

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。

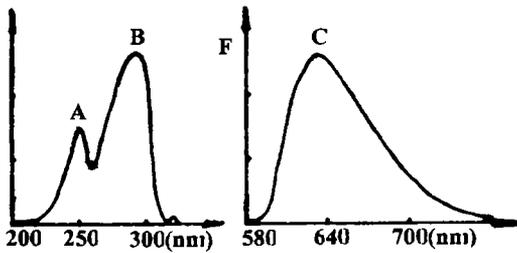
二、实验方法与结果

(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