

HPLC 测定荷瘤小鼠皮下微透析液中乳酸含量

李清宋, 邓晓霞, 曾文雪, 李珊珊, 彭乐, 刘红宁*, 林色奇*
(江西中医药大学, 南昌 330004)

[摘要] 目的:建立微透析联合 HPLC 测定荷瘤小鼠皮下微透析液中乳酸含量的方法。方法:采用微透析系统收集正常小鼠和 H22 荷瘤小鼠皮下微透析液,利用 HPLC 测定小鼠皮下微透析液中乳酸的含量。ZORBAX SB-Aq 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.1% 磷酸溶液(5:95),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 210 nm 柱温 30 ℃。结果:线性范围 20.39 ~ 611.6 mg·L⁻¹。平均回收率 97.41%,RSD 4.6%。结论:该方法能够准确检测出透析液中乳酸的含量,具有简单可靠、分析速度快、灵敏度高、精密度好等优点,为乳酸的检测提供新途径。

[关键词] 乳酸;微透析;高效液相色谱法;H22 荷瘤小鼠

[中图分类号] R284.1;R945 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)15-0044-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015150044

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20150610.0944.005.html>

[网络出版时间] 2015-06-10 9:44

Determination of Lactic Acid Content in Subcutaneous Micro-dialysis Fluid of Tumor-burdened Mice by HPLC LI Qing-song, DENG Xiao-xia, ZENG Wen-xue, LI Shan-shan, PENG Le, LIU Hong-ning*, LIN Se-qi* (Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for the determination of lactic acid content in subcutaneous micro-dialysis fluid of hepatoma-bearing mice by micro-dialysis combined with HPLC. **Method:** Micro-dialysis system was adopted to collect subcutaneous micro-dialysis fluid of normal mice and tumor-burdened mice for determining the content of lactic acid in subcutaneous micro-dialysis fluid by HPLC. The ZORBAX SB-Aq column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) was used with the mobile phase of methanol-0.1% phosphoric acid solution (5:95) at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, the detection wavelength was 210 nm, and the column temperature was set at 30 ℃. **Result:** The linearity ranged between 20.39-611.6 mg·L⁻¹ with the average recovery rate of 97.41% and RSD of 4.1%. **Conclusion:** This method is simple, reliable, rapid and highly sensitive, it can accurately detect lactic acid content in dialyzate and provide a new way to detect lactic acid.

[Key words] lactic acid; micro-dialysis; HPLC; H22-hepatoma bearing mice

肿瘤是一种能量代谢性疾病^[1],在有氧条件下,肿瘤细胞主要通过葡萄糖酵解供能,提高了对葡萄糖的摄取和乳酸的生成,且肿瘤的恶性程度越高,糖酵解增强的趋势就越明显。前期研究发现乳酸是肿瘤组织的主要能源物质之一。大量报道中医药具有抑制肿瘤细胞糖酵解的作用^[2-3],其中简便、快捷、动态观察整体动物能量代谢的变化是一项关键技术。

Sonveaux 等^[4]研究发现离血管较远的缺氧肿瘤细胞更具侵蚀性、对化疗更耐受的原因可能与乳酸的利用有关,故准确测定机体中乳酸的含量对于检测患者能量代谢情况、判断疾病的严重程度和客观判断预后均具有重要临床意义^[5]。测定乳酸的方法有滴定法、酶法^[6]、气相色谱法^[7]和高效液相色谱法(HPLC)^[8-10],其中 HPLC 可直接进样分析,具有快速、精确、检测浓度范围宽等优势。但采用

[收稿日期] 20150108(009)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81160493);江西教育厅科学技术研究项目(KJ201209263065);江西中医药大学省级重点学科建设工程重点重大科研项目(2013jzdxk066)

[第一作者] 李清宋,在读硕士,从事临床中药研究,Tel:15297910054,E-mail:464771210@qq.com

[通讯作者] *刘红宁,博士,教授,从事中医药基础理论方向研究,Tel:138030506857,E-mail:lhn0791@139.com;

*林色奇,博士,副教授,从事中药药效及作用机制的临床和实验研究,Tel:13367910705,E-mail:lsq2517@163.com

HPLC 对生物样本的处理过程比较复杂,故采用微透析法避免对样本进行复杂处理。微透析是一种实时连续活体采样技术,微透析液可直接用于 HPLC 进样分析,实现了内源性物质和体内药物的实时测定,可有效缩短取样时间,提高样品的稳定性,并能节省时间及成本,是体内药物分析的重大突破^[11-12]。本实验联合微透析和 HPLC,成功建立了 HPLC 检测荷瘤小鼠皮下透析液中乳酸含量的方法,具有快速、准确、重复性好等特点。

1 材料

1260 型高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司), MS205DU 型 1/10 万电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司),CMA4004 型微透析采血系统(台湾 CMA 公司),A10 Milli-Q 型纯水仪(法国默克密理博公司),EVC 型小鼠饲养笼系统(苏州猴皇动物实验设备科技有限公司)。透析膜(10 mm,台湾 CMA 公司),乳酸对照品(美国 Supelco 公司,批号 LC01198V,纯度 99.9%),戊巴比妥钠(德国 Merck 公司),生理盐水(浙江国镜药业有限公司,批号 C114091607),甲醇为色谱纯,水为自制纯水,其他试剂均为分析纯。

雄性昆明种 SPF 级小鼠 20 只,体重 20 ~ 22 g,购自中国食品药品检定研究院,合格证号 SCXK(京)2009-0017,25 °C 自由饮食,于中央排气通风笼盒系统环境饲养。H22 荷瘤种(中药固体制剂制造技术国家工程研究中心药理学组)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 ZORBAX SB-Aq 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相甲醇-0.1% 磷酸溶液(5:95),流速 1.0 mL·min⁻¹,检测波长 210 nm,进样量 20 μL。

2.2 溶液的配制

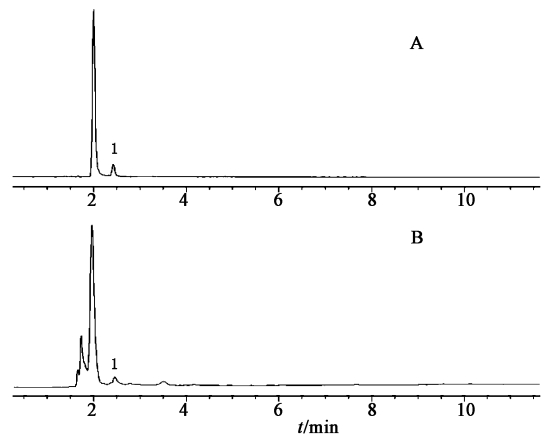
2.2.1 对照品溶液 精密称取乳酸对照品 3.67 mg,用水定容至 6 mL,即得。

2.2.2 供试品溶液 将作为透析液的生理盐水于 0.22 μm 微孔滤膜进行过滤,分装备用。分别取正常昆明种小鼠和 H22 荷瘤模型小鼠各 4 只,按 0.01 mL·g⁻¹ 给予 0.1% 戊巴比妥钠进行麻醉,待完全麻醉后,剪去穿刺部位鼠毛,采用 CMA30 型线性微透析探针穿过腹部皮下,经微透析系统按 4 μL·min⁻¹ 流速推注前述过滤后的生理盐水^[11-13],10 min 后开始收集,每只小鼠收集透析液 240 μL。分别将各组收集到的透析液充分混匀后分装(混合供试品),每管 60 μL,得到正常昆明鼠透析液供试品和 H22 荷瘤小鼠透析液供试品,于 4 °C 保存备用。

2.3 H22 荷瘤小鼠模型的建立 取 H22 荷瘤小鼠将其颈椎脱臼处死,在 75% 乙醇中浸泡 1 ~ 2 min 后抽取其腹水,用生理盐水稀释腹水并吹打混匀,于 1 000 r·min⁻¹ 离心 5 ~ 8 min,弃去上清液,加生理盐水吹打混匀进行稀释,计数配成 1 × 10⁷ 个/mL 的瘤细胞悬液,移入 50 mL 无菌离心管中,置于冰水浴中备用,按 0.2 mL/只小鼠右腋窝皮下接种。在接种后 1 周正常饲养,瘤体大小 > 15 mm × 12 mm,用于微透析系统透析收集微透析液。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性试验 按 2.1 项下色谱条件检测乳酸对照品、微透析液中乳酸含量,在相应保留时间处均有乳酸的色谱峰,见图 1。因无法清除微透析液中的乳酸,故未设阴性样品。



A. 对照品;B. 供试品;1. 乳酸

图 1 荷瘤小鼠皮下微透析液 HPLC

Fig.1 HPLC chromatograms of subcutaneous micro-dialysis fluid of tumor-burdened mice

2.4.2 线性关系考察 精密吸取乳酸对照品溶液,稀释成 10 个不同质量浓度(611.6, 458.7, 407.7, 305.8, 203.86, 152.9, 122.5, 61.16, 30.5, 20.39 mg·L⁻¹),摇匀,按 2.1 项下条件测定(n = 4),以进样量为横坐标,峰面积平均值为纵坐标,得回归方程 Y = 32.92X + 5.541(r = 0.999),微透析液中乳酸质量浓度在 20.39 ~ 611.6 mg·L⁻¹ 与峰面积的线性关系良好。最低检测下限 20.39 mg·L⁻¹。

2.4.3 精密度试验 精密吸取 61.16 mg·L⁻¹ 乳酸对照品溶液,按 2.1 项下条件重复进样 6 次,计算乳酸峰面积的 RSD 1.4%,表明仪器精密度良好。

2.4.4 重复性试验 分别取 2.2.2 项下同一混合供试品溶液 6 份,按 2.1 项下条件测定,结果乳酸平均质量浓度 26.52 mg·L⁻¹,RSD 3.9%,表明本方法重复性良好。

2.4.5 稳定性试验 取对照品溶液分别于 0, 12, 24, 48, 72, 96 h 和混合供试品溶液分别于 0, 24, 48, 96 h 按 2.1 项下条件测定, 计算对照品溶液中乳酸峰面积的 RSD 1.3%, 混合供试品溶液中乳酸峰面积的 RSD 2.3%, 表明供试品溶液和对照品溶液均在 96 h 内稳定性良好。

2.4.6 加样回收试验 取 2.2.2 项下混合供试品 6 份, 每份 60 μL , 各精密加入等体积 305.8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 乳酸对照品溶液, 混匀, 按 2.1 项下条件测定, 计算微透析液中乳酸的平均回收率 97.41%, RSD 5.0%, 表明本方法符合含量测定的要求。

表 1 微透析液中乳酸含量测定的加样回收率试验

Table 1 Recovery test for determination of lactic acid in microdialysis fluid

样品中量 / μg	测得量 / μg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
1.648 92	20.168 71	100.94		
1.521 36	18.674 18	93.49		
1.621 62	18.692 41	93.04	97.41	5.0
1.667 16	19.895 32	99.35		
1.557 84	18.637 73	93.09		
1.530 48	20.715 49	104.56		

注: 加入量均为 18.348 μg 。

2.4.7 模型组与正常组透析液中乳酸含量的比较 分别取 2.2.2 项下 H22 荷瘤小鼠模型组透析液和正常组透析液, 按 2.1 项下色谱条件测定, 计算二者中透析液乳酸质量分别为含量为 1.131, 0.532 μg , 乳酸含量 H22 荷瘤模型组明显高于正常组, 且存在显著性差异 ($P < 0.05$)。

3 讨论

体液中乳酸的水平能够反映机体能量代谢的状态, HPLC 是测定乳酸的常用方法之一, 但该方法的本前处理过程过于复杂, 不利于实时检测, 本文采用微透析法联合 HPLC 可有效提高检测效率和检测结果的稳定性。本文采用微透析联合 HPLC 检测透析液中乳酸的含量, 实现了在体、动态、实时监测机体能量代谢变化状态, 对于临床和实验研究均有一定实用价值。

预试验对色谱柱和流动相进行了考察, 根据乳酸理化特性, 考虑到其性质和流动相中水相比较, 比较大, 比较了 ZORBAX SB-C₁₈ 和 ZORBAX SB-Aq 色谱柱对乳酸的分析能力, 结果发现 ZORBAX SB-C₁₈ 色谱柱的分离度较差, 乳酸和溶剂分不开, 理论塔板数不符合要求; 而 ZORBAX SB-Aq 色谱柱不仅分离效果较好, 且不出现肩峰等, 故确定使用 ZORBAX SB-Aq 色

谱柱测定微透析液中乳酸的含量。流动相考察了 220 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钾-磷酸氢二钾缓冲液 (pH 6.7, 含 6 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 四丁基氢氧化铵^[8])、甲醇-0.1% 磷酸水溶液 (5:95)^[9] 和 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钾-磷酸 (pH 2.5)^[14] 等, 结果显示在甲醇-0.1% 磷酸水溶液系统下, 样品中乳酸的分离度较好; 同时在此流动相下考察了不同配比, 结果表明选择甲醇-0.1% 磷酸水溶液 (5:95) 时, 其峰形和分离度为最好。

[参考文献]

[1] Seyfried T N, Shelton L M. Cancer as a metabolic disease[J]. Nutr Metab (Lond), 2010, 7(7): 2-22.

[2] 白晶, 徐力. 中医药对癌症恶病质的治疗分析[J]. 中医学报, 2010, 25(2): 216-218.

[3] 张永军, 马胜林, 张爱琴. 中医药防治肿瘤恶病质的作用[J]. 实用肿瘤学杂志, 2008, 22(4): 373-375, 384.

[4] Sonveaux P, Végran F, Schroeder T, et al. Targeting lactate-fueled respiration selectively kills hypoxic tumor cells in mice [J]. J Clin Invest, 2008, 118(12): 3930-3942.

[5] Warren D E, Jackson D C. Lactate metabolism in anoxic turtles: an integrative review [J]. J Comp Physiol B, 2008, 178(2): 133-148.

[6] 柳畅先, 虞浔, 吴士筠. 酶法测定乳酸[J]. 分析试验室, 2005, 24(9): 75-77.

[7] 刘师莲, 祁维平, 秦延江, 等. 气相色谱法测定线粒体脑肌病患者血清和脑脊液中的乳酸[J]. 色谱, 2003, 21(5): 480-482.

[8] 汤丽芬, 吴珏珩, 张选红, 等. 高效液相色谱法同时测定小鼠脑组织中乳酸与磷酸肌酸含量[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 15(3): 300-301, 303.

[9] 董秀丽. 高效液相色谱法测定小鼠血清中的乳酸[J]. 光谱实验室, 2012, 29(5): 2937-2939.

[10] McHughet J, Dumont S N, Paradis J, et al. New and simple HPLC method for the determination of lactic acid content in ciprofloxacin injection [J]. J Liq Chromatogr R T, 2006, 29(13): 1905-1916.

[11] Nandi P, Lunte S M. Recent trends in microdialysis sampling integrated with conventional and microanalytical systems for monitoring biological events: A review [J]. Anal Chim Acta, 2009, 651(1): 1-14.

[12] 聂颖兰, 范斌, 闫寒, 等. 微透析与现代分析技术在线联用的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(5): 252-255.

[13] 张群林, 张云静, 吴亮, 等. 微透析-液相色谱-化学发光法测定大鼠脑组织中丹参酚类化合物浓度及其药代动力学研究 [J]. 中国药理学通报, 2010, 26(9): 1230-1237.

[14] 刘国英, 许世荣. 关于提高 HPLC 法测定乳酸准确性的探讨 [J]. 酿酒, 2008, 35(19): 47-48.

[责任编辑 刘德文]