

兔角膜基质中核黄素含量测定的 HPLC 方法建立

伍腾飞, 彭秀军

作者单位: (100048) 中国北京市, 安徽医科大学海军总医院临床学院 海军总医院眼科
作者简介: 伍腾飞, 男, 在读硕士研究生, 研究方向: 眼科学。
通讯作者: 彭秀军, 男, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向: 眼科学. PXJ1@vip.sina.com
收稿日期: 2012-09-18 修回日期: 2012-12-19

Establishment of HPLC assay method for the riboflavin in rabbits corneal stroma

Teng-Fei Wu, Xiu-Jun Peng

Department of Ophthalmology, Navy General Hospital, Beijing 100048, China

Correspondence to: Xiu-Jun Peng. Department of Ophthalmology, Navy General Hospital, Beijing 100048, China. PXJ1@vip.sina.com
Received: 2012-09-18 Accepted: 2012-12-19

Abstract

• AIM: To develop a high performance liquid chromatography (HPLC) method for determination of riboflavin in rabbits corneal stroma, and investigate the method's specificity, sensitivity and accuracy to determinate whether it can be or not used to evaluate intrastromal concentrations of riboflavin for the study of corneal cross-linking (CXL).

• METHODS: The riboflavin in rabbit's cornea homogenate was extracted on a C₁₈ - SPE cartridge after protein precipitated by heating incubation and adding 10% trichloroacetic acid, and analyzed on HPLC system with an ODS- BP column (5 μm, 250mm × 4.6mm I. D.) and a mobile phase consisted of 40% methanol and 60% pure water. The flow rate was 0.1 mL/min. The spectrophotometer was set at wavelength of 425nm for excitation and 525nm for emission.

• RESULTS: Riboflavin had a good linearity ($r^2 = 0.999584$) existed within range of 1.0×10^{-6} to 1.0×10^{-4} mg/mL. The precision of this method indicated the relative standard deviation (RSD) was 0.86% ($n = 10$), the sample solution stability RSD was 0.51% within 24 hours, and the corneal sample adding standard of the recovery were 99.3% ($n = 5$), RSD = 3.7%.

• CONCLUSION: This method is specific, accurate and sensitive, and can be used for determination of riboflavin in rabbit's corneal stroma.

• KEYWORDS: high performance liquid chromatography; riboflavin; corneal collagen cross-linking; recovery

Citation: Wu TF, Peng XJ. Establishment of HPLC assay method for the riboflavin in rabbits corneal stroma. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2013;13(1):49-51

摘要

目的: 建立兔角膜基质中核黄素含量测定的高效液相色谱 (high performance liquid chromatograph, HPLC) 分析方法, 并分析其专属性、灵敏度和准确性。

方法: 兔角膜组织匀浆经加热孵育和 10% 三氯乙酸去蛋白后离心, 组织上清液经 C₁₈-SPE 柱固相萃取后检测。高效液相色谱柱选择 ODS-BP 色谱柱 (5 μm, 250mm × 4.6mm ID), 以甲醇-纯水 (体积比为 2:3) 为流动相, pH = 7.0, 流速: 0.1 mL/min; 荧光检测器激发波长 425nm, 发射波长 525nm。

结果: 核黄素在 $1.0 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-4}$ mg/mL 范围与峰面积呈现良好的线性关系 ($r^2 = 0.999584$), 精密度的结果显示: RSD = 0.86% ($n = 10$), 样品溶液在 24h 内稳定性 RSD = 0.51%, 测得的角膜样品核黄素加标平均回收率为 99.3%, RSD 为 3.7%。

结论: 本实验中建立的样品前处理方法简单, HPLC 方法专属性强、灵敏度高、准确性好, 可作为紫外线 A/核黄素角膜胶原交联法中角膜基质内核黄素含量测定的定量方法。

关键词: HPLC; 核黄素; 角膜; 胶原交联; 回收率

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2013.01.10

引用: 伍腾飞, 彭秀军. 兔角膜基质中核黄素含量测定的 HPLC 方法建立. *国际眼科杂志* 2013;13(1):49-51

0 引言

核黄素 (riboflavin) 是一种人体必需的水溶性维生素, 经人体吸收后, 其衍生物 FMN 和 FAD 参与机体代谢过程中多种氧化还原酶的构成^[1]。近年来的研究表明, 通过 370nm 波长的紫外线 A 照射, 可促使核黄素发生光化学反应产生活性氧自由基, 后者能激发角膜基质中胶原间的交联, 从而可以增强角膜基质的生物力学特性, 达到有效控制扩张性角膜疾病的进展^[2-5]。测定核黄素方法常用荧光比色法和高效液相色谱法 (high performance liquid chromatograph, HPLC), HPLC 因其样品前处理简单、样品用量少、分离速度快而逐渐成为常用的检测核黄素的方法^[6], 在国内目前已有关于大鼠血液核黄素 HPLC、黄疸患儿血液核黄素 HPLC 及外周血中核黄素及其衍生的 HPLC 方法研究^[7-9], 但尚无角膜基质中核黄素含量的定量方法报道。本研究旨在探讨一种新的可以用于检测角膜基质中核黄素含量的 HPLC 方法。

1 材料和方法

1.1 材料 新西兰白兔 11 只, 体质量 2 ~ 2.5kg, 无眼疾, 雌雄并用 (海军总医院动物中心提供)。日立-2000 高效液相色谱仪, 日立-L-2130 型输液泵, 日立 L-2485 荧光检测器。核黄素标准品 (Sigma 公司) 符合美国药典标准, 核黄素磷酸钠 (按核黄素 5mg 计, 珠海经济特区生物化学制药厂) 加入 5mL 200g/L 右旋糖酐 (Sigma 公司) 配制成 0.1% 核黄素-20% 右旋糖酐溶液。甲醇分析纯 (辽宁嘉诚精细化学品有限公司), 纯水器制备高纯水。

1.2 方法

1.2.1 角膜样品前处理 随机取健康新西兰白兔1只,速眠新Ⅱ肌注(0.2ml/kg)全身麻醉,0.4%盐酸奥布卡因点眼,在眼科显微镜下去除双眼中央角膜9mm上皮组织,同一实验兔右眼点0.1%核黄素-20%右旋糖酐溶液,3min/次,持续30min。左眼点20%右旋糖酐3min/次,持续30min作为空白对照,平衡盐溶液冲洗角膜后全身麻醉下钻取中央角膜8.5mm范围组织,于避光试管-80℃下保存。

解冻各角膜组织后,于磷酸二氢钾平衡液(pH=7.4)中4℃下制取匀浆液,定容至2mL,取1mL匀浆液加入1mL醋酸镁溶液在65℃下孵育15min提取核黄素,随即加入10%三氯乙酸(TCA)去蛋白,离心(3200r/min,10min),取上清液,沉淀用醋酸镁溶液洗涤,洗涤上清液与之前上清液混合,将混合后上清液转入先后用2mL甲醇和2mL纯水活化过的Cleanert C18-SPE吸附柱中,待吸附结束,用2mL纯水洗涤,随即用甲醇脱洗核黄素,所得溶液用氮气吹干,再用2mL甲醇定容吹干后样本,随后将该溶液稀释100倍即得到供试样品上机液A(为点核黄素角膜样品)和供试样品上机液B(不点核黄素角膜样品),检测每次取10μL进样,该样品前处理方法主要参考Capo-chichi与Baiocchi的研究^[1,10],并做了适当修改。

1.2.2 标准品溶液配制 低强度光线下,精密称取核黄素对照品10mg,置于容量瓶中,加0.1mol/L盐酸溶解定容至100mL为工作液(a),精密量取1mL工作液(a)定容至100mL为工作液(b),精密量取1mL工作液(b)定容至10mL为标准品工作液,此时该工作液含核黄素为 1.0×10^{-4} mg/mL。

1.2.3 测定方法建立 (1) 色谱条件:色谱柱: SinaChrom ODS-BP(5μm, 250mm×4.6mm I.D., 依利特),柱温:40℃,检测器:荧光检测器,激发波长:425nm,发射波长:525nm。流动相:甲醇-纯水(2:3)为流动相,pH=7.0;流速:1.0mL/min;检测波长:激发波长425nm,发射波长525nm。(2) 样品测定:分别精密吸取10μL上机液A,上机液B和标准品工作液注入高效液相色谱仪,测出核黄素峰面积,外标法计算供试样品液中核黄素含量。

统计学分析:采用SPSS 17.0 统计软件包进行数据分析,计量资料采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,对于标准品峰面积和浓度间的线性关系采用线性回归方法进行考察,运用Origin8 软件对样品检测数据处理得到色谱图。

2 结果

2.1 方法专属性 分别吸取10μL样品上机液A和样品上机液B注入高效液相色谱仪中进行检测,结果在激发波长425nm、发射波长525nm条件下^[8],供试品溶液A呈现与标准品溶液主峰保留时间、峰形一致的色谱峰。经供试品溶液A与标准品溶液混合分离,以及调整流动相再分离,核黄素标准品主峰与供试品A主峰呈现的色谱峰始终重叠,峰形也没有改变,证实供试品呈现与标准品主峰保留时间一致的色谱峰为核黄素的色谱峰,同时样品上机液B结果显示基线紊乱,没有固定波形,与标准品色谱曲线没有重叠性,证实该样品液中没有可检测到的核黄素(图1~3)。

2.2 线性关系及灵敏度考察 低强度光线下,精密吸取核黄素标准工作液100,50,25,12.5,2,1mL后五组溶液分别定容至100mL,最后得到浓度为 1.0×10^{-4} , 5.0×10^{-5} , 2.5×10^{-5} , 1.25×10^{-5} , 2.0×10^{-6} , 1.0×10^{-6} mg/mL的6组标准溶液系

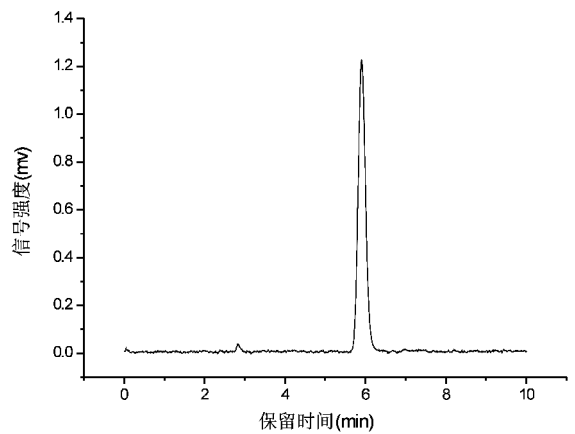


图1 核黄素标准品色谱图。

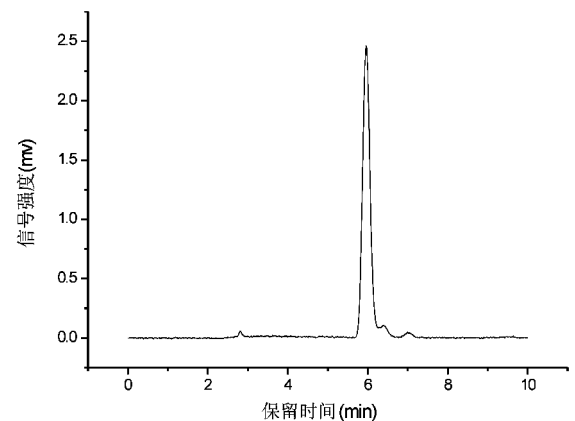


图2 点核黄素角膜供试样品A色谱图。

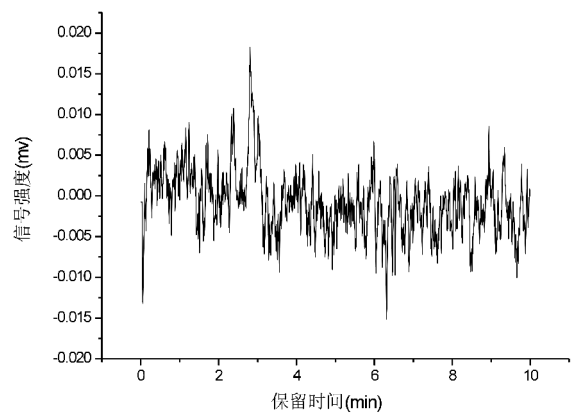


图3 未点核黄素角膜供试样品B色谱图。

列,精密吸取10μL在上述色谱条件下进样测定,以核黄素浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)绘制工作曲线,得回归方程 $Y = 23217590003.9722X - 5765.982626$ ($r^2 = 0.999584$),结果标准溶液在浓度 $1.0 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-4}$ mg/mL范围呈现良好线性关系(图4);灵敏度考察,按S/N=3计,本实验中核黄素的最低检测限为 2×10^{-8} mg/mL。

2.3 精密度考察 连续精密吸取标准品工作液(1.00×10^{-6} mg/ml)10μL,按上述色谱条件重复进样10次,得到核黄素的峰面积RSD=0.86% ($n=10$)。

2.4 稳定性考察 取同一样品溶液分别在0,4,8,10,12,24h进样10μL,测定峰面积,得到核黄素的峰面积RSD=0.51%。

2.5 加标回收率 分别精密吸取一定量供试样品上机液A和标准品工作液稀释后(此标准品工作液含量为 2.00×10^{-6} mg/mL),根据上述色谱条件进行检测,检测峰面积代

表1 角膜组织匀浆上清液中核黄素加标回收率

n=5

序号	核黄素含量(mg/mL)				回收率 (%)
	样品含量 ($\times 10^{-6}$)	标准品加入量 ($\times 10^{-6}$)	样品+标准品含量 ($\times 10^{-6}$)	回收量 ($\times 10^{-6}$)	
1	1.67	2.00	3.63	1.96	98
2	1.67	2.00	3.68	2.01	100.5
3	1.67	2.00	3.61	1.94	97
4	1.67	2.00	3.66	1.99	99.5
5	1.67	2.00	3.7	2.03	101.5

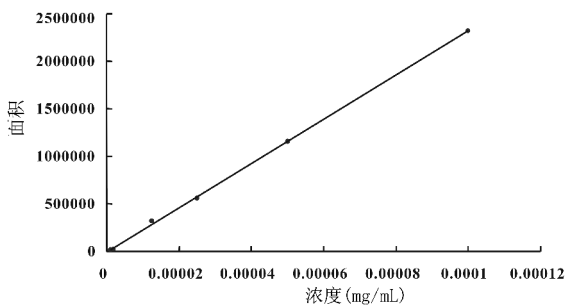


图4 核黄素标准品浓度与峰面积相关性回归曲线。

入回归方程得到供试样品含量为 1.67×10^{-6} mg/mL, 之后再将标准品工作液加入已测得含量的供试样品液中, 制备5组, 按照上述同样条件检测, 并计算检测结果, 按照加标回收率 = (加标试样测定值 - 试样测定值) / 加标量 $\times 100\%$, 计算得到加标回收率在 98% ~ 101.5%, 平均值为 99.3%, RSD = 3.7% (表1), 表明该方法的检测准确性良好。

2.6 样品检测 取健康新西兰白兔 10 只, 体质量在 2 ~ 2.5 kg 之间, 按照“1.2 方法”对兔眼角膜进行干预, 右眼为点核黄素眼, 左眼对照, 经“1.2.1 样品前处理”后, 在“1.2.3”的色谱条件下对各样品进行检测, 结果各经核黄素干预后的眼角膜匀浆液中核黄素色谱峰出峰时间与标准品保持一致 (5.91 min), 且基线平直, 无干扰波, 经峰面积代入回归方程计算得核黄素均值为: $(1.87 \pm 0.52) \times 10^{-6}$ mg/mL, 对照眼在没有核黄素干预下, 其检测图谱基线紊乱, 无与之前标准品波峰一致波形, 表明样品中无可检测到的核黄素。

3 讨论

根据目前国内外的研究结果, 紫外线 A/核黄素角膜胶原交联法的有效开展主要依赖于紫外线 A 与核黄素之间的光化学反应, 因此胶原交联方法中角膜基质中核黄素的含量可能直接影响到交联的最终效果, 也直接关系到该方法的安全性^[4,10], 建立一种有效精确的定量方法, 将有利于从定量的角度研究不同术式胶原交联方法的实用性和安全性, 如跨角膜上皮胶原交联^[5,11]。

在利用 HPLC 法检测生物样品中某成分之前, 通常需对该生物样品进行前处理来提取待测物质和去除其中的大分子物质如: 蛋白质。目前较为常用的去蛋白方法主要是采用三氯乙酸 (TCA) 沉淀法, 本实验中我们采用醋酸镁孵育和 10% TCA 来离取样品和析出蛋白^[1], 据报道 10% TCA 其去蛋白效果可能比 5% TCA 更完全, 且可能比 20% TCA 减少样品成分的水解^[1], 最后我们的结果也显示经 10% TCA 处理后角膜样品中的蛋白成分能被有效地分离去除, 检测过程中没有出现干扰现象。虽然, 去除大分子蛋白质后可以对样品进行检测, 但研究发现上清液中残留的杂质和物质离子可能对检测结果产生影响, 尤其可

能影响检测中核黄素的荧光强度而使检测结果产生较大误差, 因此在国内外的许多研究中都应用到了预柱对样品进行上机前的萃取^[1,8], 在该实验样品的萃取中我们采用了 C18-SPE 柱对样品进行萃取, 该预柱可更好地脱去上清液中的杂质及离子物质, 尤其是氯离子, 避免了其影响检测中核黄素的荧光强度^[1]。

在方法的专属性检验中, 结果显示供试品溶液 A (右) 呈现与标准品溶液主峰保留时间、峰形一致的色谱峰, 而未点核黄素样品检测中未出现与标准品一致的波谱, 表明未点核黄素的角膜基质中没有能检测到的核黄素且不含能检测到的与核黄素波谱相同的物质, 证实了供试品溶液的色谱峰即为核黄素色谱峰, 也说明了本实验色谱条件具有良好的专属性; 在精密度和回收率的考察中, 连续进供试样品溶液, 检测得到峰面积的精确度 RSD = 0.86% ($n = 10$), 表明该方法用于供试样品溶液中核黄素的测定有着良好的精确度, 稳定性实验核黄素峰面积 RSD = 0.51% ($n = 5$), 说明供试样品溶液在 24h 内能保持稳定。而加标回收率考察中, 供试样品加标后平均回收率达到了 99.3%, RSD = 3.7% (RSD < 5%), 说明该方法具有良好的灵敏度和准确性, 可以作为紫外线 A/核黄素角膜胶原交联法中角膜基质内核黄素的含量测定方法。我们的实验结果表明: 本实验中建立的样品前处理方法简单, HPLC 方法专属性强, 灵敏度高, 准确性好, 可作为紫外线 A/核黄素角膜胶原交联法中角膜基质内核黄素的含量测定方法。

参考文献

- 1 Capo-chichi CD, Gueant JL, Feillet F, et al. Analysis of riboflavin and riboflavin cofactor levels in plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2000;739(1):219-224
- 2 Wollensak G. Crosslinking treatment of progressive keratoconus: new hope. *Curr Opin Ophthalmol* 2006;17(4):356-360
- 3 Samaras KE, Lake DB. Corneal collagen cross linking (CXL): a review. *Int Ophthalmol Clin* 2010;50(3):89-100
- 4 Spoerl E, Mrochen M, Sliney D, et al. Safety of UVA-riboflavin cross-linking of the cornea. *Cornea* 2007;26(4):385-389
- 5 伍腾飞, 彭秀军. 跨角膜上皮核黄素-紫外线胶原交联的研究进展. *国际眼科杂志* 2012;12(6):1081-1084
- 6 常相娜, 王正平. 高效液相色谱在检测维生素 B-2 中的应用. *化学工程师* 2005;2:44-45
- 7 洪卫国, 邓峰, 韦京豫, 等. 大鼠全血核黄素 HPLC 测定及其初步应用. *解放军预防医学杂志* 1996;5:340-342
- 8 周琳, 莫建光, 黄岛平, 等. 高效液相色谱法测定黄疸患婴血清中维生素 B-2. *广西科学院学报* 2006;22:411-412, 415
- 9 韦京豫, 郭长江, 徐静, 等. 测定外周血核黄素及其衍生物含量的 HPLC 方法研究. *营养学报* 2006;1:79-82
- 10 Baiocchi S, Mazzotta C, Cerretani D, et al. Corneal crosslinking: riboflavin concentration in corneal stroma exposed with and without epithelium. *J Cataract Refract Surg* 2009;35(5):893-899
- 11 Leccisotti A, Islam T. Transepithelial corneal collagen cross-linking in keratoconus. *J Refract Surg* 2010;26(12):942-948