

高效液相色谱法测定大鼠坐骨神经组织中山梨醇的浓度^{*}

杨鑫伟¹, 年宏蕾¹, 姚伟洁¹, 李倩琴¹, 刘铜华², 李 静¹, 张 楠¹, 许利平^{1△} (1. 首都医科大学中医药学院, 北京 100069; 2. 北京中医药大学科技处, 北京 100029)

【摘要】 目的 建立高效液相色谱法(HPLC)测定大鼠坐骨神经组织中山梨醇浓度的方法。**方法** 采用 Agilent ZORBAX SB C18(4.6 mm × 250 mm, 5 μm)色谱柱, 以 L-鼠李糖为内标, 乙腈(A)-水(B)为流动相, 梯度洗脱, 流速 1.0 mL · min⁻¹; 检测波长 228 nm; 进样量 20 μL; 柱温 25 °C 为检测方法, 对该方法测定大鼠坐骨神经山梨醇浓度进行包括专属性试验、线性关系检测、精密度试验、加样回收率试验及稳定性试验等在内的方法学考察。**结果** 该方法专属性良好, 大鼠坐骨神经山梨醇浓度在 7.5~600 nmol · mL⁻¹ 线性范围内线性关系良好($r^2=0.999\ 9$), 最低定量限为 7.5 nmol · mL⁻¹。日内、日间精密度小于 10%, 加样回收率较高, 满足生物样品回收率在 80%~120% 内的要求, RSD 均小于 9%; 方法稳定性好, 反复冻融 3 次、室温放置 4 h、-20 °C 冻存 28 d 以及处理好的标本于进样器放置 24 h 的 RSD 均小于 10%。**结论** 该测定方法简便、结果准确、可靠, 可用于大鼠坐骨神经组织中山梨醇浓度的测定。

【关键词】 坐骨神经; 山梨醇; L-鼠李糖; 高效液相色谱法

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.01.003 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)01-0006-03

Determination of sorbitol content in rat sciatic nerve tissue by HPLC^{*} YANG Xin-wei¹, NIAN Hong-lei¹, YAO Wei-jie¹, LI Qing-qin¹, LIU Tong-hua², LI Jing¹, ZHANG Nan¹, XU Li-ping^{1△} (1. School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China; 2. Department of Science and Technique, Beijing University of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

【Abstract】 Objective To establish a method for the determination of sorbitol content in rat sciatic nerve tissue by high-performance-liquid-chromatograph(HPLC). **Methods** The HPLC was performed on the Agilent ZORBAX SB C18 column(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with acetonitrile(A)-water(B) as the mobile phase for conducting the gradient elution and with L-rhamnose as the internal standard, at the column temperature of 25 °C, the flow rate of 1.0 mL · min⁻¹, the wavelength at 228 nm and the injection volume of 20 μL. The methodological investigation of this method for determining the sorbitol content in rat sciatic nerve tissue was performed, including the specificity test, linear relation test, precision test, sample injection recovery test and the stability test. **Results** The linear range of sorbitol content in rat sciatic nerve was 7.5~600 nmol · mL⁻¹ ($r^2=0.999\ 9$) and the lowest detection limit was 7.5 nmol · mL⁻¹. The intraday and interday precision were less than 10%, the recovery rate of sorbitol sample size was higher and met the requirement of sample recovery rate of 80%~120%; the method had good stability, including the repeated freezing-thawing for 3 times, placing in the room temperature for 4 h, freezing preservation for 28 d at the temperature of -20 °C and placing of the processed sample in injector for 24 h, RSD of each test was less than 10%. **Conclusion** This method is simple, convenient, reliable in detection results and can be used in determining the sorbitol content in sciatic nerve tissue.

【Key words】 sciatic nerve; sorbitol; L-rhamnose; HPLC

糖尿病周围神经病变(DPN)是糖尿病常见的慢性并发症之一,其病因和发病机制复杂多样,而山梨醇代谢通路活性的增强、山梨醇在坐骨神经内大量蓄积是 DPN 发病的重要机制之一^[1]。许多研究表明,糖尿病周围神经功能障碍与神经组织细胞中山梨醇浓度增加密切相关,故山梨醇浓度异常增加已被视为 DPN 发病的重要标记物之一^[2]。目前,测定山梨醇浓度的方法主要包括酶法和色谱法。然而在酶法中,由于山梨醇脱氢酶除作用于山梨醇以外,还可以作用于木糖醇或其他糖醇,会导致错误的结果。色谱法中的气相色谱-质谱(GC-MS)山梨醇与其他糖醇之间存在干扰,影响山梨醇的准确定量^[3]。本文建立高效液相色谱法(HPLC)测定大鼠坐骨神经组织中山梨

醇的浓度,有助于 DPN 的防治及机制研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 仪器 Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent); Biofuge 15R 低温离心机(德国 Heraeus); DV215CD 电子天平(美国 Ohaus); PTFE 微孔滤膜(美国 Millipore); 749540-0000 微量匀浆机(美国 Kimble Chase); XW-80A 旋涡混合仪(厦门市其林贝尔仪器制造有限公司)。

1.1.2 样品与试剂 D-山梨醇(Sigma-Aldrich, 批号为 LB87587V), L-鼠李糖(沃凯, 批号为 20120515), 乙腈(Fisher, 批号为 125549), 试剂皆为分析纯。

^{*} 基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项(2009ZX09103-303); 北京市教育委员会科技计划面上项目(KM201410025014);

首都中医药研究专项(13ZY01)。

作者简介: 杨鑫伟, 女, 在读博士研究生, 主要研究中药复方防治糖尿病周围神经的病变。 △ 通讯作者, E-mail: xulp@ccmu.edu.cn。

1.1.3 动物 Wistar 大鼠, 雄性, 体重(180±20)g, SPF 级, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 合格证号为 SCXK(京)2012-0001。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件 色谱柱 Angilent ZORBAX SB C18(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-水(B), 梯度洗脱(0~5 min, 70% B; 5~10 min, 70%~81% B, 10~30 min, 81%~83% B); 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 228 nm; 柱温 25 ℃; 进样量 20 μL。

1.2.2 样品制备

1.2.2.1 标准溶液及内标溶液的配制 精密称取 D-山梨醇标准品 0.011 g, 用适量的蒸馏水溶解, 置于 100 mL 容量瓶中, 加蒸馏水至刻度, 即为 6 000 nmol·mL⁻¹ 的 D-山梨醇对照贮备液, 于 4 ℃ 保存。精密吸取适量, 用蒸馏水稀释成摩尔浓度分别为 75、150、300、600、3 000、6 000 nmol·mL⁻¹ 的 D-山梨醇标准系列溶液。精密称取 L-鼠李糖标准品 0.010 g, 用适量的蒸馏水溶解, 置于 100 mL 容量瓶中, 加蒸馏水至刻度, 即为 6 000 nmol·mL⁻¹ 的 L-鼠李糖贮备液, 于 4 ℃ 保存。精密吸取适量, 用蒸馏水稀释成摩尔浓度为 60 nmol·mL⁻¹ 的内标溶液, 于 4 ℃ 保存。

1.2.2.2 组织样品的采集 取健康雄性大鼠 12 只, 禁食 12 h(自由饮水), 以 0.35 g·kg⁻¹ 的剂量腹腔注射 10% 水合氯醛, 进行麻醉。麻醉后, 大鼠俯卧位, 用手术刀于大腿两侧臀部纵向切开皮肤后, 用止血钳和玻璃分针钝性分离尽可能长的坐骨神经。取坐骨神经组织称重, 加冷生理盐水, 制备成 20% 的匀浆液, 于 -20 ℃ 保存备用。

1.2.2.3 样品处理方法 取 200 μL 大鼠空白坐骨神经匀浆液于 2 mL EP 管中, 加入 160 μL 10% 三氯乙酸(TCA)^[3], 以 5 000 r·min⁻¹, 室温离心 15 min。取上清液 100 μL, 加入 60 nmol·mL⁻¹ 的内标 100 μL 及 500 mmol·L⁻¹ 的 Na₂CO₃ 200 μL, 涡旋混匀 1 min。依次加入 1 mol·L⁻¹ KH₂PO₄ 120 μL, 苯甲酰氯 18 μL, 8 mol·L⁻¹ NaOH 90 μL, 涡旋混匀 5 min。混合物加 1.4 mol·L⁻¹ H₃PO₄ 60 μL 和乙酸乙酯 600 μL, 涡旋混匀 5 min^[4]。静置分层后, 取乙酸乙酯相 450 μL, 置 1.5 mL 离心管, 真空干燥。残余物加 450 μL 流动相复溶, 超声 2 min 使其充分溶解。取 20 μL 进样。

1.2.3 方法学考察

1.2.3.1 专属性试验 取沉淀蛋白的大鼠空白坐骨神经匀浆上清液 100 μL, 除不加内标外, 按 1.2.2.3 项操作, 进样测定。将一定浓度的 D-山梨醇和内标溶液加入空白血浆中, 同法操作, 进样测定。

1.2.3.2 标准曲线及定量限 取沉淀蛋白的大鼠空白坐骨神经匀浆上清液 90 μL, 加蒸馏水 10 μL, 用于测定空白坐骨神经匀浆中山梨醇浓度。另取大鼠空白坐骨神经匀浆 90 μL, 加入一系列 D-山梨醇标准溶液 10 μL 和内标溶液 100 μL, 制成含 D-山梨醇分别为 7.5、15、30、60、150、600 nmol·mL⁻¹ 的标准坐骨神经匀浆样品^[5-6]。按 1.2.2.3 及 1.2.1 项进行测定, 得空白坐骨神经匀浆中山梨醇峰面积 AB、加山梨醇匀浆峰面积 AS 以及内标峰面积 AI, 分别以加山梨醇匀浆峰面积 AS/AI 减去空白匀浆的 AB/AI, 得差值 ΔA(ΔA=AS/AI-AB/AI)。以 ΔA 为横坐标, CB/CI 为纵坐标, 按最小二乘法计算回归方程和相关系数(R²)^[7]。

1.2.3.3 精密度试验 取沉淀蛋白的大鼠空白坐骨神经匀浆上清液 90 μL, 按 2.3.2 项方法配制低、中、高 3 个摩尔浓度, 即 15、150、600 nmol·mL⁻¹ 的质控样品各 5 份^[5,8], 按 1.2.2.3

项下操作, 连续测定 3 d^[5,8], 计算日内和日间精密度。

1.2.3.4 加样回收率试验 取沉淀蛋白的大鼠空白坐骨神经匀浆上清液 90 μL, 按 1.2.3.2 项下方法配制低、中、高 3 个摩尔浓度, 即 15、150、600 nmol·mL⁻¹ 的质控样品各 3 份, 按 1.2.2.3 项下操作, 进样测定。同时, 另取相应浓度的 D-山梨醇标准品, 用蒸馏水稀释到相应浓度, 进样检测, 根据回归方程计算 2 组 D-山梨醇的摩尔浓度并进行比较。

1.2.3.5 稳定性试验 取沉淀蛋白的大鼠空白坐骨神经匀浆上清液 90 μL, 按 1.2.3.2 项下方法配制低、中、高 3 个摩尔浓度, 即 15、150、600 nmol·mL⁻¹ 的质控样品各 5 份, 分别考察 D-山梨醇在坐骨神经中的稳定性, 包括反复冻融 3 次, 短期放置(室温, 4 h), 长期冻存(-20 ℃, 28 d)以及处理好的标本于进样器放置 24 h(进样器放置 0、4、8、12、18、24 h)的稳定性^[9]。

2 结果

2.1 方法专属性试验 设定的条件下, 坐骨神经中其他内源性物质不干扰 D-山梨醇和内标的测定, 且 D-山梨醇与内标分离良好, 试验结果表明, 该法专属性良好。

2.2 标准曲线及定量限 该方法线性方程为 Y=0.322 3X+0.031 9, R²=0.999 9。结果表明, D-山梨醇摩尔浓度在 7.5~600 nmol·mL⁻¹ 呈良好的线性关系, D-山梨醇最低定量限为 7.5 nmol·mL⁻¹。见图 1。

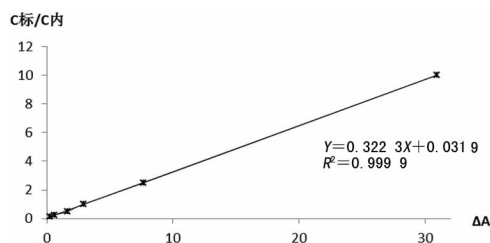


图 1 HPLC 测坐骨神经山梨醇浓度标准曲线

2.3 精密度试验 低、中、高 3 个浓度的日内精密度分别为 3.24%、5.57%、3.42%, 低、中、高 3 个浓度的日间精密度分别为 7.96%、1.39%、2.78%。检测结果显示坐骨神经样品测定的日内精密度和日间精密度 RSD 都小于 10%, 表明该测定方法的精密度高, 重现性好。

2.4 加样回收率试验 该方法得到 D-山梨醇的加样回收率分别为 (114.36±6.42)%、(92.34±1.48)%、(104.95±9.17)%, RSD 分别为 5.61%、1.60%、8.74%。

2.5 稳定性试验 该方法所有反复冻融试验测定值的低、中、高浓度的 RSD 分别为 8.69%、5.03%、3.93%; 短期放置试验测定值的低、中、高浓度的 RSD 分别为 9.32%、7.60%、4.72%; 长期冻存试验测定值的低、中、高浓度的 RSD 分别为 4.76%、5.33%、8.78%; 处理好的标本 24 h 稳定性试验测定值的低、中、高浓度的 RSD 分别为 2.01%、0.68%、0.54%。RSD 均符合精密度要求, 说明分析测试样品在保存过程中较为稳定。

3 讨论

目前, 检测 DPN 时山梨醇浓度的方法主要有酶法和色谱法。酶法是依据山梨醇在山梨醇脱氢酶催化下被氧化为果糖, 同时使氧化型辅酶 I 还原成型辅酶 I (NADH), 而 NADH 能发出荧光而进行测定的。但山梨醇脱氢酶除作用于山梨醇以外, 还可以作用于木糖醇或其他糖醇, 特异性差^[3], 且要求在 10 min 之内进行荧光强度测试, 否则会由于荧光的衰减导致较大的测定误差^[9]。GC-MS 法需要衍生化以增加挥发性, 同时还要抑制山梨醇与果糖、葡萄糖及其他糖醇之间的干扰, 色

谱峰分离度差,影响准确定量且方法过程相对复杂^[10]。

本研究证明,HPLC 法可检测坐骨神经中山梨醇的浓度。糖和糖醇的柱前衍生化可增加 HPLC 检测糖醇的灵敏度。其中苯甲酰化法已被应用于 HPLC 检测红细胞中山梨醇的浓度^[4],故本研究采用苯甲酰化方法检测坐骨神经中山梨醇的浓度。

高效液相色谱分析一般不要求复杂的样品预处理过程,但对于生物样品,则要求它的预处理过程具有富集药物,降低干扰物浓度的能力。因此,本研究采用蛋白沉淀法对坐骨神经进行生物样品前处理,以达到净化样品的目的,蛋白沉淀法是在满足分析条件的情况下的首选方法^[11],其操作简单,并且本研究采用的蛋白沉淀试剂三氯乙酸有利于山梨醇的定量回收^[11],确保了加样回收率的准确度。

本研究采用内标法对大鼠坐骨神经中山梨醇进行测定,可以减少由仪器系统或操作过程产生的误差,提高分析的准确度。由于使用 HPLC 法测定山梨醇浓度的报道很少,曾有报道用半乳糖醇为内标^[12-13],应用 HPLC 法检测坐骨神经和晶体中的山梨醇浓度,故试验初期选择了半乳糖醇为内标物质,但预试验结果显示山梨醇与半乳糖色谱峰分离度较差。本研究选择动物体内不存在的 L-鼠李糖作为内标,经预试验发现 L-鼠李糖与山梨醇达到很好的分离,且坐骨神经匀浆中内源性物质不干扰测定。经过系统的方法学考察,本研究所建立的 HPLC 测定方法灵敏度高、重复性好,方法简便易行,为坐骨神经中山梨醇浓度的准确测定提供了依据,进而为糖尿病周围神经病变的防治提供了较好的测定手段。

参考文献

- [1] Stavniichuk R, Shevalye H, Hirooka H, et al. Interplay of sorbitol pathway of glucose metabolism, 12/15-lipoxygenase, and mitogen-activated protein kinases in the pathogenesis of diabetic peripheral neuropathy [J]. *Biochem Pharmacol*, 2012, 83(7): 932-940.
- [2] Li G, Sun C, Wang Y, et al. A clinical and neuropathological study of Chinese patients with diabetic peripheral neuropathy [J]. *PLoS One*, 2014, 9(3): e91772.
- (上接第 5 页)
- sensus proposals for A unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes[J]. *Hepatology*, 2005, 42(4): 962-973.
- [7] Yoo TW, Donfield S, Lail A, et al. Effect of hepatitis C virus(HCV) genotypes on HCV and HIV-1 disease[J]. *J Infect Dis*, 2005, 191(1): 4-10.
- [8] Nabi SG, Zaffar G, Sheikh NI, et al. Hepatitis C virus genotypes: a plausible association with viral loads[J]. *Indian J Pathol Microbiol*, 2013, 56(4): 384-387.
- [9] Ali A, Nisar M, Ahmad H, et al. Determination of HCV genotypes and viral loads in chronic HCV infected patients of Hazara Pakistan[J]. *Virology*, 2011, 8(466): 2-6.
- [10] Dong ZX, Zhou HJ, Wang JH, et al. Distribution of hepatitis C virus genotypes in Chinese patients with chronic hepatitis C: Correlation with patients' characteristics and

- [3] Sim HJ, Jeong JS, Kwon HJ, et al. HPLC with pulsed amperometric detection for sorbitol as a biomarker for diabetic neuropathy [J]. *J Chromatogr B*, 2009, 877(14): 1607-1611.
- [4] Kwang-Hyok S, Ui-Nam P, Sarkar C, et al. A sensitive assay of red blood cell sorbitol level by high performance liquid chromatography: potential for diagnostic evaluation of diabetes [J]. *Clin Chim Acta*, 2005, 354(1): 41-47.
- [5] 张焯, 谢小青, 刘婷立, 等. 内源性物质药物的定量测定及生物等效性评价研究进展 [J]. *中国新药杂志*, 2011, 20(22): 2221-2228.
- [6] 钟大放, 李高, 刘昌孝. 生物样品定量分析方法指导原则(草案)[J]. *药物评价研究*, 2011, 34(6): 409-414.
- [7] 杨智, 阳利龙, 祝文兵, 等. 异硫氰酸苯酯柱前衍生 RP-HPLC 法测定人血浆中 10 种氨基酸的浓度 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2011, 16(5): 549-552.
- [8] 于敏, 张双庆, 李佐刚. 生物样品中化学药物定量分析方法验证的进展与解读 [J]. *药物分析杂志*, 2013, 33(11): 2019-2024.
- [9] 张亚超, 王仁杰, 王红, 等. 山梨醇的测定方法与其应用 [J]. *河北医药*, 2000, 22(11): 852-853.
- [10] Kiyoshima A, Kudo K, Hino Y, et al. Sensitive and simple determination of mannitol in human brain tissues by gas chromatography-mass spectrometry [J]. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 2001, 758(1): 103-108.
- [11] 戴国梁, 居文政, 谈恒山. 生物样品前处理研究进展 [J]. *中国医院药学杂志*, 2013, 33(6): 484-487.
- [12] 胡惠民, 何成, 毛晓明, 等. 高效液相色谱法测定组织中山梨醇含量[J]. *第二军医大学学报*, 1992, 13(1): 84-87.
- [13] Dethy JM, Callaert-Deveen B, Janssens M, et al. Determination of sorbitol and galactitol at the nanogram level in biological samples by high-performance liquid chromatography [J]. *Anal Biochem*, 1984, 143(1): 119-124.

(收稿日期: 2014-04-28 修回日期: 2014-09-12)

clinical parameters[J]. *J Dig Dis*, 2012, 13(11): 564-570.

- [11] Raimondi S, Bruno S, Mondelli MU, et al. Hepatitis C virus genotype 1b as a risk factor for hepatocellular carcinoma development: a meta-analysis[J]. *J Hepatol*, 2009, 50(6): 1142-1154.
- [12] Chun-Tao Wai, Greenson JK, Robert J, et al. A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C[J]. *Hepatology*, 2003, 38(2): 518-526.
- [13] Zein NN. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes[J]. *Clin Microbiol Rev*, 2000, 13(2): 223-235.
- [14] Ghany MG, Strader DB, Diagnosis DL. Management and treatment of hepatitis C: an update[J]. *Hepatology*, 2009, 49(2): 1335-1373.

(收稿日期: 2014-03-13 修回日期: 2014-08-01)