

【 评价方法学 】

HPLC 法用于小鼠高尿酸模型中血尿酸测定及相关药物评价

刘旭圆, 商倩, 李川, 刘鹏, 刘巍, 赵桂龙, 周植星, 张海枝*

天津药物研究院 天津市新药设计与发现重点实验室, 天津 300193

摘要: **目的** 建立一种快速测定高尿酸模型小鼠血浆中尿酸浓度的高效液相色谱 (HPLC) 法, 并将其用于典型药物 Lesinurad 的降尿酸作用评价。 **方法** 采用 Laballiance Series III HPLC 系统, 色谱柱为 Kromasil C₁₈ 柱 (100 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇/0.5%乙酸 (10:90), 等度洗脱, 体积流量 0.4 mL/min, 检测波长为 283 nm; 应用建立的 HPLC 法测定小鼠 ip 给予 250、500 mg/kg 尿酸 0.5、1.0、2.0 h 后血浆中尿酸浓度; ig 给予小鼠 50、150 mg/kg Lesinurad 0.5 h 后, ip 500 mg/kg 尿酸制备模型, 1 h 后 HPLC 法测定血浆中尿酸浓度。 **结果** 在建立的 HPLC 法中, 血浆尿酸浓度在 7.5~150 μg/mL 与峰面积呈良好线性关系 ($r=0.997$), 方法专属性、重复性、精密度、样品稳定性、回收率均符合生物样品检测指导原则规定。与对照组小鼠内源性血尿酸浓度比较, 250 mg/kg 剂量组在 0.5 h 血浆尿酸浓度显著升高 ($P<0.01$), 500 mg/kg 组在 0.5、1.0、2.0 h 血浆尿酸浓度均显著升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 50、150 mg/kg Lesinurad 组血尿酸浓度均显著下降 ($P<0.05$ 、 0.01), 且呈剂量相关性。 **结论** 本研究建立的 HPLC 法简便、快速、准确, 可用于小鼠血浆尿酸浓度测定及相关药物的药效评价, 为小鼠高尿酸模型建立及后续降尿酸药物的筛选提供了快速可靠的分析手段。

关键词: 尿酸; 高效液相色谱; 高尿酸模型; 血浆; Lesinurad; 药物筛选

中图分类号: R917.1

文献标志码: A

文章编号: 1674-6376(2017)03-0319-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2017.03.006

HPLC method for determination of uric acid in plasma of hyperuricemia model mice

LIU Xu-yuan, SHANG Qian, LI Chuan, LIU Peng, LIU Wei, ZHAO Gui-long, ZHOU Zhi-xing, ZHANG Hai-zhi

Tianjin Key Laboratory of Molecular Design and Drug Discovery, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To establish an efficient HPLC method for the determination of uric acid in plasma of hyperuricemia model mice, and the evaluation of uric acid lowering effect of Lesinurad. **Methods** The Laballiance Series III HPLC system was adopted with Kromasil C₁₈ column (100 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of methanol-0.5% acetic acid (10:90) for isocratic elution with a flow rate of 0.4 mL/min. The detection wavelength was set at 283 nm. The established HPLC method was used to detect the plasma uric acid level of mice at 0.5, 1.0, and 2.0 h time points after which being ip injected with 250 and 500 mg/kg uric acid. Lesinurad of 250 and 500 mg/kg was ig given to mice, 0.5 h later, mice were ip injected with 500 mg/kg uric acid to establish hyperuricemia model, and 1 h later, the established HPLC method was used to detect the plasma uric acid level of mice. **Results** There was a good linear relationship between peak area and the concentration of plasma uric acid in the range of 7.5—150 μg/mL ($r=0.997$). The specificity, repeatability, precision, stability, and recovery of the established HPLC method was in accordance with the guiding rules of biological sample determination. Compared with the endogenous serum uric acid concentration of control group mice, serum uric acid concentration of 250 mg/kg dose group was significantly increased 0.5 h after ip administration with uric acid ($P<0.01$), and serum uric acid concentration of 500 mg/kg dose group was significantly increased 0.5, 1.0, and 2.0 h after ip

收稿日期: 2016-11-23

基金项目: “精准医学研究”国家重点研发计划 (2016YFC0904903), 天津市科技计划项目 (16YFZCSY00910)

作者简介: 刘旭圆 (1986—), 男, 天津人, 助理研究员, 主要从事生物药剂学研究。E-mail: liuxy6@tjipr.com

*通信作者 张海枝, 副研究员。Tel: (022)23003144 E-mail: zhanghz@tjipr.com

administration with uric acid. Compared with model group, the concentration of uric acid in plasma decreased significantly in low dosage group administered with Lesinurad ($P < 0.05$), while decreased more significantly in high dosage group ($P < 0.01$). **Conclusion** This convenient, rapid, and accurate method can be applied to the determination of uric acid in mouse plasma and the evaluation of relative drugs, which provide an efficient analysis way for establishing hyperuricemia model and screening relative drugs.

Key words: uric acid; HPLC; hyperuricemia model; plasma; Lesinurad; drug screening

尿酸是生物体内核酸嘌呤碱代谢的终产物,其浓度水平高低与痛风、2型糖尿病、肾病、非酒精性脂肪肝、高血压、冠心病等疾病的发生密切相关^[1]。目前致力于改善尿酸水平的代谢类新药研究成为热点,其中以尿酸转运体1 (URAT1) 为作用靶点的新药 Lesinurad 在欧盟和美国 FDA 已批准上市^[2-3],而国内关于 URAT1 抑制剂的研发也取得一定进展^[4-7]。URAT1 抑制剂研发中的关键步骤是从大量候选化合物中筛选能够降低血浆中尿酸水平的先导化合物,因此亟需一种能够快速并准确测定生物体液中尿酸浓度的分析方法。

目前国内外关于生物体血浆中尿酸的测定方法主要有光谱法^[8]、电化学法^[9-10]、酶法^[11]、磷钨酸法^[11]、高效液相 (HPLC) 法^[12-14]、超高效液相色谱法 (UPLC)^[15]及液质联用法 (LC-MS)^[16]等。UPLC 及 LC-MS 法对仪器要求较高,电化学法存在选择性差的难题,酶法、磷钨酸法动物血浆中造模试剂成分干扰较多且试剂盒成本较高。现有 HPLC 法虽能一定程度上克服上述问题,但血浆前处理复杂且用到一些强酸碱,单针样品分析周期长,不适合大量生物样品测定与后续的药物筛选。本研究旨在建立一种快捷、准确测定小鼠血浆中尿酸浓度的 HPLC 方法,为小鼠高尿酸模型的建立及大量降尿酸药物的筛选提供平台。

1 材料

1.1 仪器

Laballiance Series III 高效液相色谱仪 (配有 UV6000LP PDA 检测器,美国 Laballiance 公司); XS105 型分析天平 (瑞士 METTER TOLEDO 公司); VORTEX-QILINBEIER 5 型涡旋振荡器 (江苏海门市其林仪器制造有限公司); 5415R 型高速离心机 (德国 Eppendorf 公司)。

1.2 药物及主要试剂

尿酸对照品 (Sigma-Aldric, 质量分数 > 99%, 批号 BCBK8295V); 阳性药物 Lesinurad (天津药物研究院创新中心内分泌团队自制, 质量分数 98.5%, 批号 151023LE); 纯水 (采用 Thermo Scientific Barnstead 纯水制备系统自制, 电阻率 > 18.2 兆欧);

甲醇 (色谱纯, Fisher 公司); 乙酸、氨水 (分析纯, 天津市凯信化学有限公司)。

1.3 实验动物

雄性昆明种小鼠, 体质量 18~22 g, 购自中国人民解放军 62034 部队, 许可证号 SCXK (军) 2014-0001, 不禁食。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Kromasil C₁₈ 色谱柱 (100 mm × 4.6 mm, 5 μm); 检测波长 283 nm; 流动相: 甲醇-0.5%乙酸 (10: 90); 体积流量 0.4 mL/min; 柱温 35 °C; 进样量 20 μL。

2.2 血浆样品处理

精密吸取小鼠血浆 50 μL, 加甲醇 100 μL 沉淀蛋白, 涡旋 1 min 混匀, 于 4 °C、13 000 r/min 离心 7 min, 精密吸取上清液 50 μL, 加纯水 200 μL 稀释, 涡旋 1 min 混匀, 于 4 °C、13 000 r/min 离心 2 min, 取上清液于“2.1”项下色谱条件进样分析。

2.3 标准溶液的配制

精密称取尿酸对照品 25.00 mg 于 50 mL 量瓶中, 以 0.5%氨水稀释定容, 得到质量浓度为 500 μg/mL 的尿酸对照品储备液, 分别精密吸取 500 μg/mL 的尿酸对照品储备液 1、2、4 mL 于 10 mL 量瓶中, 以纯水稀释定容, 得到质量浓度为 50、100、200 μg/mL 尿酸对照品储备液, 存放于 4 °C 冰箱, 临用时室温放置 30 min 后使用。

2.4 方法专属性考察

取 5 μg/mL 尿酸对照品溶液直接进样; 小鼠空白血浆及高尿酸模型小鼠血浆, 经“2.2”项下方法处理, 在“2.1”项下色谱条件下进样分析, 其色谱行为如图 1 所示。由图可见, 尿酸保留时间为 4.6 min, 峰型良好, 且与其他内源性物质分离完全 (分离度大于 1.5), 与尿酸对照品 PDA 扫描光谱图对比, 小鼠空白血浆内源性尿酸及高尿酸模型小鼠血浆中尿酸与其扫描光谱一致。表明小鼠血浆内源性物质不干扰尿酸的定量分析。

2.5 标准曲线的制备

精密吸取 50 μg/mL 尿酸对照品储备液 1.0、1.6、

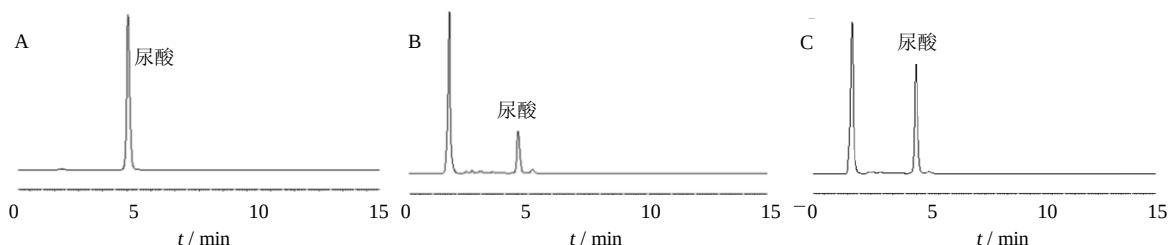


图1 尿酸对照品(A)、小鼠空白血浆(B)、高尿酸模型小鼠血浆(C)色谱图

Fig. 1 HPLC of standard uric acid (A), blank plasma of mouse (B) and plasma of hyperuricemia mouse (C)

2.0 mL 于 10 mL 量瓶中, 加纯水稀释定容, 得到质量浓度为 5、8、10 $\mu\text{g/mL}$ 尿酸标准溶液; 精密吸取 5 $\mu\text{g/mL}$ 尿酸标准溶液 1、2、4 mL 于 10 mL 量瓶中, 加纯水稀释定容, 得到质量浓度为 0.5、1.0、2.0 $\mu\text{g/mL}$ 的尿酸标准溶液; 在“2.1”项色谱条件下, 将质量浓度为 0.5、1.0、2.0、5.0、8.0、10.0 $\mu\text{g/mL}$ 尿酸标准溶液进行 HPLC 分析, 每个浓度进行双样本分析。以尿酸色谱峰面积 (Y) 对对照品浓度 (X) 做加权线性回归 (权重: $1/X$), 得尿酸线性回归方程为: $Y = 1\,015\,750X - 146\,031.5 (n=6), r=0.997$ 。

依据“2.2”项下血浆样品处理操作, 血浆共稀释 15 倍进样, 因此校正曲线中尿酸进样浓度乘以血浆处理过程稀释倍数 (15 倍) 即得到尿酸的折算血浆浓度。结果表明, 尿酸在 0.5~10.0 $\mu\text{g/mL}$ (折算血浆质量浓度 7.5~150.0 $\mu\text{g/mL}$) 范围内线性关系良好, 在 0.5 $\mu\text{g/mL}$ 时 S/N 大于 10, 本方法定量下限可达 0.5 $\mu\text{g/mL}$ (折算血浆质量浓度 7.5 $\mu\text{g/mL}$)。

2.6 重复性试验

取 5 $\mu\text{g/mL}$ 尿酸对照溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样分析, 连续进样 6 次, 以尿酸保留时间、峰面积计算, RSD 分别为 0.26%、1.44% ($n=6$), 所得色谱峰型均对称, 说明本方法的系统适用性良好, 适于进行相应批次的样品分析。

2.7 精密度试验

精密吸取小鼠空白血浆 90 μL , 分别加入 100、200、500 $\mu\text{g/mL}$ 尿酸对照溶液 10 μL , 涡旋 1 min 混匀, 得加样质量浓度 (A) 为 10、20、50 $\mu\text{g/mL}$ 小鼠血浆尿酸标准溶液, 按“2.2”项下方法处理血浆, 在“2.1”项色谱条件下, 每浓度进行 6 样本分析, 以尿酸峰面积计算, 低、中、高浓度血浆对照品 RSD 分别为 4.8%、3.0%、1.5% ($n=6$), 表明方法具有良好的精密度。

2.8 提取回收率

精密吸取小鼠空白血浆 90 μL , 分别加入纯水、100、200、500 $\mu\text{g/mL}$ 尿酸标准溶液 10 μL , 涡旋 1

min 混匀, 得到血浆对照及加样质量浓度为 10、20、50 $\mu\text{g/mL}$ 小鼠血浆尿酸测定溶液, 按“2.2”项下方法处理血浆, 在“2.1”项色谱条件下, 每浓度进行 3 样本分析, 所得结果扣除空白血浆内源性尿酸响应值, 与相应浓度标准溶液响应值对比计算, 低、中、高浓度血浆尿酸提取回收率分别为 (90.0 ± 16.4)%、(83.8 ± 6.5)%、(84.6 ± 7.2)%, RSD 分别为 4.5%、3.0%、3.2%, 符合生物样品测定指导原则要求。

2.9 稳定性实验

精密吸取小鼠空白血浆 90 μL , 分别加入 100、200、500 $\mu\text{g/mL}$ 尿酸标准溶液 10 μL , 涡旋 1 min 混匀, 得到加样质量浓度为 10、20、50 $\mu\text{g/mL}$ 小鼠血浆尿酸标准溶液, 按“2.2”项下方法处理血浆, 在“2.1”项色谱条件下, 于 0、1、2、4、8、12 h 测定尿酸峰面积, 高、中、低质量浓度样品 RSD 分别为 4.2%、1.5%、3.1%, 表明血浆样品在处理 12 h 内稳定, 满足测定需求。

2.10 小鼠血浆样品测定

2.10.1 统计学方法 采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较使用独立样本 t 检验, 置信区间 95%。

2.10.2 高尿酸模型小鼠血尿酸测定 将 42 只小鼠随机分为 7 组, 每组 6 只。选取 1 组 (共 6 只) 作为对照组, ip 0.5% CMC-Na 溶液; 选取 3 组 (每组 6 只, 共 18 只) 作为低剂量尿酸组, 按小鼠体质量 250 mg/kg 剂量 ip 尿酸 0.5% CMC-Na 混悬液; 剩余 3 组 (每组 6 只, 共 18 只) 作为高剂量尿酸组, 按小鼠体质量 500 mg/kg 剂量 ip 尿酸 0.5% CMC-Na 混悬液。对照组全部直接摘眼球取全血于不同枸橼酸钠抗凝管, 高、低尿酸组分别于 0.5、1.0、2.0 h 摘眼球取其中 1 组小鼠全血于不同枸橼酸钠抗凝管。所有全血样品 3 000 r/min 离心 10 min, 分离血浆。经“2.2”项下方法处理, 在“2.1”项色谱条件下进样分析, 测定结果见表 1。

表1 高尿酸模型小鼠血浆尿酸测定结果($\bar{x} \pm s, n = 6$)Table 1 Determination of uric acid in plasma of hyperuricemia mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	血浆尿酸/(μg·mL ⁻¹)		
		0.5 h	1.0 h	2.0 h
对照	—		10.7±3.3	
尿酸	250	41.9±4.9**	13.2±3.5	11.4±3.2
	500	73.1±6.2**	47.5±7.8**	28.9±3.3**

与对照组比较: ** $P < 0.01$ ** $P < 0.01$ vs control group

结果表明,血尿酸在0.5 h达到高峰,1.0~2.0 h浓度下降并趋于稳定,与对照组小鼠内源性血尿酸浓度比较,低剂量组在0.5 h血尿酸浓度显著升高($P < 0.01$),高剂量组3个时间点血尿酸浓度均显著升高($P < 0.01$),与相关报道一致^[17]。

2.10.3 经典药物评价 选取 Lesinurad 做为验证研究药物。将18只小鼠随机分为3组:模型组, Lesinurad 50、150 mg/kg 剂量组,每组6只。模型组 ip 尿酸 0.5% CMC-Na 混悬液(500 mg/kg),1 h后全部摘眼球取全血于不同枸橼酸钠抗凝管; Lesinurad 组 ig 给药 0.5 h后,每组均 ip 尿酸 0.5% CMC-Na 混悬液(500 mg/kg),再经1 h将小鼠全部摘眼球取全血于不同枸橼酸钠抗凝管。所有全血样品 3 000 r/min 离心 10 min,分离血浆。经“2.2”项下方法处理,在“2.1”项色谱条件下进样分析,结果见表3。可见给药1 h后的稳定期,与模型组比较, Lesinurad 50 mg/kg 剂量组血尿酸浓度显著下降($P < 0.05$),而 150 mg/kg 剂量组血尿酸浓度下降更显著($P < 0.01$),表明 Lesinurad 具有降尿酸作用且显现一定剂量相关性,与文献相符^[18]。

表3 给药小鼠血浆尿酸测定结果($\bar{x} \pm s, n = 6$)Table 3 Determination of uric acid in plasma of administered mice ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	尿酸/(μg·mL ⁻¹)
模型	—	50.0±4.3
Lesinurad	50	42.5±4.0*
	150	24.4±4.4**

与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group

3 讨论

3.1 色谱条件的优化

尿酸为弱酸性物质($pK_a = 3.89$),在有机溶剂和水中溶解性均较差,而相对易溶于碱性水溶液呈

离子化状态。离子化形态的尿酸分子在色谱柱上几乎无保留,因此测定时需将尿酸转化为分子形态。本研究尝试了以甲醇或乙腈为有机相,以纯水、pH 4.6的乙酸/乙酸铵缓冲液、0.5%乙酸及0.5%甲酸作为水相的流动相条件,结果表明尿酸在甲醇/0.5%乙酸条件下峰形良好,保留适当,并随水相增加保留时间延长,最终选择甲醇/0.5%乙酸(10:90)作为流动相。

本研究采用等度洗脱,流动相为甲醇、水及酸性较弱且腐蚀性小的乙酸作添加剂,简化操作,既可保证尿酸得到良好峰形与较短保留时间,又可使血浆所有内源性物质在10 min内出峰并与尿酸得到良好分离,缩短每针样品分析时间,为同时进行大量样品测定提供了平台。

3.2 血浆样品前处理

血浆样品前处理方法主要有萃取法和沉淀法。由于尿酸溶解性差,不易选择合适萃取溶剂,且萃取法操作复杂、费时,回收率低,不适合外标法定量。有报道^[12-14]以3倍乙腈或有机酸为沉淀剂处理血浆,研究发现有机酸如高氯酸、三氟乙酸等腐蚀性强不易操作,且高浓度酸会包裹尿酸分子影响测定,以乙腈沉淀蛋白后进样则出现较大溶剂效应,造成色谱峰展宽,保留时间提前,影响尿酸测定。因此本研究选择以2倍甲醇作为沉淀剂进行血样处理,既可避免溶剂效应,也节省溶剂成本,简化操作。

3.3 方法的优势及应用前景

血尿酸水平高低与痛风等疾病发生直接相关,维持体内尿酸的正常水平对保持内环境稳态具有重要临床意义,因而血尿酸浓度是高尿酸模型及降尿酸药物评价的关键指标。本方法以尿酸为测定指标,对小鼠高尿酸模型建立及经典药物降尿酸药效进行评价,均得到与文献报道一致的结果^[17-18]。比

较其他方法,本方法利用甲醇沉淀法处理血浆,操作简便;HPLC法峰形良好,单针运行10 min,分析周期短,为小鼠血尿酸的测定提供了一种可靠的分析手段,并可以快速有效地进行大量以降尿酸为指标的药物筛选。且本方法以血尿酸为测定关键指标,将来可辅以肌酐、尿素氮等临床指标的测定,从多学科角度评价高尿酸模型及药物,具有重要临床意义。

参考文献

- [1] Mount D B. The kidney in hyperuricemia and gout [J]. Curr Opin Nephrol Hypertens, 2013, 22(2): 216-223.
- [2] Hoy S M. Lesinurad: First global approval [J]. Drugs, 2016, 76(4): 509-516.
- [3] 陈琛,刘宁宁,缪子敬. Lesinurad:一种选择性尿酸再吸收抑制剂 [J]. 药物评价研究, 2016, 39(2): 324-328.
- [4] 田禾,蔡文卿,谢亚非,等. lesinurad的合成工艺研究 [J]. 现代药物与临床, 2015, 30(1): 1-7.
- [5] 张宪生,刘钰强,谢亚非,等. RDEA3170的合成工艺研究 [J]. 现代药物与临床, 2015, 30(10): 1179-1184.
- [6] 赵桂龙,田禾,商倩,等. 三氮唑正丙酸类 URAT1抑制剂制备方法及其在高尿酸血症和痛风治疗上的用途 [P]. CN: 105820130A, 2016-08-03.
- [7] 赵桂龙,蔡文卿,商倩,等. 四氮唑类 URAT1抑制剂制备方法及其在高尿酸血症和痛风治疗上的用途 [P]. CN: 106032377A, 2016-10-19.
- [8] 陈明,王磊,赖文泉,等. 血清尿酸紫外分光光度参考方法的建立及性能评价 [J]. 国际检验医学杂志, 2012, 3(3): 278-280.
- [9] 赵小玲,汪振辉,曹敏. 预阳极化超薄膜碳糊修饰镍铬合金电极测定尿酸 [J]. 化工时刊, 2015, 29(9): 19-23.
- [10] 孙凯,孙登明. 黄嘌呤和尿酸在修饰电极上的电化学生物行为及测定研究 [J]. 分析化学, 2014, 42(7): 991-996.
- [11] 汪丽儿,阮太成. 磷钨酸法和酶法测定尿酸实用意义的比较 [J]. 皖南医学院学报, 1995, 14(3): 319-320.
- [12] 郁颖佳,郑晓伟,黄滔敏,等. 高效液相色谱法测定人体血浆中尿酸的浓度 [J]. 复旦学报:医学版, 2006, 33(2): 273-275.
- [13] 胡坪,王瑞娟,王月荣,等. HPLC法测定人尿中尿酸含量 [J]. 分析试验室, 2011, 30(5): 50-53.
- [14] 彭长华,王昌富,李承彬,等. HPLC同时检测血清和尿样中肌酐、假尿苷、尿酸 [J]. 色谱, 1998, 16(2): 146-148.
- [15] 马青山,王茜,赵凯姝,等. UPLC-MS/MS法测定高尿酸血症大鼠血清及尿液中的尿酸和肌酐 [J]. 高等学校化学学报, 2013, 34(12): 2716-2720.
- [16] 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.
- [17] 陈光亮,孙秀霞,王钦茂,等. 小鼠高尿酸血症模型的研究 [J]. 中国药理学通报, 2001, 17(3): 350-352.
- [18] Shen Z, Rowlings C, Kerr B, et al. Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of lesinurad, a selective uric acid reabsorption inhibitor, in healthy adult males [J]. Drug Des Devel Ther, 2015, 9: 3423-3434.