DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.03.019
第26卷第3期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 3
238 2004年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)03-0238-04

CpG基序对幽门螺杆菌疫苗的免疫佐剂效应实验研究

郭桐生,冯 强,郭 刚,解庆华,邹全明 (第三军医大学医学检验系临床微生物和免疫学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨CpG在幽门螺杆菌疫苗研究中的佐剂效应。方法 将60只BALB/c小鼠分为4组,分别以*H. pylori*尿素酶B亚单位(rUreB)+CPG、rUreB+CT、单独UreB以及PBS进行口服免疫,ELISA检测胃、肠、气管冲洗液sIgA以及血清IgG亚类(IgG1,IgG2a),RT-PCR差异显示T淋巴细胞IFN-γ、IL-4 mRNA。结果 ①CpG+rUreB组在胃、肠、气管和血清产特异性抗体水平显著高于PBS组和单独rUreB组($P<0.01$),与CT+UreBs组差异不显著($P>0.05$);②抗原刺激后CpG+rUreB组T淋巴细胞表达的IFN-γ、IL-4 mRNA显著高于PBS组和rUreB组。结论 ①CpG可能是*H. pylori*疫苗研究中有效的粘膜佐剂;② CpG+rUreB组诱导的可能是Th1/Th2型免疫应答。

关键词:幽门螺杆菌;CpG基序;佐剂;尿素酶B亚单位
中图法分类号:R377;R392.7;R967 文献标识码:A

Adjuvant effects of CpG motif-containing oligodeoxynucleotide on *Helicobacter pylori* vaccine

GUO Tong-sheng, FENG Qiang, GUO Gang, XIE Qing-hua, ZOU Quan-ming (Department of Clinical Microbiology and Immunology, College of Laboratory Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To study the adjuvant effects of CpG motif-containing oligodeoxynucleotide (CpG) on *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) vaccine. Methods A total of 60 adult mice were divided randomly into four groups. Mice in groups Ⅰ, Ⅱ, Ⅲ and Ⅳ were orally immunized with recombinant *H. pylori* urease B subunit (rUreB) plus CpG, rUreB plus cholera toxin (CT), single rUreB, and phosphate-buffered saline (PBS), respectively. The specific secreting IgA (sIgA) and specific IgG subclasses (IgG1 and IgG2a) in gastric mucosa, intestinal mucosa of every mouse, tracheal mucosa were determined by ELISA. The expression levels of T cell cytokine IFN-γ and IL-4 mRNA in spleen were detected by RT-PCR. Results ① The levels of specific antibody in the gastric mucosa, intestinal mucosa, tracheal mucosa, and serum in group Ⅰ were significantly higher than those in group Ⅲ and group Ⅳ ($P<0.01$). ② The expression levels of IFN-γ and IL-4 mRNA of T cell in group Ⅰ after stimulation with antigens were significantly higher than those in group Ⅳ and group Ⅲ ($P<0.01$). Conclusion CpG may be the optimal mucosal adjuvant of *H. pylori* vaccine. Th1/Th2 type immune response might be induced by oral immunization with CpG+rUreB.

Key words: *Helicobacter pylori*; CpG motif; adjuvant; urease B subunit

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, *H. pylori*)感染率在世界人群中达到50%以上,可引起多种上消化道疾病,并与胃癌等胃部恶性肿瘤的发生密切相关。但是,现阶段临床上*H. pylori*感染治疗效果并不理想,*H. pylori*疫苗提供预防和治疗*H. pylori*感染新途径。但是单纯*H. pylori*抗原通过粘膜途径免疫常不能诱发足够的抗*H. pylori*感染的免疫应答,而通过采用合适的佐剂来增强抗原的免疫原性,可获得理想的免疫效应。含CpG基序的寡聚脱氧核苷酸(CpG-containing oligodeoxynucleotide, CpG)是一种有效的免疫佐剂[1~3],尚少见应用于*H. pylori*疫苗研究中的报道。本实验以本室构建纯化的*H. pylori*保护性抗原尿素酶B亚单位(rUreB)为抗原,CpG为佐剂口服免疫BALB/c小鼠,并以霍乱毒素(cholera toxin, CT)佐剂为对照,观察

基金项目:国家重点科技攻关计划项目(96-901-01-54),"863"生物与现代农业技术领域生物工程技术主题课题(2001AA215161)
Supported by the National Key Sci &Tech Research of China (96-901-01-54) and the National "863" Key Research Project of China (2001AA215161)
作者简介:郭桐生(1973-),男,河南省南阳市人,硕士研究生,技师,主要从事幽门螺杆菌感染和疫苗防治免疫机制方面的研究。电话:(023)68753590
通信作者:邹全明,电话:(023)68752316,E-mail:clinimmu@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2003-06-26;修回日期:2003-08-30

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

小鼠免疫后免疫效果, 探讨免疫应答机制, 为 *H. pylori* 疫苗佐剂选择研究提供参考。

1　材料和方法

1.1　动物

BALB/c 小鼠 60 只, 6~8 周龄, 雌性, SPF 级, 体质量 18~22 g, 购于四川大学实验动物中心, 动物质量合格证号: 医动字第 24101110 号。

1.2　主要试剂

CpG: 1826 # 5′-TCCATGACGTTCCTGACGTT-3′, 上海生工合成; rUreB: 本室构建纯化, 纯度≥ 90%; CT: Sigma; 生物素标记的羊抗小鼠 IgA、HRP 标记的羊抗小鼠 IgG1、HRP 标记的羊抗小鼠 IgG2a: 深圳晶美公司; Percoll 分离液: Sigma 公司; RPMI1640 培养液、96 孔细胞培养板: Gibco 公司; Tripure RNA 抽提试剂盒、RT-PCR 试剂盒: Promeage 等。

1.3　PCR 引物的设计

GenBank 中查出小鼠β-actin、IFN-γ、IL-4 的 cDNA 序列, primer primier 5.0 软件设计 PCR 引物, 引物如表 1。

通过同源性比较, 以上均为特异性引物。所有引物由上海 Sangon 公司合成, PAGE 纯化。

表 1　RT-PCR 扩增引物序列

Tab 1　Oligonucleotide sequences of 5′ and 3′ primers for RT-PCR

	Foreward	Downward	Size of PCR product
β-actin	5′-ATCCGTAAAGACCTCTATGCCAACA-3′	5′-GTCGCCTTCACCGTTCCAGTTT-3′	479 bp
IFN-γ	5′-AACTCAAGTGGCATAGATGTGG-3′	5′-GACCTCAAACTTGGCAATACTC-3′	252 bp
IL-4	5′-TGTCATCCTGCTCTTCTTTCTC-3′	5′-TGATGCTCTTTAGGCTTTCCAG-3′	380 bp

1.4　动物分组

60 只 BALB/c 小鼠随机分为 CpG(10 μg/只/次)+ rUreB 组、CT(1 μg/只/次)+ rUreB 组、rUreB 组、PBS 组, 每组 15 只。小鼠免疫前 24 h 禁食、水, 0.3 ml 胃酸中和液中和胃酸, 20 min 后免疫(共 4 次), 间隔 7 d。

1.5　胃、肠、气管冲洗液特异性 sIgA 以及血清 IgG 亚类(IgG1、IgG2a)检测

rUreB 用包被液稀释至 5 μg/ml, 100 μl/孔包被 ELISA 板或细胞培养板, 4 ℃过夜。洗涤 4 次。每孔加入 200 μl 1% BSA, 37 ℃封闭 2 h, 洗涤 4 次后, 4 ℃保存。

胃、肠、气管冲洗液特异性抗体水平采用 ABC-ELISA 检测, 稀释倍数分别为: 肠粘液(1∶4)、粘液(1∶5)、气管冲洗液(1∶10)。100 μl/孔加入包被的 ELISA 板, 37 ℃, 60 min, 洗涤 4 次, 加入生物素标记的羊抗鼠 IgA(1∶1 000), 100 μl/孔, 37 ℃, 60 min, 洗涤 4 次, 加入 HRP 标记的亲和素(1∶5 000), 100 μl/孔, 37 ℃, 60 min, 洗涤 4 次, 加入 OPD 底物显色液, 室温避光反应 30 min, 50 μl 2 mol/L H_2SO_4 终止反应, 以 PBS 孔作空白对照, 492 nm 测定各孔 *A* 值。

血清特异性 IgG1 和 IgG2a 的检测: 1∶100 倍稀释待检血清, 100 μl/孔, 加入 ELISA 板, 37 ℃, 60 min, 洗涤 4 次, 加入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG1 或 IgG2a(1∶2 000), 100 μl/孔, 37 ℃, 60 min, 洗涤 4 次, 加入 OPD 底物显色液, 室温避光反应 30 min, 50 μl 2 mol/L H_2SO_4 终止反应, PBS 孔作空白对照, 492 nm 测定各孔 *A* 值。

1.6　RT-PCR 半定量显示淋巴细胞 IFN-γ、IL-4 mRNA 表达的差异

各免疫组小鼠脾淋巴细胞的分离及抗原特异性诱导增殖试验参照文献[4]进行。200 目不锈钢网细胞筛研磨脾组织, 收集过滤的组织细胞悬液, 70% Percoll 分离液和尼龙棉柱分离 T 淋巴细胞。5×10^6/ml T 淋巴细胞加入细胞培养板, 同时加 rUreB(100 μg/ml); 分别提取抗原刺激 0、3 d 的 T 淋巴细胞的总 RNA, RT-PCR 法分析抗原刺激 0、3 d 的 T 淋巴细胞 IFN-γ、IL-4、β-actin mRNA 表达水平。总 RNA 的提取, 按 TripureTM 总 RNA 抽提试剂盒说明书进行; PCR 引物如表 1 所示, PCR 反应条参数 94 ℃ 5 min 预变性, 94 ℃ 45 s、60 ℃ 30 s(IFN-γ、β-actin)、58 ℃ 30 s(IL-4)、72 ℃ 30 s, 35 循环 72 ℃ 10 min。2%琼脂糖电泳, UVP 紫外凝胶扫描分析仪分析扩增产物, 得到各产物的 V 值, 以同一批抗原刺激 0 d 的为 100%, PBS 组抗原刺激 0 d 的 RT-PCR 产物值 V_{B0}, 3 d 的为 V_{Bx}, 其它组抗原刺激 0 d 的 RT-PCR 产物值 V_0, 3 d 的为 V_x, $\frac{Vx}{VBx}/\frac{Vo}{VBo}$ 代表样本目的基因的相对表达量。

1.7　统计学处理

采用 SPSS10.0 软件处理, *t* 检验、χ^2 检验。

2　结果

2.1　胃、肠、气管冲洗液特异性 sIgA 以及血清 IgG1、IgG2a 检测结果

小鼠口服免疫后, rUreB 组胃、肠、气管冲洗液特异性 sIgA 和血清特异性 IgG1、IgG2a 抗体水平均未见显著升高, 且与 PBS 组相差不显著($P>0.05$); 而 CpG+ rUreB 和 CT+ rUreB 组胃、肠、气管冲洗液特异性 sIgA 和血清特异性 IgG 亚类抗体水平均显著高于 PBS 组对应抗体水平($P<0.01$), 而且显著高于 rUreB 组对应抗体水平($P<0.01$); CpG+ rUreB 组除血清 IgG2a 水平显著高于 CT+ rUreB 组血清 IgG2a 水平, 其它特异性抗体水平与 CT+ rUreB 组对应抗体水平相差不显著($P>0.05$), 见表 2。

2.2　RT-PCR 差异显示淋巴细胞 IFN-γ、IL-4 mRNA 表达结果

抗原刺激后第 3 天, 淋巴细胞β-actin mRNA 表达量基本没有变化, 说明各批次抽提的总 RNA 和反转录效率基本保持一致。PBS 对照组 IL-4、IFN-γmRNA 相对表达量基本没有变化, ($P>0.05$); rUREB 组 IL-4、IFN-γmRNA 相对表达量增加幅度很小, ($P>0.05$); CpG+ rUreB 组脾淋巴细胞经抗原刺激 3 d 后 IL-4 mRNA 增加了 5.13 倍, IFN-γmRNA 增加了 5.74 倍 CT+ rUreB 组 IL-4、IFN-γmRNA 相对表达量在抗原刺激后也显著增加($P<0.01$), 见表 3。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 2 各免疫组特异性抗体结果($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Antibody levels in each immune group ($\bar{x}\pm s$)

Group	sIgA of gastric fluid	sIgA of intestinal fluid	sIgA of tracheal fluid	Serum IgG1	Serum IgG2a
PBS	0.100±0.038	0.103±0.011	0.099±0.025	0.097±0.009	0.109±0.016
rUreB	0.169±0.052 *	0.165±0.082 *	0.142±0.079 *	0.141±0.039 *	0.151±0.042 *
CpG+rUreB	1.968±0.288 #△	2.097±0.369 #△	0.955±0.146 #△	1.096±0.147 #△	0.924±0.119 #△△
CT+rUreB	2.241±0.368	2.511±0.372	1.067±0.162	1.195±0.152	0.581±0.061

*: $P>0.05$, *vs* PBS; #: $P<0.01$, *vs* PBS; △: $P<0.01$, *vs* CT+rUreB

表 3 T 淋巴细胞抗原刺激后 IL-4 和 IFN-γ 表达水平(%)

Tab 3 IL-4 and IFN-γ mRNA expression levels after stimulation with antigen(%)

Group	β-actin		IL-4		IFN-γ	
	0 d	3rd d	0 d	3rd d	0 d	3rd d
PBS	100	107	100	113	100	107
rUreB	100	95	100	128#	100	176#
CpG+rUreB	100	90	100	613△	100	674△
CT+rUreB	100	92	100	754△	100	236△

*: "0 day" product value: 100%

3 讨论

幽门螺杆菌是上消化道感染重要致病菌,目前已经确认 *H. pylori* 与上消化道疾病中的 4 种疾病密切相关:①慢性胃炎;②消化性溃疡;③胃癌;④胃粘膜相关淋巴样组织恶性淋巴瘤[5~9]。世界卫生组织已将 *H. pylori* 列入Ⅰ类致癌因子[10]。

H. pylori 世界人群感染率超过 50%,而且 *H. pylori* 非常顽固,一旦受感染,如非采用正规方案治疗将终身受累。然而 *H. pylori* 的防治并不乐观,现阶段临床上主要应用抗生素加铋剂或 H+拮抗剂治疗 *H. pylori* 感染[11]:①疗效不稳定,易复发;②易产生耐药性;③毒副反应大;④医疗费用昂贵。研发有效的 *H. pylori* 疫苗特别是口服疫苗成为根除 *H. pylori* 感染的希望。

由于粘膜免疫系统特殊性,单纯可溶性抗原经粘膜途径免疫很难激发粘膜和系统免疫应答,必须辅以合适的粘膜佐剂才能激发免疫应答。在 *H. pylori* 疫苗研究中,寻找高效安全的佐剂也成为 *H. pylori* 粘膜疫苗开发中的一个重点。当前 *H. pylori* 疫苗的研究中使用最多的粘膜佐剂是 CT 和大肠杆菌不耐热肠毒素(heat labile toxin of enterotoxigenic *E. coli*, LT),但是 CT 和 LT 对人具有较强的毒性,限制了它们的应用。寻找新的无毒、高效粘膜佐剂成为 *H. pylori* 疫苗研究的一个重点。

CpG 是一些以未甲基化的 CpG 基序为核心的寡聚脱氧核苷酸,具有强烈的免疫激活功能,主要存在于病毒、细菌及无脊椎动物的基因组中[12]。

Moldoveanu 等[2] 用 CpG 作为佐剂,以福尔马林灭活的感冒病毒为抗原滴鼻免疫小鼠,测得血清中的 IgG 和鼻粘膜 sIgA 的滴度比无佐剂对照组显著增高,认为 CpG 可能是很好的粘膜佐剂,第一次证明 CpG 具有粘膜佐剂作用。McCluskie 等[3] 以乙肝表面抗原加 CpG 滴鼻免疫小鼠,发现无论诱导粘膜免疫还是系统免疫应答,CpG 的作用均强于 CT。而且 CpG 与 CT 还有协同作用,二者合用时,免疫增强作用强于单独应用 CT 时的 10 倍。与 CT 佐剂比较,CpG 的佐剂性似乎更胜一筹。

CpG 佐剂作用机制可能与以下因素有关:①CpG 具有直接激活 B 细胞、树突细胞、巨噬细胞的功能;②在受 CpG 作用的抗原提呈细胞中,促进 IL-12 的分泌,IL-12 能激活自然杀伤细胞分泌 IFN-γ,在 IFN-γ 和 Th1 辅助 T 细胞配合下,MHC-Ⅰ类表面分子提呈抗原,激活细胞毒 T 细胞成熟分化,导致细胞免疫反应;有抗原存在时,CpG 能促进 B 细胞分泌的 IL-6 和 Th1 细胞及其他细胞因子共同激活 B 细胞成熟分化为浆细胞;③CpG 可被 B 细胞、单核细胞、巨噬细胞等内吞以小泡形式进入细胞,小泡与内体融合,使细胞产生活性氧成分(ROS),ROS 作为第二信号激活转录因子 NF-κB,通过 NF-κB 促进一些细胞因子的基因转录,进一步促进免疫应答[13~15]。

迄今为止还没有 CpG 在 *H. pylori* 疫苗研究中应用的文献报道,本研究以 CpG 为佐剂、rUreB 为抗原口服免疫 BALB/c 小鼠,在胃冲洗液、肠冲洗液、气管冲洗液均产生较高抗体滴度,与 CT 佐剂组免疫强度相差不显著,提示 CpG 可能是 *H. pylori* 疫苗研究中较好的粘膜佐剂。

抗体产生的过程可能是抗原在胃肠道被 M 细胞摄取,经抗原提呈细胞处理后,呈递给 B 细胞,同时派伊尔氏结的 T 细胞被激活,促使未成熟的 B 细胞致敏,这些致敏淋巴细胞离开淋巴结,流经淋巴管和肠系膜淋巴结,进入体循环,最后大部分淋巴细胞归巢胃肠固有层和其它粘膜效应部位。进入体循环可能激发系统免疫,产生 IgG;归巢到粘膜系统的 B 细胞在 T 细胞,主要是 $CD4^+$ T 细胞作用下分化,B 细胞进行型转换进而形成抗原特异性 IgA+B 细胞,产生 IgA[16~18]。

Guy 等[19] 以尿素酶加佐剂产生强的 Th1、Th2 型免疫应答保护作用好于尿素酶所加佐剂产生 Th2 占优势的免疫应答,认为 Th1/Th2 型免疫应答更有利于完全保护作用。本实验对 CpG+rUreB 组血清特异性 IgG1 和 IgG2a 以及 T 淋巴细胞 IFN-γ 和 IL-4 mRNA 相对表

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

达量检测，显示 CpG 佐剂诱导的可能是 Th1/Th2 型免疫应答，这可能有利于免疫保护作用，但是本研究还有待于攻毒保护试验验证。

参考文献：

[1] Krieg A M. Mechanisms and applications of immune stimulatory CpG oligodeoxynucleotides[J]. Biochim Biophys Acta, 1999, 1489(1): 107—116.
[2] Moldoveanu Z, LoveHoman L, Huang W Q, *et al*. CpG DNA, a novel immune enhancer for systemic and mucosal immunization with influenza virus [J]. Vaccine, 1998, 16(11—12): 1216—1224.
[3] McCluskie M J, Weeratna R D, Clements J D, *et al*. Mucosal immunization of mice using CpG DNA and/or mutants of the heat-labile enterotoxin of *Escherichia coli* as adjuvants[J]. Vaccine, 2001, 19(27): 3759—3768.
[4] Uchida K, Okazaki K, Debrecceni A, *et al*. Analysis of cytokines in the early development of gastric secondary lymphoid follicles in *Helicobacter pylori*-infected BALB/c mice with neonatal thymectomy[J]. Infect Immun, 2001, 69(11): 6749—6754.
[5] Nomura A, Stemmermann G N, Chyou P H, *et al*. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii[J]. N Engl J Med, 1991, 325(16): 1132—1136.
[6] Parsonnet J, Friedman G D, Vandersteen D P, *et al*. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma[J]. N Engl J Med, 1991, 325(16): 1127—1131.
[7] Blaser M J, Parsonnet J. Parasitism by the "slow" bacterium *Heliccobacter pylori* leads to altered gastric homeostasis and neoplasia[J]. J Clin, 1994, 94(1): 4—8.
[8] Dunn B E, Cohen H, Blaser M J. *Helicobater pylori*[J]. Clin Microbiol Rev, 1997, 10(4): 720—741.
[9] Parsonnet J, Shmuely H, Haggerty T. Fecal and oral shedding of *Helicobacter pylori* from healthy infected adults[J]. JAMA, 1999, 282(23): 2240—2245.
[10] Anonymous. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC working group on the evaluation of carcinogenic risks to Humans[J]. IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum, 1994, 61: 1—241.
[11] 胡伏莲. 关于幽门螺杆菌感染治疗研究中存在的问题[J]. 中华消化杂志, 1995, 15(Suppl): 61—62.
[12] Krieg A M, Yi A K, Matson S, *et al*. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation[J]. Nature, 1995, 374(6522): 546—549.
[13] Davis H L, Weeranta R D, Waldschmidt T J, *et al*. CpG DNA is a potent enhancer of specific immunity in mice immunized with recombinant hepatitis B surface antigen[J]. J Immunol, 1998, 160(2): 870—876.
[14] Tascon R E, Ragno S, Lowrie B, *et al*. Immunostimulatory bacterial DNA sequences activate dendritic cells and promote priming and differentiation of $CD8^+$ T cells[J]. Immunology, 2000, 99(1): 1—7.
[15] Bohle B, Orel L, Kraft D, *et al*. Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs induce low levels of TNF-α in human B lymphocytes: possible adjuvants for Th1 responses[J]. J Immunol, 2001, 166(6): 3743—3748.
[16] Beagley K W, Eldridge J H, Kiyono H, *et al*. Recombinant murine IL-5 induces high rate IgA synthesis in cycling IgA-positive Peyer's patch B cells[J]. J Immunol, 1988, 141(6): 2035—2042.
[17] Harriman G R, Kunimoto D Y, Elliott J F, *et al*. The role of IL—5 in IgA B cell differentiation[J]. J Immunol, 1988, 140(9): 3033—3039.
[18] Beagley K W, Eldridge J H, Lee F, *et al*. Interleukins and IgA synthesis. Human and murine interleukin 6 induce high rate IgA secretion in IgA-committed B cells[J]. J Exp Med, 1989, 169(6): 2133—2148.
[19] Guy B, Hessler C, Fourage S, *et al*. Systemic immunization with urease protects mice against *Heliobacter pylori* infection[J]. Vaccine, 1998, 16(8): 850—856.

（编辑 陈聪连）

文章编号：1000-5404(2004)03-0241-01

个案与短篇

酮康唑乳膏的制备及临床应用

Preparation and clinical application of Ketoconazole cream

李建平[1]，温 悦[1]，赵莉蓉[2]（第三军医大学大坪医院野战外科研究所：[1]药剂科，[2]皮肤科，重庆 400042）

1 药物制备

酮康唑 20 g，二甲亚砜 50 ml，乳膏基质适量，全量 1 000 g。取酮康唑溶于二甲亚砜中（水浴加热溶解）。另配乳膏基质，在乳化中温度降至 60 ℃左右加入酮康唑二甲亚砜液，搅匀，至冷，即得。

2 质量标准

2.1 性状

本品为乳白色膏状半固体外用制剂。

2.2 定性检测

取本品约 0.5 g，加 0.1 mol/L 盐酸溶液 10 ml，水浴加热，再冷却，滤过，滤液中加碘化铋试液数滴，即生成橙红色沉淀。

2.3 定量测定[2]

2.3.1 实验条件的选择 精密称取酮康唑适量，用 0.1 mol/L 盐酸溶液溶解并稀释成 3 种不同浓度的溶液，以 0.1 mol/L 盐酸溶液为空白，在 200～600 nm 波长范围内扫描，分别测定零阶和一阶导数光谱。通过测定空白基质和酮康唑在零阶导数图谱有明显重叠，表明空白基质对酮康唑测定有干扰。一阶导数图谱中酮康唑在 228 nm 波长处的波谷有一振幅，此处空白基质吸收为零，因此选择 228 nm 波长的波谷振幅为定量信息。

2.3.2 标准曲线的制备 精密称取干燥至恒重的酮康唑

（下转 244 页）

作者简介：李建平（1955—），女，河北省平山县人，副主任医师，主要从事药学专业方面的研究，发表论文 15 篇。电话：(023) 68757420

收稿日期：2003-02-01；修回日期：2003-04-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net