

光纤化学传感器在线监测家兔体内阿霉素血药浓度

吕文旭^{1*}, 陈 坚²

(新疆医科大学 1. 附属肿瘤医院药剂科, 2. 新疆医科大学药学院, 新疆 乌鲁木齐 830011)

摘要: 目的 将光纤化学传感器作为一种新的获取分析物信息的方法,用于体内药物过程监测。方法 应用溶胶凝胶法将 D-70 分子探针固定于光纤裸露端面,利用阿霉素对探针的荧光猝灭效应检测其浓度变化;同时设计了简便可行的动物模型,使光纤探头可以直接插入血管进行检测。结果 该方法的回收率为 99.4%~106.2%,日内及日间 RSD 分别为 6.6%~11.4%和 5.9%~11.7%,当信噪比为 3 时,检出限为 0.057 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。结论 此法简便,提高了分析对象的检测灵敏度,为在线在位监测其他生物体液中药物浓度及药物在生物体组织器官中的分布代谢提供了可以借鉴的新方法和新技术。

关键词: 光纤化学传感器; 药物过程监测; 阿霉素

中图分类号: R917.1 文献标识码: A 文章编号: 0513 - 4870(2002)07 - 0543 - 05

阿霉素(adriamycin, ADM)为广谱抗肿瘤药,活性强,是国内外广泛使用的抗生素类药物,但在长期使用,由于累积作用,有严重的毒副作用,尤其是对骨髓与心脏的毒性,大大限制了其应用^[1],因此开展临床血药浓度监测,有重大的实际意义。目前有关体内药物浓度的监测主要是取样分析,在一定间隔时间段取血样进行分析,操作繁复。本文设计的光纤化学传感器(FOCS)提供了一种新的在线在位监测体内血药浓度的方法^[2-4],传感器探头精巧,可直接插入血管,响应特定的分析对象。本传感器中最重要的部分是固定于光纤端部的 D-70[4-(N,N-dioctyl)amino-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole, $M_r = 404$]敏感层,它识别特定的分析对象 ADM,并将化学信息转换成可检测光学信号,由光纤将其变化传入检测器,由计算机采集数据并进行处理,以完成过程监测。

材 料 和 方 法

传感仪器系统 传感仪器系统包括精确的光学系统,传感器探头,光电检测系统及数据采集和处理系统(图 1)。

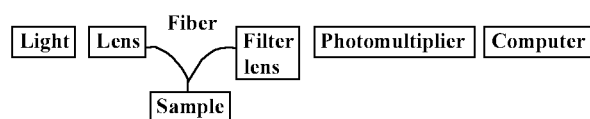


Figure 1 Schematic diagram of the fiber optic chemical sensor system

石英分支光纤($D=100\ \mu\text{m}$)的两个支端分别耦合在光源和检测器的通道上,总端外包被有一针型钢管($D=1\ \text{mm}$)以便直接插入血管。传感器探头结构:光纤裸露端部固定有 D-70 敏感膜,荧光试剂 D-70 分子分散在光纤表面,形成多孔状结构,孔径为 1~2 μm 。以氙灯(日本 Vshio Inc)作为光源,通过合适的透镜及精确的聚焦距离,将激发光聚集入分支光纤入射端到达端部,反馈分析物定量信息的光信号经由分支光纤出射端通过一定波长的干涉滤光片(波长 530 nm,上海光学镜头厂)到达光电倍增管(PMT,9292B型,英国)。模数转换器选用芯片 7135(上海无线电十四厂)测量精度 0.1 mV,模数转换速度为 3~10 次 $\cdot\text{s}^{-1}$ 。采用 VB 语言编写数据实时采集程序和数据处理程序,包括以下几个模块:数据实时采集,任意时间段内的过程监测,不同定量模型的数据处理,结果输出打印。

仪器与试剂 RF-540 型荧光分光光度计(日本 Shimadzu),石英分支光纤($D=100\ \mu\text{m}$,美国海洋公司),4503 MP6 微量电子天平(德国 Sartorius),高速离心机(4 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$),HP8453E 紫外可见分光光度计系统(美国)。阿霉素(浙江海正药业),D-70(美

收稿日期: 2001-07-28.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(29775022).

* 通讯作者 Tel: (0991) 3859623, 2649838, Fax: (0991) 3827147,

E-mail: lvwenxu@netease.com

国, Molecular Probes Inc), 正硅酸乙酯(TEOS, 天津市化学试剂一厂)。本试验动物家兔为新疆医科大学实验动物室提供。其他试剂均为分析纯。

分子探针固定方法 溶胶制备:取正硅酸乙酯(TEOS) 10 mL 于磁力搅拌下加入无水乙醇 40 mL 为 A 溶液;量取水 2.4 mL 盐酸 0.4 mL, 加入无水乙醇 17.0 mL 为 B 溶液。将 B 液在磁力搅拌下慢慢加入 A 液, 放置 24 h 形成溶胶。D-70 溶胶制备:称取 D-70 4.35 mg, 以无水乙醇稀释至 10 mL 量瓶中, 制成 D-70 储备液($435.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 取 D-70 储备液 1.0 mL, 稀释至 3 mL, 搅拌加入已制备好的溶胶溶液 5.0 mL 中, 待用。固定:将光纤端部裸露截面伸入 D-70 溶胶中, 室温放置 24 h, 取出, 室温放置 8 h, 重复 3 次即可。

标准曲线制备试验装置 将连有石英分支光纤(BFB, 其一端连接光源 LS, 另一端连接光电倍增管 PMT) 的聚乙烯流通池(FTC, 内径 2 mm, 体积 0.2 mL) 与蠕动泵(pump, $0.1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$) 连接, 在泵的作用下使样品通过该流通池模拟体内血液循环(图 2)。

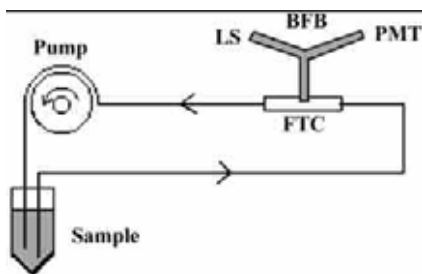


Figure 2 Scheme of the system used for the preparation of standard curve

LS: light source; BFB: bifurcated fiber bundle; PMT: photomultiplier; FTC: flow-through cell

动物模型的选择 本实验选择家兔颈动脉作为光纤探头的插入部位。从生理解剖学角度看, 实验所用光纤探头($D=1 \text{ mm}$) 对于动物仍显较粗, 而颈动脉血管较粗、壁厚且弹性好, 探头向心插入颈总动脉与左锁骨动脉的岔口处, 此处血液循环状况良好, 外加抗凝剂, 在长时间监测过程中可避免出现循环不畅问题; 而且颈动脉剥离切口小, 试验完毕, 缝合, 动物仍可存活^[5]。

传感器设计 支持物的选择: 选择将分子探针直接固定在石英光纤的裸露端面, 因石英玻璃材料作为一种很好的支持体材料, 其表面处理简单, 光学稳定性优良, 而且玻璃材料可以通过烧结或控制水解的方法形成多孔玻璃, 以增加表面积, 通过吸附作

用固定足够量的敏感试剂。敏感试剂的选择: 选择 D-70 作分子探针是基于 ADM 对 D-70 的猝灭效应, 不同浓度 ADM 对 D-70 的猝灭效应不同。固定方法: 选择溶胶凝胶法包埋分子探针, 使用室温下多次重复固定方法, 其孔径形成在 $1 \sim 2 \mu\text{m}$ 之间。

FOCS 法 取体重 2.0 ~ 2.5 kg 的健康家兔, 禁食(不禁水) 12 h, 使其仰卧于兔台, 剪去颈部兔毛, 以普鲁卡因局部麻醉, 分离其颈动脉, 固定远心端, 将光纤探头朝向近心端方向插入动脉血管, 固定, 同时 iv 枸橼酸钠 2 mL, 以防凝血, 观测数据, 然后耳缘静脉每兔给药阿霉素 10 mg。设定监测时间, 计算机自动连续采集数据, 结果由计算机按相应程序输出。

对照试验方法 以荧光法检测血清中阿霉素浓度作为对照^[6]。在 FOCS 法监测动物的同时, 分别于给药前后不同时间耳缘静脉取血 2 mL, 室温放置 30 min, 离心($4000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$) 20 min, 取上清液, 生理盐水稀释 2 倍, 用荧光分光光度计在 $E_x(481 \text{ nm}) / E_m(550 \text{ nm})$ 测定样品荧光强度。

结果与讨论

1 标准曲线与检测限

取家兔全血, 加抗凝剂枸橼酸钠适量, 配制含阿霉素 0.50, 0.99, 1.96, 4.76, 9.09, 16.67 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列溶液, 应用标准曲线试验装置, 模拟血流情况, 记录含不同浓度阿霉素通过时的荧光强度值 F 及空白血液通过时的值 F_0 , 以 $\text{Log}(F_0/F)$ 对浓度 C 回归得标准曲线: $\text{Log}(F_0/F) = 0.128 + 0.011 C$ ($\gamma = 0.9976, n = 5$)。当信噪比为 3 时, 最低检出限为 $0.057 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2 精密度和回收率

取空白全血 1.0 mL, 制备含阿霉素低、中、高 3 个浓度(1.0, 10.0, 25.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的样品, 每个浓度进行 5 样本分析, 通过装置, 根据实时采集数据及标准曲线处理数据, 测定 3 d, 求算方法精密度和回收率(表 1)。

3 可逆性和稳定性

用于在线监测的 FOCS 必须对分析物有可逆和稳定的响应。以空白全血配制含阿霉素 1.0 和 20.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的样品, 交替通过装置, 其响应曲线 RSD 分别为 2.4% 和 3.6% ($n = 5$)。开启仪器系统, 将探头插入未给药的兔血管内, 观察响应信号, 纪录 12 h 内的荧光本底强度, 结果表明响应曲线除有轻微波

动外(RSD=0.1%, n=10),未出现明显变化。上述结果表明,本仪器系统有良好的稳定性;对阿霉素的响应有良好的可逆性。

Table 1 Precision and recovery of the assay of adriamycin (ADM) in rabbit blood (n=15)

Concentration/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$		RSD/ %		Recovery/ %
Added	Found	Within run	Between run	
1.0	1.06	7.4	5.9	106.2
10.0	10.16	6.6	7.2	101.6
25.0	24.86	11.4	11.7	99.4

4 体内阿霉素经时曲线

给药后,由计算机记录连续时间段内荧光强度猝灭程度随时间的变化过程。5只家兔 iv ADM 后血药浓度于 5 min 左右达高峰,药物以二房室模型进行衰减,当体内 ADM 从血液中逐渐消除时荧光强度趋于增强。

5 方法的选择性

选用荧光法检测血清中阿霉素浓度作为对照试验方法,与本试验研究建立的 FOCS 法同时取样测定家兔 iv 阿霉素后血液中药物的浓度,比较由两种方法监测家兔所得的两组数据。由表 2 中数据可以看出,FOCS 法所测浓度数据比对照法稍高,可能因对照法所取为血清样品,在制备分离样品的过程中,血液中的药物肯定会有少量沉积或吸附在血细胞和蛋白上,造成样品的损失;而由溶胶-凝胶法制得形成的多孔状传感器探头敏感膜,不仅可以阻挡血液中各种细胞和蛋白的干扰,又能使药物分子自由进出小孔发生猝灭效应,因此其响应时间较短。另外,阿霉素进入体内主要转化为阿霉素醇,广泛分布于组织,血液中其代谢物含量低于 1%,故可认为 FOCS 所测血液中荧光猝灭变化即为阿霉素体内浓度变化。

6 药代动力学参数

根据阿霉素在兔体内的经时曲线,由计算机处理将其转化为药-时曲线,取一定时间间隔的浓度点,按 3P87 药代动力学程序以 iv 给药拟合为二室模型,药代动力学参数见表 3。同时列入对照法所得药代动力学参数。

7 阿霉素猝灭机制

由阿霉素的紫外可见吸收光谱和 D-70 的荧光光谱看,从 450~510 nm 区域内,ADM 吸收光谱与 D-70 的激发光谱大面积重叠(图 3),因此其猝灭机制主要是内过滤:即阿霉素作为猝灭剂使分子探针

D-70 的荧光强度减弱。可能存在的加和因素需进一步探讨研究。图 4 为血液中不同浓度 ADM 对 D-70 膜的猝灭曲线。

Table 2 The concentration of ADM in rabbit blood after iv administration of a single dose of 10 mg by two methods (n=5, $\bar{x}\pm s$)

Time/ min	Concentration of ADM/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	
	FOCS method	Fluorescent method
1	17.3 \pm 1.1	15.7 \pm 1.3
5	27.3 \pm 2.4	21.9 \pm 1.9
10	14.2 \pm 1.0	12.8 \pm 1.4
20	9.9 \pm 0.6	9.3 \pm 0.6
30	8.75 \pm 0.4	8.2 \pm 0.8
60	7.15 \pm 0.20	6.18 \pm 0.20
120	5.9 \pm 0.3	5.32 \pm 0.20
240	5.09 \pm 0.10	4.77 \pm 0.20
480	4.5 \pm 0.3	4.36 \pm 0.20
720	4.0 \pm 0.3	3.97 \pm 0.3
1440	3.08 \pm 0.20	2.95 \pm 0.10

FOCS: fiber optic chemical sensor

Table 3 The pharmacokinetics parameters of adriamycin determined by two methods (n=5, $\bar{x}\pm s$)

Parameter	FOCS method	Fluorescent method
A/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	14.2 \pm 1.8	12.8 \pm 1.6
B/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	6.02 \pm 0.10	5.38 \pm 0.20
Vc/ $\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}$	0.240 \pm 0.020	0.27 \pm 0.03
$T_{1/2\alpha}$ / min	12.6 \pm 1.5	13.6 \pm 2.1
$T_{1/2\beta}$ / h	23.0 \pm 2.3	28 \pm 4
K_{21} / min^{-1}	0.0158 \pm 0.0020	0.0148 \pm 0.0010
K_{10} / min^{-1}	0.0017 \pm 0.0003	0.00150 \pm 0.00020
K_{12} / min^{-1}	0.039 \pm 0.005	0.035 \pm 0.008
AUC/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{h}$	204 \pm 21	216 \pm 22
CL/ $\text{L}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}$	0.00041 \pm 0.00005	0.00004 \pm 0.00038

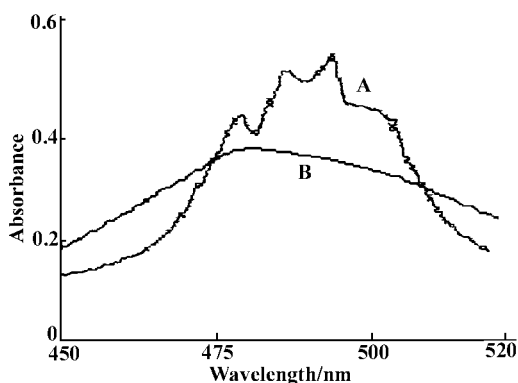


Figure 3 Comparison of the fluorescent excission spectrum of D-70 (A) and the UV-vis spectrum of ADM (B)

ADM: adriamycin; D-70: 4-(N,N'-dioctyl)aminor-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole

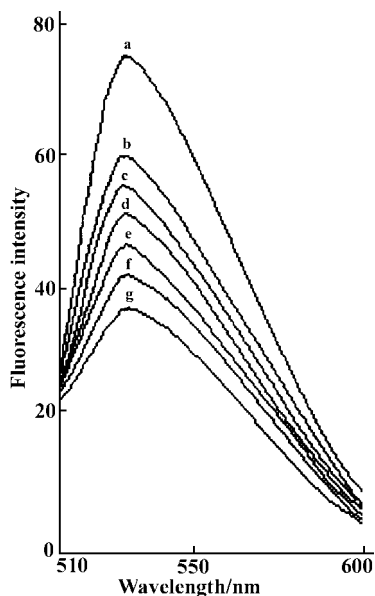


Figure 4 Fluorescent emission spectrum of D-70 with different ADM concentrations in blood of a rabbit
Concentration ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$): a. 0; b. 0.50; c. 0.99; d. 1.96; e. 4.76; f. 9.09; g. 16.67

8 D-70 固定方法的改进

溶胶凝胶法包埋分子探针已广泛应用于生物传感器中固定生物活性分子^[7-9],方法简便,较易保持分子探针的生物活性和反应性以及稳定性,并且可以通过控制温度和水解过程得到孔径适合的网状结构。由于血液环境的特殊性,我们选择了溶胶凝胶法固定分子探针并进行了改进。通常固定时常在较高温度下经过烧结,此法失去水分更多,形成孔径约为 $10 \text{ nm}^{[10]}$ 。本研究使用室温下多次重复固定方法,使其孔径形成在 $1 \sim 2 \mu\text{m}$ 之间(图5);这一结构在血液中非常有利,它能阻挡血细胞的进入,又能使药物分子自由进出,在最大程度上消除了血液成分对测定的干扰,使光纤能直接插入血管中进行血药浓度监测。

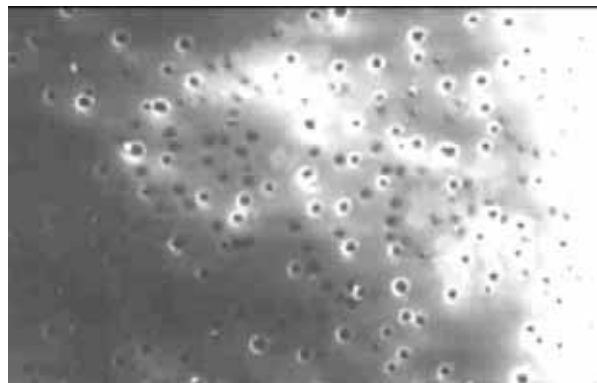


Figure 5 The electronmicrograph of the sensor probe ($\times 2000$)

本研究基于荧光分子探针的识别分离原理,应用溶胶凝胶法将 D-70 分子探针固定于光纤裸露端面,利用阿霉素对探针的荧光猝灭效应来检测其浓度变化。光纤化学传感器对阿霉素血药浓度的监测具有连续、实时、动态测定等特点,能客观地反映药物在生物组织中的经时变化过程,根据连续监测获得的药-时曲线,求解药代动力学参数,为临床合理用药提供依据。本研究也为在线在位监测其他生物体液中药物浓度及药物在生物体组织器官中的分布代谢提供了可以借鉴的新方法和新技术。

致谢: D-70 分子探针电镜照片由新疆大学电镜室提供。

REFERENCES:

- [1] Pan QC, Xu B. *Tumor Pharmacology and Chemotherapy* (肿瘤药理学与化学治疗学) [M]. Zhengzhou: Henan Medical University Press, 2000. 167 - 168.
- [2] Chen J, Li W, Yan C, et al. Characterization and application of PBA optic chemical film sensor based on fluorescence multiple quenching [J]. *Sci Sin C* (中国科学 C 辑), 1997, **40**(4): 414 - 415.
- [3] Gu YQ, Qing ZY, Tao BQ, et al. A new fiber optic sensor for detecting *in situ* the concentration of pharmaceuticals in blood [J]. *Sens Actuators (B)*, 2000, **66**(10): 197 - 199.
- [4] Li W, Chen J. Continuous *in vivo* monitoring of metronidazole in cerebrospinal fluid by a online flow-cell fiber optic chemical sensor system [J]. *Anal Chim Acta*, 1996, **331**(8): 103 - 109.
- [5] Editorial group of experimental animal anatomy in Nankai University. *Experimental Animal Anatomy* (实验动物解剖学) [M]. Beijing: People's Education Press, 1980. 30 - 32.
- [6] Shao ZG. Determination of concentration of adriamycin in serum by fluorescent method and study on pharmacokinetics in the rabbit [J]. *Chin J Hosp Pharm* (中国医院药学杂志), 1991, **11**(5): 200 - 201.
- [7] Sheila AG, Robert SG. Sol-gel-based fiber optic sensor blood pH measurement [J]. *SPIE Proc*, 1997, **2976**(12): 64 - 70.
- [8] Damian A, Maruszewski K, Podbielska H, et al. Sol-gel optodes for environmental and medical applications [J]. *SPIE Proc*, 1997, **2976**(19): 137 - 141.
- [9] Chan MA, Lawless JL, Lam SK, et al. Fiber optic oxygen sensor based on phosphorescence quenching of erythrosine B trapped in silica-gel glasses [J]. *Anal Chim Acta*, 2000, **408**(23): 33 - 37.
- [10] Bakul CD, Bruce D, Joan SV, et al. Sol-gel encapsulation methods for biosensors [J]. *Anal Chem*, 1994, **66**(22): 1120 - 1127.

CONTINUOUS MONITORING OF BLOOD ADRIAMYCIN USING A FIBER OPTIC CHEMICAL SENSOR IN RABBIT

LU Wen-xu¹, CHEN Jian²

(1. Department of Pharmacy, Tumor Hospital,
2. Department of Pharmacy, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

ABSTRACT: **AIM** To evaluate the feasibility and accuracy of continuous monitoring of drug with a fiber optic chemical sensor (FOCS) in animal. **METHODS** An accurate optical design was used to enhance the intensity of light from a 100- micron optic fiber and the fluorescence signal could be detected. A new sol-gel method was used to fix the fluorescence substance 4-(N, N'-dioctyl) amino-7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazole (D-70) on the body fiber. The vary quenching means the vary of the concentration of adriamycin (ADM) in rabbit blood. ADM was determined by FOCS based on the fluorescence multiple quenching. In a simple animal model, the carotid artery was catheterized with a cannula, housing a 100- micron optic fiber. **RESULTS** The recovery of ADM was 99.4% ~ 106.2%, the within-run and between-run RSDs were 6.6% ~ 11.4% and 5.9% ~ 11.7% respectively. The method permitted detection limits as low as $0.057 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ at a signal-to-noise ratio of 3. **CONCLUSION** Fiber optic chemical sensor is potentially useful for monitoring blood drug in biomedical field.

KEY WORDS: fiber optic chemical sensor; drug process monitor; adriamycin