

技术与方法

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.01.020

反相高效液相色谱法同时测定人血浆 5 种嘌呤物质的含量

彭建春, 杨 婧, 赵 华

(重庆医科大学药学院药物分析教研室, 重庆 400016)

【摘 要】目的:建立了高效液相色谱法同时测定血浆中 5 种嘌呤物质含量的方法,比较正常人与白血病和肝硬化患者血浆中 5 种嘌呤的含量差异,考察它们与白血病(Leukemia)和肝硬化(Liver cirrhosis)疾病的关系。方法:色谱柱:Phenomenex C18(250 mm × 4.6 mm, 5 μ m);流动相:50 mmol/L 醋酸铵(pH 4.65)-甲醇(99:1, v/v);流速:1 ml/min;检测波长:254 nm;柱温:30℃;进样量:100 μ l。结果:尿酸在 0.5~200 μ g/ml 浓度范围内线性关系良好,相关系数 $r=0.999\ 7$;次黄嘌呤、腺嘌呤和黄嘌呤在 0.005~0.3 μ g/ml 浓度范围内线性关系良好,相关系数 r 分别为 0.999 8、0.999 3 和 0.999 9;鸟嘌呤在 0.015~0.300 μ g/ml 浓度范围内线性关系良好,相关系数 $r=0.997\ 1$ 。结论:白血病和肝硬化患者血浆中的尿酸、次黄嘌呤和黄嘌呤含量明显高于正常人,腺嘌呤和鸟嘌呤无明显差异。

【关键词】高效液相色谱;尿酸;次黄嘌呤;黄嘌呤;腺嘌呤;鸟嘌呤

【中国图书分类法分类号】R917

【文献标志码】A

【收稿日期】2011-10-27

Simultaneous determination of five oxypurines in plasma by high-performance liquid chromatography

PENG Jianchun, YANG Jing, ZHAO Hua

(Department of Pharmaceutical Analysis, College of Pharmacy, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To develop and validate a simple HPLC method to determine uric acid (UA), xanthine (Xan), hypoxanthine (Hyp), adenine (Ade) and guanine (Gua) in plasma of normals and the patients with Leukemia and liver cirrhosis. Methods: The separation was performed on Phenomenex C18 column (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m), with 50 mmol/L ammonium acetate (pH 4.65)-methanol (99:1, v/v) as mobile phase isocratic elution, and measured absorbance at 254 nm. Results: Uric acid had good linear relationship in the range of 0.5~200 μ g/ml, and the correlation coefficient was 0.999 7; hypoxanthine, adenine and xanthine had good linear relationships in the range of 0.005~0.300 μ g/ml, and the correlation coefficients were higher than 0.999 3; guanine had good linear relationships in the range of 0.015~0.300 μ g/ml, and the correlation coefficient was 0.997 1. Conclusion: There are significant differences in the concentration of uric acid, hypoxanthine and xanthine in plasma between the normals and the patients with leukemia or liver cirrhosis, while adenine and guanine do not differ significantly.

【Key words】high performance liquid chromatography; uric acid; hypoxanthine; xanthine; adenine; guanine

嘌呤是生物体内重要的内源性物质。尿酸是人体内嘌呤代谢的最终产物,在正常生理情况下含量相对稳定,但在某些疾病状态下尿酸含量常常发生异常,如痛风、肾病、脑梗死、恶性肿瘤和高血压等患者血浆中的尿酸含量都明显升高。次黄嘌呤在黄嘌呤氧化酶的作用下先被氧化成黄嘌呤,最后生成尿酸,同时有氧自由基的产生,而氧自由基是多种疾病发病机制中的重要因素^[1,2]。因此作为形成氧自由基酶促反应底物的次黄嘌呤和黄嘌呤的测定日益受到人们的重视。国内对痛风、烧伤和心血管等疾病病人血浆中尿酸、黄嘌呤、

次黄嘌呤的含量研究已有报道^[3,4]。近年来,国外报道黄嘌呤、次黄嘌呤与肿瘤细胞的生长代谢关系密切^[5-11], L.Buhl^[12]将次黄嘌呤作为小鼠间皮细胞瘤生物标志物。肝硬化是一种严重和不可逆的肝脏疾病,患者体内黄嘌呤氧化酶活性明显升高,对肝损害的诊断和预后具有重要意义^[13],而黄嘌呤与次黄嘌呤作为黄嘌呤氧化酶的反应底物,它们的含量也可能随之发生变化。腺嘌呤(Ade)和鸟嘌呤(Gua)是构成 DNA 和 RNA 的基本单元,广泛参与遗传和代谢等多种生命活动,它们的代谢异常常引起诸多严重的疾病,如肾衰竭^[14]、痛风及男性不育^[15]等。

目前,临床测定血浆尿酸多采用尿酸酶法^[16],并将检测结果作为多种疾病的临床诊断指标,但由于黄嘌呤的影响使

作者介绍:彭建春(1985-),男,硕士,

研究方向:药物分析。

通信作者:赵 华,女,副教授,Email:200512317@163.com。

该法测量结果低于尿酸的实际含量^[7],影响结果的准确性。本文建立了反相高效液相色谱法同时测定正常人、白血病患者和肝硬化患者血浆中尿酸、次黄嘌呤、黄嘌呤、腺嘌呤和鸟嘌呤的含量,考察嘌呤与白血病和肝硬化疾病间的关系,为白血病和肝硬化疾病寻找新的临床诊断手段或治疗指标。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

Agilent 1100 液相色谱仪(配有 UV116 型检测器,美国惠普公司);Millipore SAS 67120 超纯水仪(Millipore Inc,US-A),TGL-16 高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂);SK-1 型快速混匀器(上海沪西分析仪器厂);BS210S 电子分析天平(Sartorius 公司);Model 828 型 pH 计(美国奥力龙公司)。

尿酸(UA,Merck 公司,纯度 99.5%),黄嘌呤(Xan,Sigma 公司,纯度 90%),次黄嘌呤、鸟嘌呤、腺嘌呤(Hyp、Gua、Ade,Sigma 公司,纯度均为 95%),氢氧化钠(分析纯,重庆市科北碚化工试剂厂),醋酸铵(分析纯,成都市科龙化工试剂厂);甲醇(Amethyst chemicals,J&K Scientific LTD),乙腈(acetonitrile,Amethyst chemicals,J&K Scientific LTD),钨酸钠(Na_2WO_4 ,Sodium tungstate,分析纯,重庆鑫泰化工试剂厂),三氯乙酸(TCA,分析纯,武汉同兴生物科技有限公司),高氯酸(HClO_4 ,Perchloric acid,分析纯,天津政成化学制品有限公司),硫酸锌(ZnSO_4 ,Zinc sulfate,分析纯,重庆市科北碚化工试剂厂),水为超纯水。

1.2 溶液的配制

精密称取尿酸标准品 0.021 0 g,置于 100 ml 容量瓶中,用 15 mmol/L 的氨水溶解定容,配成浓度为 210 $\mu\text{g/ml}$ 的标准溶液,在 4℃ 条件下保存备用。

精密称取次黄嘌呤 0.002 6 g,黄嘌呤 0.002 7 g,鸟嘌呤 0.002 5 g 分别置于 25 ml 容量瓶中,用 0.1 mol/L 的 NaOH 溶解定容,配成浓度为 100 $\mu\text{g/ml}$ 的标准溶液,在 4℃ 条件下保存备用。

1.3 样品溶液的制备

取血浆 0.1 ml,加入 0.8 ml 0.08 mol/L 的硫酸溶液,混匀,再加入 0.2 ml 10% 的钨酸钠溶液,混匀,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液 100 μl 进样。

1.4 色谱条件

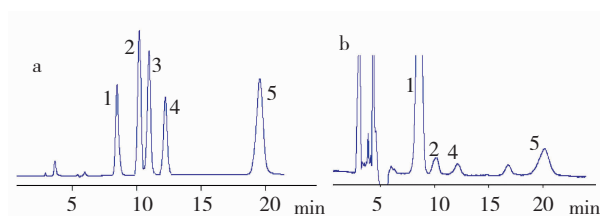
色谱柱:Phenomenex C18(250 mm $\times$ 4.6 mm,5 μm);流动相:50 mmol/L 的醋酸铵(pH 4.65)-甲醇(99:1,v/v);流速:1 ml/min;检测波长:254 nm;柱温:30℃;进样量:100 μl 。

2 结果

2.1 色谱条件的选择

在反相色谱条件下,嘌呤类物质保留较弱,且鸟嘌呤与次黄嘌呤的分离较为困难,为此全面考察了流动相中缓冲溶

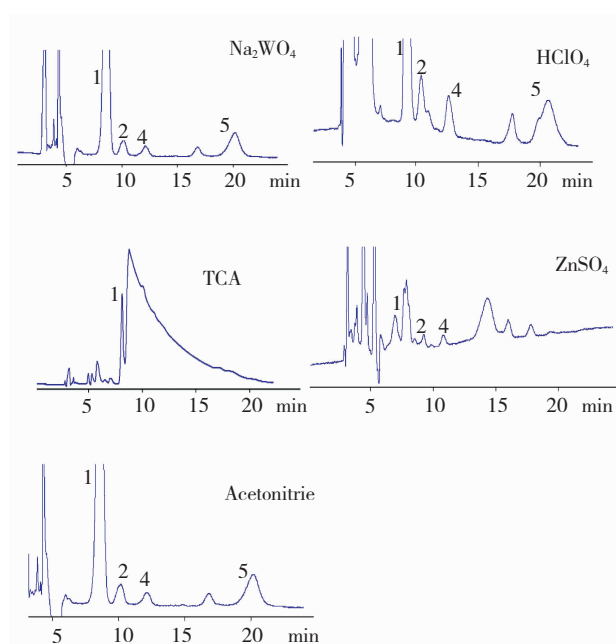
液种类、缓冲溶液 pH 以及流动相中甲醇浓度对 5 种嘌呤化合物分离情况的影响进行了全面考察,结果发现醋酸铵-甲醇流动相的分离效果优于磷酸盐-甲醇流动相,pH 为 4.65 时各种嘌呤化合物之间的分离效果较好(见图 1),尿酸、鸟嘌呤、次黄嘌呤、黄嘌呤、腺嘌呤之间的分离度分别为:5.39、1.64、3.56、10.25。



1. UA; 2. Hyp; 3. Gua; 4. Xan; 5. Ade
图 1 标准品溶液的色谱图(a)和白血病患者血浆样品的色谱图(b)
Fig.1 Chromatograms of oxypurines standard solutions and plasma samples of Leukemia

2.2 除血浆蛋白质方法的考察结果

生物样品的分析中,蛋白质的分离对分析结果的准确度和精密度有非常大的影响,为获得准确的分析结果,本实验分别以高氯酸、钨酸钠、三氯乙酸、硫酸锌和乙腈做血浆蛋白沉淀剂,考察血浆中内源性杂质对 5 种嘌呤色谱峰的干扰和对回收率的影响。结果表明,用钨酸钠和乙腈沉淀蛋白效果较好(色谱图见图 2),且钨酸钠法的回收率最高(见表 1)。



1. UA; 2. Hyp; 3. Gua; 4. Xan; 5. Ade

图 2 6 种沉淀剂沉淀血浆蛋白的样品色谱图

Fig 2 Chromatograms of plasma treated with five deproteinizing methods

2.3 标准曲线

分别将 5 种标准储备液用流动相稀释成一系列浓度的

标准工作液,按 1.4 色谱条件进样,测定峰面积,以浓度($\mu\text{g/ml}$)为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y),绘制标准曲线,计算相关系数,结果见表 2。

表 1 样品处理方法回收率					
Tab.1 Recovery of five deproteinizing methods					
蛋白沉淀剂	UA (%)	Hyp (%)	Xan (%)	Ade (%)	Gua (%)
钨酸钠	99.68	97.60	101.30	92.62	96.98
高氯酸	96.92	95.50	88.81	93.51	94.85
硫酸锌	6.69	8.31	9.38	10.20	8.98
乙腈	67.48	70.69	65.66	77.21	69.44

表 2 5 种嘌呤物质的标准曲线			
Tab.2 Standard curves of five oxypurines			
嘌呤物质	浓度范围	线性	相关系数
UA	0.005~0.3	$Y=87.47X+7.631\ 2$	0.999 7
Hyp	0.005~0.3	$Y=270.51X-0.136\ 4$	0.999 8
Xan	0.005~0.3	$Y=221.76X-0.137\ 4$	0.999 3
Ade	0.005~0.3	$Y=526.14X-0.222\ 5$	0.999 9
Gua	0.015~0.3	$Y=186.63X-0.143\ 0$	0.997 1

最低检测限:尿酸、次黄嘌呤、黄嘌呤、腺嘌呤和鸟嘌呤的最低检测限依次为是 2、0.4、0.4、0.4 ng 和 0.8 ng(S/N=3)。

2.4 回收率

取血浆 100 μl ,分别加入 10 $\mu\text{g/ml}$ 的次黄嘌呤、黄嘌呤、腺嘌呤和鸟嘌呤及 210 $\mu\text{g/ml}$ 的尿酸混合标准溶液 20、8、1 μl ,每个浓度平行 5 个样品($n=5$),按 1.3 方法处理样品,测定峰面积,计算回收率。结果见表 3。

2.5 精密度

取血浆 100 μl ,加入 10 $\mu\text{g/ml}$ 的次黄嘌呤、黄嘌呤、腺嘌呤和鸟嘌呤及 210 $\mu\text{g/ml}$ 的尿酸混合标准溶液 20 μl ,按 1.3 方法处理样品。每天测定 3 次($n=3$),连续测定 3 d,考查分析方法的日间精密度和日内精密度。结果见表 4。

2.6 生物样品测定结果

本方法测定了正常人、白血病和肝硬化患者血中尿酸、次黄嘌呤、黄嘌呤、腺嘌呤和鸟嘌呤的含量,结果见表 5[单位:($\mu\text{mol/L}$)]。

经软件 Spss statistics 17 做 t 检验,结果表明,白血病和肝硬化患者血浆中的尿酸、次黄嘌呤、黄嘌呤与正常组比较,明显高于正常组, $P\leq 0.05$,与文献报道[18]相同,而腺嘌呤和鸟嘌呤没有显著性差异,因此血浆中尿酸、次黄嘌呤、黄嘌呤有可能作为白血病和肝硬化的临床诊断指标和治疗监测指标。

表 5 生物样品测定结果						
Tab.5 The result of analyte samples						
样品	n	UA	Hyp	Xan	Ade	Gua
正常人	11	197.234 ± 67.555	0.546 ± 0.201	1.532 ± 0.403	0.412 ± 0.125	n.d.
白血病	5	387.276 ± 46.428	7.172 ± 1.521	4.289 ± 0.981	0.607 ± 0.251	n.d.
肝硬化	7	502.647 ± 50.213	2.652 ± 0.865	3.561 ± 1.542	0.433 ± 0.198	n.d.

注:n.d.表示不能检测

表 3 5 种嘌呤物质的回收率分析结果 ($n=5$)					
Tab.3 Analytic result of recovery of five oxypurines ($n=5$)					
嘌呤物质	原含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	RSD (%)
UA	4.38	0.21	4.60	104.48	1.21
	4.38	1.68	5.99	95.83	2.54
	4.38	4.20	8.53	98.72	2.39
Hyp	0.20	0.01	0.21	89.90	3.45
	0.20	0.08	0.28	99.65	3.88
	0.20	0.20	0.39	94.45	4.01
	0.08	0.01	0.09	108.61	4.98
Xan	0.08	0.08	0.16	104.13	5.67
	0.08	0.20	0.30	110.77	3.30
	0.002	0.01	0.011	95.30	4.55
Ade	0.002	0.08	0.076	92.62	3.70
	0.002	0.20	0.18	88.97	4.56
	n.d.	0.01	0.009	91.56	2.47
Gua	n.d.	0.08	0.078	96.98	3.62
	n.d.	0.20	0.19	97.15	4.51

表 4 5 种嘌呤物质分析方法的日内精密度及日间精密度 ($n=3$)

Tab.4 With in-day and day to day precisions of analytical method of five oxypurines ($n=3$)		
嘌呤物质	日内 (RSD/%)	日间 (RSD/%)
UA	1.43	3.24
Hyp	3.67	6.31
Xan	4.25	5.32
Ade	3.98	4.63
Gua	3.20	7.15

3 讨论

血浆中的黄嘌呤氧化酶主要来自于肝细胞。肝硬化作为一种慢性疾病,其正常的肝小叶结构被破坏,形成的假小叶内的肝细胞也出现不同程度的质变和弥漫性坏死,肝细胞膜通透性增加,黄嘌呤氧化酶大量释放,因此血浆中尿酸、黄嘌呤和次黄嘌呤含量升高;白血病患者体内核蛋白大量分解,使尿酸生成量增多,肾脏排泄能力下降,因此体内尿酸含量大量升高。

本文建立的高效液相色谱法测定人血浆的 5 种嘌呤就有专一性好、灵敏度高、准确度好的优点,优于临床检验中常用的尿酸酶法,可广泛作为临床的常规检测方法。

参 考 文 献

- [1] Pacher P L, Bekman J S, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease[J]. *Physiol Rev*, 2007, 87:315-424.
- [2] Wiseman H, Halliwell B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer[J]. *Biochem J*, 1996, 313:17-29.
- [3] You Z Y, Wang F J. Determination of uric acid, xanthine and hypoxanthine in fluid and organization by high-performance liquid chromatography[J]. *Chromatogram*, 1989, 7(2):95.
- [4] Xu S J, Liu T P. Determination of uric acid, xanthine and hypoxanthine in CSF by high-performance liquid chromatography[J]. *Clinical Laboratory Science*, 1998, 16(2):97-99.
- [5] Saugstad O D. Hypoxanthine as a measurement of hypoxia[J]. *Pediatr Res*, 1975, 9(4):158-161.
- [6] Sadzuka Y, Egawa Y. Effects of xanthine derivatives on the influx and efflux of doxorubicin in P388 and DOX-resistant P388 leukemia cells[J]. *Toxicology Letters*, 2002, 135(2):137-144.
- [7] Kummert T D, Garewal H S, Moon T E. Xanthine-Containing bronchodilators and pancreatic cancer[J]. *Lancet*, 1983, 2(8343):231.
- [8] Robinette C D. Methylated xanthines and pancreatic cancer[J]. *lancet*, 1981, 2(49):754.
- [9] Yee S B, Pritsos C A. Reductive activation of doxorubicin by xanthine dehydrogenase from EMT6 mouse mammary carcinoma tumors[J]. *Chemico-Biological Interactions*, 1997, 104(2-3):87-101.
- [10] Kkoglu E, Belce A, Zyurt E, et al. Xanthine oxidase levels in human brain tumors[J]. *Cancer Letters*, 1990, 50(3):179-181.
- [11] Marshman E. Hypoxanthine transport in human tumour cell lines. Relationship to the inhibition of hypoxanthine rescue by dipyrindamole[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2001, 61(4):477-484.
- [12] Buhl L, Dragsholt C, Svendsen P. Urinary hypoxanthine and pseudouridine as indicators of tumor development in mesothelioma-transplanted nude mice[J]. *Cancer Res*, 1985, 45:1159-1162.
- [13] Giller S, Urcia I, de Vries A, et al. The diagnostic value of xanthine-oxidase activity in serum of hepatic patients[J]. *Harefuah*, 1977, 93(10):309-311.
- [14] Yokozawa T, Zheng P D, Oura H et al. Animal model of adenine-induced chronic renal failure in rats[J]. *Nephron*, 1986, 44(3):230-234.
- [15] Adachi Y, Nakada T. Effect of experimentally induced renal failure on testicular testosterone synthesis in rats[J]. *Archives of andrology*, 1999, 43(1):37-45.
- [16] Sanders G T, Pasman A J, Hoek F J. Determination of uric acid with uricase and peroxidase[J]. *Clinica Chimica Acta*, 1980, 101:299-303.
- [17] Hande K R, Perini F. Hyperxanthinemia interferes with uric acid Determination by the uricase Method[J]. *Clin Chem*, 1979, 8(25):1494-1492.
- [18] Wung W E, Howell S B. Hypoxanthine concentration in normal subjects and patients with solid tumors and leukemia[J]. *Cancer Res*, 1984, 44:3144-3148.

(责任编辑:冉明会)

个案与短篇

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.01.021

1例以发热为主的自身免疫性肝炎

辛小娟

(重庆医科大学附属第一医院感染科, 重庆 400016)

【中国图书分类法分类号】R593.2

【文献标志码】B

【收稿日期】2011-07-05

1 临床资料

1.1 病史

患者,女,65岁,因“反复发热3月”于2010年10月25日入院。其体温多在38.5℃左右,以下午、夜间为主,伴畏寒,无寒战。伴乏力、纳差、厌油,偶有夜间汗多,感咽痛,偶感轻微头痛。在外院用头孢类抗生素治疗后,疗效不佳。后试行异烟肼0.3 qd、利福平0.45 qd、乙胺丁醇0.75 qd、吡嗪酰胺0.5 tid抗结核治疗近2月后,症状无好转,体温仍波动于37~39℃,渐感右膝关节隐痛不适,其余症状同前,且渐出现肝区

不适,纳差、乏力有所加重,查肝功有明显损害(ALT 310 U/L、AST 338 U/L),且病程中出现一过性红色皮疹。1年前发现肝功轻度受损(未见具体报告),查甲、乙、丙、戊肝标志物(-),自服保肝药(联苯双酯、护肝宁等)治疗,以后随访肝功能一直轻度异常。

1.2 体格检查

神清,全身皮肤黏膜及巩膜无黄染,臀部及左大腿可见少量散在风团样皮疹,红色,稍高出皮面,压之褪色。咽稍红。心肺未见明显异常。腹部丰满,右下腹见陈旧性手术疤痕,全腹软,无压痛、反跳痛及肌紧张,体检发现肝肋下0.5 cm质硬。肝区叩痛(+),双肾区无叩痛,移动性浊音(-),肠鸣音正常,双下肢无水肿。

作者介绍:辛小娟(1972-),女,讲师,
研究方向:感染病学。

(下转第88页)