

苯酚硫酸法测定兔血浆羧甲基茯苓多糖含量

郭咸希,王 晖,阮 亮,邹 军,宋金春

(武汉大学人民医院药学部,430060)

[摘要] 目的 建立兔血浆羧甲基茯苓多糖浓度测定方法。方法 对兔血浆样品进行预处理,并用苯酚硫酸法测定羧甲基茯苓多糖的含量,测定波长为488.2 nm。结果 兔血浆羧甲基茯苓多糖血药浓度线性范围为2~64 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,回归方程为 $C = 76.667 6A + 0.850 8$, $r = 0.999 8$,回收率 $\geq 96.54\%$,日内精密度 $RSD \leq 1.56\%$,日间精密度 $RSD \leq 2.53\%$ 。结论 该方法操作简便,测定结果准确可靠,可用于羧甲基茯苓多糖的血药浓度测定。

[关键词] 羧甲基茯苓多糖;苯酚硫酸法;含量测定

[中图分类号] R286;R927.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-0781(2006)05-0402-02

羧甲基茯苓多糖(carboxymethylpachyman, CMP)系中药茯苓提取物茯苓多糖的结构修饰产物,研究表明,该药有多种药理活性,可抗肿瘤,还有增强和调节免疫、抗病毒、保肝等作用^[1-8]。其相关药理作用与其在体内的血药浓度有一定相关性,故建立血药浓度测定方法有较强的实际意义。

1 材料

1.1 仪器 UNIC UV-2800 紫外-可见分光光度计(上海尤尼柯公司),Metter Toledo 电子天平(型号:AG-254)。

1.2 药品 CMP 由武汉大学药学院提供,铝片、苯酚及硫酸(AR级)。

2 方法与结果

2.1 80%苯酚试剂的制备 取100.00 g苯酚,加0.10 g铝片(预先用稀硫酸处理)及0.05 g碳酸氢钠,经过蒸馏得到新鲜苯酚,避光保存。取20.00 g新鲜双重纯化水,加入80.00 g新蒸苯酚,混匀,置于棕色瓶中保存备用。

2.2 CMP溶液的制备 精确称量CMP 0.01 g,加入100 mL的容量瓶中,加纯化水至刻度,定容摇匀,配制成 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的CMP溶液,备用。

2.3 兔血样的预处理 将离心后得到的家兔血浆样本作如下处理:用50%的乙醇溶液醇洗一次,然后 $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min,然后再将乙醇洗的血浆样本上清液移出,置于56℃的恒温水中浴20~30 min,再 $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min,取上清液备用。

2.4 反应条件的确定 用移液管从上述已配制的CMP溶液中吸取6.4 mL置于100 mL的容量瓶中,得 $64 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的CMP溶液。

2.5 吸收图谱的绘制 精取上述 $64 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的CMP溶液2 mL,置于20 mL具塞试管中,分别加入80%苯酚溶液50 μL 和浓硫酸5 mL,摇匀,静置10 min,然后置于25~30℃水浴中保温20 min。以2 mL纯化水代替CMP溶液,同法所得为空白溶液。绘制在400~600 nm波长范围内的吸收曲线。结果CMP最大吸收波长为488.2 nm。

2.6 苯酚和硫酸用量的确定 精密量取 $64 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的CMP溶液2 mL数份,分别加入不同量的80%苯酚进行反应,同“2.5”项下进行操作,得苯酚最小加入量为50 μL 。同上述操作,分别加入不同量硫酸进行反应,得硫酸最小加入量为5 mL。

2.7 反应时间及稳定性 精取上述CMP溶液2 mL数份,同“2.5”项下方法操作,分别测定不同加热时间下样品的吸光度,得最佳反应时间为10 min。测定反应完成后样品不同时间的吸光度,得稳定时间为2 h。

2.8 标准曲线的绘制 用经过预处理的血浆分别配制成2,4,8,16,32,64 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,分别精密吸取2 mL,置于20 mL的具塞试管中,分别加入80%的苯酚溶液50 μL 及硫酸5 mL,摇匀,静置10 min,然后置于25~30℃水浴中20 min;用2 mL经过预处理的血浆做空白对照试验。分别于488.2 nm波长处测定吸光度,以CMP溶液的浓度C对吸光度A进行线性回归,得回归方程为: $C = 76.667 6A + 0.850 8$, $r = 0.999 8$ 。

2.9 回收率与精密度实验 按标准曲线制备项下操作,将浓度分别为2,16,64 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液在稳定时间内测定吸光度($n = 5$),并通过标准曲线计算其浓度,得平均吸光度值分别为0.036,0.212,0.818,回收率分别为96.54%,96.67%,98.01%,日内精密度分别为 $RSD = 1.56\%$, 1.34% , 0.98% 。由于样品吸光度稳定时间关系,日间精密度以不同日期($n = 5$)平行操作后测得,分别为 $RSD = 2.53\%$, 2.01% , 1.28% 。

3 讨论

本实验原理是多糖在强酸作用下水解生成单糖,并迅速脱水生成糠醛,再与苯酚缩合生成有紫外吸收的有色物质,实验用羧甲基茯苓多糖为实验室产品,其中含有的纤维素及具有糖类结构的化合物对测定结果可能有影响^[9]。另外,配制好的80%苯酚溶液必须避光保存,以防止氧化生成有色物质干扰测定。血样的处理要尽可能除去蛋白等杂质,以防杂质碳化变黑,不利于实验的进行。应控制反应时的发热量,在加入浓硫酸的时候,将试管放入冷水中,并且缓缓地贴壁加入浓硫酸,待温度稳定后再振荡摇匀。

[参考文献]

[1] 陈春霞,赵大明,张秀军,等. 羧甲基茯苓多糖的抗肿瘤实验[J]. 福建中医药,2002,33(3):38-40.
[2] 陈春霞. 羧甲基茯苓多糖的抗肿瘤活性与免疫效应[J]. 食用菌学报,2001,8(3):39-44.

[收稿日期] 2005-07-28 **[修回日期]** 2005-08-11

[作者简介] 郭咸希(1970-),男,湖北咸宁人,主管药师,博士,主要从事药动学研究。电话:027-88041911-8898, E-mail: hustgxx@sina.com。

- [3] 纪芳,李鹏飞,徐胜元,等. 甲基茯苓多糖的制备及体内抗肿瘤作用的实验研究[J]. 中国微生态学杂志,2003,15(6):333-334.
- [4] 徐琳本,肖梅英,樊湘红. 羧甲基茯苓多糖口服液的免疫作用及抗肿瘤作用研究[J]. 中成药,2000,22(3):222-224.
- [5] 陈春霞. 羧甲基茯苓多糖对小鼠免疫功能的影响[J]. 食用菌,2002,22(4):39-41.
- [6] 张信岳,杨根元,梁丽坚,等. 羧甲基茯苓多糖钠体外抗 I 型单纯疱疹病毒的作用[J]. 中药新药与临床药理,2003,14(3):161-163.
- [7] 陈春霞. 羧甲基茯苓多糖的保肝与催眠作用[J]. 食用菌,2003,23(增刊):46-47.
- [8] 杨吉成,盛伟华,张云,等. 羧甲基茯苓多糖对 HPBL 分泌 IL-2、TNF、IL-6、IFN- γ 的调节作用[J]. 中国免疫学杂志,1997,13(5):293-295.
- [9] 陈苹,陈桂良,陈从恒. 比色法测定羧甲基茯苓多糖的含量[J]. 中国中药杂志,1995,20(9):543-544.

荧光偏振免疫分析法与化学发光酶免疫法 测定人血浆茶碱浓度*

杨秀斐¹,余玉木²,徐克²

(1. 温州医学院药学院,325000;2. 浙江省温州市第二人民医院药剂科,325000)

[摘要] 目的 比较荧光偏振免疫分析法与化学发光酶免疫法测定茶碱血药浓度的结果,以指导临床合理用药。方法 用荧光偏振免疫分析法与化学发光酶免疫法平行测定 18 例老年慢性阻塞性肺疾病患者的茶碱血药浓度。结果 两种方法之间有良好的线性关系,比较线性回归方程为 $Y=0.8305X+0.8757$,相关系数 $r=0.9913$;144 例次茶碱血药浓度测定结果表明,荧光偏振免疫分析法比化学发光酶免疫法测得值低,平均低 $(1.81 \pm 0.62) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ($P < 0.05$),18 例患者茶碱药时数据经计算机拟合,均呈单室开放模型,两法所得药动学参数均差异无显著性。结论 两法均准确、灵敏、稳定,且均具特异性,但从经济学角度考虑,化学发光酶免疫法更适用于茶碱的临床血药浓度监测。

[关键词] 氨茶碱;荧光偏振免疫分析法;化学发光酶免疫法;药动学

[中图分类号] R971.9;R969

[文献标识码] A

[文章编号] 1004-0781(2006)05-0403-02

茶碱是临床常用的支气管扩张药,主要用于治疗急、慢性支气管哮喘,由于其安全和有效治疗范围较窄(成人安全血药浓度为 $5 \sim 20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,儿童安全血药浓度为 $6 \sim 12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),且其血药浓度个体差异较大,易产生心悸、心律失常、血压下降等不良反应甚至危及患者(尤其是儿童)的生命。目前国内茶碱的测定方法有荧光偏振免疫分析法(FPIA)、化学发光酶免疫法(CLEIA)、高效液相色谱法(HPLC)、紫外分光光度法(UV)、放射免疫法(RIA)、匀相酶标放大免疫法(EMIT)、克隆化酶供体免疫分析法(CEDIA)等,为保证安全有效地使用该药,临床需寻找一种准确、快速且简便的定量测定血药浓度的方法。文献[1]报道了对各测定方法的比较,但对 FPIA 与 CLEIA 法的比较笔者尚未见报道。笔者在本实验中采用以上两法平行测定茶碱血药浓度的结果,并对两种方法的药动学参数进行了比较。

1 材料与方

1.1 仪器 TDXFLX 荧光偏振免疫分析仪(美国雅培公司),ACCESS 粒子全自动化学发光酶免疫分析系统(美国贝克曼公司)。

1.2 试剂 茶碱缓释片(商品名:舒弗美,广东迈特兴华制药有限公司生产,规格:每片 0.1 g,批号:010802);茶碱荧光偏振免疫法(FPIA)检测试剂(美国雅培公司生产,批号:83836Q100);化学发光酶免疫法(CLEIA)茶碱检测试剂由美国贝克曼公司提供。

1.3 临床资料 诊断为慢性阻塞性肺疾病(COPD)的老年患者共 18 例,其中男 14 例,女 4 例,年龄 $63 \sim 90$ 岁,平均 (65 ± 12) 岁,经检查肝、肾功能正常,无烟、酒等不良嗜好或已戒烟、酒 > 2 a。

1.4 血样的采集 所有患者均口服茶碱缓释片,每次 0.1 g, qid,连用 3 d,第 4 天早晨服茶碱缓释片前(0 h)及服茶碱缓释片后 0.5,1,2,4,6,8,12 h 通过留置针采集静脉血各 1 mL,抽得的血样立即离心分离出血清, -20°C 保存待测,所得血清样本共 144 份。实验期间均进食普通饮食,禁饮(食)茶、咖啡、巧克力等饮料及一切已知对茶碱吸收代谢有影响的药物。

1.5 测定方法 化学发光酶免疫法采用微粒子固相免疫竞争法。原理:顺磁性铁固体颗粒外包被羊抗兔 IgG 与包被茶碱单克隆抗体结合后再与抗体标本中的茶碱或定量标记的碱性磷酸酶茶碱竞争,形成免疫复合物,用缓冲液洗掉未结合的标记物,再加碱性磷酸酶发光底物 Lumi-phos * 530,底物去磷酸化放出光,测定其放出的光子与标准比较定量^[2] [线性范围 $0 \sim 40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,最低检测浓度为 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,方法回收率 $(100 \pm 3)\%$,批间 RSD 为 4.34%,批内 RSD 为 3.70%]。荧光偏振免

[收稿日期] 2005-07-19 [修回日期] 2005-10-08

[基金项目] * 温州市科技发展计划立项课题(基金编号: S2001A10)

[作者简介] 杨秀斐(1969-),女,浙江温州人,副主任药师,学士,从事医院药学工作。电话:0577-88070181, E-mail: wzsleyxs@163.com。