

大鼠血清尿酸液相色谱-紫外检测新方法的建立及比较研究

夏子茵¹, 柴媛媛¹, 徐云霞¹, 俞沁玮¹, 黄鑫¹, 张陆勇^{1,2}, 江振洲¹

(1. 中国药科大学新药筛选中心, 江苏省药效研究与评价服务中心, 多靶标天然药物全国重点实验室, 南京 210009;

2. 广东药科大学新药研发中心, 广州 510006)

[摘要] 目的 建立更准确、灵敏的液相色谱紫外 (liquid chromatography-ultraviolet, LC-UV) 检测大鼠血清尿酸的方法, 并将该方法与市售试剂盒的检测结果进行比较, 为氧嗪酸钾诱导的大鼠高尿酸血症模型中血清尿酸含量的准确测定提供新方法。**方法** 采用向 SPF 级雄性 SD 大鼠腹腔注射氧嗪酸钾 (300 mg/kg) 的方法建立高尿酸血症大鼠模型, 对照组给予等量的 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液。经眼眶后静脉丛采血, 离心获得大鼠血清样品, 经 0.1% 三氟乙酸-乙腈 (含内标 3, 4-二羟基苄胺氢溴酸盐) 沉淀后, 取上清液进样分析。采用 Waters XBridge HILIC 色谱柱 (150 mm×4.6 mm, 3.5 μm) 对尿酸进行分离, 使用乙腈 (含 0.5% 甲酸与 2 mmol/L 甲酸铵) 作为有机相, 甲醇溶液 (甲醇:水=1:1, 含 0.5% 甲酸与 2 mmol/L 甲酸铵) 作为水相, 进行等度洗脱, 于 290 nm 波长处进行检测。使用活性炭处理的血清样品作为空白生物基质, 用于方法学验证。分别使用所建立的 LC-UV 方法与两种市售试剂盒 (尿酸酶法和磷钨酸法) 检测高尿酸血症模型大鼠的血清尿酸水平, 并对 3 种检测方法的准确度进行比较。**结果** 大鼠血清中的尿酸在 10~200 μg/mL 质量浓度内线性关系良好 ($R>0.999$), 定量下限为 10 μg/mL, 准确度为 -2.17%~2.21%, 批内精密度的 0.52%~1.95%, 批间精密度的 3.04%~4.90%, 提取回收率为 83.12%~89.91%。在氧嗪酸钾诱导的大鼠高尿酸血症模型中, 市售的磷钨酸法试剂盒测定结果显著高于 LC-UV 法测定结果, 市售的尿酸酶法试剂盒测定结果显著低于 LC-UV 法测定结果, 但 LC-UV 方法的加样回收率结果最佳 (95.90%~99.96%)。**结论** 所建立的 LC-UV 方法能够准确测定大鼠血清中尿酸含量, 与市售试剂盒相比具有更高的准确度, 推荐作为氧嗪酸钾诱导的大鼠高尿酸血症模型中血清尿酸含量的检测方法。

[关键词] 尿酸; 液相色谱; 内标法; 高尿酸血症; 大鼠

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2023)03-0314-09



Quantification of Uric Acid of Rat Serum by Liquid Chromatography-ultraviolet Detection and Its Comparison Study

XIA Ziyin¹, CHAI Yuanyuan¹, XU Yunxia¹, YU Qinwei¹, HUANG Xin¹, ZHANG Luyong^{1,2}, JIANG Zhenzhou¹

(1. New Drug Screening Center, Jiangsu Center for Pharmacodynamics Research and Evaluation, State Key Laboratory of Natural Medicines, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 2. Center for Drug Research and Development, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

Correspondence to: ZHANG Luyong (ORCID: 0000-0003-1164-7371), E-mail: lyzhang@cpu.edu.cn;

JIANG Zhenzhou (ORCID: 0000-0002-0420-0822), E-mail: beaglejiang@cpu.edu.cn

[ABSTRACT] Objective To establish a more accurate and sensitive liquid chromatography-ultraviolet (LC-UV) method for the determination of uric acid in rat serum, and compare the results with those of commercial kits, providing a new method for the accurate determination of uric acid in the rat hyperuricemia model induced by potassium oxonate. **Methods** A hyperuricemia model was established by intraperitoneal injection of potassium oxonate (300 mg/kg) into SPF-grade male SD rats, and the control

[第一作者] 夏子茵 (1997—), 女, 硕士, 研究方向: 药代与靶向代谢组学。E-mail: xiaziyin0701@163.com。ORCID: 0000-0003-0660-5214

[通信作者] 张陆勇 (1962—), 男, 博士, 教授, 研究方向: 新药筛选及早期成药性评价和分子毒理学。E-mail: lyzhang@cpu.edu.cn。ORCID: 0000-0003-1164-7371;

江振洲 (1976—), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 药源性肝脏毒性及其分子机制、代谢动力学物质基础研究。E-mail: beaglejiang@cpu.edu.cn。ORCID: 0000-0002-0420-0822

group was administered an equal amount of 0.5% sodium carboxymethylcellulose solution. Blood samples were collected from the posterior orbital venous plexus and centrifuged to obtain serum samples. After precipitation with 0.1% trifluoroacetic acid-acetonitrile (containing the internal standard 3, 4-dihydroxybenzylamine hydrobromide), the supernatant was injected for analysis. Uric acid was separated on a Waters XBridge HILIC column (150 mm×4.6 mm, 3.5 μm) using acetonitrile (containing 0.5% formic acid and 2 mmol/mL ammonium formate) as the organic phase and methanol solution (methanol: water=1: 1, containing 0.5% formic acid with 2 mmol/L ammonium formate) as the aqueous phase for isocratic elution and detection at 290 nm. Serum samples treated with activated carbon were used as substitute matrices for the methodological verification. Serum uric acid levels in rats with potassium oxonate-induced hyperuricemia were measured using the established LC-UV method and commercially available kits (uricase and phosphotungstic acid methods), and the accuracies of the three methods were compared. **Results** Serum uric acid showed a good linear relationship ($R>0.999$) at mass concentration of 10–200 μg/mL in rats, the lower limit of quantification was 10 μg/mL, the accuracy ranged from -2.17% to 2.21%, the intra-batch precision ranged from 0.52% to 1.95%, the inter-batch precision ranged from 3.04% to 4.90%, and the extraction recovery ranged from 83.12% to 89.91%. In the rat model, the results obtained using the commercially available phosphotungstic acid method kit were significantly higher than those of the LC-UV method, and those obtained using the commercially available uricase method kit were significantly lower than those of the LC-UV method, but the LC-UV method showed the best recovery of the spiked sample (95.90%–99.96%). **Conclusion** The LC-UV method developed in this study can determine the concentration of uric acid in rat serum with higher accuracy than commercially available kits and is recommended for the determination of serum uric acid in the rat model of hyperuricemia induced by potassium oxonate.

[Key words] Uric acid; Liquid chromatography; Internal standard method; Hyperuricemia; Rats

尿酸作为嘌呤代谢的终产物，是临床诊断痛风、肾结石的传统生化指标^[1-2]。尿酸在人体功能中起着至关重要的作用，尿酸水平过高会引发一系列疾病。研究发现，高尿酸与非酒精性脂肪肝^[3-4]、高血压^[5]、动脉粥样硬化^[6]、静脉血栓栓塞^[7]、代谢综合征^[8-9]等密切相关。高尿酸血症对身体多种脏器都可产生损害，如关节损伤、肾脏损伤、心血管损伤等^[10]。高尿酸血症动物模型的建立是高尿酸血症临床前研究的关键工具，其中常用的就是氧嗪酸钾诱导的大鼠高尿酸血症模型^[11]，血清尿酸含量又是该模型的关键性指标。有效降低尿酸水平是降低痛风发生风险及预防并发症的关键。因此，准确测定血尿酸水平对监测高尿酸血症的发生、发展及临床前研究至关重要。

目前，尿酸的检测方法主要有试剂盒检测法与液相色谱法，其中试剂盒的检测原理主要分为尿酸酶法和磷钨酸法^[12]，然而血清中许多内源性物质可能干扰尿酸酶法和磷钨酸法的测定，使测量结果出现偏差^[13]。高效液相色谱法经过样品前处理，利用样品中各组分在色谱柱中固定相和流动相间分配系数或吸附系数等差异，将各组分分离后进行定量分析，具有很好的专属性^[14]。因此，本研究将建立液相色谱-紫外(liquid chromatograph-ultraviolet, LC-UV)检测方法，

并与市售的尿酸酶法、磷钨酸法试剂盒比较，用于测定高尿酸血症模型大鼠的血清尿酸含量，以期血清尿酸的准确检测提供参考。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

尿酸标准品(纯度≥99%，批号BCCC8658)和3, 4-二羟基苄胺氢溴酸盐(3, 4-dihydroxybenzylamine hydrobromide, DHBA)标准品(纯度98%，批号MKBS7646V)均购自德国Sigma Aldrich公司；氧嗪酸钾(批号YQ34L-LA)购自梯希爱(上海)化成工业发展有限公司；羧甲基纤维素钠(carboxymethylcellulose sodium, CMC-Na, 批号20170810)购自国药集团化学试剂有限公司；三氟乙酸(色谱纯)购自美国TEDIA公司；甲醇、乙腈和甲酸均为色谱纯，购自德国Merck公司；尿酸检测试剂盒(酶比色法, 批号20210831)和尿酸检测试剂盒(磷钨酸比色法, 批号202100807)均购自南京建成生物工程研究所有限公司。

1.2 仪器

LC-20AD 色谱泵、SIL-20AC 自动进样器、CBM-20A 连接器和 SPD-20A 紫外吸收检测器均为日本 Shimadzu 公司产品；色谱柱(货号186004441)购自沃

特世科技(上海)有限公司; HT-220A柱温箱为中国天津市恒奥科技发展有限公司产品; Sartorius QUINTIX125D-1CN天平(精度0.01 mg)为德国Sartorius公司产品; Legend Micro 21R低温离心机和GenPure UV-TOC/UF xCAD plus自动纯水机为美国Thermo Fisher Scientific公司产品。

1.3 实验动物

SPF级雄性SD大鼠12只, 体质量160~180 g, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司[SCXK(沪)2017-0005], 实验动物质量合格证编号为20170005065698。动物饲养于中国药科大学药理学动物实验中心[SYXK(苏)2021-0011], 实验期间动物自由进食、饮水, 12 h/12 h昼夜节律正常。动物实验方案经中国药科大学伦理委员会审核批准(2021-09-025)。

1.4 高尿酸血症大鼠模型的建立

12只SPF级雄性SD大鼠在实验前适应性饲养1周。将SD大鼠随机分为对照组和氧嗪酸钾诱导的高尿酸血症组, 每组6只, 禁食12 h。高尿酸血症组腹腔注射氧嗪酸钾(300 mg/kg), 对照组给予等量的0.5% CMC-Na溶液。给药完毕后, 动物结束禁食。分别于氧嗪酸钾给药前及给药后1 h, 经眼眶后静脉丛采血500 μ L于1.5 mL离心管中, 所得血样经3 500 \times g离心10 min得血清样品。

1.5 LC-UV检测

1.5.1 尿酸及DHBA标准品溶液的配制

尿酸标准品溶液的制备: 精密称定尿酸标准品, 用0.01 mol/L氢氧化钠溶液溶解并定容, 配制质量浓度为1 mg/mL的尿酸标准品溶液。

DHBA标准品溶液的制备: 精密称定DHBA标准品, 用甲醇溶解并定容, 配制质量浓度为1 mg/mL的内标标准品溶液。

1.5.2 尿酸标准曲线样品及质控样品工作溶液的配制

取尿酸1 mg/mL的标准品溶液, 用甲醇稀释制备质量浓度分别为10、25、50、80、100、120、160、200 μ g/mL的尿酸标准曲线样品工作溶液, 以及质量浓度分别为25、100、160 μ g/mL的质控样品工作溶液。

1.5.3 空白生物基质的制备

取实验室前期收集的经眼眶后静脉丛采血所得空白雄性SD大鼠血清样品, 每1 mL血清加入150 mg活性炭, 涡旋振荡30 min后离心(14 000 \times g, 15 min), 取上清液。该过程重复两次后即可得到无尿酸的空白血清样品。

1.5.4 样品前处理

取12只雄性SD大鼠的血清50 μ L, 加入250 μ L 0.1%三氟乙酸-乙腈(含内标DHBA 70 μ g/mL), 涡旋振荡后离心(14 000 \times g, 10 min); 取上清液250 μ L, 加入50 μ L超纯水, 涡旋振荡后二次离心(14 000 \times g, 10 min); 取上清液250 μ L, 进样分析。

1.5.5 色谱分析条件

色谱柱为Waters XBridge HILIC (4.6 mm \times 150 mm, 3.5 μ m)。流动相水相为甲醇溶液(甲醇和水体积比为1:1, 含0.5%甲酸和2 mmol/mL甲酸铵), 有机相为乙腈(含0.5%甲酸和2 mmol/mL甲酸铵)。采用等度洗脱, 水相与有机相的体积比为1:9, 流速为0.5 mL/min, 进样体积为10 μ L, 柱温为40 $^{\circ}$ C, 自动进样器温度为4 $^{\circ}$ C, 检测波长为290 nm。

1.6 方法学验证

根据《药物非临床药代动力学研究技术指导原则》(<https://www.cde.org.cn/zdzy/domesticinfo?page?zdzyIdCODE=3e1a118fa1599529d3406fe6ee5821a5>), 该方法验证内容包括专属性、线性、准确度、精密度、定量下限、提取回收率及稳定性。

1.6.1 专属性

分别取SD大鼠的空白生物基质、加入了尿酸的空白生物基质、正常大鼠血清, 按照“1.5.4”项下样品前处理方法, 考察方法的专属性, 以确认内源性物质在尿酸和DHBA的保留时间内有无干扰。

1.6.2 标准曲线

按照“1.5.2”项下描述配制尿酸标准曲线样品工作溶液, 分别吸取50 μ L于1.5 mL离心管中, 氮吹仪挥干溶剂, 加入50 μ L空白生物基质, 混匀后按照“1.5.4”项下描述处理上述标准血清样本。以尿酸与内标DHBA的峰面积比为纵坐标, 以相应质量浓度为横坐标, 使用加权最小二乘法进行回归分析, 制作标准曲线。

1.6.3 准确度和精密度

按照“1.5.2”项下描述配制尿酸质控样品工作溶液, 分别吸取50 μ L于1.5 mL离心管中, 氮吹仪挥干溶剂, 加入50 μ L空白生物基质, 混匀后按照“1.5.4”项下描述处理上述血清样本。为考察批内和批间差异, 3个浓度均平行制备5份, 并连续测定3个分析批次。准确度用相对误差(relative error, RE)表示; 精密度用质控样品的批内和批间相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)表示。

1.6.4 定量下限

按照“1.5.2”项下描述配制质量浓度为10 μg/mL的尿酸工作液, 吸取50 μL于1.5 mL离心管中, 氮吹仪挥干溶剂, 加入50 μL空白生物基质, 混匀后按照“1.5.4”项下描述处理。平行制备5份, 连续测定3个分析批次。

1.6.5 提取回收率

通过比较空白生物基质分别在提取前和提取后加入尿酸标准品的峰面积比, 评价尿酸在3个质控浓度下的提取回收率, 确定其结果的精密度和可重现性。

1.6.6 稳定性

按照“1.5.2”项下描述配制尿酸质控样品工作液, 分别吸取50 μL于1.5 mL离心管中, 氮吹仪挥干溶剂, 加入50 μL空白生物基质, 混匀。分别考察其在4℃自动进样器中放置25 h、-20℃条件冻融3次、室温放置4 h、-20℃条件下放置1周、-80℃条件下放置4周的稳定性, 以确定生物样品的存放条件和时间。

1.7 试剂盒检测及3种方法比较

采用尿酸酶法和磷钨酸法两种市售试剂盒测定大鼠血清样本中尿酸含量, 测定流程按照试剂盒说明书进行。尿酸酶法试剂盒检测出的尿酸浓度单位为μmol/L, 而磷钨酸法试剂盒与本研究建立的LC-UV方法测出的尿酸单位为μg/mL, 3种方法比较时将LC-UV方法与磷钨酸法所测的尿酸浓度单位统一换算为μmol/L。

为验证LC-UV方法检测血清尿酸含量的准确性, 比较了LC-UV检测方法和市售试剂盒(尿酸酶法和磷钨酸法)检测高尿酸血症组大鼠给药前与给药后1 h血清样品中的加样回收率。在已知浓度的大鼠血清中加入定量的对照品, 按照LC-UV法、尿酸酶法与磷钨酸法的处理步骤分析, 得到的结果与理论值的比值即为加样回收率。为避免超出两种试剂盒的检测限值, 加样质量浓度分别设置为10 μg/mL和25 μg/mL。

1.8 数据处理与统计方法

采用SPSS 23.0软件进行统计分析。两组间比较采用独立样本 t 检验; 多组间比较采用单因素方差分析, 组内两两比较采用LSD- t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 方法学验证结果

2.1.1 专属性

如图1A~B所示, 尿酸和内标DHBA均具有良好

的峰形, 并且分离效果好, 其保留时间分别为6.45 min和13.45 min。空白生物基质在尿酸和DHBA的保留时间窗口中, 内源性干扰低于定量下限响应的20%, 不影响尿酸的测定(图1C~D)。对照组大鼠血清中尿酸保留时间与尿酸对照品溶液、空白生物基质中加入尿酸的保留时间相同, 并且大鼠血清中无内源性物质干扰DHBA出峰(图1E~F)。

2.1.2 标准曲线

以尿酸与内标DHBA的峰面积比为纵坐标, 以相应质量浓度为横坐标, 使用加权最小二乘法进行回归分析, 权重系数为 $1/x^2$ 。所得线性方程为 $y=0.022x-0.021$, 相关系数 $R > 0.999$ 。标准曲线如图2所示。

2.1.3 准确度、精密度和定量下限

如表1所示, 尿酸在质控浓度的准确度(以RE表示)在-2.17%~2.21%, 批内精密度(以RSD表示)在0.52%~1.95%, 批间精密度(即RSD)在3.04%~4.90%。尿酸测定的定量下限质量浓度为10 μg/mL。尿酸在定量下限的准确度(以RE表示)为-1.99%, 批内和批间的精密度(以RSD表示)分别为2.42%和5.07%。

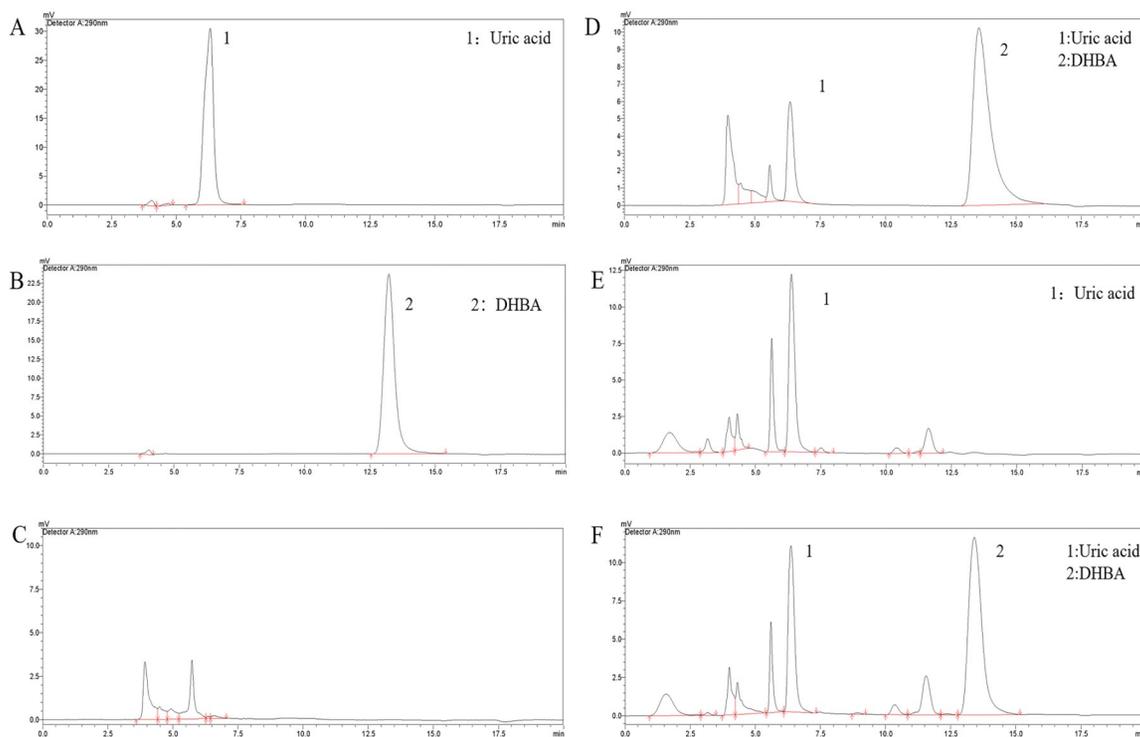
2.1.4 提取回收率和稳定性

如表1所示, 该方法在3个质控浓度的提取回收率在83.12%~89.91%, 其精密度(以RSD表示)均小于15%。质控样品在稳定性验证所考察的各种条件下, RE均小于±15%。

2.2 大鼠血清尿酸含量

如图3A所示, 采用LC-UV法对比检测对照组和高尿酸血症组大鼠在给药前与给药后1 h的血清尿酸水平, 可以看出给药前两组血清尿酸水平差异无统计学意义($t=-1.314$, $P=0.218$), 但是给药1 h后高尿酸血症组血清尿酸水平显著高于对照组($t=-5.514$, $P < 0.001$), 同时也显著高于给药前($t=-13.074$, $P < 0.001$), 说明造模成功。

进一步比较高尿酸血症组大鼠在造模前和造模1 h后, 不同检测方法测定血清尿酸含量的差异。如图3B所示, 磷钨酸法试剂盒的检测值在0 h显著高于LC-UV法, 差异具有统计学意义($t=2.961$, $P=0.010$)。尿酸酶法试剂盒与LC-UV法的检测值在0 h差异无统计学意义($t=-0.767$, $P=0.455$)。如图3C所示, 造模1 h后, 磷钨酸法试剂盒的检测值显著高于LC-UV法($t=3.149$, $P=0.007$), 尿酸酶法试剂盒的检测值显著低于LC-UV法($t=4.843$, $P < 0.001$)。



注: A, 10 $\mu\text{g/mL}$ 尿酸对照品溶液; B, 50 $\mu\text{g/mL}$ 3, 4-二羟基苄胺氢溴酸盐 (DHBA) 对照品溶液; C, 空白生物基质; D, 定量下限样品; E, 对照组 (腹腔注射给予等量的0.5% CMC-Na 溶液) 大鼠血清 (无内标); F, 对照组大鼠血清。

Note: A, 10 $\mu\text{g/mL}$ uric acid standard solution; B, 50 $\mu\text{g/mL}$ DHBA (3, 4-dihydroxybenzylamine hydrobromide) standard solution; C, Blank biomatrix; D, Lower limit of quantitation sample; E, Rat serum (without internal standard) in the control group (intraperitoneal injection of an equal amount of 0.5% CMC-Na solution); F, Rat serum in the control group.

图1 尿酸专属验证的色谱图

Figure 1 Chromatogram of uric acid specificity verification

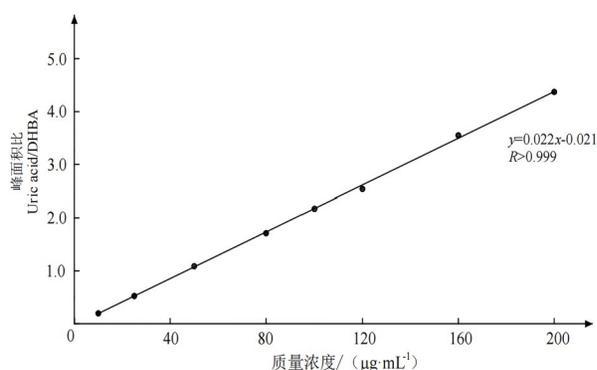


图2 尿酸的标准曲线图

Figure 2 Standard curve of uric acid

2.3 LC-UV 法与市售试剂盒检测的加样回收率比较

如表2所示, 磷钨酸法试剂盒的加样回收率在造模前后均偏高; 尿酸酶法试剂盒的加样回收率偏低, 并且在造模后加样质量浓度为10 $\mu\text{g/mL}$ 时加样回收率由60.05%降低至27.37%, 加样质量浓度为25 $\mu\text{g/mL}$

时加样回收率由84.31%降低至43.55%。而LC-UV检测方法在造模前后的不同加样质量浓度组之间, 回收率均高于95%, 说明LC-UV具有较好的测定准确度。

LC-UV法、磷钨酸法、尿酸酶法这3种方法检测血清尿酸的原理、特点及局限性比较如表3所示。

3 讨论

目前, 尿酸的检测方法主要有试剂盒法与高效液相色谱法, 其中试剂盒的检测原理主要分为尿酸酶法和磷钨酸法。尿酸酶法的检测原理是尿酸在尿酸酶的作用下生成尿囊素、二氧化碳和过氧化氢, 过氧化氢进而与显色剂反应显色^[15]。然而造模剂氧嗪酸钾是尿酸酶的抑制剂, 可能会抑制反应试剂中尿酸酶的活性, 导致检测结果偏低。磷钨酸法的检测原理是尿酸在碱性溶液中与磷钨酸反应生成尿囊素、二氧化碳以及钨蓝, 钨蓝的生成量与尿酸含量成正比, 可进行比色测定^[16]。然而, 磷钨酸法特异性差, 易受其他还原性物

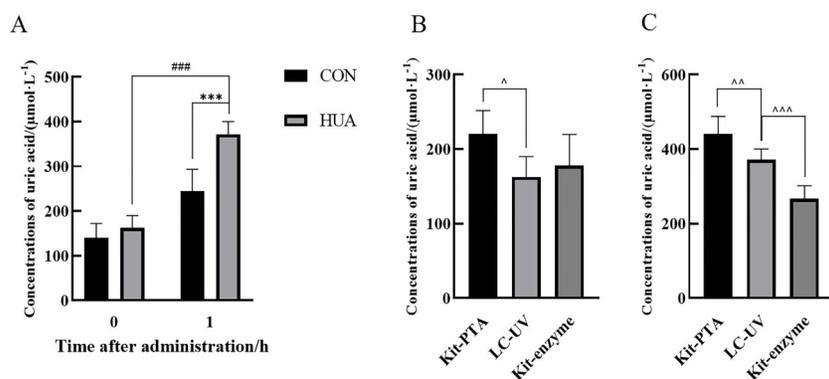
表1 尿酸检测的批内/批间准确度、精密度、提取回收率以及稳定性

Table 1 Intra- and inter-batch accuracy and precision, extraction recovery and stability test of uric acid determination

尿酸质量浓度 $\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	批内准确度和精密度		批间准确度和精密度		提取回收率		稳定性				
	Intra-A&P/% (n = 5)		Inter-A&P/% (n = 15)		Extraction recovery/% (n = 5)		Stability (RE)/%				
	RE	RSD	RE	RSD	$\bar{x} \pm s$	RSD	4 °C (n = 5)	FTC (n = 5)	RT (n = 3)	-20 °C (n = 3)	-80 °C (n = 3)
10	-1.99	2.42	-3.67	5.07							
25	-2.17	1.95	-3.68	4.90	89.91±4.55	5.06	-3.12	-2.19	-11.47	-1.09	-9.51
100	0.74	1.54	1.15	3.04	84.42±1.61	1.90	-2.48	-2.23	-6.85	-5.01	-14.51
160	2.21	0.52	-0.56	3.67	83.12±5.63	6.77	-5.46	-4.57	-8.41	-6.74	-12.76

注：A&P为准确度和精密度，用相对误差（RE）表示准确度，用质控样品的批内和批间相对标准偏差（RSD）表示精密度；FTC为冻融条件；RT为室温条件。

Note: A&P, accuracy and precision; RE, relative error; RSD, relative standard deviation; FTC, freeze-thaw cycles; RT, room temperature.



注：A，LC-UV法检测两组大鼠给药前和给药后1h的血清尿酸浓度（CON，给予0.5%CMC-Na溶液的对照组；HUA，腹腔注射300mg/kg氧嗪酸钾的高尿酸血症组。与CON组相比，*** $P < 0.001$ ；与给药前相比，*** $P < 0.001$ 。 $n = 6$ ）。B~C，给药前和给药后1h三种方法测定的血清尿酸浓度比较（LC-UV，液相色谱-紫外检测法；Kit-PTA，磷钨酸法试剂盒；Kit-enzyme，尿酸酶法试剂盒。与LC-UV法相比， $^{\wedge}P < 0.05$ ， $^{\wedge\wedge}P < 0.01$ ， $^{\wedge\wedge\wedge}P < 0.001$ 。 $n = 6$ ）。

Note: (A) LC-UV method was used to detect the serum uric acid concentration of rats in the two groups before and 1 h after administration (CON, control group administered 0.5% CMC-Na solution; HUA, hyperuricemia group administered 300 mg/kg potassium oxyzate). Compared with the CON group, *** $P < 0.001$; Compared to before administration, *** $P < 0.001$. $n = 6$). (B-C) Serum uric acid concentration was measured using three methods before and 1 h after administration (LC-UV, liquid chromatography-ultraviolet; Kit-PTA, phosphotungstic acid method Kit; Kit-enzyme, uricase method Kit. Compared with LC-UV, $^{\wedge}P < 0.05$, $^{\wedge\wedge}P < 0.01$, $^{\wedge\wedge\wedge}P < 0.001$. $n = 6$).

图3 给药前与给药后1h大鼠血清尿酸含量

Figure 3 Determination of serum uric acid concentrations in rats before and 1 h after administration

表2 LC-UV法与市售试剂盒检测的加样回收率比较

Table 2 Comparison of the spiked recovery of LC-UV method and commercially available kits

($n=3, \bar{x} \pm s$)

取样时间/h Time/h	加样质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$ $\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	加样回收率/% Recovery of spiked samples/%		
		LC-UV	磷钨酸法 Kit-PTA	尿酸酶法 Kit-enzyme
0 ^a	10	99.97±6.86	118.83±21.22	60.05±11.2
	25	95.90±4.54	117.90±8.48	84.31±4.31
1 ^a	10	98.18±3.23	125.00±5.34	27.37±8.62
	25	99.64±0.99	112.96±3.85	43.55±5.38

注：LC-UV，液相色谱-紫外检测法；Kit-PTA，磷钨酸法试剂盒；Kit-enzyme，尿酸酶法试剂盒。a，LC-UV法测定HUA组给药前和给药后1h血清尿酸质量浓度分别为21.21 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和50.71 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

Note: LC-UV, liquid chromatography-ultraviolet detection; Kit-PTA, phosphotungstic acid method; Kit-enzyme, uricase method. a, The concentrations of uric acid in serum before and 1 h after administration were 21.21 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 50.71 $\mu\text{g}/\text{mL}$ by LC-UV.

表3 LC-UV法与磷钨酸法、尿酸酶法检测血清尿酸含量的比较

Table 3 Comparison of liquid chromatography-ultraviolet (LC-UV) method with phosphotungstic acid method and uricase method for determining serum uric acid

检测方法 Method	原理 Principle	特点 Features	局限性 Limitations
磷钨酸法 Phosphotungstic acid method	尿酸在碱性溶液中与磷钨酸反应,生成尿囊素、二氧化碳和钨蓝,钨蓝的生成量与尿酸含量成正比	操作简单,检测时间短,成本低,可用于自动化分析	特异性差,准确度低,检测结果易受血清中其他还原性物质影响
液相色谱-紫外检测法 LC-UV	溶于流动相中的各组分经过固定相时,由于与固定相发生作用的大小不同,导致其保留时间不同	专属性强,准确度高,线性范围广,色谱柱可反复使用	成本较高、检测时间较长
尿酸酶法 Uricase method	尿酸在尿酸酶的作用下生成尿囊素、二氧化碳和过氧化氢,过氧化氢与显色剂反应显色	操作简单,检测时间短,成本低,可用于自动化分析	尿酸酶的活性易被血清中氧嗪酸钾抑制,准确度低

质(如谷胱甘肽、抗坏血酸)的影响^[12]。在反应过程中,还原物质会增加显色产物的含量,导致检测结果高于真实值。而在高效液相色谱法中,溶于流动相中的各组分经过固定相时,由于与固定相发生作用(吸附、分配、排阻、亲和)的大小、强弱不同,在固定相中滞留时间不同,从而能实现对待测组分的分离,因此,高效液相色谱具有专属性强、准确度高特点。本研究中3种检测方法的加样回收率表明,在氧嗪酸钾诱导的大鼠高尿酸血症模型中,尿酸酶法与磷钨酸法的准确度均低于LC-UV检测方法,因此在该模型中建议采用更准确、可靠的LC-UV分析方法来检测高尿酸血症大鼠模型的血清尿酸水平。

根据《药物非临床药代动力学研究技术指导原则》中生物样品分析方法的基本要求,专属性考察结果表明LC-UV检测方法的专属性良好,标准曲线结果表明LC-UV检测方法所测尿酸在10~200 μg/mL范围内有良好的线性关系。上述指导原则中要求准确度的验收标准为RE在±15%内,精密度的验收标准为RSD小于

15%,定量下限的验收标准为RE在±20%内、RSD小于20%。本研究结果表明,LC-UV检测方法的质控浓度与定量下限准确度和精密度良好,符合样品分析要求;而且LC-UV检测方法的提取回收率稳定,质控样品在考察条件下稳定性良好,能够满足测定需求。因此,本研究建立的LC-UV法专属性、标准曲线、准确度、精密度、定量下限、提取回收率及稳定性的考察结果均符合方法学验证要求。

在已报告的尿酸LC-UV检测方法中,反相C18柱是最常用的色谱柱。由于尿酸极性大(尿酸结构式见图4A),使用常规的反相色谱柱保留时间短,为了延长尿酸保留时间需要使用高比例的水相,然而高比例水相会影响色谱柱的使用寿命。Zhao等^[17]建立了一种LC-UV方法检测血浆与尿中的肌酐与尿酸,该方法使用了C18柱与高比例的水相作为流动相,尿酸的出峰时间仅在3 min左右,保留时间短,易被血清中的内源性物质干扰测定。Waters XBridge HILIC是未键合的亚乙基桥杂化颗粒色谱柱,HILIC是一种用来改善在反相色谱中保留较差的强极性物质保留行为的色谱技术,通过采用强极性固定相,并且结合高比例有机相/低比例水相组成的流动相来实现这一目的^[18]。本研究采用HILIC柱与90%的有机相等度洗脱进行尿酸含量分析,对色谱柱的使用寿命没有损害,对尿酸有较好的保留。

在采用质谱为检测器的尿酸检测方法中,同位素内标是最常用也是最为理想的^[19],但由于分离能力有限,同位素内标并不适用于LC-UV检测。在部分已发表的文献中并未选用合适的内标用于尿酸含量的LC-UV测定^[17,20]。本研究在方法摸索过程中筛选了尿酸

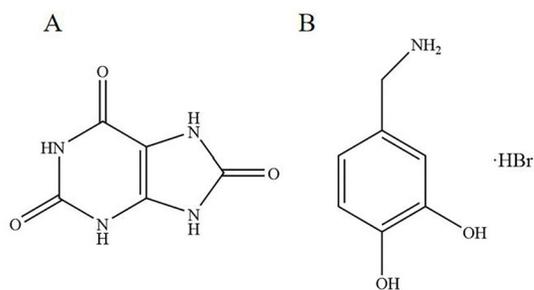


图4 尿酸(A)与DHBA(B)的结构式

Figure 4 Structures of uric acid (A) and 3,4-dihydroxybenzylamine hydrobromide (DHBA) (B)

的结构类似物5-氟尿嘧啶、DHBA等,其中DHBA与尿酸的结构存在部分相似(DHBA与尿酸的结构式见图4),均具有芳香环结构,能够与尿酸实现很好的分离,并且其出峰稳定,响应良好,无内源性物质干扰。因此,本研究选择DHBA作为血清尿酸含量测定的内标,为尿酸LC-UV检测方法的建立提供了参考。

另外,尿酸作为维持人体健康的内源性生物活性分子,在LC-UV测定中常缺乏真实的空白生物基质来制备标准曲线。Wen等^[15]采用LC-UV法检测血清中尿酸含量,并与常规的尿酸检测方法(尿酸酶法和磷钨酸法)进行了对比,但该方法未使用空白生物基质,基质中存在的内源性干扰对测定的影响不明。本研究选择了活性炭处理过的血清作为空白基质,结果证实其在尿酸和内标的保留时间窗口中无明显内源性干扰,不影响尿酸的测定。

综上所述,本研究建立的LC-UV法与之前已报告的LC-UV法相比,主要有如下优势:(1)本方法选用了HILIC柱与高比例有机相洗脱进行尿酸含量分析,不仅对色谱柱的使用寿命没有损害,而且对尿酸有较好的保留;(2)本方法为尿酸的LC-UV检测选择了一个合适的内标,使用内标法定量更加准确;(3)本方法选择了活性炭处理过的血清作为尿酸含量测定的空白生物基质,检测结果更加准确。与此同时,本方法也存在一些不足:(1)HILIC色谱柱需要较长的平衡时间才能有稳定的基线和色谱峰保留^[21],导致每批分析时间较长,有待进一步优化;(2)本方法目前仅用于动物模型中尿酸的检测,是否适用于人类血尿酸含量的测定尚需进一步验证。

本研究表明,在氧嗪酸钾诱导的大鼠高尿酸血症模型中,尿酸酶法与磷钨酸法的准确度均低于LC-UV法,本研究所建立的LC-UV法能够更加准确、可靠地测定氧嗪酸钾诱导的高尿酸血症模型大鼠的血清尿酸含量。

[医学伦理声明 Medical Ethics Statement]

本研究涉及的所有动物实验均已通过中国药科大学伦理委员会批准(审批号:2021-09-025)。所有实验过程均遵照中国实验动物相关法律法规条例要求进行。

All animal experiments in this study were approved by the Ethics Committee of China Pharmaceutical University (Approval Letter No. 2021-09-025). All experimental protocols followed the guidelines of experimental animal-related laws and regulations.

[作者贡献 Author Contribution]

夏子茵参与课题设计、实验操作、数据收集整理、统计分析、文章撰写及修改;
柴媛媛负责课题设计与论文修改;
徐云霞、俞沁玮参与实验操作、数据收集;
黄鑫进行实验指导;
张陆勇、江振洲负责课题策划、实验指导,以及论文修改指导及定稿。

[利益声明 Declaration of Interest]

所有作者均声明本文不存在利益冲突。

[参考文献 References]

- [1] 孙琳,王桂侠,郭蔚莹.高尿酸血症研究进展[J].中国老年学杂志,2017,37(4):1034-1038. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2017.04.112.
SUN L, WANG G X, GUO W Y. Research progress of hyperuricemia[J]. Chin J Gerontol, 2017, 37(4):1034-1038. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2017.04.112.
- [2] FATHALLAH-SHAYKH S A, CRAMER M T. Uric acid and the kidney[J]. Pediatr Nephrol, 2014, 29(6):999-1008. DOI: 10.1007/s00467-013-2549-x.
- [3] XU C F, YU C H, XU L, et al. High serum uric acid increases the risk for nonalcoholic fatty liver disease: a prospective observational study[J]. PLoS One, 2010, 5(7): e11578. DOI: 10.1371/journal.pone.0011578.
- [4] LIU J, XU C F, YING L M, et al. Relationship of serum uric acid level with non-alcoholic fatty liver disease and its inflammation progression in non-obese adults[J]. Hepatol Res, 2017, 47(3): E104-E112. DOI: 10.1111/hepr.12734.
- [5] PERTICONE M, TRIPEPI G, MAIO R, et al. Risk reclassification ability of uric acid for cardiovascular outcomes in essential hypertension[J]. Int J Cardiol, 2017, 243:473-478. DOI: 10.1016/j.ijcard.2017.05.051.
- [6] PRASAD M, MATTESON E L, HERRMANN J, et al. Uric acid is associated with inflammation, coronary microvascular dysfunction, and adverse outcomes in postmenopausal women[J]. Hypertension, 2017, 69(2): 236-242. DOI: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.08436.
- [7] KUBOTA Y, MCADAMS-DEMARCO M, FOLSOM A R. Serum uric acid, gout, and venous thromboembolism: the atherosclerosis risk in communities study[J]. Thromb Res, 2016, 144:144-148. DOI: 10.1016/j.thromres.2016.06.020.
- [8] KANBAY M, JENSEN T, SOLAK Y, et al. Uric acid in metabolic syndrome: from an innocent bystander to a central player[J]. Eur J Intern Med, 2016, 29:3-8. DOI: 10.1016/j.ejim.2015.11.026.
- [9] SHARAF EL DIN U A A, SALEM M M, ABDULAZIM D O. Uric acid in the pathogenesis of metabolic, renal, and cardiovascular diseases: a review[J]. J Adv Res, 2017, 8(5):537-548. DOI: 10.1016/j.jare.2016.11.004.
- [10] BORGHI C, AGABITI-ROSEI E, JOHNSON R J, et al. Hyperuricaemia and gout in cardiovascular, metabolic and kidney disease[J]. Eur J Intern Med, 2020, 80:1-11. DOI: 10.1016/j.ejim.2020.07.006.
- [11] 周子正,徐琳,高建东.高尿酸血症动物模型研究进展[J].医学综

- 述, 2020, 26(8): 1462-1466. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2084.2020.08.002.
ZHOU Z Z, XU L, GAO J D. Research progress of hyperuricemia animal model[J]. Med Recapitul, 2020, 26(8): 1462-1466. DOI: 10.3969/j.issn.1006-2084.2020.08.002.
- [12] 王璟. 检测尿酸的方法比较及进展[J]. 糖尿病临床, 2014, 8(8): 362-363. DOI: 10.3969/j.issn.1672-7851.2014.08.005.
WANG J. Comparison and progress of methods for detecting serum uric acid[J]. Clin J Diabetes World, 2014, 8(8):362-363. DOI: 10.3969/j.issn.1672-7851.2014.08.005.
- [13] WANG Q W, WEN X, KONG J M. Recent progress on uric acid detection: a review[J]. Crit Rev Anal Chem, 2020, 50(4): 359-375. DOI: 10.1080/10408347.2019.1637711.
- [14] GUMUSTAS M, KURBANOGU S, USLU B, et al. UPLC versus HPLC on drug analysis: advantageous, applications and their validation parameters[J]. Chromatographia, 2013, 76(21):1365-1427. DOI: 10.1007/s10337-013-2477-8.
- [15] WEN S S, ZHANG Z X, CHEN X P, et al. An improved UPLC method for determining uric acid in rat serum and comparison study with commercial colorimetric kits[J]. Acta Chromatogr, 2019, 31(3): 201-205. DOI: 10.1556/1326.2018.00449.
- [16] 江民川, 赵阳, 马芳芳, 等. 尿酸检测方法的研究进展[J]. 化工科技, 2021, 29(3):75-79. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0511.2021.03.014
JIANG M C, ZHAO Y, MA F F, et al. Research progress on uric acid detection methods[J]. Sci Technol Chem Ind, 2021, 29(3): 75-79. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0511.2021.03.014.
- [17] ZHAO J X. A simple, rapid and reliable high performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of creatinine and uric acid in plasma and urine [J]. Anal Methods, 2013, 5(23): 6781-6787. DOI: 10.1039/C3AY41061G.
- [18] BUSZEWSKI B, NOGA S. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) —a powerful separation technique [J]. Anal Bioanal Chem, 2012, 402(1): 231-247. DOI: 10.1007/s00216-011-5308-5.
- [19] 张海晨, 李水军, 孙贺伟, 等. 液相色谱 - 串联质谱法测定尿酸及与常规检测方法的比较[J]. 检验医学, 2015, 30(5):422-426. DOI: 10.3969/j.issn.1673-8640.2015.05.004.
ZHANG H C, LI S J, SUN H W, et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for uric acid and its comparison with clinical routine determination method[J]. Lab Med, 2015, 30(5):422-426. DOI: 10.3969/j.issn.1673-8640.2015.05.004.
- [20] 刘旭圆, 商倩, 李川, 等. HPLC法用于小鼠高尿酸模型中血尿酸测定及相关药物评价[J]. 药物评价研究, 2017, 40(3):319-323. DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.03.006.
LIU X Y, SHANG Q, LI C, et al. HPLC method for determination of uric acid in plasma of hyperuricemia model mice[J]. Drug Eval Res, 2017, 40(3):319-323. DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.03.006.
- [21] MCCALLEY D V. Managing the column equilibration time in hydrophilic interaction chromatography[J]. J Chromatogr A, 2020, 1612:460655. DOI: 10.1016/j.chroma.2019.460655.

(收稿日期:2022-12-14 修回日期:2023-04-13)

(本文编辑:张俊彦,富群华,丁宇菁,崔占鼎)

【引用本文】

夏子茵, 柴媛媛, 徐云霞, 等. 大鼠血清尿酸液相色谱-紫外检测新方法的建立及比较研究[J]. 实验动物与比较医学, 2023, 43(3): 315-323. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.189.

XIA Z Y, CHAI Y Y, XU Y X, et al. Quantification of uric acid of rat serum by liquid chromatography-ultraviolet detection and its comparison study[J]. Lab Anim Comp Med, 2023, 43(3): 314-322. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2022.189.

《实验动物与比较医学》有关作者投稿必备信息和材料的说明

《实验动物与比较医学》是我国实验动物科学与比较医学领域创刊最早的专业性学术期刊,执行严格的同行评议和二审三校制度。为提高稿件审理效率,以及规范作者投稿行为,本刊加大初审力度。从2021年4月起,作者从本刊官网(<http://www.slarc.org.cn/dwyx>)投稿时,除提交Word格式的完整论文外,还需提供以下必备信息和材料:

1. 所有署名作者的信息,包括最高学历、职称、研究方向、E-mail、电话,以及开放研究者与贡献者身份识别码(open researcher and contributor ID, ORCID)等。

2. 第一作者单位盖章的论文审查表或介绍信扫描件,需承诺本文符合科研诚信要求。

3. 涉及动物实验的研究性文章还需提供实验动物的生产许可证和质量合格证、实验场所的实验动物使用许可证、该研究的实验动物福利伦理审查表的扫描件。文中注明以上三证一表的准确编号,并在文末列出本文涉及的医学伦理声明。

4. 填写作者贡献及利益冲突声明表,并在文末列出所有署名作者的贡献情况及利益声明。

5. 研究如有基金资助,请提供与本文内容相符的基金立项证明,并在首页注明基金名称、受资助项目名称及编号。

以上2~5材料均请打包后,作为附件上传至本刊投稿系统。若材料或信息不齐、造假,编辑部将直接退稿。

详情可见本刊官网首页的“期刊政策”-“投稿指南”和“投稿必看”-“稿件要求细则”。相关模板可至“投稿必看”-“附件模板下载”获取。

《实验动物与比较医学》编辑部