论著

文章编号:1000-5404(2006)16-1688-04

RP-HPLC 法测定小鼠血清及脏器中白藜芦醇浓度

王 莉[1],周 红[1],张三奇[2],文爱东[2],王婧雯[2],连佳芳[2] ([1]第三军医大学基础医学部药理学教研室,重庆 400038;[2]第四军医大学西京医院药剂科,西安 710032)

提 要:目的 建立可快速测定小鼠血清及部分脏器匀浆中白藜芦醇浓度的 RP-HPLC 法。**方法** 取血清或组织匀浆液 0.1 ml,加入 1.0 ml 乙醚提取两次,每次振荡,离心(6 400 r/min,10 min),取有机层在 40 ℃水浴中氮气流吹干,残渣用 100 μl 甲醇混悬溶解,取上清液 20 μl 进样。选用分析柱:Kromasil C_{18}(150 mm×416 mm,5 μm);流动相:甲醇:水(48:52);流速:1 ml/min;柱温:室温;柱压:12 kPa;检测波长:303 nm;进样体积:20 μl。**结果** 各工作曲线线性范围为 0.25~25 μg/ml,最低检测浓度为 100 ng/ml(S/N≥3)。各样品平均绝对回收率大于 88%,方法回收率在 96%~100%之间,日内和日间精密度的 RSD 均小于 10%。**结论** 此方法经济、可靠、简单、快速,可用于白藜芦醇血药浓度分析及动物体内分布研究。

关键词:反相高效液相色谱法;白藜芦醇;血清;组织匀浆

中图法分类号:R282.71;R284.1;R927.2 **文献标识码**:A

Rapid quantitation of resveratrol in mouse serum and tissue homogenates by RP-HPLC

WANG Li[1], ZHOU Hong[1], ZHANG San-qi[2], WEN Ai-dong[2], WANG Jing-wen[2], LIAN Jia-fang[2] ([1]Department of Pharmacology, College of Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Department of Pharmacy, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract: Objective To develop a rapid RP-HPLC method for quantitative determination of resveratrol in mouse serum and tissue homogenates. **Methods** Ten milliliter ethyl oxide was added into 0.1 ml serum or tissue homogenates, then the mixture was shaken and centrifuged at 6400 r/min for 10 min. The organic layer of mixture was dried under a stream of nitrogen at 40 ℃. The above operation was repeated for twice. The residue was reconstituted in 100 μl methanol and 20 μl supernatant was injected into the HPLC for analysis. HPLC analysis was performed using a Kromasil column (150 mm×416 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of two components: methanol and water with a volume ratio of 48:52. The flow-rate is 1 ml/min and the temperature of column is about 27 ℃. The column pressure is about 12 kPa and the determinative wavelength is 303 nm. **Results** All the curves were linear over a range from 0.25 μg/ml to 25 μg/ml. The minimal detectable drug concentration was 100 ng/ml (S/N≥3). The average extraction recovery rate of resveratrol was more than 88%. The methodological recovery rates of resveratrol ranged from 96% to 100%. The within-day and between-day precision was both less than 10%. **Conclusion** The assay is economical, simple, rapid and specific in detecting the resveratrol concentration in blood and other tissues.

Key words: RP-HPLC; resveratrol; serum; tissue homogenates

1940 年,Takaoka 首先从毛叶藜芦中分离出白藜芦醇,其化学结构为 3,5,4′-三羟基-二苯乙烯。它是一种天然活性成分,药理作用广泛,但是由于缺乏体内灵敏、特异、高效的检测方法,限制了其研究及临床应用。因此,建立一种简便、快速的样品前处理及相应的分析方法对于白藜芦醇的研究及临床应用十分必要。为此,本研究旨在建立一种 RP-HPLC 分析方法,用于分析动物血清及脏器组织匀浆中白藜芦醇浓度。

1 材料与方法

LC-10Avp 高效液相色谱仪;LC-10AT 恒流泵;SPD-10AV 紫外检测器;Class-VP510 色谱工作站(日本岛津);BP-190S 电子分析天平(德国赛多利斯);XW-80A 漩涡混合器(江苏海门市麒麟医用仪器厂);TG16-W 微量高速离心机(湖南仪器仪表总厂光华仪器厂);白藜芦醇(购自 Sigma 公司,含量:99.9%,批号:040801);其他试剂均为分析纯。

1.1 色谱条件

色谱柱:Kromasil C_{18} 柱(150 mm×416 mm, 5 μm);保护柱:

作者简介:王 莉(1979-),女,陕西省西安市人,硕士,药师,主要从事靶向给药方面的研究。电话:(029)83375475-8015

通讯作者:张三奇,电话:(029)83375475-8205

收稿日期:2005-08-24;修回日期:2006-05-09

大连伯瑞 C_{18} 柱(27 mm × 8 mm, 10 μm);流动相:甲醇∶水 = 48∶52;流速:1 ml/min;检测波长:303 nm;柱压:12 kPa;柱温:室温。

1.2　实验方法

1.2.1　白藜芦醇标准液的配制　　精密称取白藜芦醇 5.0 mg,置于 100 ml 容量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,配制成 50 μg/ml 的母液,冰箱 4 ℃贮存备用。

1.2.2　生物样品的处理　　取小鼠血清或脏器匀浆 0.1 ml,加入 1.0 ml 乙醚提取 2 次,每次振荡,离心(6 400 r/min, 10 min),取有机层在 40 ℃水浴中氮气流吹干。残渣用 100 μl 甲醇混悬溶解,上清液 20 μl 进样。

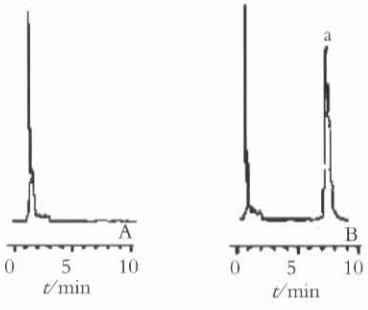
1.2.3　标准曲线的制作　　取空白血清或组织匀浆 0.1 ml,分别加入 0.1ml 根据母液稀释成浓度为 25.0、5.0、2.5、0.5、0.25 μg/ml 系列浓度标准液,按 1.2.2 方法处理生物样品,采用 HPLC 测定。以白藜芦醇峰面积(A)对浓度(C)进行线性回归,得血清和各组织匀浆的标准曲线。

1.2.4　小鼠体内白藜芦醇浓度测定　　按 150 mg/kg 小鼠尾静脉注射白藜芦醇溶液,于给药 5 min 后处死小鼠,取血清、肝、肾、肺、心、脾,按 1.2.2 方法处理生物样品,测定白藜芦醇浓度。

2　结果

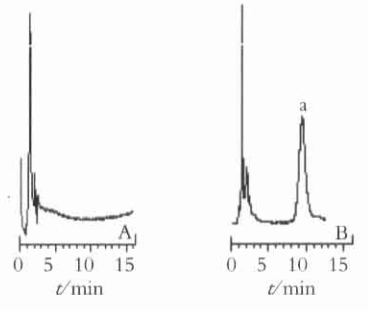
2.1　色谱行为

空白血清和组织匀浆对样品的测定均无干扰,血清及各脏器匀浆中白藜芦醇色谱图见图 1 ~ 6。



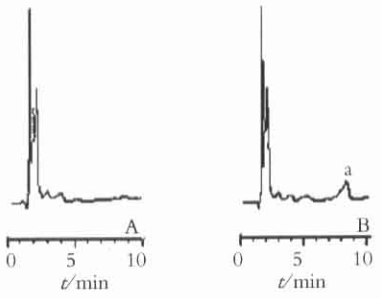
A: 空白血清;B: 内含白藜芦醇的血清样品. a: 白藜芦醇

图 1　血清中白藜芦醇色谱图



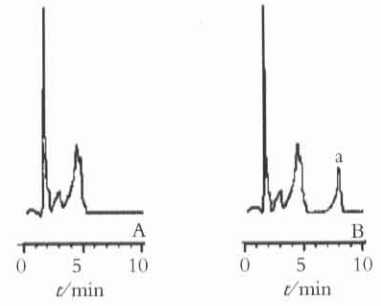
A: 空白肝匀浆;B: 内含白藜芦醇的肝匀浆样品. a: 白藜芦醇

图 2　肝匀浆中白藜芦醇色谱图



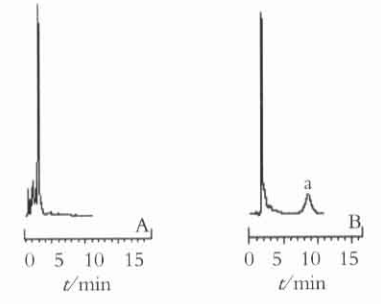
A: 空白脾匀浆;B: 内含白藜芦醇的脾匀浆样品. a: 白藜芦醇

图 3　脾匀浆中白藜芦醇色谱图



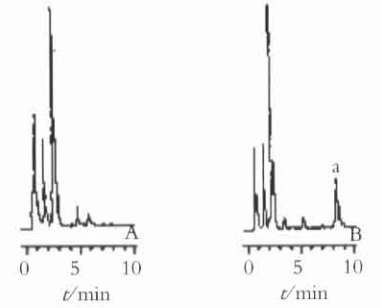
A: 空白心匀浆;B: 内含白藜芦醇的心匀浆样品. a: 白藜芦醇

图 4　心匀浆中白藜芦醇色谱图



A: 空白肾匀浆;B: 内含白藜芦醇的肾匀浆样品. a: 白藜芦醇

图 5　肾匀浆中白藜芦醇色谱图



A: 空白肺匀浆;B: 内含白藜芦醇的肺匀浆样品. a: 白藜芦醇

图 6　肺匀浆中白藜芦醇色谱图

2.2　回归方程和灵敏度

白藜芦醇在 0.25 ~ 25 μg/ml 范围内线性关系良好。回归方程分别为:血清:A = 18 870C + 1 014,2,r = 0.999;心匀浆:A = 17 608C + 2 354.7,r = 0.999;肝匀浆:A = 3 9048C − 34 615,

$r=0.998$；脾匀浆：$A=45\ 667C-25\ 810$，$r=0.997$；肾匀浆：$A=28\ 633C-16\ 199$，$r=0.994$；肺匀浆：$A=19\ 258C+11\ 024$，$r=0.997$。以 S/N≥3 计算，白藜芦醇最低检测浓度为 100 ng/ml。

2.3 提取回收率和方法回收率

以 0.1 ml 水代替血清和组织匀浆，按“1.2.3 标准曲线的制作”项下方法测定标准液的峰面积与样品处理后测得白藜芦醇的峰面积（As）。按公式 A/As × 100% 计算出提取回收率。根据标准曲线测得浓度与实际浓度之比即为方法回收率，结果见表1。

表1 白藜芦醇的提取回收率和方法回收率结果（$n=5$，%）

样品	浓度	提取回收率		方法回收率	
	(μg/ml)	平均回收率	RSD	平均回收率	RSD
血清	0.5	97.62±1.49	1.47	98.13±1.05	1.02
	5.0	98.84±2.76	2.73	99.25±1.95	1.78
	25.0	97.64±1.92	1.97	100.17±0.23	0.20
心	0.5	96.88±2.99	2.98	96.54±2.25	2.32
	5.0	99.25±0.49	0.47	99.62±1.88	1.85
	25.0	95.38±1.36	1.40	98.97±0.96	1.05
肝	0.5	98.67±2.01	2.07	96.15±1.93	1.99
	5.0	97.79±2.95	3.02	93.83±0.93	0.94
	25.0	98.14±2.28	2.31	100.13±1.55	1.39
脾	0.5	92.97±1.06	1.05	98.72±1.82	1.86
	5.0	95.38±1.94	2.02	93.51±2.01	2.07
	25.0	97.91±2.25	2.27	98.16±1.95	2.09
肾	0.5	97.29±1.79	1.75	94.52±1.91	2.03
	5.0	99.54±1.86	1.91	101.21±0.55	0.67
	25.0	95.28±1.48	1.53	97.46±1.94	1.81
肺	0.5	95.51±3.45	3.51	96.57±2.90	1.51
	5.0	99.38±2.98	2.99	97.14±2.95	2.04
	25.0	97.65±2.26	2.31	99.42±1.94	1.99

2.4 方法精密度

取空白血清和组织匀浆 0.1 ml 各5份，分别加入 0.5、5.0、25 μg/ml 的白藜芦醇标准液 0.1 ml，按“1.2.3 标准曲线的制备”项下方法处理和测定。1 d 内测定 5 次，计算日内 RSD；1 次/d 测定，连续 3 d，计算日间 RSD，结果见表2。

表2 方法精密度试验结果（$n=5$）

样品	浓度(μg/ml)	日内 RSD(%)	日间 RSD(%)
血清	0.5	4.7	5.6
	5.0	3.2	4.8
	25.0	1.9	3.6
心	0.5	5.1	8.3
	5.0	2.3	4.8
	25.0	1.6	3.7
肝	0.5	3.8	9.1
	5.0	2.9	6.7
	25.0	1.5	5.2
脾	0.5	7.2	9.0
	5.0	3.6	6.8
	25.0	2.1	5.2
肾	0.5	7.9	8.8
	5.0	2.8	7.2
	25.0	1.3	4.3
肺	0.5	8.0	9.2
	5.0	5.1	5.9
	25.0	3.3	2.6

2.5 小鼠体内样品浓度测定结果（$n=5$）

按 150 mg/kg 小鼠尾静脉注射白藜芦醇溶液，测定出血清、肝、肾、肺、心、脾中药物浓度分别为（44.22±1.68）、（17.56±1.97）、（12.72±1.48）、（22.48±1.23）、（18.41±1.17）、（21.63±1.45）μg/ml。

3 讨论

白藜芦醇是一种天然活性成分，药理作用广泛，主要包括：①抑制血小板聚集、预防心脏病发生；②调节血液中胆固醇的含量；③抗菌作用；④抗癌作用；⑤抗衰老作用；⑥植物雌激素样作用等。最新研究表明，白藜芦醇还能通过降低血清和肝脏的脂质，减少脂质过氧化物在体内的积累，降低 GPT，从而起到保护肝脏的作用。但是，目前研究表明：单纯应用白黎芦醇溶液治疗肝脏疾病效果较差。主要因为其肝脏分布少、体内代谢不稳定[1]等缺点所致，故临床应用受到很大限制。基于此，许多研究者试图利用多种载体将白藜芦醇靶向作用于肝脏，从而有效发挥其肝保护作用。但是由于缺乏白藜芦醇体内灵敏、特异、高效的检测方法，限制了其研究及临床应用。因此，本研究旨在建立一种 RP-HPLC 分析方法，用于分析动物血清及脏器组织匀浆中白藜芦醇浓度，为进一步的研究奠定技术基础。

不少药物体内靶向分布研究都采用同位素测定技术，原因主要在于该技术具有灵敏度高，生物样品处理简单，测定速度快，可对大批量样本同时进行测定等优点；但也存在测定结果重现性差，代谢物干扰，放射性污染等问题。本研究采用 RP-HPLC 法，建立的方法前处理简单，在所选色谱条件下，内源性物质与 RES 能得到很好的分离，不干扰样品测定，测定结果准确，重现性好，可避免由于放射性同位素的引入可能引入的同位素效应，导致与原药不同的体内分布。

文献[2]报道用甲醇：水（90∶10）为流动相，我们经过实验体会到，此流动相不能与杂质峰分开。经流动相配比选择后确认采取甲醇：水（48∶52），可获得较短的保留时间，同时又可与杂质峰分离。

关于检测波长，文献[3]分别报道了 280 nm，284 nm 等多种检测波长，本实验通过波长扫描显示白藜芦醇在 303 nm 处有最大吸收峰，且干扰最小。

文献[4]利用固相萃取的方法来处理生物样品，最低定量浓度为 10 ng/ml。但药物体内分布研究所需生物样品数量很多，使用固相萃取柱花费较大，耗时较长，故不宜应用；文献[5]报道采用甲醇沉淀蛋白，离心，上清液进样分析，我们经过实验发现，此法分离的上清液放置 24 h，有大量蛋白沉淀。上清液多次进样

后，柱压不稳定，不能完全地除去蛋白。通过预实验，我们分别用乙醚、乙酸乙酯、二氯甲烷、乙腈作为萃取溶剂，结果乙醚作溶剂萃取血清和各组织的白藜芦醇有较高的提取回收率，反复多次进样柱压也无明显上升，因此本研究采用乙醚萃取法。本研究建立的方法最低定量浓度为0.25 μg/ml，在小鼠给药12 h后仍可测到其组织中浓度，满足了小鼠体内靶向分布研究的要求，不失为一种经济、可靠、简单、快速的方法。

参考文献：

[1] KIMURA Y, OHMINAMI H, OKUDA H, *et al*. Effects of stilbene components of roots of Polygonum ssp. on liver injury in peroxidized oil-fed rats[J]. Planta Med, 1983, 49(1): 51-54.

[2] BARBERI-HEYOB M, MERLIN J L, WEBER B. Determination of 5-fluorouracil and its main metabolites in plasma by high-performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr, 1992, 573(2): 247-252.

[3] JUNG M, BERGER G, POHLEN U, *et al*. Simultaneous determination of 5-fluorouracil and its active metabolites in serum and tissue by high-performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 1997, 702(1-2): 193-202.

[4] HOETELMANS R M, PROFIJT M, MENNHORST P L, *et al*. Quantitative determination of (-)-2′-deoxy-3′-thiacytidine (lamivudine) in human plasma, saliva and cerebrospinal fluid by high-performance liquid chromatography with ultraviolet detection[J]. J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 1998, 713(2): 387-394.

[5] 薛克昌，张三奇，顾 宜，等. 十六酸拉米夫定酯固体脂质纳米粒的肝靶向研究[J]. 解放军药学学报，2004，20(1)：1-4.

（编辑 王 红）

文章编号：1000-5404(2006)16-1691-01

个案与短篇

烤瓷牙临时冠边缘处理

杨彦春 （第三军医大学西南医院口腔科，重庆 400038）

随着金属烤瓷牙技术的不断进步和完善，其在临床的应用越来越广泛。在制作过程中，在对基牙进行预备后常规需要制作临时冠[1]。这既是为了保护牙髓，也是为了满足临床上患者对美观的要求。但制作不当的临时冠却常常引起牙龈红肿发炎甚至牙龈退缩等不良后果，严重影响烤瓷牙的修复效果，其关键问题在于临时冠边缘处理不恰当[2]。本科室在临床实践中对于临时冠边缘处理积累了一定的经验，取得了较好的治疗效果。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集我科室近期40例烤瓷牙修复病例，且全部进行了临时冠修复。其中男性24例，女性16例，平均年龄34岁。共制作50个临时冠，其中前牙31个，后牙19个。

1.2 材料

弹性印模材，成品牙片，自凝塑料，氧化锌粘固粉。

1.3 方法

牙体预备后，常规制备印模，灌制石膏模型并涂分离剂，将成品牙片比照模型调磨合适，以单体将其溶涨备用。同时调拌自凝塑料至丝状期，注意液粉比例，防止过多的游离单体析出刺激牙龈。将调拌好的单体放置于基牙及缺失部位，并将预备好的牙片放置于相应的牙位上，以雕刻刀小心修正外形，并尽量将边缘修薄。完全凝固后取下临时冠，常规调磨，抛光，然后以细金钢砂石将临时冠颈边缘修整为刃状边缘，使颈边缘与龈缘保持0-0.5 mm距离。

2 结果

临时冠戴用时间最短为5 d，最常约6周。只有3个(6%)出现牙龈红肿，其中没有1例出现牙龈退缩，其余效果均满意。

3 讨论

临时冠在保护牙髓神经，防止基牙移位，恢复美观等方面起到了重要作用，为烤瓷牙的永久修复打下了良好的基础。所以临时冠的制作具有较为重要的意义。

我科室在临时冠制作中发现将其颈边缘处理为刃状边缘，并将其尽量抛光细致并使其与龈缘间距离保持在0-0.5 mm之间可以有效的防止牙龈出现红肿退缩等不良反应。同时，在制作过程中要注意自凝塑料的粉液比例。制作精细，边缘处理良好的临时冠可以在恢复美观，保护牙髓等方面起到良好的效果，并且我们所采用的方法操作简单，效果更为满意。

关键词：烤瓷牙；临时冠
中图法分类号：R783.6 文献标识码：B

参考文献：

[1] 张 翠，陈明艳，张国华. 烤瓷牙临时冠两种制作方法比较[J]. 山东医药，2005，45(9)：57.

[2] 方 晓，王锋君. 烤瓷修复体引起牙龈炎临床初步分析[J]. 口腔颌面修复学杂志，2005，6(2)：99-100.

（编辑 栾 嘉）

作者简介：杨彦春(1974-)，男，河北省保定市人，硕士，主治医师，主要从事口腔颌面部缺损的修复及整形方面的研究。电话：1023-68754406

收稿日期：2005-10-18；修回日期：2005-12-11