

1. 标准曲线的制备: 精密称取注射用盐酸阿糖胞苷约0.5g, 置25ml量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 按中国药典法测其含量后, 备用。精密量取1.0、2.0、3.0、

4.0、5.0、6.0ml分别置25ml量瓶中, 用水稀释至刻度, 置2dm测定管中, 依法分别测定旋光度, 结果见表1。

表1 浓度与旋光度的关系

浓度 (mg/ml)	0.776	1.552	2.382	3.104	3.880	4.656
旋光度 (α)	0.202	0.398	0.602	0.800	1.020	1.195

其回归方程: $C = 3.8619\alpha - 0.0017$
 $r = 0.9997$

加入其他赋形剂, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 置2dm测定管中, 依法测定旋光度, 代入回归方程, 计算其含量及回收率, 结果见表2。

2. 回收试验: 精密称取盐酸阿糖胞苷约50mg 5份, 分别置25ml量瓶中, 按处方

表2 回收试验结果

序号	投入量 (mg/ml)	收得量 (mg/ml)	回收率 (%)
1	1.94	1.96	101.03
2	1.94	1.93	99.48
3	1.98	1.96	98.99
4	2.00	2.01	100.50
5	1.97	1.96	99.49
$\bar{X} \pm SD$			99.60 \pm 0.58%
CV			0.58%

3. 样品测定: 取盐酸阿糖胞苷滴眼液适量, 置2dm测定管中, 依法测定旋光度, 代入回归方程, 计算其含量即可。

的含量, 简便快速, 结果准确, 符合基层医院快速检验的要求。

小 结

2. 温度对盐酸阿糖胞苷的旋光度略有影响, 故测定时应调节溶液温度至20℃。

1. 用旋光法测定盐酸阿糖胞苷滴眼液

放射受体法测定人尿中东莨菪碱浓度

梁秉文 陆瑜 季爱民*

我们于1987年利用国产膜材研制成功了东莨菪碱经皮治疗系统 (TTSS), 通过了

部级鉴定即将批准投产, 为了确保用药安全有效, 又进一步研究了监测东莨菪碱尿药浓度的方法, 根据文献报道的RRA (Radio

* 第二军医大学药学院84级实习生

receptor Assay) 方法测定东莨菪碱血药或尿药浓度, $[^3\text{H}]-\text{QNB}$ (tritiated guinclidinyl benzylate), 从M胆碱受体中定量取代东莨菪碱从而达到了测定目的, 利用我们实验室的条件, 建立了自己的RRA方法。做了标准尿药曲线, 测试了该方法的日内、日间误差, 并实测了东莨菪碱透皮给药后人尿药浓度, 初步证明了该方法是可行的。

当前由于国内缺少合适的测定体液中低浓度东莨菪碱及其它作用于副交感神经药物的方法, 这样人们服药后就很难获得这些药物的动力学数据, 现有的几种方法都不能达到迅速、灵敏地测定低浓度药物的要求。GC或酸性染料法, 测定的灵敏度亦达不到。而GC-MS方法又是非专一性的且牵涉到繁琐的提取步骤。 $[^3\text{H}]-\text{QNB}$ 与M受体有较强的结合力, 用它作为放射配基来研究药物与M胆碱受体的竞争抑制反应, 因而产生了用放射配基法, 测定TTSS尿中非常低的东莨菪碱浓度的方法。

一、仪器、材料、试剂

岛津120分光光度计 日本
Beckman Ls9800液体闪烁测定仪, Beckman公司, Beckman ultracentrifuge L 8—M超速冷冻离心机 Beckman公司
XHF高速匀浆机 上海兴华仪器厂
电热恒温水浴锅 江苏省南通通海电器厂
多用振荡器 北京冰箱电机厂
真空滤器 南京大学玻璃房制
49—型玻璃纤维滤膜 上海试纸厂
5 μl 、50 μl 、100 μl 微量进样器 上海求精仪器厂
 $[^3\text{H}]-\text{QNB}$ Amershan Laboratories
Buckinghamshire England
比放强度43.3ci/mmol
氢溴酸东莨菪碱(A、R) 北京药品生物制品
检定所
磷酸二氢钾 南京化学试剂厂

磷酸氢二钠 南京化学试剂厂
酚试剂甲、乙 空军南京医院制
L-酪氨酸 上海康达氨基酸厂
2.5—二苯基恶唑 (PPO) 上海试剂一厂
1.4—双—[5—苯基恶唑基—2]苯
(POPOP) 上海试剂一厂
硫酸铜 (A、R) 南京化学试剂厂

二、实验方法

1. M受体制备: SD大白鼠♀, 断头取大脑称重后, 按1:9 (W/V) 加入冰冷0.32M蔗糖溶液, 先用玻璃匀浆器冰浴下手动匀浆1 min再用高速匀浆机 (16.000q-m) $30'' \times 2$, 中间停1分钟, 再在超速冷冻离心机上 $500 \times g$ 10 min离心弃沉淀, 取上清液再 $14,000 \times g$ 20 min离心, 沉淀加入5倍原大脑重 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{PO}_4^{3-}$ 缓冲液手动匀浆1 min制成悬液, 按Lowry's改良方法测定蛋白质含量, pH7.4的 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{PO}_4^{3-}$ 缓冲液稀释至2 mg/ml, 分装于塑料安瓿中, 置低温冰箱中保存备用, 使用时取出室温融化, 6小时内保持活性, 受体蛋白的提制应在4℃以下完成。

2. 放射配体结合分析实验: 加入放射配体 $[^3\text{H}]-\text{QNB}$ 使成0.1nm (44.3ci/mmol), 50 μl 尿样 (或空白尿+标准东莨菪碱溶液) 100 μl 受体溶液, 加缓冲液至终体积为1 ml, 非特异性结合管中加入 $2 \times 10^{-5}\text{M}$ 阿托品溶液0.10ml, 总结合管中不加, 在37℃孵育一定时间后, 加入3 ml冰冷缓冲液终止反应, 立即滴加至玻璃纤维滤膜上, 5—10℃下负压抽滤, 3 ml冰冷缓冲液洗涤二次, 以除去游离的 $[^3\text{H}]-\text{QNB}$, 滤纸在90℃下烘一段时间后, 移至10ml液闪瓶中, 加入液闪剂A (PPO: 3g; POPOP: 0.3g, 二甲苯1000ml) 暗适应至少8 hr以减少化学发光。Beckman LS—9800液闪仪计数CPM (计数效率约为60%), 特异性结合

= 总结合 - 非特异性结合, 结合反应均设复管处理, 并重复二次。

3. 受试者贴片给药及取尿样测定: 两受试者, 男、22—23岁, 健康, 自愿参试。贴用TTSS前12小时内取原尿(空白尿)。贴用后收集尿液, 每隔8小时取样并测量体积, 共收集到112小时。按上法测定计数, 由各自标准曲线求算尿中游离东莨菪碱药物浓度。

三、结果与讨论

1. 线性范围

在我们选择的实验条件下, 东莨菪碱浓度在 $2.5 \times 10^{-12} \text{M} \sim 9.0 \times 10^{-11} \text{M}$ 范围内和 $[^3\text{H}]-\text{QNB}$ 的抑制性按 $\log \sim \text{logit}$ 关系处理成线性。各样品管中加入 $50 \mu\text{l}$ 空白尿后测得结果见图1, 相关系数 $r = -0.9959$, $\text{IC}_{50} = 17.78 \text{ng/ml}$ 。

2. 重现性

为了测试放射配基结合实验的重现性, 空白尿中分别含有6.84、12.21、20.08、34.19 ng/ml 的东莨菪碱的溶液在同一天和

不同天中按实验部分步骤重复进行测定, 由结果表明, 该方法有较好的重现性。

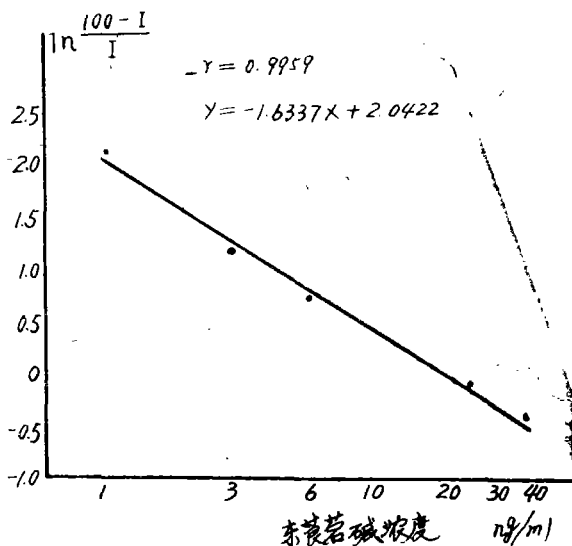
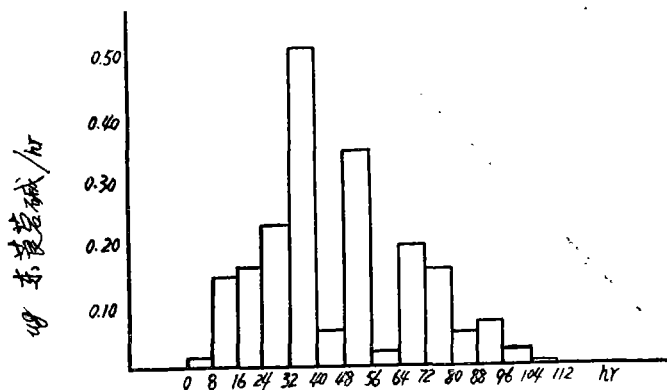


图1 标准曲线 东莨菪碱浓度 ng/ml

3. 游离东莨菪碱尿排泄速率

东莨菪碱经皮给药后72小时用放射配基结合实验测得分泌于尿中游离型东莨菪碱平均为 196.49ng/hr , 接近国外报道数值, 112小时测得的尿排曲线见图2)。



4. 灵敏度

此方法的灵敏度达到 1.2ng/ml 仅次于 GC-MS 联用方法, 且有操作简单、迅速、不需要提取步骤等优点, 而 GC-MS 有以下缺点: 检测时需要合成内标物, 需要复杂及耗时的提取步骤, 且在这种情况下东莨菪碱

易水解, 水解产物影响检测峰, 而这些代谢产物在放射配基结合实验中不影响测定。

放射配基结合实验法主要是生化上用来研究药物与受体间相互反应的, 国外有报道用该方法测定激素、神经递质及其在体液中药物浓度, 用该方法测定阿托品的浓度是较

经典的。

用放射配体结合法测定东莨菪碱经皮给药后尿药浓度国内尚未见报道。由于该法操作简单,测定体液中浓度不需要提取步骤,

灵敏度高,有较好的重现性,这给东莨菪碱经皮给药系统(TTSS)的临床应用带来了广阔的前景。有关这方面的研究我们正在进行。

应用逆流色谱/热喷式质谱联用分析天然产物

[Y.-W.Lee等, J Liq. Chromatogra 1988,11 (1): 153]

陈海生摘译 蔡定国校

一种新近发展起来的分析用高速行星式离心逆流色谱仪与质谱仪连接、提供了一种新的分析方法,这种逆流色谱/质谱联用(CCC/MS)法汲取了逆流色谱具适用范围广,分辨力高和质谱仪检测灵敏度高的优点。作者应用此技术成功地分离并鉴定了蔓性长春花(Vinca minor L.)中的生物碱长春花胺(Vincamine)和甲氧基长春花胺(Vincine)。

试剂

二相溶剂系统用正己烷:乙醇:水=6:5:5(V/V),二相溶剂置分液漏斗中,在室温充分混合平衡,然后用5 μ m过滤器过滤排气。

分析型高速逆流色谱仪

该仪器配有一个缠绕多圈PTFE(内径0.85mm)的柱,半径5cm,转速2000rpm,用Waters 6000A HPLC泵输送流动相,一台ISCO Model 1840可变波长紫外一可见吸收检测仪。柱子首先注满固定相(上相),而后在转速1500rpm状态下,泵入流动相(下相),当流出的流动相澄清后注入样品溶液。

热喷射逆流色谱/质谱(CCC/MS)

从逆流色谱流出的液体(0.8ml/min)通过一个无死体积的T形管导入waters 6000A泵, T形管配备一个贮液器。为了达

到热喷所需溶剂的压力, waters泵是必需的。又因为逆流色谱流速有变化,热喷用的waters泵调节流速0.7ml/min,配备一个贮液器以提供额外溶剂或排出逆流色谱系统过多的溶剂。自waters泵流出的液体与0.3M醋酸铵(0.3ml/min)同轴混合以便为离子汽化电离提供挥发缓冲作用。这个溶剂系统总流量1ml/min,通过一个uv检测仪(280nm),然后进入热喷接口。热喷接口(Vestec, Houston, TX)安装在Finnigan 4500型四极质谱仪上,接口包括一个温度控制器和数字显示器。为了分析生物碱,用离子汽化电离时,使用正负离子检测或用化学电离(CI)时采用一根金属丝。给予金属丝的电压1000V,发射电流0.15mA。质谱仪扫描从m/2180到m/2600/2秒。四极质量每天用聚丙烯乙二醇(A MW 1000)校正。

结果

在热喷质谱图上,长春胺(Vincamine MW354)显示一个质子化的分子离子峰m/Z 355[M+H]⁺亦观察到碎片离子m/237[M+H-H₂O]⁺。甲氧基长春胺(Vincine MW384)的热喷质谱图上也显示一个质子化分子离子峰m/Z 385[M+H]⁺和碎片离子m/Z 367[M+H-H₂O]⁺,在负离子检测记录质谱上、二个化合物的离