

· 技术交流 ·

用胶束荧光法研究秦皮甲素 和乙素在兔体内脏的分布

庞志功 汪宝琪 张汉利

(西安医科大学药学院, 西安 710061)

秦皮甲素和秦皮乙素是木樨科白腊树树皮所含主要有效成分,具有抗炎抗菌抑制肿瘤和调节免疫的生理活性。文献中对秦皮甲素、乙素的测定和临床应用多有报道^[1~3],但对秦皮甲素、乙素在动物脏器的分布未见报道。本文在研究秦皮甲素、乙素的药代动力学之后,采用高灵敏的 β -环糊精(β -CD)单分子胶束荧光法对经预处理后的内脏样品进行测定,按文献^[4] β -CD具有中空圆锥形结构,在空腔外部及空腔两端开口处属于亲水区,在空腔内属于疏水区,这种特殊结构就形成了一个单分子胶束,当外界客体分子(Guest M)的直径与主体分子(Host M) β -CD空腔直径相当时,就可以嵌入腔内,由于腔内的疏水区微环境改变就可达到增溶作用。本文选用的秦皮甲素、秦皮乙素都是客体分子,都可以嵌入 β -CD空腔内形成包含物,利用 β -CD包含物的增溶增敏作用,达到测定微量和痕量药物的目的。本文设计的实验方案,秦皮甲素使用激光波长 λ_{ex} 为360 nm,发射波长 λ_{em} 为420 nm,可达到 3.78×10^{-10} g/ml的检出限,测得秦皮甲素在兔体内脏心、肝、肾、肺中的含量分别为0.1740,0.1744,0.1743,0.1274 μ g/g。秦皮乙素使用 λ_{ex} 为360 nm, λ_{em} 为470 nm,可达到 5.54×10^{-11} g/ml的检出限,测得秦皮乙素在兔体内脏心、肝、肾、肺中的含量分别为0.1234,0.1443,0.1430,0.0904 μ g/g。秦皮甲素平均回收率为91.2%($n=4$),秦皮乙素平均回收率为91.1%($n=4$)。

1 实验材料

1.1 仪器与试剂

930型荧光光度计(上海第三分析仪器厂);SK-1型旋涡振荡器(江苏国华仪器厂);XHF-1型匀浆机(上海光华电子仪器厂)。

秦皮 *Fraxinus rhynchophylla* Hance 由本院生药标本室提供,产于陕西,为长条状块片,厚3~6 mm,外表面灰棕色,具龟裂状沟纹。质坚硬,断面纤维性较强;其它质量指标符合中国药典要求;秦皮甲素、秦皮乙素标准品(中国药品生物制品检定所)。

乙醇,乙酸乙酯,氯仿,甲醇等均为分析纯。

1.2 动物

大耳白品系家兔(本校动物实验中心提供)。

2 实验方法

2.1 样品制备

称取秦皮粉末5 g,加水煎煮2次,每次30 min,放冷过滤,合并滤液,待用。取健康家兔3只,禁食24 h后开始灌胃,在兔体对药物进行24 h吸收代谢之后,处死动物,取出心、肝、肾、肺,用生理盐水冲洗3次,滤纸吸干后称重、剪碎,放入适量生理盐水中浸泡10 h,分别用匀浆机匀浆,离心(3000 r/min),得组织匀浆上清液。分别取上清液2 ml,加 Ca^{2+} 沉淀蛋白,再离心,将上清液用乙酸乙酯提取6次,合并提取液,于75℃水浴中挥干溶剂,取50 μ l乙醇溶解提取物后,再用微量注射器取25 μ l点于硅胶GF₂₅₄薄板上,并用标准品点样对照,用氯仿-甲醇-水(30:10:3)混合液为展开剂上行展开,待上行距达15 cm时,取出薄板,凉干展开剂,在254 nm紫外灯下观察荧光斑点,将与对照品 R_f 值相等(秦皮甲素 R_f 为0.33,秦皮乙素 R_f 为0.68)的样品斑点划圈标记(见图1),再刮下样品斑点置10 ml具塞离心管中,准确加入乙醇4 ml,热水浴中浸泡3 h,并不断振荡,静置离心,取2 ml上清液于10 ml量瓶中用水定容。

2.2 测定

分别取秦皮甲素、乙素 1 ml 定容于 10 ml 量瓶中,各加入 0.5% 的 β -CD 溶液 0.2 ml,再分别加入 pH 为 6.5 和 7.5 的硼砂盐酸缓冲液 1 ml,于快速混匀器上分别振荡 5 min 和 3 min 后,用水定容待测。

选用 λ_{ex} 为 360 nm, λ_{em} 为 420 nm 在 930 型荧光光度计上测定秦皮甲素的荧光强度;选用 λ_{ex} 为 360 nm, λ_{em} 为 470 nm 测定秦皮乙素的荧光强度 (I_F),并作随机工作曲线,分别求取主要脏器中秦皮甲素、秦皮乙素的含量。

3 测定结果

本文在平行条件下,测定了 3 只家兔服药 24 h 心、肝、肾、肺中秦皮甲素、秦皮乙素的含量,结果见

Tab 1. Content in rat viscera

Sample	Heart, $\mu\text{g/g}$	Average, $\mu\text{g/g}$	Liver, $\mu\text{g/g}$	Average, $\mu\text{g/g}$	Kidney, $\mu\text{g/g}$	Average, $\mu\text{g/g}$	Lung, $\mu\text{g/g}$	Average, $\mu\text{g/g}$
Aesculin	0.1896	0.1740	0.1662	0.1744	0.1732	0.1734	0.1359	0.1274
	0.1752		0.1723		0.1662		0.1170	
	0.1752		0.1846		0.1816		0.1293	
	0.1215		0.1319		0.1537		0.0922	
Aesculetin	0.1195	0.1234	0.1439	0.1443	0.1420	0.1430	0.0903	0.09042
	0.1293		0.1498		0.1322		0.0888	

4 讨论

4.1 激发波长(λ_{ex})和发射波长(λ_{em})的选择

经 RF-540 型荧光光度计扫描,本文选择秦皮甲素 λ_{ex} 360 nm, λ_{em} 420 nm;秦皮乙素 λ_{ex} 360 nm, λ_{em} 470 nm,加入 β -CD 后无红移紫移现象,见图 2。

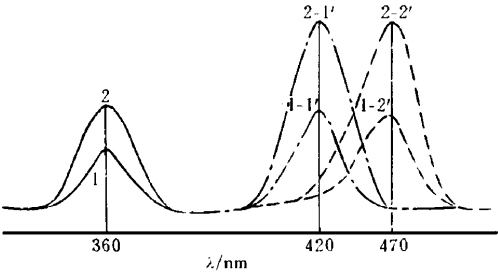


Fig 2. Fluorometry spectra

1. aesculetine (λ_{ex}); 2. aesculin, aesculetine + β -CD (λ_{ex}); 1-1', aesculin (λ_{em}); 2-1', aesculin + β -CD (λ_{em}); 1-2', aesculetine (λ_{em}); 2-2', aesculetine + β -CD (λ_{em})

表 1。

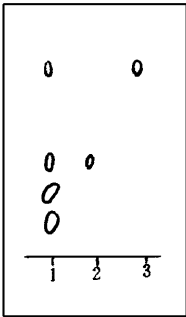


Fig 1. Thin layer chromatography
1. sample 2. aesculin 3. aesculetin

4.2 实验条件的选择

4.2.1 β -CD 用量选择 用 2×10^{-6} g/ml 秦皮甲素、秦皮乙素标准溶液 1 ml,分别加入不同体积的 β -CD 溶液,振荡后测定荧光强度。实验结果表明秦皮甲素、秦皮乙素加入 β -CD 0.2 ml 效果均最佳。

4.2.2 振荡时间的选择 分别取 2×10^{-6} g/ml 秦皮甲素、秦皮乙素标准溶液 1 ml,加入 β -CD 0.2 ml,分别振荡 1,3,5,10,15,25,30 min 后,按实验方法进行平行实验,测定结果见图 3。由图 3 可知秦皮甲素振荡 5 min 效果最佳,秦皮乙素振荡 3 min 效果最佳。

4.2.3 测定介质的选择 对柠檬酸-氢氧化钠,硼砂-盐酸,氨-氯化铵,碳酸氢钠-氢氧化钠,磷酸二氢钾-盐酸等不同缓冲系列进行实验,结果表明,秦皮甲素、秦皮乙素均用硼砂-盐酸作为介质为佳,其中秦皮甲素的 pH 值为 6.5,秦皮乙素的 pH 值为 7.3。

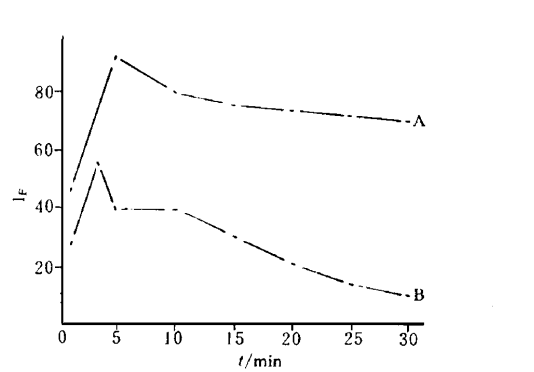


Fig 3. The relationship of fluorescent intensity between vi-

Tab 2. Linear range

Sample	Work curve order,g/ml	Regression equation	Correlation coefficient	Instrument sensitivity
Aesculin	10 ⁻⁶	$I_F=4.21C+9.12$	$r=0.9990$	2
	10 ⁻⁷	$I_F=1.40C+2.83$	$r=0.9980$	2
	10 ⁻⁸	$I_F=0.65C+5.6$	$r=0.9912$	2
Aesculetine	10 ⁻⁶	$I_F=1.04C+23.3$	$r=0.9900$	2
	10 ⁻⁷	$I_F=-1.63C+5.30$	$r=0.9985$	2
	10 ⁻⁸	$I_F=4.31C+19.6$	$r=0.9927$	3
	10 ⁻⁹	$I_F=-2.05C+10.75$	$r=0.9973$	3

Tab 3. Recovery test

Sample	Sample content, 10 ⁻⁷ g/g	Added amount of standard,10 ⁻⁷ g/ml	Determination value, 10 ⁻⁷ g/g	Recovery, %	Average recovery, %
Aesculin	1.662	1	2.598	93.6	91.2
	1.662	2	3.468	90.3	
	1.662	3	4.358	89.9	
	1.662	4	5.294	90.8	
Aesculetine	1.195	1	2.098	90.3	91.1
	1.195	2	3.015	91.0	
	1.195	3	3.984	93.0	
	1.195	4	4.798	90.1	

4.5 结果分析

秦皮甲素、秦皮乙素按其结构属于香豆素类具有生理活性的药物,按中医理论归肝、胆大肠经,虽具有清热燥湿之功效,而在内脏的分布与作者以往研究的生物碱略有不同,生物碱在心脏的分布与24 h后血药浓度比较低一个数量级,而秦皮甲素、乙素在心脏的分布(甲素、乙素分别为0.1740,0.1234 μg/g)与24 h后血药浓度比较同在一个数量级(甲素、乙素分别为0.612,0.297 μg/ml),因此用药时需注意药物在心脏的积累。

bration time A:aesculin; B:aesculetine
4.2.4 测定温度的选择 对秦皮甲素、秦皮乙素β-CD 包含物在不同温度下(15~50℃)测定荧光强度,结果表明,温度变化对荧光强度影响不大,故以室温为宜。

4.3 工作曲线

本文对秦皮甲素、秦皮乙素的线性范围进行了考察,其工作曲线的回归方程,相关系数见表2。

4.4 回收试验

于8支10 ml离心管中各加入1 ml兔肾匀浆离心上清液,然后再分别加入不同浓度的秦皮甲素或秦皮乙素标准溶液,按实验方法测得回收率见表3。

参 考 文 献

1 曾美怡,付桂兰,邬家林.秦皮中秦皮甲素和乙素的含量测定.中药通报,1987,7(1):26
2 郭希圣,章育中.秦皮中香豆素成分的薄层分离和光密度测定.药学学报,1983,18(6):446
3 Egan D.香豆素类化合物的药理代谢、分析及应用.国外医学·药学分册,1991,18(5):280
4 汪宝琪,庞志功,李生有.β-环糊精单分子胶束荧光法测定大黄素、大黄酚、大黄酸的含量.中国药科大学学报,1991,22(6):375