

高效液相色谱法测定大鼠血浆和全血中核黄素的含量

韦京豫, 郭长江, 杨继军, 蒋与刚, 李云峰, 徐琪寿

(军事医学科学院卫生学环境医学研究所, 天津 300050)

摘要: 为了直接反映核黄素营养状况对血中核黄素水平的影响, 建立了高效液相色谱测定大鼠血浆及全血中核黄素含量的方法。采用 Diamonsil C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm i.d. 5 μm)分离, 以甲醇-5 mmol/L 乙酸铵(体积比为 35:65)为流动相, 流速 1.2 mL/min, 荧光检测器检测(激发波长 450 nm, 发射波长 520 nm)。样品经乙腈、三氯甲烷处理后进样分析。核黄素测定的线性范围为 5~200 nmol/L, 最低检测限为 2.5 nmol/L (S/N=2), 日内测定的峰面积的相对标准偏差(RSD)为 1.2%, 日间测定的 RSD 为 4.3%。核黄素在血浆样品中的加标回收率为 97.0%~104.0%, 在全血样品中的加标回收率为 97.4%~104.4%。

关键词: 高效液相色谱法, 核黄素, 血浆, 全血, 大鼠

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2003)04-0375-03

Determination of Riboflavin in Rat Plasma and Blood by High Performance Liquid Chromatography

WEI Jingyu, GUO Changjiang, YANG Jijun, JIANG Yugang, LI Yunfeng, XU Qishou

(Institute of Hygiene and Environmental Medicine, The Academy of Military Medical Sciences, Tianjin 300050, China)

Abstract: A high performance liquid chromatographic method (HPLC) has been developed for the determination of riboflavin in plasma and blood of rats. A Waters model 600 HPLC pump and a Diamonsil C₁₈ column were used. The mobile phase consisted of 35% methanol and 65% 5 mmol/L ammonium acetate solution. The flow rate was 1.2 mL/min. The spectro-photofluorimeter was set at a wavelength of 450 nm for excitation and 520 nm for emission. The samples were pretreated with acetonitrile and chloroform. The results show a good linear correlation between riboflavin concentration (from 5 nmol/L to 200 nmol/L) and fluorescence intensity. The detection limit was 2.5 nmol/L with signal to noise ratio of 3. The intra-assay and inter-assay coefficients of variation were 1.2% and 4.3%, respectively. The recoveries for the plasma and blood were in the ranges of 97.0% - 104.0% and 97.4% - 104.4%, respectively. The experimental results on rat showed that plasma or blood riboflavin contents measured by this method decreased significantly after a riboflavin deficient diet feeding or starvation.

Key words: high performance liquid chromatography; riboflavin; plasma; blood; rat

核黄素是人体生长发育需要的重要水溶性维生素之一, 其在体内形成两种主要衍生物——黄素单核苷酸(FMN)和黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD), 作为黄素酶的辅酶参与体内一系列生化代谢过程。20世纪90年代全国营养调查结果显示, 我国公民膳食中核黄素摄入严重不足, 仅为中国营养学会推荐供给量的58.4%。核黄素缺乏可以引起口角炎、舌炎、阴囊皮炎等, 核黄素缺乏还与贫血、一些肿瘤的发生密切相关^[1], 因此, 研究核黄素营养状况的评价方法具有十分重要的理论与实践意义。核黄素营养状况评价主要采用间接的功能性指标(如红细胞

谷胱甘肽还原酶活性系数和尿中核黄素类物质排出量等)来评价^[2]。核黄素测定一般采用微生物法或荧光比色法^[2], 但由于方法比较繁琐或特异性不够, 不能区分核黄素及其衍生物, 难以满足研究工作深入进行的需要。随着高效液相色谱(HPLC)分析技术的发展和运用, 国内外建立了一些血中核黄素的测定方法, 但是操作过程与结果不尽一致^[3~7]。为了直接反映核黄素营养状况对血中核黄素水平的影响, 我们参考国内外有关文献, 通过优化操作条件, 选择用乙腈、三氯甲烷处理血样, 以甲醇-乙酸铵作为流动相, 建立了测定大鼠血浆和全血中核黄素

含量的高效液相色谱分析方法,为进一步开展人体核黄素营养状况评价奠定了基础。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Waters 600 型输液泵与 474 荧光检测器。核黄素及其两种主要衍生物 FMN 和 FAD 标准品购自 Sigma 公司;甲醇、乙腈为色谱纯,冰醋酸为优级纯,三氯甲烷、乙酸铵为分析纯,实验用水为高纯水。

1.2 色谱条件

色谱柱 Diamonsil C₁₈(250 mm×4.6 mm i.d., 5 μm) 和保护柱 EasyGuard C₁₈(8 mm×4 mm i.d., 5 μm) 均购自 Dikma 公司;流动相:甲醇-5 mmol/L 乙酸铵(体积比为 35:65, pH 6.5),流速 1.2 mL/min;荧光检测器激发波长 450 nm,发射波长 520 nm;柱温为室温,进样体积为 100 μL。

1.3 标准溶液配制

分别准确称取 37.6, 9.4, 17.6 mg 的核黄素、FMN 和 FAD 标准品,用 0.02 mol/L 冰醋酸溶液溶解并分别定容至 500, 100, 100 mL,得到浓度均为 200 μmol/L 的标准储备液,分装后置于 -20 °C 冰箱中避光保存。临用时用 0.02 mol/L 冰醋酸将其稀释成相应的工作液。

1.4 样品处理

取大鼠血浆样品 300 μL,加乙腈 300 μL,振荡 10 s 以沉淀蛋白,以 10 000 r/min 速率离心 10 min。吸取上清液,加三氯甲烷 600 μL,振荡 10 s 以萃取乙腈,以 10 000 r/min 速率离心 10 min,取上清液 100 μL 直接进样分析。

对于大鼠全血样品需首先溶血,方法如下:取全血 200 μL,加去离子水 200 μL 混匀,于 4 °C 冰箱中放置 10 min,然后加乙腈 400 μL,振荡 10 s 沉淀蛋白,以 10 000 r/min 速率离心 10 min,吸取上清液,加三氯甲烷 800 μL,振荡 10 s,以 10 000 r/min 速率离心 10 min,取上清液 100 μL 直接进样分析。

2 结果与讨论

2.1 流动相

核黄素由异咯嗪与核糖醇侧链组成,水溶性较小,在微酸性条件下较为稳定,对碱性环境和紫外线敏感,分析时应在避光和微酸性条件下进行,必要时加一定比例的有机溶剂增溶。由于生物样品中除了核黄素外,还含有其衍生物 FMN 和 FAD,因此,良好的分离效果是获得理想方法的关键。文献[3,4]报道采用反相高效液相色谱法测定血中核黄素时,流动相一般选择一定比例的甲醇或乙腈加上缓冲盐

溶液, pH 范围为 1.8~4.0,必要时加离子对试剂以改善分离效果。我们参考文献[3]的方法,以甲醇-5 mmol/L 乙酸铵(pH 6.5)(体积比为 35:65)作为流动相,对核黄素与其衍生物 FMN、FAD 的分离效果较好,保留时间分别为 8.88, 5.90, 4.48 min(见图 1)。按照文献[3]的方法,我们曾经使用冰醋酸将流动相 pH 调整为 4.0,结果 FAD 保留时间后移,FMN 和核黄素分离不佳,荧光强度均有所下降。Lopez-Anaya 和 Mayersohr[4]报道随着溶液 pH 的升高,核黄素、FMN 及 FAD 的荧光强度均随之下降,影响检测灵敏度。这可能是由于溶液酸性增加对其结构有一定影响所致。鉴于上述情况,我们认为测定时流动相 pH 不宜调得太低。

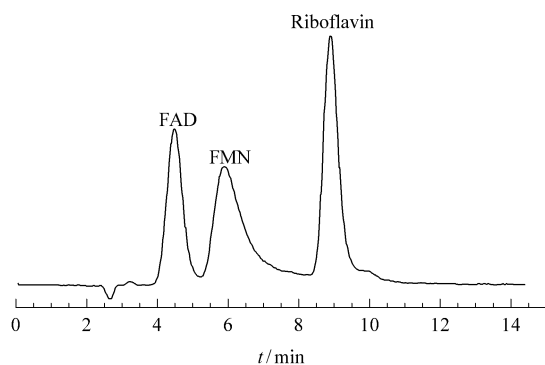


图 1 核黄素、FMN 和 FAD 混合标准色谱图

Fig.1 Chromatogram of the mixture of riboflavin, flavin adenine dinucleotide (FAD) and flavin mononucleotide (FMN) standards

2.2 样品前处理

分析血中核黄素及其衍生物 FMN、FAD 时,有人采用三氯醋酸沉淀蛋白提取后进行测定的方法[3,5]。我们曾经试验用 10%(体积分数)三氯醋酸沉淀蛋白,发现用 10% 三氯醋酸处理样品对核黄素、FMN 和 FAD 的荧光强度、保留时间均有一定影响,回收率也不能令人满意。洪卫国等[7]采用高温高压盐酸水解的方法处理样品,结果核黄素回收率变化幅度较大。我们又选用乙腈、三氯甲烷提取的方法[4],结果较为满意。该方法不仅有效地去除了蛋白和脂肪等干扰物质,而且还排除了前处理对样品的稀释作用。

除了少数样品外,我们在对大鼠血浆和全血中核黄素检测时没有记录到明显的 FAD 和 FMN 的吸收峰(图 2)。这是因为 FAD 和 FMN 主要存在于细胞内,血浆样品中的含量可能太低而不易被检测到,红细胞内含量虽然较多,但是由于 FAD 和 FMN 与黄素蛋白酶结合较为牢固,可能需要采用水解或酶解的方法才能将其完全解离下来[2];FAD 在酸性条件下不稳定,可以自动分解为 FMN[3];FMN 在酸性条件下可出现异构化现象[8]。生物样品如血中

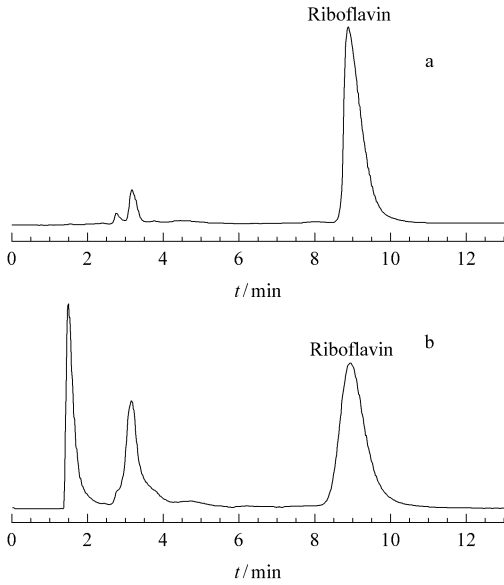


图2 大鼠血浆(a)和全血(b)中的核黄素分析色谱图
Fig.2 Chromatograms of rat plasma(a) and blood(b)
for riboflavin analysis

还存在磷酸酯酶,对FMN具有分解作用^[4]。因此,对于血中FMN和FAD的分析条件尚有待于今后进一步摸索。

2.3 标准曲线和灵敏度

将浓度为200 $\mu\text{mol/L}$ 的核黄素标准储备液用0.02 mol/L的冰醋酸溶液分别稀释成5, 10, 30, 50, 100, 200 nmol/L的溶液进行测定。以核黄素标准品浓度 x (nmol/L)为横坐标,峰面积 y 为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程为 $y = 12\,393x - 10\,682$, $r = 0.9998$,由此表明核黄素在此浓度范围内线性良好。核黄素的检测下限为2.5 nmol/L(按 $S/N = 2$ 计)。

2.4 精密度和回收率

取浓度为20 nmol/L的核黄素标准溶液,分别于日内和日间重复测定数次,以测定方法的精密度,结果日内测定的核黄素峰面积的相对标准偏差(RSD)为1.2%($n = 20$),日间测定的RSD为4.3%($n = 10$);取大鼠血浆和全血样品各10份,分别加入20和40 nmol/L的核黄素标准品,测定回收率分

别为97.0%~104.0%和97.4%~104.4%。

2.5 动物试验

实验一:健康雄性Wistar大鼠,体重80~100 g,随机分为正常对照组和核黄素缺乏组,每组10只。正常对照组喂饲含核黄素的饲料,缺乏组喂饲无核黄素的饲料,喂饲2周后于眼眶采血,并用肝素抗凝,离心分离血浆。测定结果显示,正常对照组和核黄素缺乏组大鼠血浆中核黄素含量分别为(75.6 ± 11.3) nmol/L和(5.9 ± 0.8) nmol/L, t 检验表明差异具有非常显著性意义($P < 0.01$),说明核黄素缺乏可使血浆中核黄素含量很快下降。

实验二:健康雄性Wistar大鼠,体重215~245 g,随机分为正常对照组和完全饥饿组,每组15只,喂饲第10 d于眼眶采血,并用肝素抗凝。测定结果显示正常对照组和完全饥饿组大鼠全血中核黄素含量分别为(77.7 ± 8.4) nmol/L和(52.2 ± 10.4) nmol/L, t 检验显示两组间差别具有显著性意义($P < 0.05$)表明饥饿后血中核黄素含量也有显著变化。

参考文献:

- [1] Ge Keyou, Zhai Fengying, Yan Huaicheng, Cheng Lie, Wang Qing, Jia Fengmei. Acta Nutrimenta Sinica, 1995, 17(2):123
葛可佑,翟凤英,阎怀成,程列,王青,贾凤梅. 营养学报, 1995, 17(2):123
- [2] Chinese Nutrition Society. Chinese DRIs. Beijing: Light Industry Publishing House, 2000. 315, 318
中国营养学会. 中国居民膳食营养素参考摄入量. 北京:中国轻工业出版社, 2000. 315, 318
- [3] Zempleni J. Ann Nutr Metab, 1995, 39:224
- [4] Lopez-Anaya A, Mayersohn M. J Chromatogr, 1987, 423:105
- [5] Capo-Chichi C D, Gueant J L, Feillet F, Namour F, Vidailhet M. J Chromatogr B, 2000, 739(1):219
- [6] Botticher B, Botticher D. Int J Vit Nutr Res, 1987, 57:273
- [7] Hong Weiguo, Deng Feng, Wei Jingyu, Xu Qishou. Journal of Preventive Medicine of Chinese PLA, 1996, 14(5):340
洪卫国,邓峰,韦京豫,徐琪寿. 解放军预防医学杂志, 1996, 14(5):340
- [8] Nielsen P, Rauschenbach P, Bacher A. Methods Enzymol, 1986, 122:209