

四、讨论

1. 微量微生物法监测丁胺卡那霉素的血药浓度, 实验条件简便, 实验费用较低, 操作程序简单, 取血量少, 病人易接受, 对样品不需作繁琐处理。

2. 此方法与其它化学方法有良好的相关性, 回收率和重复实验表明, 日内、日间误

差均小于 5%, 重现性好, 能满足设备简陋的中小医院的常规抗生素血药浓度的监测。

3. 10 例患者的血药浓度均达峰值, 谷峰浓度均小于 $3\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

参考文献

[1] 陈刚主编. 治疗药物监测理论与实践. 北京: 人民军医出版社, 1988: 167~70

荧光分光光度法控制鬼臼毒素脂质体的质量

马守栋 李国锋* 陈志良* 许重远*

(解放军第 91 医院 山东兖州 272000)

摘要 本文以荧光分光光度法分别测定了脂质体液中鬼臼毒素总含量、未包入脂质体内的游离鬼臼毒素含量, 及脂质体的包封率。最大激发波长 290nm, 发射波长 633nm, 线性范围 $28.03 \sim 448.40\mu\text{g}/\text{L}$ ($r = 0.9997$), 回收率在 99% 以上。本法灵敏度高, 专属性强, 结果准确。

关键词 荧光分光光度法; 鬼臼毒素脂质体; 质量控制

尖锐湿疣的发病率逐年升高, 鬼臼毒素 (Podophyllotoxin) 霜、酊剂是目前治疗该病的一线药物, 由于透皮性差, 疗效欠佳^[1]。根据脂质体易透过皮肤的特性, 作者制备了鬼臼毒素脂质体(另文发表)。有关其含量测定方法, 已报道的有紫外分光光度法^[2]、薄层扫描法^[3]、HPLC 法^[4]等, 但用荧光分光光度法, 国内尚未见报道。在证实其具荧光特性的基础上, 作者以荧光分光光度法控制鬼臼毒素脂质体的质量, 取得了满意的结果, 现报道如下:

一、仪器与试剂

日立 3000 荧光分光光度计: 日本; 鬼臼毒素对照品: 中国医科院药物研究所; 脂质体: 以逆相蒸发法^[5]制备; 卵磷脂: 上海禽蛋二厂; 胆固醇: 上海长城生化药厂; sephadex-50 葡聚糖凝胶: 瑞典; pH7.0 磷酸盐缓冲液 (PBS): 按《中国药典》90 版方法配制; 乙

醇: AR 级, 安徽特级酒精总厂。

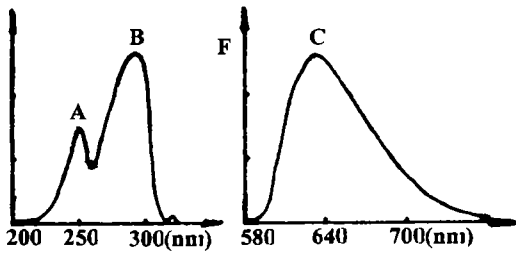
二、实验方法与结果

(一) 光谱测定 精密称取 105℃ 干燥至恒重的鬼臼毒素对照品适量, 以乙醇溶解并稀释成 $56.05\text{mg}/\text{L}$ 的贮备液, 备用。精密量取贮备液适量, 以乙醇稀释成适当浓度的溶液, 置荧光分光光度计上扫描 (仪器条件: 激发、发射狭缝均为 10nm, 灵敏度中档, 温度 $25 \pm 1^\circ\text{C}$), 得鬼臼毒素的最大激发波长为 290nm、250nm, 最大发射波长 633nm (见附图)。因以 290nm 作为激发光源测得的荧光强度较大, 故选择该波长为测定用激发波长。

取卵磷脂、胆固醇适量, 均以热乙醇溶解, 冷至室温, 分别稀释成适当浓度的溶液。相同条件下, 以 290nm 激发光分别扫描卵磷脂、胆固醇乙醇溶液及二者混合液的发射光谱, 结果三者均在 580nm 处有一峰。

由此可知, 以 290nm 为激发光波长、633nm 为发射光波长测定鬼臼毒素的含量, 供试液中的成膜材料卵磷脂及胆固醇均不产

* 第一军医大学南方医院



附图 鬼白毒素的激发光谱(A、B)和发射光谱(C)

生干扰。

(二)线性关系考察 精密量取鬼白毒素贮备液0.5ml于10ml量瓶中,以乙醇稀释至

刻度。分别精密量取0.1、0.2、0.4、0.8、1.6ml于10ml量瓶中,均以乙醇稀释至刻度。以乙醇为空白,分别测定各浓度对照品液的相对荧光强度(F),以浓度C($\mu\text{g/L}$)对F回归,得回归方程为: $F = 1.22C + 5.08$, $r = 0.9997$ 。

(三)回收率试验 精密量取已测知含量的脂质体适量,数份,分别加入适当浓度的鬼白毒素对照品液适量,混匀,按“二·(七)·2”、“二·(七)·3”项下方法分别制备相应的供试液,按“二·(八)”项下方法测定其中鬼白毒素含量,分别计算鬼白毒素经凝胶柱过滤后的回收率,及经乙醇提取等处理后的回收率。结果见表1。

表1 回收率试验结果(n=5)

| 加入量($\mu\text{g/l}$) | 测得量 \pm SD($\mu\text{g/l}$) | | 回收率 \pm RSD(%) | |
|------------------------|---------------------------------|-------------------|------------------|------------------|
| | 凝胶柱过滤 | 乙醇提取 | 凝胶柱过滤 | 乙醇提取 |
| 56.05 | 55.51 \pm 0.29 | 55.62 \pm 0.26 | 99.04 \pm 0.52 | 99.23 \pm 0.47 |
| 84.08 | 83.34 \pm 0.43 | 83.50 \pm 0.39 | 99.12 \pm 0.51 | 99.31 \pm 0.43 |
| 112.10 | 111.16 \pm 0.54 | 110.35 \pm 0.55 | 99.16 \pm 0.48 | 99.27 \pm 0.50 |
| 平均回收率 | | | 99.1 | 99.3 |

(四)精密度试验 同一条件下,连续测定适当浓度对照品液的F值,结果其RSD为0.28%(n=7)。

(五)稳定性试验 将“二·(七)”项下2种供试液(S_1 、 S_2)室温放置1、3、6、12、24、48h时,分别测定其F值,结果 S_1 、 S_2 的RSD分别为0.38%、0.41%(n=6)。见表2。

表2 稳定性试验结果

| 放置时间 t (h) | F 值 | | RSD(%) | |
|------------|--------|--------|--------|-------|
| | S_1 | S_2 | S_1 | S_2 |
| 1 | 326.90 | 209.61 | | |
| 3 | 326.24 | 208.85 | | |
| 6 | 325.03 | 208.01 | 0.38 | 0.41 |
| 12 | 325.31 | 208.12 | | |
| 24 | 324.81 | 207.81 | | |
| 48 | 323.34 | 207.15 | | |

(六)激发光照射试验 将适当浓度对照品液于290nm激发光照射下进行时间扫描,间隔一定时间测定其F值。结果该液在

633nm处的F值33min内未变。

(七)供试液的制备

1. 脂质体凝胶柱分离试验 取充分溶胀的葡聚糖凝胶适量,按文献法^[6]制备凝胶柱($\phi 12\text{mm} \times 100\text{mm}$)。精密量取脂质体液0.5ml于注顶,以PBS洗脱,流速1.0ml/min,每份收集2ml,均以荧光分光光度计检测,以确定游离鬼白毒素所在的流分。结果共收得18个流分,游离鬼白毒素出现在第9~16流分之间的16ml洗脱液中。

2. 测定脂质体液中鬼白毒素总量的供试液(S_1) 精密量取脂质体液0.5ml于蒸发皿内,水浴蒸干,以热乙醇将残留物定量移入50ml量瓶中,待冷至室温,补加乙醇至刻度,摇匀,过滤,弃去初滤液,精密量取续滤液0.2ml于10ml量瓶中,以乙醇稀释至刻度,即得 S_1 。

3. 测定游离鬼白毒素含量的供试液

(S₂) 精密量取脂质体液 0.5ml, 按“二·(七)·1”项下确立的条件进行凝胶柱分离, 准确收集游离鬼臼毒素部分于 25ml 量瓶中, 以水稀释至刻度。精密量取 4ml 于蒸发皿内, 以下按“二·(七)·2”项下自“水浴蒸干”起操作, 即得 S₂。

(八) 样品测定 取 3 批脂质体, 按“二·(七)”项下方法制备供试液。以乙醇为空白, 适当浓度对照品液为校正, 分别测定供试液的 F 值, 代入方程并按稀释倍数计算脂质体液中总鬼臼毒素含量 C₁ 及游离鬼臼毒素含量 C₂。(C₁ - C₂) 即为包入脂质体内的鬼臼毒素含量 C₃, (C₃/C₁ × 100%) 即为脂质体的包封率。结果见表 3。

表 3 样品测定结果

| 批号 | C ₁ (μg/l) | C ₂ (μg/l) | 包封率(%) |
|--------|-----------------------|-----------------------|--------|
| 960311 | 263.11 | 208.33 | 20.8 |
| 960412 | 264.23 | 208.48 | 21.1 |
| 960421 | 264.87 | 207.66 | 21.6 |

注: 表中数据为 3 次测定平均值

三、讨论

1. 实验初期, 曾先后试用紫外分光光度法、HPLC 法测定鬼臼毒素脂质体的含量, 各因成膜材料干扰鬼臼毒素的紫外吸收、粘性较大的卵磷脂较难从色谱柱上洗脱, 使 2 种方法均未获成功。后来, 在发现鬼臼毒素具

荧光特性的基础上, 采用荧光分光光度法测定, 成膜材料对测定无干扰, 可直接对供试液进行测定, 操作简便, 灵敏度高, 结果准确。

2. 根据脂质体粒子与鬼臼毒素分子悬殊的大小差异, 采用葡聚糖凝胶过滤法, 将脂质体液中包入脂质体内的鬼臼毒素与游离鬼臼毒素(指未包入脂质体内)分离, 以便分别求出二者的含量。

实验中发现少数粒径较大的脂质体难以从凝胶柱上洗脱, 若直接测定包入脂质体内的鬼臼毒素含量, 结果会偏低, 故本文在测出游离鬼臼毒素含量及鬼臼毒素总含量的基础上, 换算出包入脂质体内鬼臼毒素的含量及脂质体的包封率, 从而较全面地控制了该制剂的质量。

参考文献

[1] 徐文严. 尖锐湿疣的治疗进展. 国外医学皮肤病学分册, 1992;18(1):6~9
 [2] 董晓萍等. 川产八角莲中鬼臼毒素的分离鉴定及含量测定. 天然产物研究与开发, 1994;6(2):17~20
 [3] 贾忠建等. 薄层扫描法测定桃儿七中鬼臼毒素的含量. 中草药, 1988;19(7):13
 [4] 白亚民等. 桃儿七中鬼臼毒素的 HPLC 法分离与含量测定. 中药通报, 1988;13(5):295~7
 [5] 袁继民主编. 现代药物制剂技术. 济南: 济南出版社, 1992:273
 [6] 杨文澜主编. 色谱及有关方法的实验室手册. 北京: 机械工业出版社, 1985:183

(上接第 334 页)

[1] 邓思清, 贺俊云. 诺氟沙星葡萄糖注射液. 中国医院药学杂志, 1992;12(4):188
 [2] 张华如. 0.5% 氟哌酸滴眼液的制备及应用. 北京临床药学, 1994;7(3):40
 [3] 刘莉, 杨杰, 葛卫红. 诺氟沙星滴耳剂的研制及临床应用. 药学情报通讯, 1992;10(4):36
 [4] 杜育云, 马文秀, 彭永富等. 氟哌酸耳用滴丸的研制及临床观察. 中国药学杂志, 1994;29(4):217
 [5] 朱正来, 金保兴, 李军. 复方氟哌酸滴鼻剂的应用. 中国医院药学杂志, 1990;10(8):366

[6] 王惠兰, 徐坤娜, 吴素华等. 氟哌酸灌肠剂的制备及应用. 中国医院药学杂志, 1991;11(7):328
 [7] 王林泉, 张金章, 周纳明等. 复方诺氟沙星灌肠液治疗慢性结肠病变临床观察. 药学实践杂志, 1996;14(1):21
 [8] 丁来英, 王莹, 贺丽华等. 氟哌酸栓剂的制备与含量测定. 药学情报通讯, 1992;10(3):43
 [9] 范义凤. 复方诺氟沙星糊剂治疗脓疱疮的疗效观察. 中国医院药学杂志, 1996;16(8):376
 [10] 王兴权, 乔继德, 曹志坤. 氟哌酸果冻的制备及应用. 中国医院药学杂志, 1991;11(11):517