

喂饲补阳还五汤大鼠血清中黄芪甲甙的固相萃取 - 化学衍生化 - 荧光分光光度法测定

游文玮¹袁昭晖²袁 丽²袁学锋²第一军医大学¹ 基础部化学教研室袁中医系中药新药研究重点实验室袁广东 广州 510515

摘要目的 建立一种测定黄芪甲甙的方法遥方法 采用固相萃取小柱对血清样品进行预处理袁用茴香酸在硫酸介质中与黄芪甲甙反应产生强烈荧光物质的特性来测定血清中的黄芪甲甙遥结果 经固相萃取处理后的血清样品无干扰袁黄芪甲甙与茴香酸的反应产物的最大激发波长为 姿=310nm袁最大发射波长为 姿=376nm袁黄芪甲甙在 1~10 滋/ml 浓度范围内与荧光强度呈线性关系袁相关系数 r=0.9999遥测定样品平均回收率为 97.1%袁SD=2.6%(n=5)遥结论 此方法灵敏袁准确袁选择性好袁用于测定鼠血清中的黄芪甲甙遥

关键词 固相萃取 化学衍生化 荧光分光光度法 补阳还五汤 大鼠血清 黄芪甲甙

中图分类号 Q-331; R282.6 文献标识码 文章编号 000-2588(2003)04-0335-02

Determination of serum astragaloside in rats fed with Buyanghuanwu decoction using solid-phase extraction, chemical derivatization and fluorospectrophotometry

YOUWen-wei¹, WUZhao-hui², TONGLi², XINGXue-feng²

¹Teaching and Research Section of Chemistry, Department of Basic Medical Sciences, ²Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Development, Department of Traditional Chinese Medicine, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To develop a method for determining the serum astragaloside in rats fed with Buyanghuanwu decoction (a preparation of a traditional Chinese medicine). Methods A solid-phase extraction column was employed for pretreating the serum samples. The fluorescence characteristics of the extract were measured following chemical derivatization with anisic acid-sulphuric acid. Results The endogenous interference was removed by solid-phase extraction. The excitation and emission maxima of the reaction product from astragaloside and anisic acid were at 310 nm and 376 nm respectively. The linear range of the calibration curve was 1.0 to 10.0 滋/ml with r=0.9999. The average recovery rate of the method was 97% with relative standard derivation of 2.59% (n=5). Conclusion This method is rapid and highly sensitive, and useful for monitoring the concentration of astragaloside in rat serum.

Key words: solid-phase extraction; chemical derivatization; fluorospectrophotometry; Buyanghuanwu decoction; rat serum; astragaloside

补阳还五汤为清代名医王清任创制的益气活血名方袁治中风及中风后遗症遥现代医学研究表明袁它具有扩张血管袁增加脑血流量袁改善微循环袁降低血液黏度袁抑制血小板聚集袁溶解血栓袁抗自由基等作用遥补阳还五汤由黄芪 120 g 袁当归 6 g 袁赤芍 6 g 袁川芎 3 g 袁桃仁 3 g 袁红花 3 g 袁地龙 3 g 组成遥方中大剂量应用黄芪袁而黄芪甲甙又是黄芪的主要活性成分遥测定喂饲补阳还五汤的大鼠血清中的黄芪甲甙袁对于阐述补阳还五汤的作用机制和物质基础具有重要的意义遥黄芪甲甙的测定方法主要有紫外分光光度法袁薄层扫描法袁高效液相色谱法等遥上述测定方法各有其局限

性袁比如灵敏度低袁无法检测血清中的黄芪甲甙遥黄芪甲甙仅在 200nm 处有紫外吸收袁对紫外检测不利遥本文应用荧光分光光度法袁针对大鼠血清内源性杂质干扰严重的特点袁建立了用固相萃取净化和富集血清袁再用化学衍生荧光分光光度法测定黄芪甲甙的方法遥

1 仪器与试剂

1.1 仪器

RF-5000 荧光分光光度计 日本岛津 袁 18 固相萃取小柱 00mg

1.2 试剂

黄芪甲甙对照品储备溶液 精密称取 10mg 黄芪甲甙对照品 中国药品生物制品检定所 含量测定用 溶于 10ml 容量瓶中 定容至刻度 摇匀 制成 1.0mg/ml 黄芪甲甙对照品的甲醇储备液 2% 茴香酸无水乙醇溶液 用时配制 2% 硫酸

收稿日期 003-02-19

基金项目 国家自然科学基金 9970900 广东省中医药管理局资助课题 00006

Supported by National Natural Science Foundation of China (39970900)

作者简介 游文玮 1963 年 福建漳州人 袁 1979 年毕业于厦门大学化学系 副教授 电话 20-61648197

溶液所用试剂均为分析纯

1.3 含药大鼠血清样品的制备

用补阳还五汤水煎剂浓缩液 1g/ml 生药连续 3 d 喂饲大鼠 3 d 后取血清分离大鼠血清冷冻备用

2 方法与结果

2.1 血清样品的固相萃取

准确移取血清样品 3ml 以 0.5ml/min 速率加压使样品溶液经过预先活化过的 C18 固相萃取小柱将柱抽干 黄芪甲甙被萃取到柱上 部分杂质随废液排出 依次用 5ml 水 10% 甲醇淋洗 最后将柱抽干 用甲醇 3ml 洗脱 黄芪甲甙 收集洗脱液 洗脱液于 60℃ 水浴上用氮气挥干 再用 1ml 甲醇溶解 定容作为供试液

2.2 化学衍生荧光分析方法

准确移取 0.3 mg/ml 的黄芪甲甙对照品溶液 0.05ml 于 5ml 干燥容量瓶中 加入 2% 茴香酸乙醇溶液 0.6ml 再加入 72% 硫酸溶液 0.8ml 摇匀 置于 60℃ 水浴中反应 30min 取出冷却至室温 用无水乙醇定容至刻度 摇匀 在 RF-5000 荧光分光光度计扫描 得黄芪甲甙的激发光谱和发射光谱 如图 1 所示 由此确定黄芪甲甙反应产物的最大激发波长 $\lambda_{ex}=310\text{nm}$ 最大发射波长 $\lambda_{em}=376\text{nm}$ 在此波长条件下测定黄芪甲甙反应产物的荧光强度值 同时作空白校正

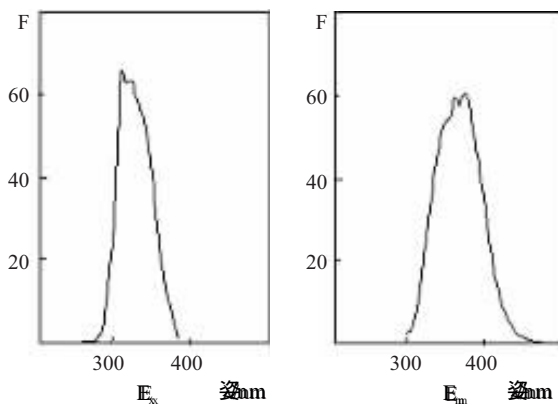


图 1 黄芪甲甙与茴香酸反应产物的荧光光谱

Fig.1 Fluorescence spectra of the reaction product by astragaloside and anisic acid

2.3 标准曲线

移取 1mg/ml 的黄芪甲甙对照品溶液分别制成 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.8 和 1 mg/ml 的标准系列溶液 取 0.05ml 于 5ml 量瓶中 再分别加入按 2.1 项下处理的空白血清 0.05ml 按 2.2 项下操作 测定荧光强度 同时作空白校正 以荧光强度 对黄芪甲甙浓度 进行回归处理 得标准曲线的线性回归方程为 $Y=20.627X-1.8484$ 相关系数 $r=0.999$ 线性范围为 1~10 μg/ml

2.4 精密度试验

平行移取 0.1mg/ml 黄芪甲甙对照品溶液 0.05ml 五份 分别加入按 2.1 项下处理的空白血清 0.05ml 按 2.2 项下操作 测定荧光强度 结果 $RSD=1.5\%$

2.5 稳定性试验

取 0.3mg/ml 的黄芪甲甙对照品溶液 0.5ml 按 2.2 项下操作 放置 0, 1, 2, 3, 4 h 测定荧光强度 结果表明在 4 h 内荧光强度稳定

2.6 回收率试验

精密移取已知含量的供试液 5 份 每份 50 μg 分别精密加入 0.3mg/ml 黄芪甲甙对照品溶液 50 μg 按 2.2 项下操作 测定荧光强度 同时作空白 根据外标两点法 分别求各份的含量 结果见表 1

表 1 回收率试验结果

Tab.1 Results of recovery test

Content (μg)	Added (μg)	Found (μg)	Recovery (%)	Average recovery (%)	RSD (%)
13.0	15.0	27.6	97.3	-	-
13.0	15.0	28.1	100.7	-	-
13.0	15.0	27.2	94.7	97.1	2.59
13.0	15.0	27.2	94.7	-	-
13.0	15.0	27.7	98.0	-	-

2.7 样品测定

精密移取含补阳还五汤高剂量组大鼠血清和补阳还五汤低剂量组大鼠血清各 3 ml 按 2.1 项下操作 制备供试液 移取供试液 0.05ml 于 5ml 量瓶中 按 2.2 项下操作 测定荧光强度 同时作空白校正 根据外标两点法 计算血清样品中黄芪甲甙的含量 测得含补阳还五汤高剂量组大鼠血清和含补阳还五汤低剂量组大鼠血清中黄芪甲甙的浓度为 86.7 和 76.7 μg/ml

3 讨论

3.1 取血清样品

本试验曾按文献 采用正丁醇萃取血清样品 结果空白血清在测定波长处干扰严重 为了除去大鼠血清中内源性杂质的干扰 本试验采用固相萃取技术处理血清样品 结果在测定波长处空白血清和含补阳还五汤 黄芪甲甙 阴性液的血清均无干扰 本方法采用固相萃取技术有效地富集和净化样品 并结合了荧光分光光度法灵敏度高的优点 方法灵敏 准确 选择性好 适合于含补阳还五汤大鼠血清中微量黄芪甲甙的测定

3.2 试剂空白吸收的消除

试验中发现 无水乙醇的选择至关重要 不同厂家 不同批号的无水乙醇在测定波长处荧光强度不同

发出桥延支到桥延沟附近的脑干和下橄榄核。在接近面听神经之前分叉形成内听侧支。侧支伴随面听神经走行。在接近内耳门处折返形成血管袢。发出内听动脉供应内耳及中耳。小脑前下动脉回返穿通支沿途发出营养面听神经的细小血管。折返后行向脑干和小脑。终末支供应面听神经出脑处的脑干。内听动脉和小脑前下动脉常参与听神经瘤的供血。在听神经瘤切除术中应仔细辨认。尽量避免损伤。小脑前下动脉可位于听神经瘤的下方、前方或上方。发生听神经瘤后。上述动脉可能因受牵拉或挤压而发生位置的改变。增加了手术的难度。如果在手术中一旦损伤这些动脉。即使面听神经解剖结构保留完整。仍会出现面瘫和听力障碍。如果小脑前下动脉主干受损。造成脑干缺血水肿。出现呼吸心跳骤停。在应用乙状窦后入路切除听神经瘤过程中。去除内听道后壁时。避开骨迷路是能否保留听力的关键。由于人类颞骨的变异性很大。而且没有能确定其确切位置的标记。因此打开内听道只能依靠术前 CT 和术者的个人经验。国内有研究认为。在不损伤骨迷路。最大角度不超过 61° 的情况下。内听道最大磨除范围平均为 7.09mm。粗略计算。最大安全磨开内耳道后壁接近总长的 2/3。神经内镜借助良好的照明。通过一个狭小的通道。即可进入桥小脑角。避免了对脑组织及神经血管等结构的过分牵拉。真实反映了各组织结构之间的解剖关系。同时还可以通过各种角度进行观察。能更全面地了解解剖结构之间的关系。

参考文献院

咱暂 Silverstein H, Rosenberg SI, Flanzer J, et al. Intraoperative facial nerve monitoring in acoustic neuroma surgery. *咱暂 Am J Otol*, 1993, 14(6):524-32.

咱暂 赵洪洋. 听神经瘤的显微外科技术. *咱暂中国临床神经外科杂志 (Chin J Clin Neurosurg)*, 2000, 5(1):63-5.

咱暂 Rowed DW, Nedzelski JM. Hearing preservation in the removal of intracanalicular acoustic neuromas via the retrosigmoid approach. *咱暂 Neurosurg*, 1997, 86(3):456-61.

咱暂 Matula C, Day JD, Czech T, et al. The retrosigmoid approach to acoustic neurinomas: technical, strategic, and future concepts. *咱暂 Acta Neurochir (Wien)*, 1995, 134(3-4):139-47.

咱暂 Rhoton AL. The posterior cranial fossa: microsurgical anatomy & surgical approaches. *咱暂 Neurosurgery*, 2000, 47(Suppl):S129-30.

咱暂 O'Connell GM, O'Flynn P. Endoscopic anatomy of the cerebellopontine angle. *咱暂 Am J Otol*, 1993, 14(2):122-5.

咱暂 江涛, 王忠诚, 于春江, 等. 听神经瘤听力保留的显微解剖学研究. *咱暂中国微侵袭神经外科杂志*, 2001, 6(1):38-42.

Jiang T, Wang ZC, Yu CJ, et al. Microanatomical study on acoustic neurinomas hearing preservation. *咱暂 Chin J Mini Invasive Neurosurg*, 2001, 6(1):38-42.

咱暂 Tatagiba M, Samii M, Matthies C, et al. The significance for postoperative hearing of preserving the labyrinth in acoustic neurinoma surgery. *咱暂 Neurosurg*, 1992, 77(5):677-84.

咱暂 江涛, 王忠诚, 于春江, 等. 单侧枕下乙状窦后入路磨开内耳道后壁与骨迷路保护. *咱暂中华神经外科杂志*, 1999, 15(4):196-9.

Jiang T, Wang ZC, Yu CJ, et al. Suboccipital retrosigmoid approach drilling of the posterior wall of the internal acoustic meatus and preserving bone labyrinths. *咱暂 Chin J Neurosurg*, 1999, 15(4):196-9.

责任编辑 隋开颜 冤

渊 上接 336 页 冤

有的空白值非常高。甚至掩盖了样品的信号。所以本试验使用的无水乙醇。必须经过筛选。选择空白吸收低的试剂。

3.3 反应温度的选择

本试验曾考察了不同温度条件下反应产物的荧光强度值。发现在温度 80~90℃ 益。荧光强度最高。但荧光不稳定。方法精密度不好。改用 60℃ 反应 30min。表精密度和标准曲线线性良好。

参考文献院

咱暂 曲宏达, 佟丽, 沈剑刚. 补阳还五汤对体外培养的大鼠皮层神经元缺氧凋亡的影响. *咱暂第一军医大学学报*, 2002, 22(1):35-8.

Qu HD, Tong L, Shen JG, et al. Protective effect of Buyanghuanwu decoction (BYHWT) on cultured rat cortical neurons against hypoxia induced apoptosis. *咱暂 J First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2002, 22(1):35-8.

咱暂 佟丽, 曲宏达, 陈育尧, 等. 补阳还五汤对大鼠脑皮层神经元生长的影响. *咱暂第一军医大学学报*, 2002, 22(8): 711-2.

Tong L, Qu HD, Chen YY, et al. Effects of Buyanghuanwu decoction (BYHWT) on proliferation of cultured rat cortical neurons. *咱暂 First Mil Med Univ/Di Yi Jun Yi Da Xue Xue Bao*, 2002, 22(8):711-2.

咱暂 李连达, 何夏秋. 高效薄层扫描法测定中风脑脉通口服液中药黄芩甲甙的含量. *咱暂中国中药杂志 (Chin J Chin Mater Med)*, 1991, 16: 90-91.

咱暂 杨丙友, 于砚青, 张秀云, 等. 薄层扫描法测定利肝隆糖衣片中黄芩甲甙的含量. *咱暂中医药学报 (ACMP)*, 1995, 2: 44-5.

咱暂 王静竹, 阎汝南, 关莹, 等. HPLC 测定黄芪炮制品中黄芩甲甙含量. *咱暂中国中药杂志 (Chin J Chin Med)*, 1998, 23:84-5.

咱暂 刘养清, 杜鸣, 徐秉久. 大茴香酸-硫酸荧光体系测定黄芩甲甙. *咱暂药理学学报*, 2000, 35(7):544-6.

Liu YQ, Du M, Xu BJ. Determination of Astragaloside by the system 4-methoxybenzoic acid and sulphuric acid. *咱暂 Acta Pharm Sini*, 2000, 35(7):544-6.

责任编辑 陈望忠 冤