6} \text{ g/mL}$ 范围内与化学发光强度呈线性关系, 分别进行线性回归, 结果如表 1.

表 1 校准曲线表

浓度范围(g/mL)	校准曲线	相关系数(%)
$2 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-7}$	$y = -0.310 + 1.53x$	99.8
$1 \times 10^{-7} \sim 1 \times 10^{-6}$	$y = 18.8 + 2.68x$	99.5

11 次空白测定后得相对标准偏差为 2.04%, 检出限为 $7.2 \times 10^{-9} \text{ g/mL}$. 由于尿酸浓度超过 $1 \times 10^{-6} \text{ g/mL}$ 化学发光强度随尿酸浓度增加反而降低, 因此对未知样品, 最好用稀释法以确定其中尿酸含量是否在本法测定的范围.

2.9 样品的测定

取三份人尿样品各 1mL, 加入 Fe^{3+} 1mL 以消除抗坏血酸的干扰, 加水稀释至 10mL, 放置 10min 后用上述方法进行测定, 同时作回收实验, 结果如表 2 所示:

表 2 样品测定结果

样品号	测得值 1 ($\mu\text{g}/10\text{mL}$)	加标量 ($\mu\text{g}/10\text{mL}$)	测得值 2 ($\mu\text{g}/10\text{mL}$)	回收率 (%)	相对标准偏差 ($n=3$)
1	7.73	1.00	8.35	92	1.26%
2	8.26	1.00	9.40	105	0.86%
3	6.78	1.00	7.80	102	1.44%

加标量为在样品中加入尿酸的量; 测得值 1 为加入标准前测得样品中尿酸的量; 测得值 2 为加入标准后测得的尿酸总量.

参考文献

- 1 朱忠勇,“临床医学检验”,上海科学技术出版社,上海,1977,第308页.
- 2 M. A. Arnold, *Anal. Chem.*, **1992**, 64(21), 1015A.
- 3 J. Janata, *Anal. Chem.*, **1992**, 64(19), 921A.
- 4 T. M. C. C. Filisetti - Cozzi, N. C. Carpita, *Anal. Biochem.*, **1991**, 197(1), 157.
- 5 M. Suzuki, M. Takayanagi, T. Yashiro, *Chem. Pharm. Bull.*, **1991**, 39(10), 2745.
- 6 G. Park, R. N. Adams, W. R. White, *Anal. Lett.*, **1972**, 5, 887.
- 7 Suellen. P. Ferraris, H. Lew, N. M. Elsayed, *Anal. Biochem.*, **1991**, 195(1), 116.
- 8 F. J. Manuel de Villena Rueda, R. Perez Perez, L. M. Polo Diez, *An. Quim.*, **1990**, 86(3), 271.
- 9 杨敏丽,吕九如,章竹君,分析试验室, **1993**, 12(1), 100.
- 10 K. Nakachima, N. Hayasid, S. Kawaguchi, *Anal. Sci.*, **1991**, 7(5), 715.
- 11 I. M. Kolthoff, R. Belcher 著,梁树权译,“容量分析”(卷三),科学出版社,北京,1963,第598页.

New Chemiluminescence
Reaction System for Analysis of Polyhydroxy - compounds
—— Determination of Uric Acid in Urine

FENG Man - Liang HUANG Yu - Wen ZHANG Zhu - Jun*
(Department of Chemistry, Shanxi Normal University, Xi'an, 710062)

Abstract A novel flow injection chemiluminescence method for the determination of polyhydroxy - compounds was described. The method is based on that polyhydroxy - compounds enhance the CL reaction of luminol with $K_7[Cu(IO_6)_2]$ in potassium hydroxide medium. In the experiments, luminescent reagent——luminol was injected in order to keep the baseline steady and save reagents, especially, to improve sensitivity. The method was used in measuring uric acid in urine and it allows quantitation of uric acid concentration in the $2 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-6} \text{g/mL}$ range with a detection limit of $7.2 \times 10^{-9} \text{g/mL}$. RSD=2.04%.