

网络出版时间: 2019-7-15 18:07 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20190715.0922.030.html>

◇技术与方法◇

HPLC 同时测定关节炎大鼠血清色氨酸和犬尿氨酸

韩萍 杨雪枝 赵英杰 张冰洁 李丝雨 张斌斌 常艳 魏伟

摘要 建立新的高效液相色谱法(HPLC)检测佐剂性关节炎(AA)大鼠血清中色氨酸(Trp)和犬尿氨酸(Kyn)。SD大鼠成模后取血清,用蛋白沉淀法处理,离心后取上清液进样。考察该方法的专属性、标准曲线、精密度、回收率和稳定性等能否用于AA大鼠Trp和Kyn含量测定。Trp保留时间9.0 min,线性范围25~1 000 $\mu\text{mol/L}$,检测限0.27 $\mu\text{mol/L}$; Kyn保留时间5.6 min,线性范围0.5~10 $\mu\text{mol/L}$,检测限0.07 $\mu\text{mol/L}$; 平均回收率在80%~120%范围之内; 日内、日间精密度RSD均小于15%,符合生物样品定量分析方法要求,并可应用于AA大鼠血清中Trp和Kyn测定。建立了一种灵敏度高、快速的HPLC分析方法,适于测定AA大鼠血清中Trp和Kyn含量。

关键词 色氨酸; 犬尿氨酸; 高效液相色谱法; 血清; 大鼠; 佐剂性关节炎

中图分类号 R 967

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2019)08-1313-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.08.030

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是一种复杂的自身免疫病,特征是慢性滑膜炎和关节破坏,发病机制尚不清楚^[1]。色氨酸(L-tryptophan, Trp)是人体必需氨基酸,可以调节适应性免疫^[2-3],多数Trp代谢是沿着犬尿氨酸(L-kynurenine, Kyn)途径代谢的,该途径产生Kyn及一系列代谢产物,参与炎症免疫反应^[4]。大鼠佐剂性关节炎(adjunct arthritis, AA)模型在病理机制等方面与人的RA相似,是研究RA较为理想的模型之一^[5]。本实验通

过建立AA模型,检测正常和模型大鼠血清中Trp和Kyn含量变化,目前主要采用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)检测Trp和Kyn的含量^[6-7],在制备标准曲线等时使用的血清进行了透析,此法可在同时测定Trp和Kyn的条件下,减少干扰因素。

1 材料与方法

1.1 样本 动物为健康雄性SD大鼠20只,合格证号:[SCXK(皖)2017-001],体质量(170±20)g,购自安徽医科大学实验动物中心。样本的收集AA大鼠成模后处死取血于15 ml离心管中,静置2 h后,2 000 r/min离心20 min,取上清液,并于-20℃保存。

1.2 仪器 Agilent1200 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司); Sigma 3-30K 高速冷冻离心机(上海纳腾仪器有限公司); AA-200DS 电子分析天平(美国Denver仪器公司); Amicon Ultra-0.5 超滤离心机(美国Millipore公司)。

1.3 试剂 L-Trp(WXBC4097V)、L-Kyn(BCBT1074)购自德国SIGMA-ALDRICH,纯度≥98%;冰醋酸(20170106)、醋酸钠(20170320)、高氯酸(20170204)均为分析纯,购自中国医药集团化学试剂有限公司。

1.4 AA大鼠模型的制备 将大鼠随机分为两组,即对照组和模型组,每组10只。将BCG 80℃水浴灭活1 h,与经过高压灭菌的石蜡充分研磨,制成10 mg/ml完全弗氏佐剂(complete Freund adjuvant, CFA),于大鼠右后足跖皮内注射CFA 0.1 ml致炎^[8],正常组用生理盐水同法注射。

1.5 溶液的配制

1.5.1 储备液配制 精密称取L-Trp对照品40.90 mg, L-Kyn对照品2.08 mg,用体积百分比为2.5%的高氯酸溶解,定容至10 ml容量瓶中,得浓度20 000 $\mu\text{mol/L}$ 、1 000 $\mu\text{mol/L}$ 对照品储备液,4℃保存,用时稀释。

1.5.2 流动相溶液配制 精密称取醋酸钠4.922 8

2019-01-24 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号:81573443、81673444); 安徽省自然科学基金杰出青年基金(编号:170808J10); 2016年高校优秀青年人才支持计划重点项目(编号: gxyqZD2016043); 安徽医科大学第四批“青年拔尖人才支持计划”

作者单位: 安徽医科大学临床药理研究所, 抗炎免疫药物教育部重点实验室, 抗炎免疫药物安徽省协同创新中心, 合肥 230032

作者简介: 韩萍,女,硕士研究生;

常艳,女,副教授,硕士生导师,责任作者, E-mail: yychang@ahmu.edu.cn;

魏伟,男,教授,博士生导师,责任作者, E-mail: wwei@ahmu.edu.cn

g ,加纯水溶解于 100 ml 容量瓶中定容 ,制成 600 mmol/L 储备液。用时加纯水稀释得 15 mmol/L 溶液 ,冰醋酸调节 pH 至 4 ,再用 0.45 μm 微孔滤膜过滤。

1.5.3 血清透析 将透析袋在体积 2% (w/v) NaHCO₃ 和 1 mmol/L EDTA(pH 8.0) 中将透析袋煮沸 10 min ,再放在 1 mmol/L EDTA(pH 8.0) 中煮沸 10 min ,冷却后放于 4 ℃。将需要透析的血清装入透析袋 ,放入 KrebsRinger 磷酸盐缓冲液 [78.1% NaCl 溶液 ,2.3% CaCl₂ - 2H₂O 溶液 ,3.1% KCl 溶液 ,0.8% MgSO₄ - 7H₂O ,15.6% Na₂HPO₄ - HCl 缓冲液(pH 7.4)]中 ,血清:缓冲液(1 : 25 ,v/v) ,于 4 ℃透析 36 h ,缓冲液每 8 ~ 10 h 更换 1 次 ,至少更换 3 次。

1.5.4 供试品溶液的配制 取透析血清 100 μl 于离心管中 ,加入 100 μl 5% 高氯酸 ,充分混匀 ,14 000 r/min 离心 10 min ,取上清液用 0.22 μm 微孔滤膜过滤 ,取 20 μl 进样。

1.6 色谱条件 色谱柱: Agilent TC-C₁₈(250 mm × 5 mm ,5 μm) ;流动相 :乙腈 :醋酸钠(体积百分比 8 : 92) ;流速 1.0 ml/min; Trp 紫外检测波长: 280 nm; Kyn 紫外检测波长: 360 nm; 柱温: 30 ℃; 进样量: 20 μl。

1.7 统计学处理 数据分析应用 SPSS 16.0 软件处理 ,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示 ,两组数据之间比较采用 *t* 检验 ,多组之间采用单因素方差分析(ANOVA) ,*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AA 大鼠模型的建立 模型组大鼠在免疫后第 14 天出现继发病变 ,出现足爪红肿 ,体质量减轻 ,全身评分、关节炎指数、关节肿胀数和足爪肿胀度明显增加 ,与正常组比较 ,差异有统计学意义(*P* < 0.01) 。见图 1 ~ 6。

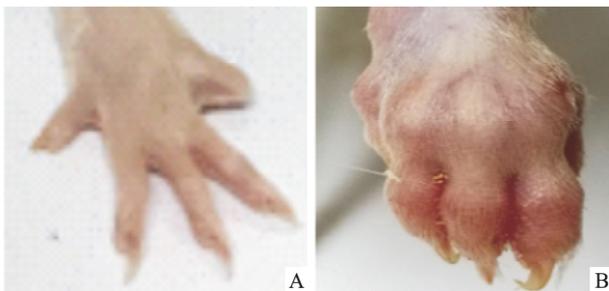


图 1 肉眼观察大鼠足爪肿胀
A: 对照组; B: 模型组

2.2 HPLC 方法学结果

2.2.1 专属性实验 在 1.6 项色谱条件下分别对空白血清、空白血清加对照品溶液、供试品溶液进样分析 ,Trp 保留时间 9.0 min ,Kyn 保留时间 5.6 min ,峰形良好 ,样品中其他内源性物质不干扰测定 ,与杂质分离良好。结果见图 7 ~ 9。

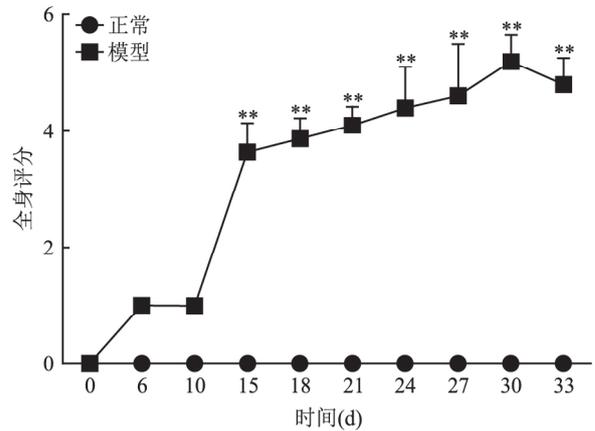


图 2 大鼠全身评分
与正常比较: ** *P* < 0.01

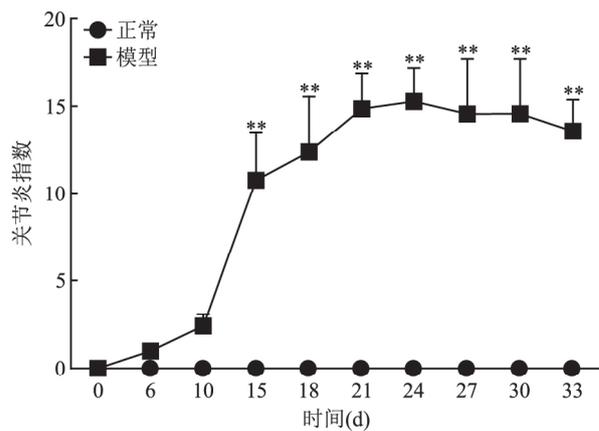


图 3 大鼠关节炎指数
与正常比较: ** *P* < 0.01

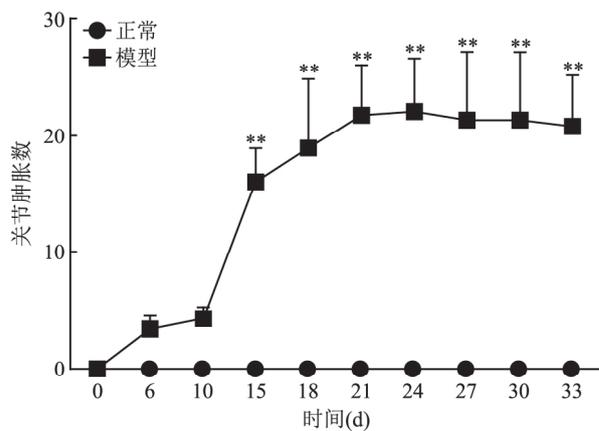


图 4 大鼠关节肿胀数
与正常比较: ** *P* < 0.01

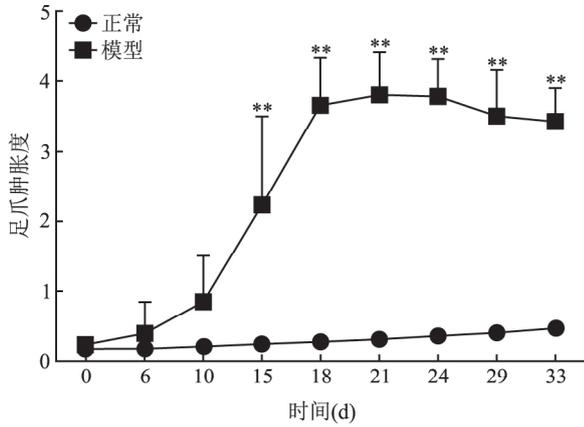


图5 大鼠足爪肿胀度
与正常比较: ** $P < 0.01$

2.2.2 线性关系考察

2.2.2.1 Trp 标准曲线 取20 000 $\mu\text{mol/L}$ Trp 对照品储备液,加入空白血清中,使 Trp 浓度分别为 25、50、100、250、500、1 000 $\mu\text{mol/L}$ 并按 1.5.4 中供试品溶液处理后进行 HPLC 分析。以加入对照品溶液样品峰面积 (Y) 对浓度 (X) 进行线性回归,得标准曲线方程,Trp: $Y = 2.3878X - 6.8935$, $R^2 = 0.9998$, Trp 在 25 ~ 1 000 $\mu\text{mol/L}$ 范围内线性关系

良好。见表 1。

2.2.2.2 Kyn 标准曲线 取1 000 $\mu\text{mol/L}$ Kyn 对照品储备液,加入空白血清中,使 Kyn 浓度分别为 0.5、1、2、5、10、20 $\mu\text{mol/L}$ 并按 1.5.4 中供试品溶液处理后进行 HPLC 分析。得标准曲线方程, Kyn: $Y = 2.7538X - 1.1566$, $R^2 = 0.9993$, Kyn 在 0.5 ~ 20 $\mu\text{mol/L}$ 范围内线性关系良好。见表 2。

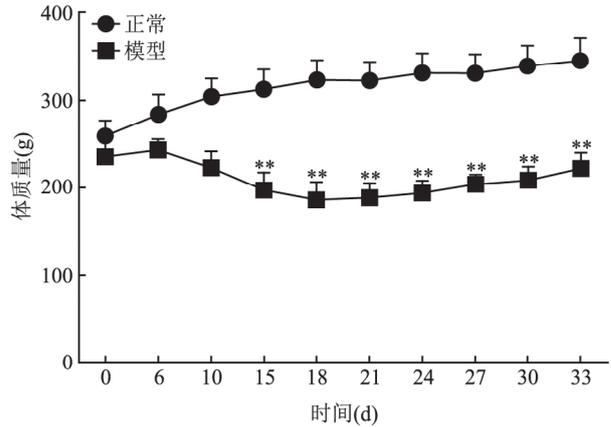


图6 大鼠体质量变化
与正常比较: ** $P < 0.01$

表1 Trp 标准曲线 ($n = 5, \bar{x} \pm s$)

编号	1	2	3	4	5	6
浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	25	50	100	250	500	1 000
峰面积	59.58 \pm 0.47	114.10 \pm 1.87	234.12 \pm 2.92	594.52 \pm 9.91	1 159.98 \pm 13.74	2 392.78 \pm 48.25

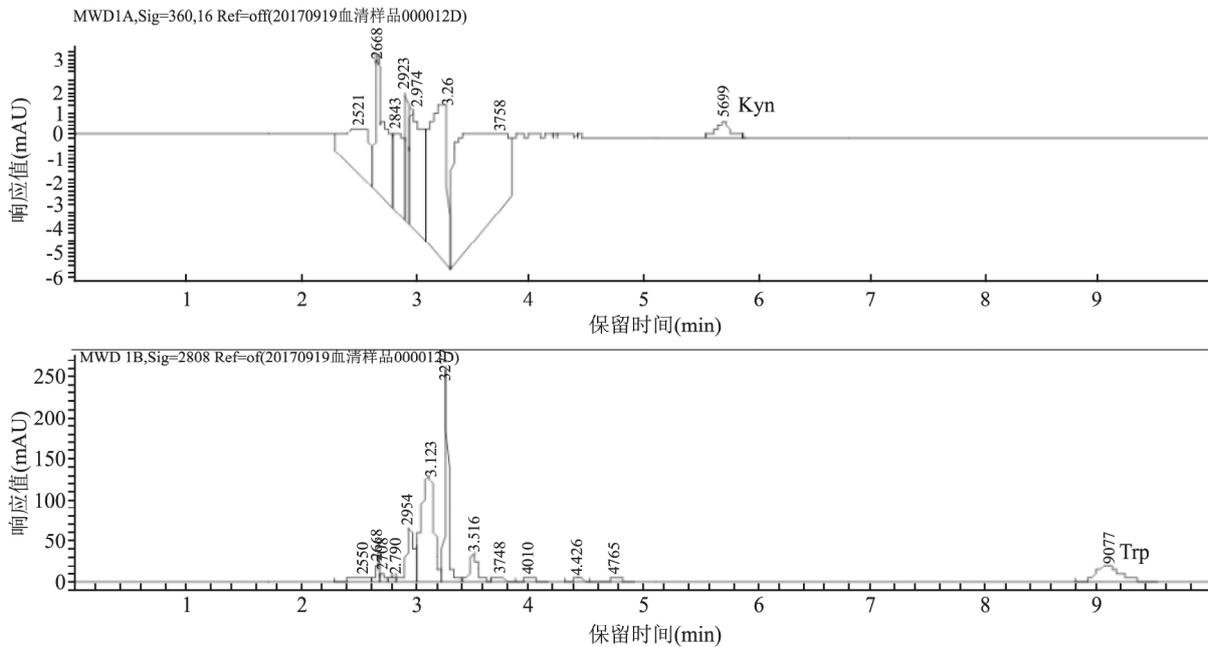


图7 空白血清 Kyn 和 Trp 色谱图

表 2 Kyn 标准曲线($n=5 \bar{x} \pm s$)

编号	1	2	3	4	5	6
浓度($\mu\text{mol/L}$)	0.5	1	2	5	10	20
峰面积	0.96 \pm 0.27	1.68 \pm 0.42	4.94 \pm 0.15	12.80 \pm 0.70	25.88 \pm 1.71	54.20 \pm 2.33

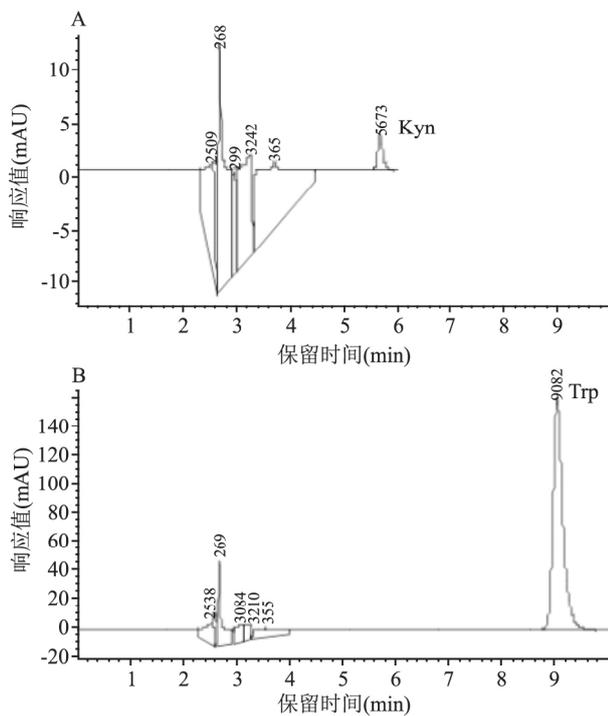


图 8 空白血清外加对照品色谱图

A: 加入 Kyn 2 $\mu\text{mol/L}$; B: 加入 Trp 100 $\mu\text{mol/L}$

2.2.3 检测限和定量限 在血清中加入一定量的对照品溶液,按 1.5.4 项中样品处理方法进行 HPLC 分析并做 3 次平行实验。按信噪比(S/N)为 3 计检测限, Trp、Kyn 检测限分别为 0.27 $\mu\text{mol/L}$ 、0.07 $\mu\text{mol/L}$; 按 S/N 为 10 计定量限, Trp、Kyn 定量限分别为 0.83 $\mu\text{mol/L}$ 、0.56 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.2.4 回收率(准确度) 试验 取 Trp 和 Kyn 对照品溶液加入到空白血清中制成低、中、高 3 个浓度的标准血样,处理后进行 HPLC 分析,每个浓度 1 d 内平行配制 3 个样品,测定回收率, Trp 回收率为 96.71% ~ 112.58%, Kyn 回收率为 92.60% ~ 117.82%。见表 3。

表 3 Trp 和 Kyn 回收率($n=5 \bar{x} \pm s$)

活性物质	浓度($\mu\text{mol/L}$)	实际样品浓度($\mu\text{mol/L}$)	回收率(%)	RSD(%)
Trp	50	56.29 \pm 3.01	112.58	5.35
	250	241.77 \pm 3.92	96.71	1.62
	500	810.73 \pm 23.54	101.34	2.90
Kyn	1	0.93 \pm 0.09	92.60	9.83
	5	5.89 \pm 0.14	117.82	2.34
	10	11.27 \pm 0.20	112.66	1.78

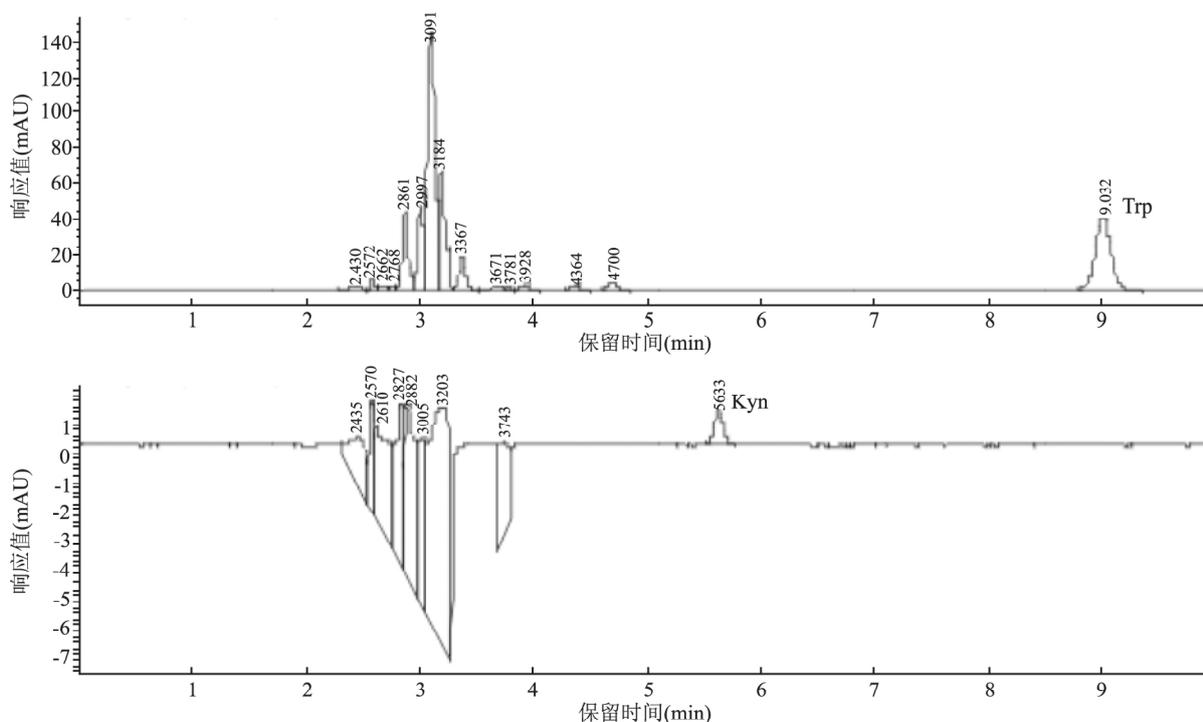


图 9 实际样品 Trp 和 Kyn 色谱图

表4 Trp 和 Kyn 精密度($n=5$, $\bar{x} \pm s$)

活性物质	浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	日内精密度		日间精密度	
		实际样品浓度($\mu\text{mol/L}$)	RSD(%)	实际样品浓度($\mu\text{mol/L}$)	RSD(%)
Trp	50	54.13 \pm 2.68	4.95	53.65 \pm 2.41	4.49
	250	242.39 \pm 3.45	1.43	244.57 \pm 4.02	1.65
	500	812.96 \pm 29.76	3.67	816.58 \pm 26.73	3.27
Kyn	1	1.090 \pm 0.097	8.90	1.100 \pm 0.083	7.55
	5	5.756 \pm 0.146	2.54	5.690 \pm 0.133	2.34
	10	12.009 \pm 0.281	2.34	11.893 \pm 0.372	3.13

2.2.5 精密度试验 取 Trp 和 Kyn 对照品溶液加入空白血清中制成低、中、高 3 个浓度标准血样,每个浓度水平 1 d 内平行配制 3 个样品,测定日内精密度,每个浓度水平 3 d 内测定 3 次,计算日间精密度。Trp 和 Kyn 相对标准偏差(RSD)均小于 15%,符合样品分析要求。见表 4。

2.2.6 稳定性试验 取 Trp 和 Kyn 对照品溶液加入血清中,供试品分别在 4 °C、25 °C 下放置。将供试品分别在 0、4、8、12、16、20、24 h 测定 Trp 和 Kyn 含量考察其稳定性,结果表明样品在 4 °C 和 25 °C 均可稳定放置 24 h,稳定性较好,符合生物样品稳定性测定的要求。

2.3 实际样品中 Trp 和 Kyn 测定 用上述建立的方法测定了正常组和模型组大鼠血清中 Trp 和 Kyn 浓度。经分析,模型组和正常组的差异有统计学意义($P < 0.01$),与正常组比较,Trp 的浓度降低,Kyn 的浓度升高,Kyn/Trp 比值升高。见表 5。

表5 实际样品测定结果($n=5$, $\bar{x} \pm s$)

活性物质	正常组	模型组
Trp($\mu\text{mol/L}$)	126.25 \pm 12.61	63.33 \pm 10.17 **
Kyn($\mu\text{mol/L}$)	2.05 \pm 0.39	5.37 \pm 1.31 **
Kyn/Trp 比值	0.016 3 \pm 0.031 0	0.084 8 \pm 0.128 8 **

与正常组比较: ** $P < 0.01$

3 讨论

由于 Kyn 代谢与炎症免疫之间有着密切的关系,Kyn 已成为 RA 等多种疾病的参与者^[9]。在正常机体中,Trp 和 Kyn 维持着一个动态平衡,但当体内的 Trp 和 Kyn 含量变化时,机会诱发各种疾病,例如自身免疫病或恶性肿瘤等^[4,10]。吲哚胺 2,3-双加氧酶(indoleamine 2,3-dioxygenase,IDO1)是此代谢通路的限速酶之一,目前大多数的研究是采用测定 Kyn 和 Trp 比值来评价 IDO1 的活性^[11],定量测定体内 Trp 和 Kyn 浓度为诊断相关疾病提供了重要的依据。

大鼠体内的 Trp 和 Kyn 均为内源性物质,建立方法学时需采用不含待测物的空白血清,排除血清自身 Trp 和 Kyn 对定量测定的干扰,本实验采用 Krebs-Ringer 磷酸盐缓冲液进行血清透析,可获得不含或含极少量内源性物质的空白血清样本。为了进一步提高测定的准确性,还采用了标准加入法对 Trp 和 Kyn 进行检测^[12]。用 HPLC 测定血清中 Trp、Kyn 时需去除血清中的蛋白,本实验采用高氯酸蛋白沉淀法,无需衍生化处理与梯度洗脱,并与之前文献^[13]报道相比保留时间缩短,节约时间。本实验流动相中乙腈的比例调到 8% 相对于乙腈比例为 3% 或 4% 峰面积响应值增大,保留时间缩短。流速太小,峰面积响应值小,出峰时间较长,但流速太大,柱压较大,最终采用 1.0 ml/min 的流速。

随着对 Trp、Kyn 及其他代谢产物的深入研究,发现 Kyn 是此代谢通路上极为重要的中间代谢物,在多种疾病中有重要作用,与疾病发展密切相关^[14]。检测 Trp 和 Kyn 浓度变得极为重要。结果表明,与对照组比较,AA 大鼠 Trp 和 Kyn 及其比值都有显著变化,Trp 浓度降低,Kyn 浓度升高,Kyn/Trp 升高,提示 Trp-IDO1-Kyn 代谢通路异常可能参与 RA 的发生发展。HPLC 有准确、灵敏度高等特点,是现阶段检测 Trp 和 Kyn 含量的主要方法。经过本实验实际应用,只需将血清去除蛋白,无需柱前衍生化即可进行测定,且专属性、线性范围、检测限、定量限、准确度、精密度、稳定性等方法学指标均符合测定要求,适用于大鼠体内 Trp 和 Kyn 含量测定。

参考文献

- [1] Okada Y, Terao C, Ikari K, et al. Meta-analysis identifies nine new loci associated with rheumatoid arthritis in the Japanese population [J]. Nat Genet 2012, 44(5): 511-6.
- [2] D'Amato N C, Rogers T J, Gordon M A, et al. A TDO2-AhR signaling axis facilitates anoikis resistance and metastasis in triple-negative breast cancer [J]. Cancer Res 2015, 75(21): 4651-64.
- [3] Lanz T V, Williams S K, Stojic A, et al. Tryptophan-2,3-Dioxygenase

- ase (TDO) deficiency is associated with subclinical neuroprotection in a mouse model of multiple sclerosis [J]. *Sci Rep* ,2017 ,7: 41271.
- [4] Cervenka I , Agudelo L Z , Ruas J L. Kynurenines: Tryptophan's metabolites in exercise ,inflammation ,and mental health [J]. *Science* ,2017 ,357(6349) : 1 - 8.
- [5] 宋珊珊 ,张玲玲 ,魏 伟. 实验性关节炎动物模型建立及病理机制研究进展 [J]. *中国药理学通报* 2011 ,27(12) : 1648 - 52.
- [6] Zhao J. Simultaneous determination of plasma creatinine , uric acid , kynurenine and kynurenic acid by high-performance liquid chromatography: method validation and application to the assessment of renal function [J]. *Biomed Chromatogr* 2015 ,29(3) : 410 - 5.
- [7] Iizuka H , Hirasa Y , Kubo K , et al. Enantiomeric separation of D , L-tryptophan and D , L-kynurenine by HPLC using pre-column fluorescence derivatization with R(-)-DBD-PyNCS [J]. *Biomed Chromatogr* 2011 ,25(7) : 743 - 7.
- [8] Chang Y , Wu Y , Wei W , et al. Therapeutic effects of TACI-Ig on rats with adjuvant-induced arthritis *via* attenuating inflammatory responses [J]. *Rheumatology(Oxford)* 2011 ,50(5) : 862 - 70.
- [9] Chen Y , Guillemin G J. Kynurenine pathway metabolites in humans: disease and healthy states [J]. *Int J Tryptophan Res* 2009 ,2: 1 - 19.
- [10] Badawy A A. Tryptophan availability for kynurenine pathway metabolism across the life span: Control mechanisms and focus on aging , exercise , diet and nutritional supplements [J]. *Neuropharmacology* 2017 ,112(Pt B) : 248 - 63.
- [11] Pertovaara M , Raitala A , Uusitalo H , et al. Mechanisms dependent on tryptophan catabolism regulate immune responses in primary Sjögren's syndrome [J]. *Clin Exp Immunol* 2005 ,142(1) : 155 - 61.
- [12] Jeffrey K , Benjamin S , Robert H W , et al. Extraction and quantification of tryptophan and kynurenine from cultured cells and media using a high performance liquid chromatography (HPLC) system equipped with an ultrasensitive diode array detector [J]. *Bio Protoc* ,2016 ,6(7) : e1781.
- [13] Zhao J , Chen H , Ni P , et al. Simultaneous determination of urinary tryptophan , tryptophan-related metabolites and creatinine by high performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorimetric detection [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2011 ,879(26) : 2720 - 5.
- [14] Owe-Young R , Webster N L , Mukhtar M , et al. Kynurenine pathway metabolism in human blood-barrier cells: implications for immune tolerance and neurotoxicity [J]. *J Neurochem* ,2008 ,105: 1346 - 57.

Simultaneous determination of tryptophan and kynurenine by HPLC in serum from rats with arthritis

Han Ping , Yang Xuezhi , Zhao Yingjie , et al

(*Institute of Clinical Pharmacology , Anhui Medical University , Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immune Medicine , Ministry of Education , Collaborative Innovation Center of Anti-inflammatory and Immune Medicines , Hefei 230032*)

Abstract To establish a high performance liquid chromatography (HPLC) method for determination tryptophan (Trp) and kynurenine (Kyn) in serum from rats with adjuvant induced arthritis (AA) . A model was established in SD rats , and the rat serum was taken after model formation and treated with protein precipitation , after centrifugation , the supernatant was taken for injection. The specificity , standard curve , precision , recovery and stability of the method were investigated could be used for the determination of Trp and Kyn in AA rats. The retention time of Trp was about 9.0 min , the linear range was 25 ~ 1 000 $\mu\text{mol/L}$, the detection limit was 0.27 $\mu\text{mol/L}$, the retention time of Kyn was about 5.6 min , the linear range was 0.5 ~ 10 $\mu\text{mol/L}$, and the detection limit was 0.07 $\mu\text{mol/L}$. The average recovery rate is in the range of 80% ~ 120% ; the intra-day and inter-day precision RSD were less than 15% . These were in line with the requirements of the biological sample quantitative analysis method , and could be applied to the quantitative determination of Trp and Kyn in serum from rats with AA. The HPLC method with high sensitivity and rapidity is established and suitable for the determination of Trp and Kyn in rat serum.

Key words tryptophan; kynurenine; high performance liquid chromatography; serum; rat; adjuvant induced arthritis