



间接能量传递超声法在生物医学制剂制备中的应用

丁振英 郑秀龙

(第二军医大学放射医学研究室, 上海)

我们曾^[1]报道过用国产 CSF-1A 型超声波清洗机处理 DNA 分子, 取得了与用英制 MSE 及上海一医^[2]研制的 CPS-1 型探头式超声波粉碎机同样的剪切效果, 并且避免了探头式超声波仪因变幅杆伸入溶液可能引起的污染。在前述基础上, 我们进一步用此机对常见生物医学制品进行了粉碎试验, 现将实验结果及其与探头式超声波粉碎机粉碎效果的比较, 介绍如下:

一、材料与方 法

① DNA 溶液 小牛胸腺 DNA (上海牛奶公司产品) 分子量 $4-40 \times 10^6 \text{ dal}$, 以 0.2 mg/ml 溶于 0.14 M NaCl 溶液中。

② 细胞: 用郑升^[3]等建立的小鼠腹水型淋巴性白血病 L_{712} 细胞。该细胞经 615 纯种小鼠腹腔移植传代, 至今已 300 代。

③ 组织: 取正常家兔新鲜或冷冻保存的肝、脾组织备用。

④ 苯甲酸雌二醇 (上海第十二制药厂产品) 棒状结晶。

⑤ 雌酚酮汞: 本室药理组提供; 不规则颗粒状。

⑥ CSF-1A 型超声波清洗机 (上海超声波仪器厂产品), 包括发生器 (输出功率 250 W , 20 KHZ) 和 CSQ-1 超声波清洗槽, 槽内装有四个直径为 7 cm 的压电式辐射器, 每只辐射器输出功率为 60 W 。

⑦ 多孔塑料框架, 多头试管夹及铁支架。

⑧ 医用塑料圆柱形平底管: 选用的规格

有: 1. 小号 $1.3 \times 5.3 (\text{cm})$, 2. 中号 $1.8 \times 4.5 (\text{cm})$, 3. 大号 $3.5 \times 8.0 (\text{cm})$ 。

二、实验方法

将盛有样品溶液的塑料管夹在铁支架上, 超声处理时将塑料管置于超声槽内压电辐射器的中央, 管底距辐射器约 2 mm , 在冰水 (用小、中号管时, 水深 $3.5-3.7 \text{ cm}$, 用大号管时, 水深约 5.5 cm) 中, 以电流强度 300 mA 超声一定时间, 根据需要, 一次可同时超声 1—4 个样品, 然后检测样品破碎程度。

1. 超声剪切 DNA

DNA 溶液 2 ml , 置于小号塑料管内, 超声 1 分钟, 然后用琼脂糖凝胶电泳法^[1]分离, 再在紫外光 (254 nm) 灯下检测和照相, 以鉴定 DNA 片段大小, 并与 MSE 及 CPS-1 型探头式超声波粉碎机的结果进行比较。

2. 超声粉碎生物样品

(1) 细胞: 将接种 L_{712} 细胞 6 天后的 615 小鼠颈椎脱臼处死, 用注射器抽取腹水, 以无菌生理盐水稀释至所需浓度, 混匀后分装于小号塑料管各 1 ml 和 2 ml ; 中号管各 5 ml ; 大号管各 10 ml 。分别超声不同时间后, 用血球计数器镜下常规计数细胞。用处理前后细胞数的变化计算出细胞破碎率。

(2) 组织匀浆的制备: 取新鲜肝、脾组织各 2 g 。剪成小块后置大号塑料管内, 加无菌冰冷生理盐水 10 ml , 超声。

3. 超声粉碎药品

将苯甲酸雌二醇或雌酚酮汞 $10-40 \text{ mg}$, 置

小号塑料管内,加蒸馏水 1ml, 并加 1% 药用表面活性剂吐温 1 滴, 分别超声 10 分钟、15 分钟;用目镜测微器,透射电镜和 TAIH 库尔特计数器观察超声前后颗粒大小的变化。

三、结果与讨论

1. 对 DNA 的剪切效果

小号塑料管内放小牛胸腺 DNA 溶液 2ml, 分别用 CSF-1A 型超声波清洗机, 用 300 mA 超声 1—1.5 分钟. 在相近条件下, 用 MSE 超声波粉碎机以振幅 22 μ m 和 CPS-1 型 25W 各超声 1 分钟. 超声后的 DNA 样品与 AluI 酶切的 pBR 322 DNA 片段, EcoRI 及 BglII 酶切的 λ DNA 片段, 同时做琼脂糖凝胶电泳以作比较. 结果见图 1.



图 1 不同超声波仪剪切的 DNA 片段与标准酶切 DNA 片段电泳图谱的比较

- 1.对照. 2. CSF-1A300 mA1.5'. 3. CPS-1 25W1'. 4. MSE 22 μ m1'. 5. CSF-1 A 300 mA1'. 6. AluI 酶切 pBR322 DNA 片段. 7. EcoRI酶切 λ DNA 片段. 8. BgIII 酶切 λ DNA 片段.

用上述三种酶切 DNA 片段的参考分子量

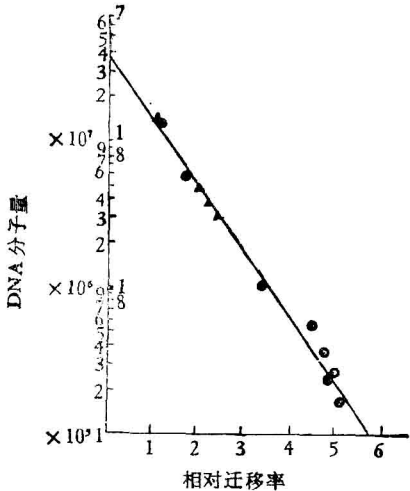


图 2 DNA 分子量——相对迁移率参考曲线

- ▲ EcoRI 酶切 λ DNA 片段.
● BgIII 酶切 λ DNA 片段.
○ AluI 酶切 pBR 322 DNA 片段.

表 1 不同超声波仪剪切 DNA 分子片段大小的比较

超声波仪	超声时间(分钟)	DNA 片段分子量 ($\times 10^5$ dal)
CSF-1A (300mA)	1.5	1.2—2.4
	1	1.2—4.0
MSE (22 μ m)	1	1.2—3.1
CPS-1(25W)	1	1.1—2.4

与其凝胶电泳的相对迁移率在半对数座标纸上作图(图 2), 用三种超声波仪剪切的 DNA 片段的相对迁移率, 从图 2 参考曲线上即可查出 DNA 片段分子量分布范围, 其片断较集中部位的分子量见表 1.

由图 2 和表 1 可见, 此机与探头式超声波粉碎机对 DNA 分子可达到相似的剪切效果, 分子量由 10^7 降到 10^5 dal^[2].

表 2 CSF-1A 型超声波清洗机对 L_{7712} 细胞粉碎效果

管 型	悬液体积 (ml)	超声时间	破碎率(%) (平均值±标准差)	实验次数(次)
小 号	1	15''—30''	99.6±0.2	6
	2	30''—1'	99.4±0.4	7
中 号	5	1'—1 $\frac{1}{2}$ '	99.3±1.0	4
大 号	10	1 $\frac{1}{2}$ '	97.4±3.9	5

本法在研究工作中^[4,5]已取得较好的效果。

2. 对生物样品的粉碎效果

(1) 粉碎细胞

将 L_{7714} 细胞悬液 ($0.14-1.41 \times 10^7$ 个细胞/ml) 分别置于小、中、大号塑料管内, 经本机 300mA 超声不同时间后, 镜检超声前后细胞数的变化, 结果见表 2。

(2) 组织匀浆的制备

将 2 克肝或脾组织剪碎后置大号塑料管内, 加 10ml 冰冷生理盐水, 超声 3 分钟即可得到均匀的匀浆液。

从生物组织或细胞中制备细胞器及提取核酸、糖蛋白和酶等生物制剂时, 需先将其粉碎或匀浆。用探头式超声波仪粉碎组织细胞时, 除污染探头外, 还由于探头脱屑的污染及升温过高而影响生物制剂的活性。用玻璃匀浆器, 操作不方便, 且样品损耗较多。间接能量传递超声法制备生物样品可避免上述缺陷。

3. 对药品的粉碎效果

苯甲酸雌二醇和雌酚酮汞超声前颗粒大小极不均匀, 多在 $20\mu\text{m}$ 以上, 大的粒径可达 $100-200\mu\text{m}$ (图 3, 4), 超声 10 分钟后, 绝大多数粒径在 $20\mu\text{m}$ 以下, 经透射电镜观察, 小的 $1\mu\text{m}$ 左右 (图 5, 6)。用乳钵研磨雌酚酮汞或苯甲酸雌二醇, 颗粒大小仍不均匀, $20\mu\text{m}$ 以上的颗粒较多 (图 7, 8)。将后者超声 15 分钟后, 其粒径基本均小于 $20\mu\text{m}$ 。粒径大小的测定结果见表 3。

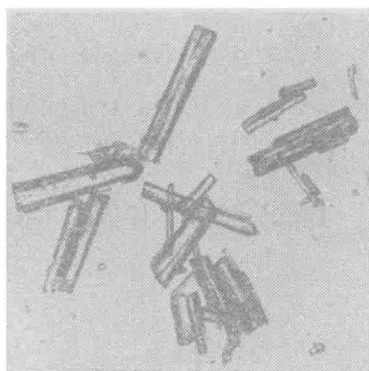


图 3 苯甲酸雌二醇超声前的晶体 ($\times 33$)

由表 3 可见, 用本法粉碎晶体药物, 其颗粒

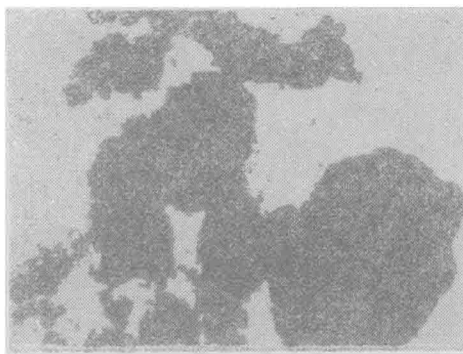


图 4 雌酮酮汞超声前的颗粒 ($\times 33$)



图 5 苯甲酸雌二醇经本机以 300 mA 超声 10 分钟后的颗粒 ($\times 33$)

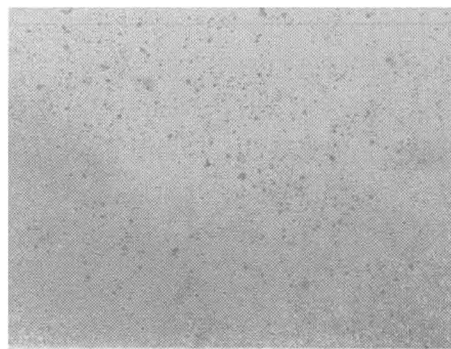


图 6 雌酮酮汞经本机以 300 mA 超声 10 分钟后颗粒 ($\times 33$)

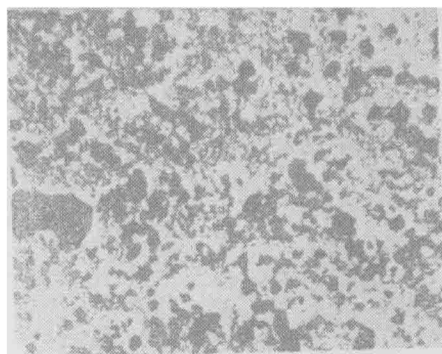


图 7 研磨后雌酮酮汞颗粒 ($\times 33$)

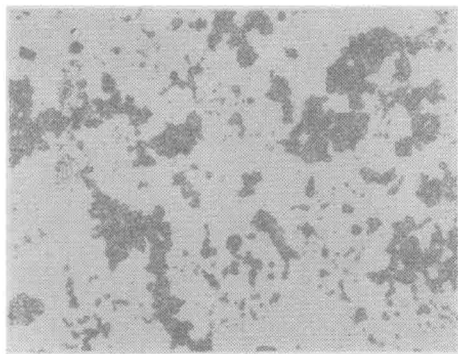


图8 研磨后苯甲酸雌二醇颗粒 ($\times 33$)

表3 CSF-1A 型超声波清洗机对苯甲酸雌二醇超声
15分钟后粒径大小的分布

粒 径 (μm)		%总粒数
4	5	42.90
5	6.4	19.35
6.4	8	16.55
8	10.1	9.07
10.1	12.7	5.38
12.7	16	2.95
16	20.2	1.93
20.2	50	1.87

较孔钵人工研磨的细且均匀, 粒径在 $16\mu\text{m}$ 以下的达 98% 左右, 超过 $20\mu\text{m}$ 的不到 2%, 基本符合我国药典标准^[6], 可用于混悬型注射剂的制备。用本法制备的药物油剂混悬液, 肌肉注射时通针性较好。此法损耗药物较少, 操作方便。

4. 其他

我们还对大肠杆菌生理盐水悬浮液进行超声, 经涂片、碱性复红染色, 镜检超声前后细菌数的变化, 结果超声 10 分钟后, 破碎率达 70% 以上, 与探头式超声波仪近似^[2]。

我们还对中性茶油在水中的乳化作用进行了观察。以中性茶油、甘油、水和豆磷脂 (乳化

剂) 按乳油液注射剂处方^[7], 配制后置塑料管内超声 5 分钟, 镜下检查有的油粒粒径可达 $1\mu\text{m}$ 左右, 表明本法也适用于油/水乳剂的制备。

在超声过程中, 我们发现平底塑料管有时因超声时间较长 (10—15 分钟) 而出现裂缝, 为此我们分别试用过平底钠玻璃管、尼龙管、低钾闪烁瓶、聚乙烯软管及有机玻璃管 (聚甲基丙烯酸甲酯管), 结果证明, 除有机玻璃管外, 其他各种材料的平底管效果较差。再一次证明, 玻璃材料制成的平底管因其反射系数较大^[8], 损耗超声能量大, 达不到粉碎的目的; 而有机玻璃管与聚苯乙烯塑料管一样, 对超声波的反射系数较小, 损耗超声能量少, 可粉碎药物。有机玻璃管超声长达 30 分钟仍未见裂痕, 所以要较长时间超声粉碎样品时, 选用有机玻璃管较适宜。

本机可一次同时超声四个样品, 可在同一条件下分析相同或不同的样品以减少仪器操作误差, 提高分析工作的准确性, 缩短工作时间, 一次超声总容量可从 1 ml 至 100 ml。

L₇₇₁₂ 细胞由上海医学院郑升同志提供; 药物晶体由本室药理组 and 同位素组提供; 大肠杆菌由本校微生物教研室提供, 上海第一医学院马远鸣同志给我们工作以支持, 在此一并致谢。

参 考 文 献

- [1] 郑秀龙等:《第二军医大学学报》, 4, 131, 1983.
- [2] 马远鸣等:《上海第一医学院学报》, 9, 298, 1982.
- [3] 郑升等:《肿瘤》, 2, 1, 1982.
- [4] 郑秀龙等:《全军放射医学年会论文摘要》第二军医大学, 43 页, 1982 年.
- [5] 刘楠等:同上, 第 44 页.
- [6] 中华人民共和国卫生部药典委员会编:《中华人民共和国药典》, 一部, 1977 年.
- [7] 沈阳药学院主编:《药剂学》, p. 182, 1980. 人民出版社.
- [8] Blitz. J.: *Ultrasonics methods & Applications*, London Butterworths, 14, 1971.

[本文于 1983 年 12 月 29 日收到]