

双波长等吸收紫外分光法测定玻璃体内苏拉明浓度

朱晓波¹, 唐仕波¹, 蔡葵花², 陈红英², 黄 强¹

(中山大学 1. 中山眼科中心, 2. 中山医学院分析测试中心, 广东 广州 510060)

摘 要:【目的】设计并论证检测玻璃体内苏拉明质量浓度的双波长等吸收紫外分光法。【方法】25 只白兔摘除眼球冷冻后获取玻璃体, 经过匀浆、沉淀、稀释等系列预处理后首先检验正常兔眼玻璃体个体差异性及其紫外分光法测定玻璃体内苏拉明浓度的方法学特异性。接着建立标准曲线方程, 考察检测方法的精密度和准确度, 确立最低检测量限, 最后检测苏拉明在玻璃体内的样品稳定性。【结果】选取 261 nm 和 269 nm 两波长, 全部 6 个个体及混合玻璃体的吸光值差 $\Delta A(A_{261} - A_{269})$ 介于 ± 0.002 之间; 外加高、低浓度苏拉明的曲线以及实际注药的高、低浓度苏拉明曲线与空白玻璃体的曲线走势一致且位于其上, 各曲线的波峰波谷位置未见偏移; 标准曲线方程为 $y = 4.234x + 2$, $r = 0.9991$; 次低、中浓度、次高标准浓度点的日内相对标准差 (RSD) 分别为 13.16%、9.67%、10.35%, 日间 RSD 分别为 17.59%、10.09%、11.11%, 相对回收率分别为: $(95.89 \pm 0.08)\%$ 、 $(96.69 \pm 0.07)\%$ 、 $(97.43 \pm 0.01)\%$; 设计标准曲线的最低质量浓度 $45 \mu\text{g}/\text{mL}$; 其日内、日间相对标准差分别为 14.14%、15.94%, 检验回收率为 $(94.92 \pm 0.01)\%$; 常温组样品, 8 h 及以内稳定性尚好, 之后不稳定。低温组及 3 次冻融组稳定性良好。【结论】在给定条件下, 白兔玻璃体的个体差异可以忽略, 双波长等吸收紫外分光法检测玻璃体内苏拉明浓度的方法学特异性好, 精确度、准确度、灵敏度和样品稳定性符合规定要求, 因此用该方法测定的玻璃体内药物浓度结果可靠。

关键词: 苏拉明; 玻璃体; 药物检测; 紫外分光法

中图分类号: R 927

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2004)03-0225-06

Two-Wavelength Ultraviolet Spectrophotometry on the Assay of Suramin in the Vitreous of Rabbits

ZHU Xiao-bo¹, TANG Shi-bo¹, CAI Kui-hua², CHEN Hong-ying², HUANG Qiang¹

(1. Zhongshan Ophthalmic Center, 2. Analytical Testing Center of SUN Yat-sen Medical College, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

Abstract: 【Objective】 To establish and demonstrate the two-wavelength ultraviolet spectrophotometry (TWUS) on the assay of suramin in the vitreous of rabbits. 【Methods】 25 albino rabbits were sacrificed and enucleated eyeballs. After a series of procedures, including frozen, ground, added acetonitrile, centrifuged and diluted, the vitreous were measured for their continuous photo spectrum at wavelength range from 350 nm to 190 nm, and the absorbance was measured just at wavelength 261 nm and 269 nm. The verified items included individual difference of rabbits, specificity of the assay, standard curve, precision (relative standard deviation), accuracy (relative rate of recovery) and sensitivity (the minimum detective concentration, ρ_{\min}) of the assay, as well as the stability of the detected simple. 【Results】 When wavelength of 261 nm and 269 nm was chosen as a pair of equal point of absorbance, all of the 6 rabbits had no difference in absorbance. There were similar photo spectrums a-

收稿日期: 2003-08-30

基金项目: 广东省重点科技攻关基金资助项目 (97-45); 中山眼科中心创新基金资助项目 (20009)

作者简介: 朱晓波 (1970 -), 男, 四川巴中人, 博士生, 主治医师; 唐仕波, 课题负责人, 通讯作者. E-mail: sbtang@gzsums.edu.cn

among the blank vitreous, drug -injected vitreous and drug-added vitreous. The wave crest of all spectrum localized at 265nm or about showed no marked shift. The standard equation of the line was $\hat{y} = 4.234x + 2$ ($r = 0.9991$). During one day, the relative standard deviation of 3 different concentration were 13.16%, 9.67% and 10.35%, with their relative rate of recovery (95.89 ± 0.08)%, (96.69 ± 0.07)% and (97.43 ± 0.01)% respectively. The ρ_{\min} was 45 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Although the samples could not be stored at room temperature over 8 h, those stored at 4 $^{\circ}\text{C}$ and -20°C or less than 8 h at room temperature were very stable for measurement. 【Conclusion】 On given conditions, the individual difference of rabbits can be neglected. All the data of each verified item are in accordance with the national relevant rules. Therefore, two-wavelength ultraviolet spectrophotometry is a reliable method for measurement of drug mass concentration in vitreous.

Key words: suramin; vitreous; drug assay; ultraviolet spectrophotometry

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2004, 25(3): 225-230]

目前, 玻璃体内药物浓度的检测方法并不多, 最多用的是高压液相色谱技术 (high-pressure liquid chromatography, HPLC)。这种检测方法灵敏度高, 所需样品量少, 自动化程度高, 因此在国外很受欢迎。但是, 这种方法需要昂贵的色谱仪、色谱柱以及专门的检测试剂, 操作分析还需要专业人员, 所以限制了它的广泛应用。其他的方法还有酶联免疫分析 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)^[1]和固相纤维蛋白分光光度计分析 (spectrophotometric solid-phase fibrin assay, SOFIA)^[2], 荧光分光光度计分析^[3]、荧光偏振免疫法^[4] (fluorescence polarization immunoassay, FPIA) 等, 它们往往针对特定的药物、需要特定的试剂盒和特殊的仪器。我们在研究中发现双波长等吸收紫外分光法 (two-wavelength ultraviolet spectrophotometry, TWUS) 检测玻璃体内苏拉明质量浓度操作简便、方法学各项监测指标符合规定要求、检测结果可靠, 是一种很好的检测方法。

1 材料和方法

1.1 主要试剂仪器与动物

苏拉明 (suramin, Sigma 公司)。健康新西兰白兔 25 只, 雌雄兼用, 体质量 1.8 ~ 2.2 kg, 由中山大学药学院动物实验中心提供。

1.2 正常兔眼个体差异性检验

完全随机法选取 6 只白兔处死后摘取眼球立即投入液氮中, 24 h 后取出再冷藏于 -70°C 的低温冰箱中待检。取保存的眼球, 每只兔取 1 眼, 快速去除眼球壁及眼球前段结构, 立即置于冰水预冷的匀浆器内, 冰冻条件下反复匀浆 10 min, 测量记录

各玻璃体体积。6 份玻璃体液各取 0.2 mL, 按 5:1 比例加入乙腈 0.04 mL, 振荡混匀, 在 4 $^{\circ}\text{C}$, 10 000 r/min ($r = 5\text{ cm}$) 条件下离心 15 min。再取上述 6 份样本各 0.2 mL 混匀后制成混合样本 (称空白 A 液, 下同), 同样条件下加乙腈并离心。吸取各上清液 0.2 mL, 按 1:2 比例加平衡盐液 (balanced salt solution, BSS) 稀释 3 倍。以 BSS 为参比调零, 记录 6 个个体及混合后的空白 A 液的光谱图; 测定记录它们在波长为 256 ~ 275 nm 时的连续吸光度值; 检测波长 261 nm (λ_1 , 下同) 和 269 nm (λ_2 , 下同) 的吸光值, 计算它们相应的吸光值差 $\Delta A = A_1 - A_2$ 。

1.3 紫外法检测方法的特异性检验

完全随机法选取白兔 2 只, 经颞上方扁平部向玻璃体内注射 80 g/L 的苏拉明 / BSS 液 10 μL 。注入 15 min 及 10 d 后摘眼球, 取 0.2 mL 玻璃体按步骤 1.3 处理后扫描用药后的高、低浓度样品光谱图。另取 2 份空白 A 液各 0.4 mL, 分别加入 18、240 g/L 苏拉明 / BSS 液各 1 μL (终浓度分别为 45、600 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 处理后扫描空白玻璃体外加标准苏拉明的光谱图。再取 1 份空白 A 液 0.2 mL, 处理后扫描空白玻璃体样品的光谱图。比较 3 种玻璃体样品的光谱图, 测定 5 条曲线第 2 波峰对应波长, 其参比调零液均为 BSS。

1.4 双波长标准曲线与线性范围的建立

吸取空白 A 液 0.4 mL 共 9 份, 分别加入不同浓度的苏拉明液, 配成终浓度分别为 45、60、75、100、150、250、400、600、800 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准溶液 (简称 V 液, 下同), 相应称为 V_{1-9} 液。按上述步骤 1.3 方法将各浓度点标准 V 液进行沉淀稀释处理; 另取 0.2 mL 空白 A 液, 不加苏拉明, 同样处理后

作为参比调零液。选取波长 λ_1 和 λ_2 测定记录 V_{1-9} 的相应吸光度值,并计算 V_{1-9} 相应的 $\Delta A = A_1 - A_2$ 。以标准质量浓度 ($\rho_{s, s}$) 为纵坐标, λ_1 和 λ_2 两组吸光度值及 ΔA 为横坐标,分别做 3 组线性回归,考察各自线性程度。以标准质量浓度 ($\rho_{s, s}$) 为纵坐标 (y), ΔA 为横坐标 (x), 建立双波长标准曲线方程。

1.5 检测方法的精密度考察

按上述方法配制标准 V 液中 V_2 、 V_5 和 V_8 3 个浓度点,每点 9 个样品。分别于同一天内及半年内各自 5 次测定它们的吸光度值(非同一天检测都重新配制新的标准曲线),换算成相应的浓度,计算 3 个浓度各自同一天内及半年内 5 次的相对标准差(RSD),前者称为日内变异,后者称为日间变异。

1.6 检测方法的准确度(相对回收率)考察

完全随机法选取 18 只眼球分 3 组,按上述方法获取玻璃体并每只眼吸取 0.4 mL, 每组随机对应加入 24、60、320 g/L 的苏拉明/BSS 液各 1 μ L,按步骤 1.2 处理后测定每只眼球的吸光度值,换算成浓度后计算出相对回收率(RRR),再统计所有 3 组 3 个标准浓度点各自的相对回收率。

1.7 最低检测量限的确立

完全随机法选择 2 只白兔,双眼注入 80 g/L 的苏拉明/BSS 液 10 μ L, 15 min 后按前述步骤 1.3 方法采集并处理玻璃体样本后测定苏拉明浓度,以 6 只眼(加上步骤 1.4 的 2 眼)的平均浓度作为最大质量浓度 (ρ_{max})。以 ρ_{max} 的 1/10 ~ 1/20 确定所配制的标准曲线最低质量浓度 (ρ_{min});按照上述步骤 1.6 的方法,测定 $\rho_{min} = 45 \mu\text{g/mL}$ 的精密度。随机选择 6 只眼球配制 6 份最低浓度标准液,处理后按步骤 1.6 测定准确度。

1.8 样品稳定性

用空白 A 液配制终浓度为 150 $\mu\text{g/mL}$ 的含药玻璃体样本 4.0 mL,按前法处理后用 BSS 稀释为 12.0 mL。将其平均分 3 组 40 份,分别放置于常温下(第 1 组 6 份)、-20 $^{\circ}\text{C}$ (第 2 组 17 份)及 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中(第 3 组 17 份)。24 h 内分 5 次检测第 1 组样品,计算其质量浓度 RSD。半年内分 3 次检测上述第 2 组和第 3 组样品,计算每次冷冻(第 2 组)和冻融(第 3 组)条件下的样品质量浓度 RSD,比较每次的检测结果。

1.9 统计学分析

对上述 1.4、1.5 部分的数据分别采用 t 检验、

线性回归方差分析进行统计学处理。

2 结果

2.1 正常兔眼个体差异性

6 只兔及混合 A 液的扫描光谱图见图 1, 其中中间为 A 液波形。在 350 nm 到 190 nm 范围内,可见双峰,波峰位于 (265.08 ± 0.09) nm 和 (203.7 ± 1.197) nm, A 液波峰位于 265.2 nm 和 204.2 nm。全部 6 个样品及 A 液在 λ_1 和 λ_2 的吸光度值差 ΔA ($A_{261} - A_{269}$) 介于 ± 0.002 之间。

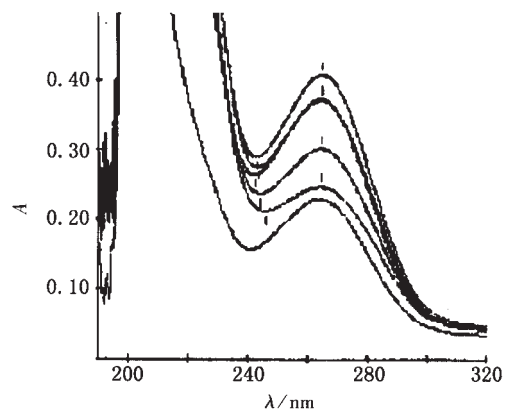


图 1 6 个个体及混合 A 液的光谱图

Fig. 1 The photo spectrum of six samples and their mix (named as liquid A)

2.2 紫外法检测方法的特异性

如图 2 所示,空白玻璃体的光谱图曲线(①线)与空白玻璃体外加苏拉明 45 $\mu\text{g/mL}$ (②线)、600 $\mu\text{g/mL}$ (③线)的扫描曲线以及注药 15 min(④线)、10 d(⑤线)后的玻璃体样品扫描曲线的曲线走势一致,高、低浓度外加样品的曲线以及高、低浓度实际注药样品曲线始终位于空白之上(其中⑤线比③线第 2 峰稍高,④线比较②线第 1 峰稍高)。5 条曲线第 2 波峰峰值波长为 (265.05 ± 0.025) nm,统计学检验没有显著性($t = 2.68, P > 0.05$)。

2.3 双波长标准曲线与线性范围

标准浓度点 V_{1-9} 在 λ_1 和 λ_2 两波长的相应吸光度值及相应的 $\Delta A = A_{261} - A_{269}$ 见表 1。

以 $\rho_{s, s}$ 为纵坐标 (y), λ_1 和 λ_2 两组吸光度值为横坐标 (x), 分别做线性回归, λ_1 的线性方程为 $\hat{y} = 1790x - 205$, 相关系数 r 为 0.9775, λ_2 的方程为 $\hat{y} = 1267x - 146$, 相关系数 r 为 0.9873。可

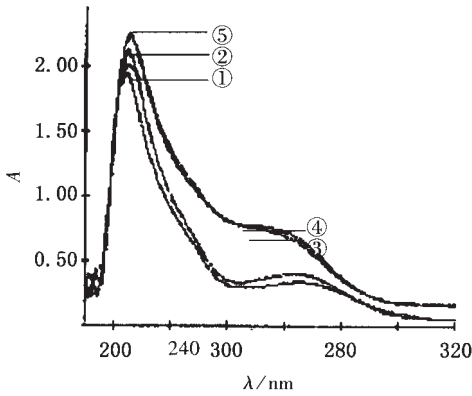


图 2 3 种玻璃体样品光谱图

Fig. 2 The photo spectrum of three kinds of sample of vitreous

Curve from top to bottom : represent curve 4, 3, 5, 2, 1 respectively; Curve 1 comes from blank vitreous; Curve 2 and curve 3 come respectively from 45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ suramin-added vitreous; Curve 4 and curve 5 come from suramin-injected vitreous (15 minutes and 10 days after injection, respectively). Curve 4 is higher than curve 3 at the second crest and curve 2 is lower than curve 5 at the first crest

见各标准浓度与其相应的吸光值具有线性关系。

以 $\rho_{s,s}$ 为纵坐标 (y), ΔA 为横坐标 (x), 选用 V_1 和 V_{3-9} 建立的标准曲线方程为 $\hat{y} = 4\ 234\ x + 2$, 相关系数 $r = 0.999\ 1$ (由于以全部标准点做回归时相关系数较低, 故选择剔除 V_2)。由此可见以吸光度差值进行回归具有良好的线性关系。3 个方程的线性图见图 3。

表 1 各标准浓度点的吸光度值及线性情况

Table 1 The light absorption value (A) of each standard concentration and their line relationship

Code	$\rho_{s,s}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	A_{269}	A_{261}	ΔA
V_1	45	0.121	0.131	0.010
V_2	60	0.126	0.138	0.012
V_3	75	0.167	0.184	0.017
V_4	100	0.165	0.188	0.023
V_5	150	0.181	0.212	0.031
V_6	250	0.306	0.369	0.063
V_7	450	0.402	0.509	0.107
V_8	600	0.460	0.604	0.144
V_9	800	0.502	0.687	0.185
r	-	0.9775	0.9873	0.9991
P	-	< 0.01	< 0.01	< 0.01

$\rho_{s,s}$ means standard mass concentration of suramin

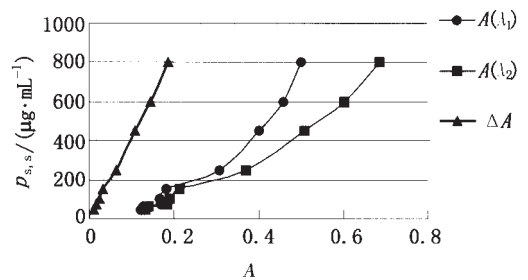


图 3 各标准浓度点吸光度值与浓度的线性关系

Fig. 3 The line relationship between mass concentration and light absorption value

表 2 3 个标准浓度点的日内变异和日间变异

Table 2 The intra-day and day-to-day relative standard deviation (RSD) of light absorption value at three concentrations

Code	$\rho_{s,s}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	Intra-day deviation			Day-to-day deviation		
		ΔA	$\rho_{s,t}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	RSD / %	ΔA	$\rho_{s,t}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	RSD / %
V_2	60	0.0142 ± 0.0019	61.91 ± 8.14	13.16	0.0144 ± 0.0026	62.76 ± 11.04	17.59
V_5	150	0.0318 ± 0.0031	136.43 ± 13.19	9.67	0.0314 ± 0.0032	134.73 ± 13.59	10.09
V_8	600	0.1432 ± 0.0149	607.73 ± 62.93	10.35	0.1416 ± 0.0155	602.08 ± 66.90	11.11

$\rho_{s,s}$ means standard mass concentration and $\rho_{s,t}$ means test concentration of suramin

2.4 检测方法的精密度

次低、中、次高 3 个标准浓度点的精密度详细情况见表 2, 可见 3 个标准点的日内变异分别是 13.16%、9.67%、10.35%; 日间变异则分别为 17.59%、10.09%、11.11%。

2.5 检测方法的准确度(相对回收率)

抽到 18 只眼中, 11 只左眼 7 只右眼, 检测的次低、中、次高 3 个标准浓度点的相对回收率分别为 $(95.89 \pm 0.08)\%$ 、 $(96.69 \pm 0.07)\%$ 和 $(97.43$

$\pm 0.01)\%$, 如表 3 所示。

表 3 3 个标准浓度点的相对回收率

Table 3 The relative rate of recovery (RRR) at three concentrations

Code	$\rho_{s,t}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	ΔA	$\rho_{s,t}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	RRR / %
V_2	60	$0.013\ 2 \pm 0.001\ 2$	57.53 ± 4.95	95.89 ± 0.08
V_5	150	$0.033\ 8 \pm 0.002\ 6$	145.04 ± 11.17	96.69 ± 0.07
V_9	800	$0.183\ 7 \pm 0.002\ 6$	779.43 ± 10.93	97.43 ± 0.01

$\rho_{s,s}$ means standard mass concentration and $\rho_{s,t}$ means test concentration of suramin

2.6 最低检测定量限

本实验测得 ρ_{\max} 为 $717.33 \mu\text{g}/\text{mL}$, 故确定所配制的标准曲线 ρ_{\max} 为 $45 \mu\text{g}/\text{mL}$; 最低标准浓度的质控样品日内、日间相对标准差分别为 14.14%、15.93%, 此时随机抽样的 6 只眼球, 检验回收率为 $(94.92 \pm 0.01)\%$ 。详细情况列于表 4。

表 4 最低标准浓度点的准确度和精密度

Table 4 The precision and accuracy at the minimum standard concentration

	Intra-day	Day-to-day	Accuracy
ΔA	0.0112 ± 0.0016	0.0108 ± 0.0018	0.0097 ± 0.0012
$\rho_s / (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	49.21 ± 6.96	47.51 ± 7.6	44.13 ± 5.10
$\rho_s / (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	45	45	45
RSD / %	14.14	15.94	—
RRR / %	—	—	94.92 ± 0.01

ρ_s means standard mass concentration and ρ_t means test concentration of suramin; RRR: relative rate of recovery; RSD: relative standard deviation

2.7 样品稳定性

肉眼观察常温组 6 份样品, 可见 8 h 及以内

的 3 份仍保持澄清透明, 摇晃未见明显的絮状或颗粒状、团状物漂浮。但 16 及 24 h 样品却见到有絮状及颗粒状悬浮物, 检测前必须再次离心。低温组及冰冻组复温后都保持澄清透明, 立即检测无须再离心。常温组 (第 1 组) 样品 ΔA 为 (0.0256 ± 0.005) , 检测浓度 $(107.6 \pm 21.1) \mu\text{g}/\text{mL}$, 测量浓度 RSD 为 19.59%。4 °C 组及 -20 °C 组样品的检测情况列于表 5。表中可见两组半年内 3 次检测的 RSD 均 < 10%。

3 讨论

药物治疗是增殖性玻璃体视网膜病变、化脓性眼内炎、葡萄膜炎等一些常见的眼后段疾病非常重要的治疗措施。目前能在眼内使用的药物种类并不多, 对上述一些严重影响视功能的疾病的控制尚不十分理想, 因此急需研制开发更多更好的新药。药物的开发, 在了解初步的药效以后, 紧接着很关键的一步就是必须了解药物在体内的药代动力学过程, 包括吸收、分布、代谢和排除。这又涉及到药物

表 5 低温 (4 °C、-20 °C) 组样品稳定性检测

Table 5 The stability of sample in low temperature (4 °C、-20 °C)

Time Point	Group 2 (4 °C)			Group 2 (-20 °C)			
	ΔA	$\rho_s / (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	RSD / %	Thaw	ΔA	$\rho_s / (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	RSD / %
1	0.0304 ± 0.0011	130.5 ± 4.8	3.70	1	0.0310 ± 0.0016	133.04 ± 6.7	5.03
2	0.0308 ± 0.0013	132.2 ± 5.5	4.17	2	0.0318 ± 0.0017	136.43 ± 7.6	5.54
3	0.0312 ± 0.0018	134.3 ± 7.6	5.67	3	0.0309 ± 0.0019	132.44 ± 8.3	6.24

ρ_s means standard mass concentration and ρ_t means test concentration of suramin

在玻璃体内的检测方法问题。

3.1 TWUS 检测玻璃体内药物浓度的原理

选择两个合适的波长, 使背景干扰组分在这两个波长处具有相同的吸光值, 而被测组分具有足够的吸光度差, 就可以在不分离背景干扰组分的情况下直接测定需要检测的组分。

3.2 正常兔眼个体差异性及 TWUS 的特异性

结果 2.1 说明选取 269 nm 和 261 nm 两个波长为等吸光值波长点, 各兔眼之间的个体差异可以忽略, 因此保证了在每一次实验中无论随机选取单个个体或是以多个个体混匀后配制标准曲线, 其空白背景与被检用药样品背景都具有同质性。结果 2.2 表明苏拉明的加入方式和浓度高低未对玻璃体造成影响, 各曲线的波峰波谷位置未见红移或蓝

移, 因此用紫外法检测玻璃体内的苏拉明具有很好的特异性, 不会受到其他内源性物质或相应的代谢物对样品的干扰。

3.3 TWUS 的标准曲线及其可重复性、检测效率及敏感度

表 1 和图 3 中可见, 虽然两波长的吸光值实测数据在低浓度点偏低, 但它们与标准浓度具有明显的线性趋势。而由吸光值差 (ΔA) 与标准浓度拟和的直线方程 $r = 0.9991$ ($R^2 = 0.9981$), 线性趋势更明显, 经方差分析 $P < 0.01$, 具有统计学显著性。表 2 显示这种检测方法在次低浓度点, 中间和次高浓度 3 个质控样品点的日内/日间 RSD 符合国家有关规定的要求^[5], 说明 TWUS 检测可重复性好。而表 3 显示 3 个浓度点的回收率超过 95%, 表

明 TWUS 检测效率高,符合国家有关规定^[5]。

表 4 给出了最低标准浓度点(45 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的准确度及精密度情况,其日内与日间变异程度分别为 14.14%、15.94%,回收率达到 94.92%,说明该浓度点的检测结果可靠。文献报道 HPLC 检测血浆苏拉明,最低可检测到 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$,而目前我们选择的玻璃体最低检测点为 45 $\mu\text{g}/\text{mL}$,似乎灵敏度比起 HPLC 低很多,但不同的检测目的要求的灵敏度可以不同,800 μg 的苏拉明注入兔眼玻璃体后的最大质量浓度为 717 $\mu\text{g}/\text{mL}$,45 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 约为其 6%,完全符合国家有关规定^[5]。一味追求较高的灵敏度在另一方面又会造成不必要的浪费,事实上,更低剂量的苏拉明在眼内,既无治疗价值又不会导致毒副作用,没有什么实际意义。

3.4 TWUS 检验周期和样品的保存条件

结果 2.7 中样品在 4 $^{\circ}\text{C}$ 低温及 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰冻条件下(包括 3 次冻融后)长达半年之久仍然稳定性尚好,表明 TWUS 完全可以应付较长周期的检测,满足玻璃体内药代动力学检测的需要。常温下放置时间太长稳定性下降,提示在实验过程中,样品的处理及检测在室温停留的时间不宜太长,应尽量在低温状态下完成。

3.5 TWUS 检测玻璃体内药物浓度的优点

如前所述,兔眼玻璃体在 265 nm 左右峰形对称性好,波峰吸光度值不高,适合双波长等吸光度检测(图 1)。只要待检药物在该波长两侧具有较大的吸光值差,都可采用该方法,而不必费心寻找方法排除玻璃体的干扰。苏拉明固有吸收峰位于 237 nm、313 nm,蛋白结合率达 99.89%^[6],图 2 显示在其固有吸收波长处检测苏拉明的吸光值受蛋白质背景影响很大,因此文献报道必须采用离子对试剂磷酸四丁基胺及木瓜醇进行提取分离,然后选取波长 313 nm 用 HPLC 检测。我们发现苏拉明溶解于玻璃体内,在波长为 265.2 nm 的波峰两侧具有较大的吸光度差(图 2),选取 261、269 nm 作为两个等背景吸收波长点,按照本方法可以省却烦琐的提取分离步骤,摒弃检测其固有吸收波长,用紫外分光光度计同样能达到很好的检测效果,因此既经济又简便。

除此之外,当选取上述两个等背景吸收波长点,兔眼玻璃体个体差异可以忽略,具有良好的同

质性。这意味着在每次不同的检测时间可以随机选取单个或多个个体混匀后配制标准曲线,既保证了标准曲线的空白背景与被检用药样品背景的同质性同时又不必设置自身对照,节省大量样品。

紫外分光光度仪操作简便易学、性价比比例适宜、检测范围广,已普遍应用在各种实验室,成为实验室最基本的仪器。除外最简单的手拉型(如上海医疗仪器厂 720 型),目前也有能与电脑联机的半自动型(如岛津 UV-1601 型),因此同样能适应现代医学新形式。我们用其检测苏拉明的浓度以了解苏拉明在兔眼玻璃体内的代谢过程,结果与国外学者^[7]用 HPLC 方法所得出的代谢结论在总体上是-一致的,说明其检测玻璃体内药物浓度的结果可靠性可以与 HPLC 相比较。因此应用双波长等吸收紫外分光法检测玻璃体内药物浓度具有广泛的前景,本研究为古老的紫外分光法注入了新的活力,为玻璃体内药物浓度的检测提供新的思路。

参考文献:

- [1] 梁小玲,李绍珍,高汝龙,等.玻璃体中碱性成纤维细胞生长因子的定量[J].中山医科大学学报,1998,19(3):183-6.
- [2] Jaffe G J, Green G D, McKay B S, et al. Intravitreal clearance of tissue plasminogen activator in the rabbit[J]. Ophthalmol, 1988, 106(7): 969-72.
- [3] 梁厚成,惠延年,蔡用舒,等.道诺霉素脂质体玻璃体内代谢及视网膜毒性[J].眼科研究,1993,11(2): 87-9.
- [4] 曾水清,吕源淑,胡出椿,等.丁胺卡那霉素在兔眼玻璃体内的药代动力学研究[J].中华眼底病杂志,1995,11(1): 28-30.
- [5] 国家药典委员会.中华人民共和国药典[M].2000 版二部.北京:化学工业出版社,2000.附录 193-5.
- [6] Tjaden U R, Reeuwijk H J, Greef J V, et al. Bioanalysis of suramin in human plasma by ion-pair high-performance liquid chromatography [J]. Chromatography, 1990, 525(1): 141-9.
- [7] Hassan T S, Hartzler M K, Cheng M, et al. Anti-angiogenic effects, ocular toxicity and vitreous clearance of suramin in vivo [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1994, 35(4): 1374.

(编辑 刘清海)