

文章编号: 1006-2858(2008)09-0724-04

RP-HPLC法测定尿液中非蛋白氮代谢产物的含量

高新星¹, 郭娜¹, 李芳¹, 杨凌², 郭兴杰¹

(1. 沈阳药科大学药学院, 辽宁 沈阳 110016; 2. 中国人民解放军第202医院, 辽宁 沈阳 110003)

摘要: 目的 建立 RP-HPLC 法同时测定尿液中尿素、肌酸、肌酐、尿酸和马尿酸 5 种非蛋白氮代谢产物。方法 色谱柱为 Century C₁₈ 柱 (200 mm × 4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-20 mmol L⁻¹ 乙酸铵缓冲液 (pH 6.8) 为流动相, 进行梯度洗脱, 检测波长为 220 nm。结果 肌酸、肌酐、尿酸和马尿酸的质量浓度在 2 ~ 100 mg L⁻¹ 内、尿素的质量浓度在 100 ~ 1 000 mg L⁻¹ 内线性关系良好, 方法平均回收率为 97.6 % ~ 105.7 %, RSD 均小于 4.2 %。结论 该法灵敏、准确, 适用于临床尿液中非蛋白氮代谢产物的检测。

关键词: 非蛋白氮代谢产物; 尿素; 肌酸; 肌酐; 尿酸; 马尿酸; 反相高效液相色谱法

中图分类号: 917 **文献标志码:** A

尿素、肌酸、尿酸、肌酐和马尿酸是尿中主要非蛋白氮代谢产物。这 5 种代谢产物的含量与肾功能正常与否关系密切, 可作为肾病的标志物。长期持续的高血压往往会损伤肾脏, 引起高血压性肾病。当发生高血压性肾病时, 这 5 种物质的含量发生明显变化, 因此体内这 5 种物质的含量高低可作为高血压患者肾功能的评价指标。近年来, 有文献报道用 HPLC 法同时测定尿酸和肌

酐^[1], 肌酸、尿酸和肌酐^[2], 肌酸、尿酸、肌酐和马尿酸^[3], 尿素、肌酸、尿酸和肌酐^[4], 但同时测定上述 5 种物质的方法还未见报道。作者首次建立了灵敏、快速的 HPLC 梯度洗脱法同时测定尿液中尿素、肌酸、尿酸、肌酐和马尿酸 (化学结构式见图 1) 的浓度, 并应用该法对来自健康受试者和高血压患者的尿液进行了初步分析研究。

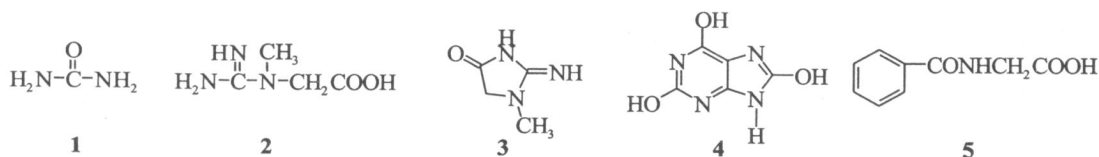


Fig. 1 Structures of urea (1), creatine (2), creatinine (3), uric acid (4) and hippuric acid (5)

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪: PU-2080 高压泵、UV-2075 紫外检测器 (日本分光公司), Sepu3000 色谱数据工作站 (山东金普分析仪器有限公司)。

尿酸对照品 (分析纯, BBI 原装试剂, 纯度质量分数 > 99.0 %), 尿素、肌酸、肌酐和马尿酸对照品 (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司, 纯度质量分数 > 99.0 %), 乙腈 (色谱纯, 市售), 水为二次蒸馏水 (自制)。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

尿素、肌酸、肌酐和马尿酸对照品贮备液分别用乙酸铵缓冲液配制。尿酸对照品贮备液用 20 mol L⁻¹ 的碳酸锂溶液在 70 °C 水浴中溶解配制, 冷却至室温, 棕色瓶中保存。

精密量取各对照品贮备液适量, 用乙酸铵缓冲液稀释制成系列对照品溶液。

2.2 尿样的收集和处理

正常人和高血压患者的尿液均来自中国人民

收稿日期: 2007-12-24

作者简介: 高新星 (1982-), 女 (汉族), 黑龙江鸡西人, 硕士研究生, E-mail: gaoxinxing_2006@163.com; 郭兴杰 (1956-), 女 (汉族), 辽宁葫芦岛人, 教授, 博士, 主要从事中药分析和体内药物分析研究, Tel: 024-23986285, E-mail: gxjhyz@yahoo.com.cn。

解放军第 202 医院。高血压按 WHO 标准诊断,所有患者均详细询问病史。测定时,取新鲜晨尿 8 000 r·min⁻¹离心 5 min,用乙酸铵缓冲液稀释 10 倍,过 0.45 μm 滤膜。

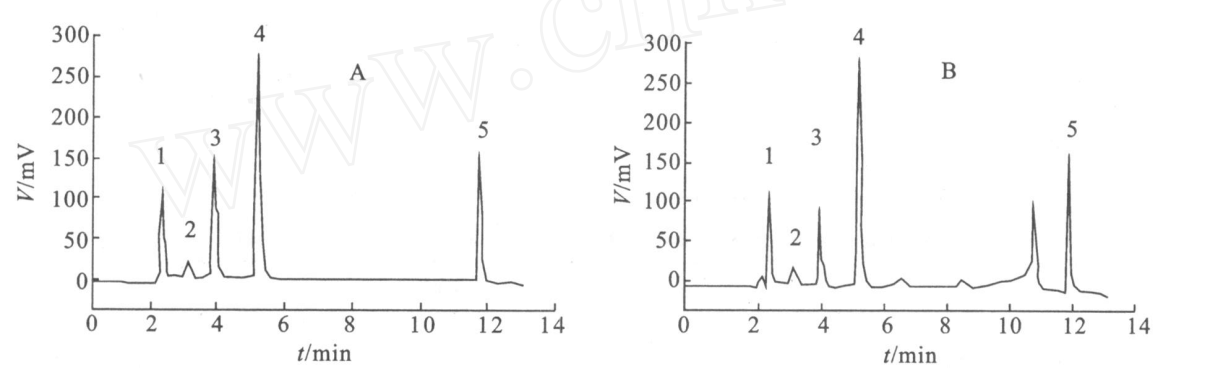
2.3 色谱条件

色谱柱:Century C₁₈柱(200 mm×4.6 mm,5 μm,大连中汇达科学仪器有限公司);流动相 A 为乙腈,流动相 B 为乙酸铵缓冲液(20 mmol L⁻¹,用三乙胺调 pH 值为 6.8),线性

梯度洗脱程序:0~5 min、0%A,5~15 min、A 由 0%变化至 70%,15~20 min、A 由 70%变化至 0%;流速:1.0 mL·min⁻¹;检测波长:220 nm;柱温:室温;进样量:20 μL。

2.4 方法的专属性

在“2.3”条色谱条件下进样测定,对照品溶液和尿样色谱图见图 2。由图 2 可见,5 种化合物在 13 min 内达到了完全分离,尿样中内源性物质不干扰测定。



1—Urea;2—Creatine;3—Uric acid;4—Creatinine;5—Hippuric acid
Fig. 2 HPLC chromatograms of standard solution (A) and urine sample (B)

2.5 稳定性考察

取处理后尿样,置于 4℃冰箱中放置,分别于 0、1、2、4、6、8 h 进样分析(双样本),计算 5 种物质峰面积的相对标准差均小于 3.2%,说明样品溶液至少在 8 h 内稳定。

2.6 线性范围和最低检测限的测定

取系列对照品溶液,在“2.3”条色谱条件下进

样,以待测物质量浓度(ρ,mg L⁻¹)为横坐标,以峰面积(A)为纵坐标,进行回归计算。5 种化合物的线性关系数据见表 1。分别取 5 种物质的对照品贮备液,用乙酸铵缓冲液进行逐级稀释,测定最低检测限,当 S/N 为 3 时,尿素、肌酸、肌酐、尿酸和马尿酸的最低检测限分别为 2.0、0.5、0.05、0.15、0.05 ng。

Table 1 Linear range, regression equation and correlation coefficient of the urea, creatine, uric acid, creatinine and hippuric acid

Component	ρ (linear ranges)/(mg L ⁻¹)	Regression equation	r
Urea	100 - 1 000	$A = 2.218 \times 10^3 \rho - 1.095 \times 10^2$	0.999 9
Creatine	2 - 100	$A = 4.590 \times 10^3 \rho - 39.00$	0.997 8
Uric acid	2 - 100	$A = 1.927 \times 10^4 \rho + 3.950 \times 10^2$	0.999 9
Creatinine	2 - 100	$A = 4.860 \times 10^4 \rho + 2.190 \times 10^4$	0.999 9
Hippuric acid	2 - 100	$A = 5.662 \times 10^4 \rho + 4.500 \times 10^4$	0.998 1

2.7 方法的精密度和准确度

取正常受试者尿液 0.5 mL,向其中加入已知量的对照品贮备液,用乙酸铵缓冲液稀释至 10 mL,分别制备 5 种物质(2 个水平的质量浓度)的质量控制样品,每一质量浓度进行 6 样本分析。用测得量(测定值与本底值之差)与加入量之比计算回收率,并计算精密度,结果见表 2。

2.8 样品含量测定

用上述建立的方法测定 20 例正常人和 10 例高血压患者尿中非蛋白氮质量浓度,结果见表 3。直观分析,正常男性的肌酸、尿酸和肌酐含量均高于正常女性,而尿素和马尿酸含量低于正常女性;患者尿液中非蛋白氮含量均高于正常组。采用 t 检验进行显著性分析,正常男性和正常女性非蛋白氮含量无显著性差异(P<0.05),正常人和患者非蛋白氮含量无显著性差异(P<0.05)。尽管

患者组尿液非蛋白氮含量高于正常组,但两组间脏损伤。
无显著性差异,初步判断高血压患者尚未发生肾

Table 2 The results of precision and accuracy of the urea ,creatine ,uric acid ,creatinine and hippuric acid

Component	$\rho_{\text{added}}/(\text{mg L}^{-1})$	Mean recovery/ %	Precision RSD/ %
Urea	100	105.1	4.2
	500	102.1	1.0
Creatine	2	99.2	3.2
	10	99.8	2.4
Uric acid	2	103.5	1.9
	10	97.6	0.8
Creatinine	2	105.7	2.6
	10	98.4	1.7
Hippuric acid	2	99.0	3.4
	10	100.7	0.7

Table 3 The contents of urea ,creatine ,uric acid ,creatinine and hippuric acid in urine($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Group	$\rho(\text{urea})/(\text{mg L}^{-1})$	$\rho(\text{creatine})/(\text{mg L}^{-1})$	$\rho(\text{uric acid})/(\text{mg L}^{-1})$	$\rho(\text{creatinine})/(\text{mg L}^{-1})$	$\rho(\text{hippuric acid})/(\text{mg L}^{-1})$
Normal male	302.8 $\pm$ 34.9	34.2 $\pm$ 3.7	70.0 $\pm$ 7.2	101.8 $\pm$ 7.7	33.4 $\pm$ 4.5
Normal female	308.9 $\pm$ 34.3	32.0 $\pm$ 3.4	66.5 $\pm$ 6.9	96.5 $\pm$ 7.1	35.8 $\pm$ 3.3
Patients	316.5 $\pm$ 42.5	35.1 $\pm$ 3.9	72.1 $\pm$ 3.1	105.1 $\pm$ 9.6	37.0 $\pm$ 4.4

3 讨论

3.1 尿液预处理方法的选择

作者对尿液的处理方法进行了考察。用水稀释尿液,在尿素的保留时间处出一倒峰,干扰尿素的测定。改用乙酸铵缓冲液稀释尿液后无倒峰出现,且尿素峰形好。

3.2 色谱条件的优化

文献报道的 HPLC 测定方法均采用磷酸盐缓冲液作为流动相。考虑到磷酸盐对仪器和色谱柱的损害,作者选择了乙酸盐缓冲液作为流动相。缓冲溶液 pH 值对组分的保留时间和分离行为有较大的影响:pH 值小于 6 时,肌酐和尿酸色谱峰重叠;pH 值大于 7 时,肌酐的洗脱时间明显缩短,而尿酸的洗脱时间又太长。因此,调节乙酸铵缓冲液的 pH 值为 6.8,使 5 种化合物均获得了较好的分离效果和令人满意的峰形。

尿素、尿酸、肌酸、肌酐和马尿酸在紫外光区的最大吸收波长分别为 195、240 (290)、220、235 和 235 nm。由于尿液中肌酸的含量低,为了提高检测灵敏度,选择了肌酸的最大吸收波长 220 nm 作为检测波长。

作者建立了 RP-HPLC 法测定尿液中非蛋白氮代谢产物,该法具有简便、快速、灵敏的特点,能准确可靠地测定 5 种非蛋白氮代谢产物的含量,且容易推广应用。该法适用于临床尿液中非蛋白氮代谢产物的检测和研究。

参考文献:

[1] J EN Jem-fon ,HSIAO Shih-liang ,L IU Kang-hsiung. Simultaneous determination of uric acid and creatinine in urine by eco-friendly solvent-free high performance liquid chromatographic method [J]. Talanta ,2002 ,58 (4) : 711 - 717.

[2] WERNER G ,SCHEIDER V ,EMMERT J. Simultaneous determination of creatine ,uric acid and creatinine B by high-performance liquid chromatography with direct serum injection and multi-wavelength detection [J]. Chromatogr B ,1990 ,525 (2) :265 - 275.

[3] YANG Yue-dong. Simultaneous determination of creatine ,uric acid ,creatinine and hippuric acid in urine by high performance liquid chromatography [J]. Biomedical Chromatography ,1998 ,12 :47 - 49.

[4] 孔宇 ,赵永席 ,王波. 反相高效液相色谱法测定尿液 4 种肾病标志物 [J]. 第四军医大学学报 , 2006 ,27 (7) :668 - 670.

Determination of nonprotein-nitrogen metabolites in urine by RP-HPLC

GAO Xin-xing¹, GUO Na¹, LI Fang¹, YANG Ling², GUO Xing-jie¹

(1. School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China; 2. 202th Hospital of the Chinese PLA, Shenyang 110003, China)

Abstract: Objective To establish an RP-HPLC method for the simultaneous determination of 5 kinds of nonprotein-nitrogen metabolites in urine (urea, creatine, creatinine, uric acid and hippuric acid). **Methods** The five compounds were successfully separated on a C₁₈ column (200 mm × 4.6 mm, 5 μm) using a mobile phase of acetonitrile-ammonium acetate (20 mmol L⁻¹, pH 6.8) with gradient elution. The detection wavelength was selected at 220 nm. **Results** The method was linear over the concentration range of 2 - 100 mg L⁻¹ for creatine, uric acid, creatinine and hippuric acid and 100 - 1 000 mg L⁻¹ for urea. The mean recovery of the method was 97.6% - 105.7%. The precisions were less than 4.2%. **Conclusions** The method is sensitive and accurate, and is suitable for determination of nonprotein-nitrogen metabolites in urine.

Key words: nonprotein nitrogen metabolite; urea; creatine; creatinine; uric acid; hippuric acid; RP-HPLC

(上接第 701 页)

Chemical constituents of aerial parts of *Asarum heterotropides* Fr Schmidt. var. *mandshuricum* (Maxim.) Kitag.

XU Lei, LÜ Shuai, SUN Bo-hang, GAO Hui-yuan, WU Li-jun

(School of Traditional Chinese Materia Medica, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

Abstract: Objective To study the chemical constituents of aerial parts of *Asarum heterotropides* Fr Schmidt. var. *mandshuricum* (Maxim.) Kitag. **Methods** The compounds were isolated by chromatography on silica gel column and identified by the physiochemical properties and spectral analysis. **Results** Six compounds were obtained and identified as (10bS) 8,9-dihydroxy-1,5,6,10b-tetrahydro-2H-pyrrolo[2,1-a]isoquinolin-3-one (1), nicotinic acid (2), 5-hydroxymethylfuroic acid (3), succinic acid (4), kaempferol (5), kaempferol-3-O-β-D-glucopyranoside (6). **Conclusions** Compounds 1 - 3 are firstly isolated from *Asarum*. Compound 5 is isolated from *Asarum heterotropides* Fr Schmidt. var. *mandshuricum* (Maxim.) Kitag. for the first time.

Key words: *Asarum heterotropides* Fr Schmidt. var. *mandshuricum* (Maxim.) Kitag.; aerial part; chemical constituent; structure identification