

Stanovení kyseliny močové v lidském séru pomocí HPLC s UV detekcí – porovnání s enzymatickou metodou

Kandár R.¹, Žáková P.¹, Mocová T.¹, Skalický J.², Kovařík J.²

¹Katedra biologických a biochemických věd, Fakulta chemicko-technologická, Univerzita Pardubice, Pardubice

²Oddělení klinické biochemie a diagnostiky, Krajská nemocnice Pardubice, Pardubice

SOUHRN

Je zde popsána metoda pro specifické stanovení kyseliny močové v lidském séru. Byla testována účinnost různých deproteinizačních činidel. Výsledky získané proměřením 300 vzorků sér pomocí vysoce účinné kapalinové chromatografie byly porovnány s výsledky získanými rutinní enzymatickou metodou.

Vzorky sér byly deproteinovány pomocí kyseliny chloristé a supernatanty byly analyzovány vysoce účinnou kapalinovou chromatografií na reverzní fázi. Pro separaci byla užitá kolona MAG 1, 4,6 x 150 mm, Biospher PSI 200, 5 µm. Mobilní fáze byla směs 5% metanolu v 25 mmol/l dihydrogenfosforečnanu sodného (v/v), pH 4,75.

Analytické parametry metody jsou vyhovující: variační koeficienty přesnosti v sérii a mezi sériemi se pohybovaly pod 5 %. Výťažnost, určená metodou standardních přídavek, se pohybovala v rozmezí 90,0–103,4 %. Mez stavitelnosti byla 10,0 µmol/l (3,3 pmol/nástřik).

Výsledky získané chromatografickou metodou dobře korelovaly s výsledky získanými rutinní enzymatickou metodou, avšak chromatografická metoda poskytovala vyšší hodnoty, a to v závislosti na dané skupině pacientů. Zde prezentovaná metoda je vhodná pro analýzu těch vzorků, u nichž klasická enzymatická metoda poskytuje nespolehlivé výsledky.

Klíčová slova: kyselina močová, HPLC s UV detekcí, enzymatická metoda, porovnání metod.

SUMMARY

Kandár R., Žáková P., Mocová T., Skalický J., Kovařík J.: Determination of uric acid in human serum using HPLC with UV detection

A sensitive method for the specific determination of uric acid in human serum is described. The effectiveness of various protein precipitants was tested. Results from measurements by high-performance liquid chromatography on 300 serum samples were compared with an enzymatic method.

Serum samples were deproteinized with perchloric acid and analyzed by reversed-phase high-performance liquid chromatography. For the separation, a reverse phase column MAG 1, 4.6 x 150 mm, Biospher PSI 200 C18, 5 µm, was used. The mobile phase consisted of 5% methanol in 25 mmol/L sodium dihydrogenphosphate (v/v), pH 4.75.

The analytical performance of this method is satisfactory: the intra-assay and inter-assay coefficients of variation were below 5%. Quantitative recoveries of spiked serum samples were between 90.0 – 103.4%. The limit of quantification was 10.0 µmol/L (3.3 pmol/inject).

Results obtained by chromatographic method correlated well with an enzymatic method, but gave at average higher values depending on a group of patients. Presented method is useful for the analysis of samples where the classical enzymatic method do not give reliable results.

Key words: uric acid, HPLC with UV detection, enzymatic method, a comparison of methods.

Úvod

Kyselina močová (KM) je konečným produktem metabolismu purinů u lidí. Stanovení KM se používá při diagnostice různých nemocí, jako je selhání ledvin, dna, leukémie, lupénka a onemocnění srdce. Zvýšené hladiny KM nalézáme také u takových stavů, jako je alkoholismus, obezita, diabetes, vysoký cholesterol a hypertenze [1–3]. KM se považuje za významnou antioxidační látku, ovšem nedávné studie naznačily, že KM vstupuje do buněk prostřednictvím specifických transportérů a vyvolává zde prozánětlivé a prooxidační reakce [4–6].

V současné době existuje mnoho metod pro stanovení KM v biologickém materiálu. Enzymatické metody, využívající urikázu [7] a metody s kyselinou fosfowolfrá-

movou [8] jsou zaměřeny na stanovení koncentrací KM v séru a moči a jsou limitovány citlivostí. Enzymatické metody jsou více rezistentní vůči různým interferujícím látkám v porovnání s metodou využívající redukce kyseliny fosfowolframové kyselinou močovou. K odstranění těchto interferujících látek se používají různé separační metody, především vysoce účinná kapalinová chromatografie (HPLC) s UV [9, 10], elektrochemická [11] a hmotnostní [12, 13] detekce, plynová chromatografie [14] a kapilární elektroforéza [15]. Pro stanovení KM v různém biologickém materiálu byly vyvinuty také různé elektrochemické metody [16, 17].

Cílem této práce bylo vyvinout a validovat HPLC metodu s UV detekcí pro rutinní stanovení KM v séru a porovnat ji s enzymatickou metodou běžně používanou v klinicko-biochemických laboratořích.

Materiál a metody

Chemikálie

Kyselina močová, kyselina chlorovodíková, kyselina metafosforečná, kyselina fosforečná, kyselina chloristá, kyselina trichloroctová, kyselina šťavelová, kyselina 5-sulfosalicylová, dihydrogenfosforečnan sodný, octan sodný a octan amonný byly od Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), metanol, etanol a acetonitril pro HPLC analýzu od firmy Merck KgaA (Darmstadt, Německo).

Pro kvantifikaci byly použity kalibrátory o koncentraci 0, 708 a 1439 $\mu\text{mol/l}$ (šarže 8JJ178, 8JD278, 8JD378) od firmy Dade Behring (Newark, DE, USA). Kontrolní séra chemTRAK® (šarže TLM10081, TLM10082) byly od firmy MAS® Controls (Passau, Německo). Pro určení analytických parametrů metody byl připraven zásobní roztok kyseliny močové v 1 mmol/l kyselině chlorovodíkové, který byl rozdělen na jednotlivé porce (asi 5 ml), které byly uchovávány při $-80\text{ }^\circ\text{C}$. Všechny ostatní chemikálie byly čistoty p. a.

Instrumentace

Chromatografické analýzy byly provedeny na kapalinovém chromatografu Shimadzu (Kyoto, Japonsko), složeného z čerpadla LC-10ADvp, autosampleru SIL-10ADvp, termostatu kolon CTO-10ASvp, spektrofotometrického detektoru s proměnnou vlnovou délkou SPD-10Avp a řídicího systému SCL-10Avp. Software a hardware pro řízení, záznam a vyhodnocení dat z chromatografického systému poskytla firma DataApex (Praha, Česká republika).

Vzorky a pacienti

Vzorky sér byly získány z Oddělení klinické biochemie a diagnostiky Krajské nemocnice Pardubice od anonymních pacientů ($n = 300$, 143 žen ve věku 61 ± 18 roků a 157 mužů ve věku 62 ± 17 roků). Pacienti byli rozděleni podle diagnóz do pěti skupin: pacienti s diabetem ($n = 35$, 18 žen ve věku 60 ± 20 roků a 17 mužů ve věku 61 ± 17 roků), pacienti s diagnózou hypertenze ($n = 51$, 24 žen ve věku 62 ± 18 roků a 27 mužů ve věku 63 ± 16 roků), pacienti s kardiovaskulárním onemocněním ($n = 52$, 25 žen ve věku 70 ± 18 roků a 27 mužů ve věku 69 ± 17 roků), pacienti s urologickými potížemi ($n = 85$, 41 žen ve věku 60 ± 19 roků a 44 mužů ve věku 64 ± 17 roků), pacienti s ostatními diagnózami, kteří byli bráni jako kontrolní skupina ($n = 77$, 35 žen ve věku 48 ± 21 roků a 42 mužů ve věku 49 ± 22 roků). Studii odsouhlasila etická komise při Krajské nemocnici Pardubice.

Vzorky krve byly odebrány do odběrových plastových zkumavek s gelem (Vacuette, č. 455071, Greiner Labor-technik Co., Kremsmünster, Rakousko). Sérum bylo od krevního koláče odděleno pomocí centrifugace ($1700 \times g$, 15 minut, laboratorní teplota). Vzorky sér byly uchovávány při $-80\text{ }^\circ\text{C}$ a doba uchování nepřesáhla 1 měsíc.

Příprava vzorku

Všechny vzorky pacientů byly měřeny v duplikátu. Bylo testováno několik deproteinačních činidel. Vychlazené deproteinační činidlo (1 mol/l kyselina chloristá, 10% kyselina metafosforečná, 10% kyselina 5-sulfosa-

licylová, 10% kyselina trichloroctová, acetonitril s 0,1 mol/l kyselinou chlorovodíkovou, acetonitril s 0,1 mol/l kyselinou octovou, metanol s 0,1 mol/l kyselinou chlorovodíkovou, etanol s 0,1 mol/l kyselinou chlorovodíkovou) bylo opatrně přidáno (400 μl) k séru nebo standardům (200 μl). Směs byla důkladně promíchána, inkubována (10 min, $4\text{ }^\circ\text{C}$) a poté odstředěna ($22000 \times g$, 10 min, $4\text{ }^\circ\text{C}$). Supernatant byl desetkrát zředěn mobilní fází (50 μl supernatantu a 450 μl mobilní fáze), přefiltrován skrze nylonový filtr (0,20 μm) o průměru 4 mm (Supelco, Bellefonte, PA, USA) a filtrát byl převeden do tmavých vialek o objemu 1 ml.

HPLC analýza

KM byla separována na koloně MAG 1, 4,6 x 150 mm, Biospher PSI 200 C18, 5 μm (Labio a.s., Praha, Česká republika) opatřená ochranným PEEK filtrem s porozitou 0,5 μm (Supelco, Bellefonte, PA, USA) při $25\text{ }^\circ\text{C}$. Mobilní fází byla směs metanolu a dihydrogenfosforečnanu sodného (25 mmol/l), 5 : 95, v/v, pH 4,75. Průtok mobilní fáze byl 0,5 ml/min. Efluent byl monitorován při 292 nm (absorpční maximum KM). Množství KM bylo určeno z odpovídající plochy píku pomocí softwaru Clarity (DataApex, Praha, ČR). Koncentrace KM ve vzorcích séra byly odečteny z kalibrační křivky.

Stanovení kyseliny močové enzymatickou metodou

Principem metody je měření poklesu absorbance KM při 293 nm za katalýzy enzymem urikázy. Hladiny KM u pacientů byly měřeny pomocí setu Uric Acid Flex® na biochemickém analyzátoru Dimension® RxL Max® (Siemens Healthcare Diagnostic Ltd., Deerfield, IL, USA), na Oddělení klinické biochemie a diagnostiky Krajské nemocnice Pardubice v rámci běžného vyšetření.

Statistické analýzy

Výsledky jsou prezentovány jako střední hodnota \pm SD. Pro porovnání dvou výběrů (pacienti oproti kontrolní skupině, ženy oproti mužům) byl použit Studentův t-test a analýza korelace (korelace hladiny KM s věkem a korelace mezi HPLC a enzymatickou metodou) byla provedena s použitím Spearmanova koeficientu pořadové korelace (software QCExpert, Trilobyte, Pardubice, Česká republika). Hodnota $p < 0,05$ byla považována za statisticky významnou.

Výsledky a diskuse

Účinnost jednotlivých deproteinačních činidel

Pro dané HPLC podmínky byla vhodná pouze dvě precipitační činidla, a to kyselina chloristá a kyselina metafosforečná. Výtěžnost metody se v obou případech pohybovala v blízkosti 100% a KM byla v chlazeném autosampleru ($8\text{ }^\circ\text{C}$) stabilní po dobu minimálně 24 hodin (výsledky neukázány). Při deproteinaci pomocí okyselených organických rozpouštědel jsme nedosahovali přijatelné výtěžnosti, navíc pík KM za daných HPLC podmínek zřetelně chvostoval. Kyseliny trichloroctová a 5-sulfosalicylová byly také nevhodné, neboť

silně absorbují při 292 nm. Pro další analýzy jsme zvolili jako precipitační činidlo kyselinu chloristou, protože je levnější než kyselina metafosforečná.

HPLC analýza kyseliny močové

HPLC chromatogram KM v lidském séru je ukázán na obrázku 1. Analytické parametry pro stanovení KM pomocí HPLC s UV detekcí jsou shrnuty v tabulkách 1 a 2. Pro určení přesnosti v sérii jsme analyzovali směsné sérum desetkrát v průběhu jednoho dne za identických podmínek. Pro určení přesnosti mezi sériemi jsme použili stejné směsné sérum, které jsme analyzovali v průběhu dvanácti dní. Koeficienty variace byly pod 5 %. Výtěžnost metody, určená metodou standardních přídavek, se pohybovala v rozmezí 90,0–103,4 %. Kalibrační křivka byla lineární v celém rozsahu testovaných koncentrací (10–1000) $\mu\text{mol/l}$. Rovnice regresní přímky (získána kombinací patnácti kalibračních křivek) je $y = 8,5421x - 50,4125$. Průměrná směrnice, intercept a korelační koeficient (r) byly 8,5421 (95% interval spolehlivosti: 8,4026 – 8,6698), -50,4125 (-26,4805 až -76,8789) a 0,9997. Typická kalibrační křivka, konstruována z devíti bodů, je znázorněna na obrázku 2. Nejnižší koncentrace KM, která může být kvantifikována s přijatelnou správností a přesností je 10,0 $\mu\text{mol/l}$ (3,3 pmol/nástřik) [přesnost v sérii s CV = 7,5%, $n = 10$; přesnost mezi sériemi s CV = 9,6%, $n = 12$]. Detekční limit KM, definovaný jako poměr užitečného signálu k šumu 3 : 1 (S/N) byl 2,0 $\mu\text{mol/l}$ (0,7 pmol/nástřik) [nástřik 10 μl ; citlivost detektoru: 0,001 AUFS].

Table 1. Precision of uric acid for serum samples analysis

A) Precision (within-day)		
Sample (n)	Mean \pm SD ($\mu\text{mol/L}$)	CV (%)
Serum (10)	201.4 \pm 4.8	2.4
Serum (10)	633.5 \pm 12.0	1.9
B) Precision (between day)		
Sample (n)	Mean \pm SD ($\mu\text{mol/L}$)	CV (%)
Serum (12)	206.7 \pm 9.9	4.8
Serum (12)	645.3 \pm 20.0	3.1

SD – standard deviation
CV – coefficient of variation

Kyselina močová byla separována na koloně s vázanou reverzní fází (C18). Eluce byla izokratická, s použitím směsi metanolu a dihydrogenfosforečnanu sodného jako mobilní fáze. Složení mobilní fáze bylo optimalizováno za účelem nejlepší separace a co nejkratšího retenčního času pro KM. Pro určení co nejvhodnějšího složení mobilní fáze byly analyzovány jak standardy, tak také směsné sérum. Byly testovány různé mobilní fáze (zejména dihydrogenfosforečnan sodný, octan sodný a octan amonný ve směsi s metanolem, etanolem a acetonitrilem) a různé gradienty mobilních fází. Nejlepších výsledků jsme dosáhli s mobilní fází metanol – 25 mmol/l dihydrogenfosforečnan sodný (5 : 95 v/v, pH 4,75) při izokratické eluci. Zjišťovali jsme také optimální teplotu pro separaci KM (od 20 do 45 $^{\circ}\text{C}$). Optimální teplotní interval byl mezi 20 a 25 $^{\circ}\text{C}$. Kritérii byly rozlišení, stabilita absorbance a rychlost analýzy.

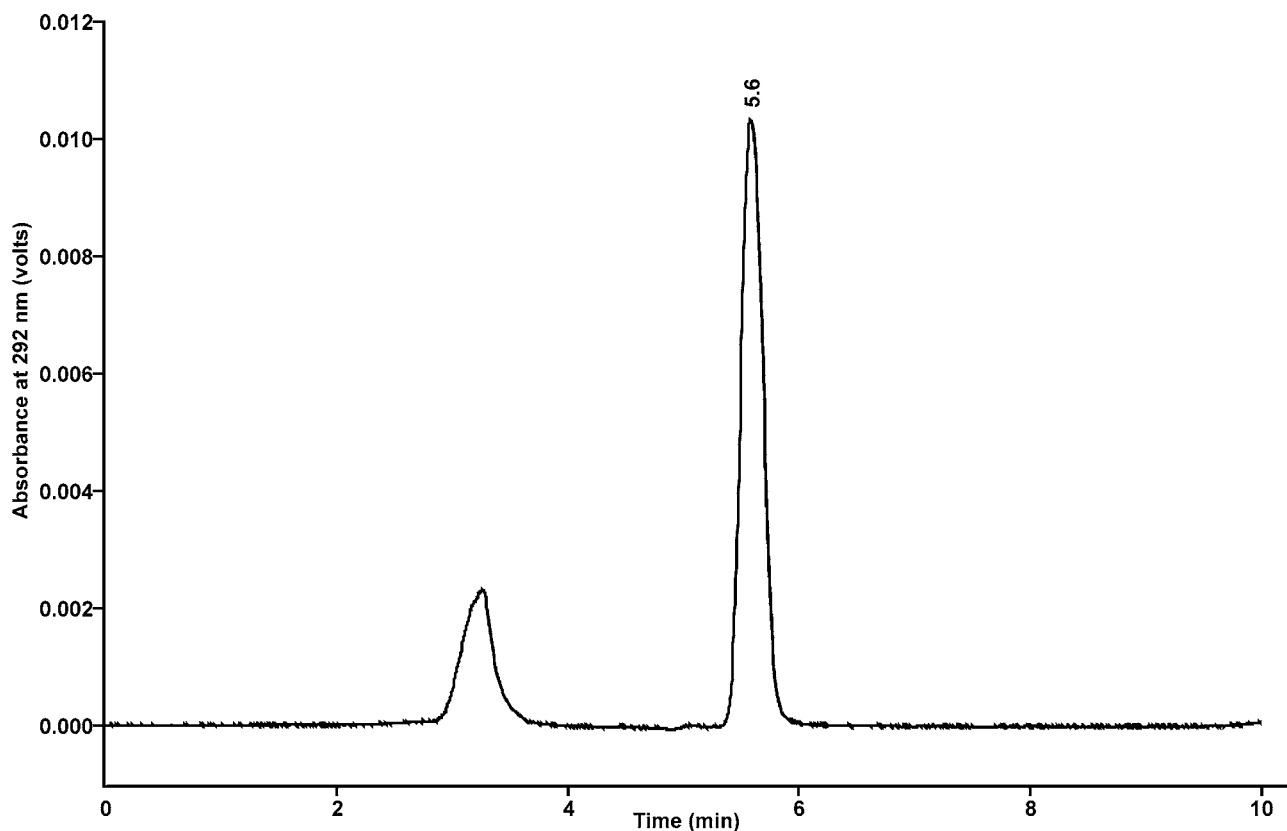
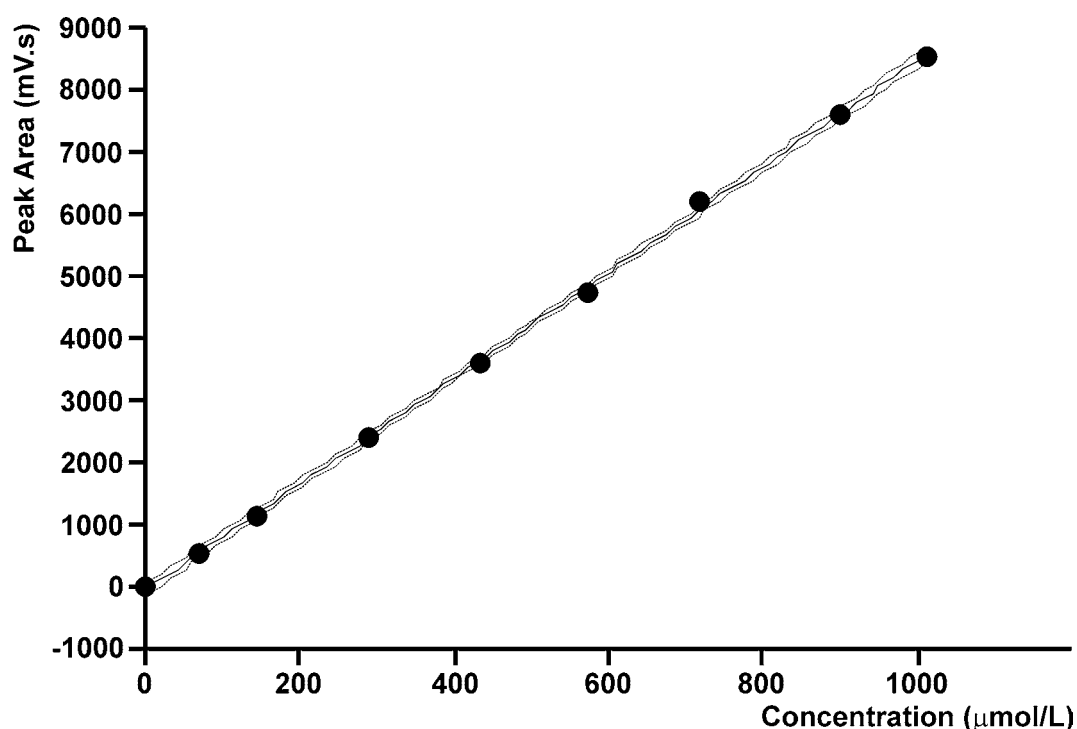


Fig. 1. Representative HPLC chromatogram of serum uric acid (191.4 $\mu\text{mol/L}$)
HPLC conditions: an isocratic elution (mobile phase: 5% methanol in 25 mmol/L sodium dihydrogenphosphate, pH 4.75). Stationary phase was an analytical column MAG 1, 4.6 x 150mm, Biospher PSI 200 C18, 5 μm fitted PEEK pre-column filter, pore size 0.5 μm . The flow rate was kept constant at 0.5 mL/min and separation ran at 25 $^{\circ}\text{C}$.

Table 2. Recovery of uric acid for serum samples analysis

Recovery					
Added ($\mu\text{mol/L}$)	Observed ($\mu\text{mol/L}$)*	Recovery (%)	Added ($\mu\text{mol/L}$)	Observed ($\mu\text{mol/L}$)*	Recovery (%)
0	204.4 \pm 4.3	-	0	642.1 \pm 19.9	-
25	228.1 \pm 4.5	94.8	5	646.6 \pm 19.7	90.0
50	253.0 \pm 5.6	97.2	10	651.4 \pm 18.9	93.0
75	278.2 \pm 5.7	98.4	15	656.3 \pm 21.5	94.7
100	302.4 \pm 6.4	98.0	20	660.8 \pm 21.8	93.5
250	455.9 \pm 8.7	100.6	50	693.8 \pm 20.9	103.4
500	703.7 \pm 12.7	99.9	100	743.0 \pm 27.9	100.9
	Mean	98.2 \pm 1.9		Mean	95.9 \pm 4.7
	CV	1.9		CV	4.9

*Mean \pm SD of triplicate assays is recorded.

**Fig. 2.** Typical standard curve for HPLC quantification of uric acid (QCexpert, Trilobyte, Pardubice, Czech Republic)

Regression equation: $y = 8.512x - 49.183$

$R^2 = 0.9997$

$A = 8.512$ (SD = 0.045); $B = -49.183$ (SD = 8.452)

Tři různé kolony, všechny typu C18, byly testovány v rámci této studie: kolona MAG 1, 4,6 x 150mm, Biospher PSI 200 C18, 5 μm opatřená ochranným PEEK filtrem s porozitou 0,5 μm ; kolona Discovery® BIO Wide Pore C18, 150 x 4mm, 5 μm opatřená ochrannou kolonkou Discovery® BIO Wide Pore C18, 20 x 4mm, 5 μm (Supelco, Bellefonte, PA, USA); kolona LichroCART 125 x 4mm, Purospher STAR RP-18e, 5 μm opatřená ochrannou kolonkou LichroCART 4 x 4mm, Purospher STAR RP-18e, 5 μm (Merck KgaA, Darmstadt, Německo). Všechny tři testované kolony poskytly výbornou separaci KM s vysokým rozlišením a poměrně krátkým retenčním časem. Pro studii jsme zvolili kolonu MAG 1, která je dvakrát levnější než kolona LichroCART od firmy Merck a čtyřikrát levnější než kolona Discovery od firmy Supelco.

Stanovení kyseliny močové v séru vybraných pacientů

Údaje o hladinách KM u pacientů, korelace mezi věkem a hladinou KM, stejně tak jako porovnání hladin KM u pacientů s diabetem, hypertenzí, kardiovaskulárním onemocněním a urologickými potížemi oproti pacientům s ostatními diagnózami jsou uvedeny v tabulkách 3 a 4.

Je zcela známým faktem, že hladiny KM u mužů jsou vyšší než u žen. To potvrzují i naše výsledky, avšak u pacientů s diabetem, kardiovaskulárním onemocněním a urologickými potížemi ne statisticky významně (viz tab. 3). Pomocí Studentova t-testu jsme našli statisticky významně vyšší hladiny KM u pacientů s kardiovaskulárním onemocněním v porovnání s kontrolní skupinou ($341,4 \pm 119,2$ oproti $296,2 \pm 97,0$; $p = 0,0025$), a to

Table 3. Group characteristic

	N	Age (years) Mean ± SD	Uric acid (µmol/L) Mean ± SD	P* (Patients vs. a control group)	P* (F vs. M)
Patients with DM (all)	35	62 ± 15	315.4 ± 109.4	0.0869	
Patients with DM (F)	18	60 ± 20	279.3 ± 118.9	0.0840	0.0807
Patients with DM (M)	17	61 ± 17	320.2 ± 136.5	0.2584	
Patients with hypertension (all)	51	64 ± 15	315.1 ± 100.7	0.1208	
Patients with hypertension (F)	24	62 ± 18	267.4 ± 103.5	0.3762	0.0010
Patients with hypertension (M)	27	63 ± 16	336.0 ± 117.4	0.1313	
Patients with CVD (all)	52	71 ± 15	341.4 ± 119.2	0.0025	
Patients with CVD (F)	25	71 ± 18	311.1 ± 135.9	0.0139	0.2005
Patients with CVD (M)	27	69 ± 17	346.1 ± 130.9	0.0613	
Patients with urologic diseases (all)	85	63 ± 17	296.4 ± 111.3	0.9690	
Patients with urologic diseases (F)	41	60 ± 19	268.0 ± 135.7	0.7192	0.0587
Patients with urologic diseases (M)	44	64 ± 17	310.0 ± 97.2	0.7368	
Patients with other diseases; a control group (all)	77	49 ± 21	296.2 ± 97.0	–	
Patients with other diseases; a control group (F)	35	48 ± 21	258.0 ± 94.5	–	0.0029
Patients with other diseases; a control group (M)	42	49 ± 22	314.9 ± 109.8	–	

DM – diabetes mellitus, CVD – cardiovascular diseases, F – female, M – male, *Student's t-test

Table 4. Correlations between age and uric acid levels

	Correlation	Regression analysis	
	Spearman's rho*	R	F-test (P)
All patients	0.2028	0.2050	0.0004
All patients (F)	0.2846	0.2857	0.0005
All patients (M)	0.1275	0.1168	0.1451
Patients with DM (all)	0.1768	0.0124	0.9437
Patients with DM (F)	0.1207	0.1279	0.6129
Patients with DM (M)	0.1299	0.2413	0.3508
Patients with hypertension (all)	0.1746	0.2478	0.0796
Patients with hypertension (F)	0.2783	0.3385	0.1056
Patients with hypertension (M)	0.1013	0.1661	0.4076
Patients with CVD (all)	0.0818	0.0753	0.5956
Patients with CVD (F)	0.2054	0.2649	0.1850
Patients with CVD (M)	-0.0836	0.0880	0.6623
Patients with urologic diseases (all)	0.1094	0.0929	0.3975
Patients with urologic diseases (F)	0.1117	0.1712	0.2846
Patients with urologic diseases (M)	0.1147	0.1117	0.4705
Patients with other diseases (all)	0.2427	0.2656	0.0196
Patients with other diseases (F)	0.3101	0.3412	0.0449
Patients with other diseases (M)	0.2275	0.2338	0.1363

*Spearman's rank correlation coefficient

především u žen ($311,1 \pm 135,9$ oproti $258,0 \pm 94,5$; $p = 0,0139$). Dále jsme zjistili, že hladiny KM statisticky významně korelují s věkem, pouze analyzujeme-li celý soubor pacientů a u skupiny pacientů s ostatními diagnózami, především žen (viz tab. 4). Je zajímavým zjištěním, že u ostatních skupin pacientů hladiny KM s věkem nekorelují. Nelze však dělat žádné závěry, neboť jednotlivé soubory obsahují malý počet pacientů.

Porovnání chromatografické a enzymatické metody

V klinicko-biochemických laboratořích je pro monitorování hladin KM široce používána urikazová metoda. Buď měříme úbytek KM při 293 nm, nebo produkt urikazové reakce, peroxid vodíku, tzv. peroxidáza-spřaženou reakcí. Séru, jako biologickému materiálu, se dává přednost před plazmou, protože antikoagulancia, jako

Table 5. A comparison of an HPLC method with an enzymatic method

	Correlation	Regression analysis	
	Spearman's rho*	R	Regression equation
All patients	0.9724	0.9776	0.9983x - 6.4595
All patients (F)	0.9845	0.9870	1.0007x - 9.6031
All patients (M)	0.9482	0.9622	0.9789x + 2.4312
Patients with DM (all)	0.9639	0.9571	0.9595x + 2.3388
Patients with DM (F)	0.9876	0.9586	0.8952x + 16.7268
Patients with DM (M)	0.9289	0.9520	0.9722x + 3.6826
Patients with hypertension (all)	0.9793	0.9785	1.0335x - 15.5822
Patients with hypertension (F)	0.9861	0.9873	1.0488x - 26.1159
Patients with hypertension (M)	0.9573	0.9659	0.9488x + 20.4289
Patients with CVD (all)	0.9656	0.9623	1.0065x - 3.7473
Patients with CVD (F)	0.9869	0.9853	1.0676x - 27.2451
Patients with CVD (M)	0.9341	0.9311	0.9201x + 31.0804
Patients with urologic diseases (all)	0.9698	0.9896	0.9866x - 7.2393
Patients with urologic diseases (F)	0.9850	0.9952	0.9855x - 7.3951
Patients with urologic diseases (M)	0.9433	0.9726	0.9860x - 6.6126
Patients with other diseases (all)	0.9784	0.9811	0.9800x + 0.3708
Patients with other diseases (F)	0.9686	0.9837	0.9700x + 2.8447
Patients with other diseases (M)	0.9579	0.9759	0.9842x - 0.7756
Levels up 200 µmol/L	0.8776	0.9732	0.9886x - 3.4939
Levels between 200 - 400 µmol/L	0.9393	0.9321	0.9974x - 6.3703
Levels over 400 µmol/L	0.8526	0.9206	1.0478x - 29.1449

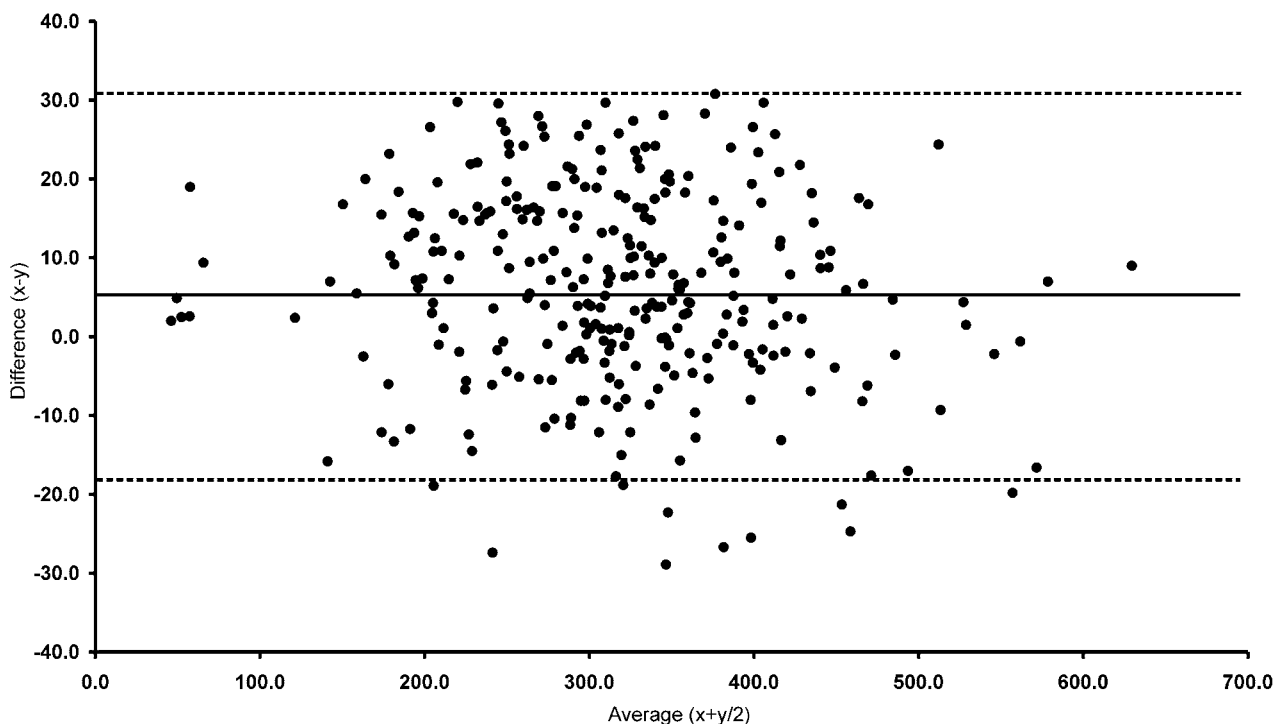


Fig. 3. Bland-Altman difference plot
 Average difference \pm 1.96 standard deviation of the difference.
 x = HPLC method; y = enzymatic method; n = 300

EDTA, citrát a oxalát, inhibují urikázu [7]. Nevýhodou urikazové metody, založené na měření množství peroxidu vodíku, je interference takových látek, jako jsou bilirubin, kyselina askorbová, glutathion, lipidy a hemoglobin [18, 19]. Přímá urikazová metoda, měřící rozdíl mezi počáteční a konečnou (po urikazové reakci) UV absorbancí, je k těmto interferencím rezistentní, vyjma xanthinu [20]. Nevýhodou přímé urikazové metody je její nižší citlivost.

Výsledky získané naší chromatografickou metodou dobře korelovaly s výsledky získanými urikazovou metodou (obr. 3), avšak naše metoda poskytovala vyšší hodnoty (tab. 5). Největší rozdíly jsme zaznamenali u pacientů s diabetem (v průměru o 4,5 %), pacientů s hypertenzí (v průměru o 4,9 %) a pacientů s urologickými potížemi (v průměru o 4,2 %), a to vždy u žen. Také jsme zjistili, že při porovnání hladin KM pohybujících se při dolní hranici referenčních hodnot, jsou rozdíly nejvyšší. To by vysvětlovalo, proč jsou vždy v dané skupině pacientů nejvyšší rozdíly u žen. Na druhou stranu jsou tyto rozdíly mnohem významnější než hladiny KM mezi ženami a muži (např. u pacientů s hypertenzí jsou hladiny KM naměřené chromatografickou metodou u žen v průměru o 4,9 % vyšší a u mužů dokonce v průměru o 1,0 % nižší v porovnání s enzymatickou metodou).

Na chromatografické koloně MAG 1 jsme doposud provedli více jak 2000 analýz bez výraznější změny retenčního času a symetrie píku KM. Životnost kolony je tak dosti vysoká, což významně snižuje náklady na jednu analýzu. Příprava vzorku je velmi jednoduchá a zahrnuje pouze deproteinaci a filtraci supernatantu. Výhodou chromatografické metody je také možnost simultánního stanovení dalších analytů, vztahujících se nějakým způsobem ke KM. Touto metodou lze např. simultánně stanovit kyselinu askorbovou v rámci studií zabývajících se antioxidačními vlastnostmi KM a kyseliny askorbové. Zde je však příprava vzorku trochu komplikovanější, neboť kyselina askorbová je více nestabilní v porovnání s KM [21].

Závěr

Prezentovaná HPLC s UV detekcí je dostatečně citlivá, přesná a správná. Pro svoji jednoduchost a nízké náklady na analýzu je vhodná pro vědecké studie, ale také pro klinická pracoviště k analýze vzorků, kde enzymatická metoda poskytuje nespolehlivé výsledky nebo k analýze neobvyklých biologických materiálů, jako jsou např. lyzát erytrocytů, mozkomíšní mok, sliny apod.

Literatura

- Ochiai, M. E., Barreto, A. C., Oliveira, M. T. Jr., Munhoz, R. T., Morgado, P. C., Ramires, J. A. Uric acid renal excretion and renal insufficiency in decompensated severe heart failure. *Eur. J. Heart Fail.*, 2005, 7, 4, p. 468–474.
- Gołembiewska, E., Ciechanowski, K., Safranow, K., Kedzierska, K., Kabat-Koperska, J. Renal handling of uric acid in patients with type 1 diabetes in relation to glycem control. *Arch. Med. Res.*, 2005, 36, 1, p. 32–35.
- Langlois, M., De Bacquer, D., Duprez, D., De Buyzere, M., Delanghe, J., Blaton, V. Serum uric acid in hypertensive patients with and without peripheral arterial disease. *Atherosclerosis*, 2003, 168, 1, p. 163–168.
- Kang, D. H., Park, S. K., Lee, I. K., Johnson, R. J. Uric acid-induced C-reactive protein expression: implication on cell proliferation and nitric oxide production of human vascular cells. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2005, 16, 12, p. 3553–3562.
- Khosla, U. M., Zharikov, S., Finch, J. L., Nakagawa, T., Roncal, C., Mu, W., Krotova, K., Block, E. R., Prabhakar, S., Johnson, R. J. Hyperuricemia induces endothelial dysfunction. *Kidney Int.*, 2005, 67, 5, p. 1739–1742.
- Corry, D. B., Eslami, P., Yamamoto, K., Nyby, M. D., Makino, H., Tuck, M. L. Uric acid stimulates vascular smooth muscle cell proliferation and oxidative stress via the vascular renin-angiotensin system. *J. Hypertens.*, 2008, 26, 2, p. 269–275.
- Liao, F., Zhao, Y., Zhao, L., Tao, J., Zhu, X., Liu, L. Evaluation of a kinetic uricase method for serum uric acid assay by predicting background absorbance of uricase reaction solution with an integrated method. *J. Zhejiang Univ. Science B*, 2006, 7, 6, p. 497–502.
- Elin, R. J., Johnson, E., Chesler, R. Four methods for determining uric acid compared with a candidate reference method. *Clin. Chem.*, 1982, 28, 10, p. 2098–2100.
- Kock, R., Delvoux, B., Greiling, H. A high-performance liquid chromatographic method for the determination of hypoxanthine, xanthine, uric acid and allantoin in serum. *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 1993, 31, 5, p. 303–310.
- Cooper, N., Khosravan, R., Erdmann, C., Fiene, J., Lee, J. W. Quantification of uric acid, xanthine, and hypoxanthine in human serum by HPLC for pharmacodynamic studies. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2006, 837, 1–2, p. 1–10.
- Inoue, K., Namiki, T., Iwasaki, Y., Yoshimura, Y., Nakazawa H. Determination of uric acid in human saliva by high-performance liquid chromatography with amperometric electrochemical detection. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2003, 785, 1, p. 57–63.
- Dai, X., Fang, X., Zhang, C., Xu, R., Xu, B. Determination of serum uric acid using high-performance liquid chromatography (HPLC)/isotope dilution mass spectrometry (ID-MS) as a candidate reference method. *J. Chromatography B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2007, 857, 2, p. 287–295.
- Kim, K. M., Henderson, G. N., Ouyang, X., Frye, R. F., Sautin, Y. Y., Feig, D. I., Johnson, R. J. A sensitive and specific liquid chromatography – tandem mass spectrometry method for the determination of intracellular and extracellular uric acid. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2009, 877, 22, p. 2032–2038.
- Chen, X. B., Calder, A. G., Prasitkusol, P., Kyle, D. J., Jayasuriya, M. C. Determination of ¹⁵N isotopic enrichment and concentrations of allantoin and uric acid in urine by gas chromatography/mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.*, 1998, 33, 2, p. 130–137.
- Pormsila, W., Krähenbühl, S., Hauser, P. C. Capillary electrophoresis with contactless conductivity detection for uric acid determination in biological fluids. *Clin. Chim. Acta*, 2009, 636, 2, p. 224–228.
- Kannan, P., John, S. A. Determination of nanomolar uric and ascorbic acids using enlarged gold nanoparticles modified electrode. *Anal. Biochem.*, 2009, 386, 1, p. 65–72.

17. **Thiagarajan, S., Tsai, T. H., Chen, S. M.** Easy modification of glassy carbon electrode for simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid. *Biosens. Bioelectron.*, 2009, 24, 8, p. 2712–2715.
18. **Aoki, Y., Ihara, H., Nakamura, H., Aoki, T., Yoshida, M.** Effects of serum bilirubin on determination of uric acid by the uricase-peroxidase coupled reaction. *Clin. Chem.*, 1992, 38, 7, p. 1350–1352.
19. **Kroll, M. H., Elin, R. J.** Interference with clinical laboratory analyses. *Clin. Chem.*, 1994, 40, 11, p. 1996–2005 [Erratum in: *Clin. Chem.*, 1995, 41(5), p. 770].
20. **Duncan, P. H., Gochman, N., Cooper, T., Smith, E., Bayse, D.** A candidate reference method for uric acid in serum. I. Optimization and evaluation. *Clin. Chem.*, 1982, 28, 2, p. 284–290.
21. **Kandár, R., Žáková, P.** Determination of ascorbic acid in human plasma with a view to stability using HPLC with UV detection. *J. Sep. Sci.*, 2008, 31, 20, p. 3503–3508.
Práce byla podpořena výzkumným záměrem MŠMT 0021627502.
Do redakce došlo 7. 8. 2009.

*Adresa pro korespondenci:
Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
Katedra biologických a biochemických věd
Fakulta chemicko-technologická
Univerzita Pardubice
Studentská 573
532 10 Pardubice
e-mail: roman.kandar@upce.cz*