

荧光分析法在药物分析中的应用研究进展

王永利¹, 张江伟¹, 王立华¹, 敖登高娃², 黄慧婷¹, 李美红¹

(1. 河北北方学院应用化学研究所, 河北 张家口 075000;

2. 内蒙古大学化学化工学院, 呼和浩特 010021)

[摘要] 对常用的荧光分析方法和新型荧光分析在药物分析中的应用进行了评述。常用荧光分析方法有胶束增敏荧光分析法、反相胶束增敏荧光分析法、稀土荧光探针法和同步荧光分析法; 新型的荧光分析法有荧光猝灭分析法、化学计量学方法、色谱-荧光联用技术和流动注射-荧光检测技术。认为, 目前荧光分析法的主要发展趋势是: 进一步寻找对药物荧光增强效果更好的胶束体系; 详细研究荧光探针的作用机理, 寻求专属性强、灵敏度更高、制备更简便的稀土荧光探针; 联合多种检测技术, 探索多组分复杂组成的样品的快速、准确检测的方法。

[关键词] 荧光分析法; 药物分析; 胶束增敏

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)12-0253-03

Research Progress of Fluorimetry in Pharmaceutical Analysis

WANG Yong-li¹, ZHANG Jiang-wei¹, WANG Li-hua¹, Aodeng Gao-wa², HUANG Hui-ting¹, LI Mei-hong²

(1. Institute of Applied Chemistry of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China;

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Inner Mongolia University, Hohhot 010021, China)

[Abstract] Fluorescence analysis has been widely used in various pharmaceutical analysis of compound drug and body liquid for its high sensitive, selective, simple, reproducible and less consumed characteristic features. In this paper, the application of common and new type fluorescence analysis in pharmaceutical analysis was signified. The main fluorescent analysis methods include glue beam radio sensitizing fluorescence analysis, inverse glue beam radio sensitizing fluorescence analysis, rare earth fluorescence probe method and synchronous fluorescence analysis. New type of fluorescence analysis have fluorescence destroy analysis, chemo metrics methods, chromatography coupled techniques and fluorescence flow injection fluorimetry testing technology. Meanwhile, the main tendency was prospected.

[Key words] fluorimetry; pharmaceutical; analysis; apply

荧光指物质分子因吸收外来辐射的光子能量而从基态激发至激发态, 再由第一电子激发单重态所产生的辐射跃迁返回到基态而伴随的发光现象^[1]。利用物质的荧光特性对物质样品进行定性和定量分析的方法称为荧光分析法。药物分析是分析化学原理、方法和技术在药学研究及生命科学

研究领域中的具体应用, 是药物化学与分析化学的结合^[2]。

荧光分析法具有高灵敏度、高选择性、信息量丰富、检测限低等众多优点。但由于自身具有发射荧光特性的物质相对较少, 许多有机药物分子所含基团对荧光光谱有吸收, 导致荧光减弱甚至熄灭。还有许多药物成分的荧光光谱重叠严重而相互干扰, 致使常规荧光分析法在药物分析中的应用受到限制。此外, 拉曼峰和散射光的背景干扰, 也使常规荧光分析法的灵敏度和选择性受到了影响。为了解决常规荧光分析法存在的诸多问题, 近年来, 发展了各种新型荧光分析技术。

1 常用的荧光分析方法

1.1 胶束增敏荧光分析法 胶束增敏荧光分析法是指在溶

[收稿日期] 2011-03-06

[基金项目] 张家口市科学技术研究与发展计划项目 (0921100D)

[第一作者] 王永利, 河北北方学院讲师, 硕士, 从事应用化学研究, Tel: 18931316766, E-mail: fanguanguiju@163.com

液中使表面活性剂与荧光分子发生缔合,采用溶液化学和专属性荧光基团的方法来改进荧光法的检测和专属性的一种荧光分析法。它具有增敏、增稳、增溶等许多优点,由于其灵敏度高,选择性好,操作简便,被认为是痕量分析中最有前途的新领域。

应用该方法进行药物分析主要是找出合适的胶束体系,目前已报道的胶束体系以十二烷基硫酸钠居多;敖登高娃等^[3]测定了在表面活性剂十二烷基硫酸钠存在下氟罗沙星的含量。由于胶束的生成,使氟罗沙星自身荧光大大增强。在胶束体系中,选择 $\lambda_{\text{ex}} = 290 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 450 \text{ nm}$, 最佳 pH 4.5 ~ 5.5, 建立了在十二烷基硫酸钠胶束体系中测定氟罗沙星的新方法,该方法可直接用于药物制剂中氟罗沙星含量的测定。王晓霞等^[4]研究了氟比洛芬在不同胶束体系中的荧光特性,发现在酸性介质中十二烷基硫酸钠对氟比洛芬的荧光有较强的增敏作用。梁丽华等^[5]研究发现在酸性介质中十二烷基硫酸钠对吡哌酸有较强的增敏作用,在胶束体系中选择波长 $\lambda_{\text{ex}} = 277 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 439 \text{ nm}$, 最佳 pH 5.0。齐岩松^[6]等研究发现在 pH 5.0 的醋酸-醋酸钠缓冲溶液中十二烷基硫酸钠对加替沙星的荧光有显著增敏作用,在胶束体系中选择 $\lambda_{\text{ex}} = 277 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 439 \text{ nm}$, 加替沙星的检出限为 $2.3 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。张莹等^[7]研究了环丙沙星-Al-十二烷基磺酸钠体系,由于生成胶束多元络物,而使环丙沙星在体系微环境中减少了其分子内活化过程及荧光猝灭效应,增加了单重态分子总数,提高了荧光强度。

1.2 反相胶束增敏荧光分析法 反相胶束是两性分子溶于非极性溶剂和少量的水中,自发形成的一个热力学稳定的、光学透明的球形有序聚集体。它具有极性内核,能增溶水溶性或极性分子,并将溶质限制在其有限空间里,从而增加了发光体有效浓度,显著地提高了荧光强度。反相胶束增敏荧光法具有灵敏度高,线性范围宽,操作简单等特点。

白小红等^[8,9]研究了双[2-乙基己基]-磺酸基琥珀酸/环己烷/水(AOT/ $\text{C}_6\text{H}_{12}/\text{H}_2\text{O}$)反相胶束介质中中药有效成分盐酸小檗碱的荧光性质。还研究了双[2-乙基己基]-磺酸基琥珀酸(气溶胶 OT 或 AOT)/环己烷/水反相胶束介质中中药有效成分氯原酸的荧光性质,发现氯原酸在上述反相胶束体系中,不仅荧光有增强现象,而且分子激发和发射光谱发生红移。据此建立了反相胶束增敏室温荧光法测定氯原酸的新方法。

1.3 稀土荧光探针法 稀土离子可以与多种有机化合物形成配合物,用合适的激发光激发该稀土有机配合物,配合物中的配体分子可以吸收激发光,然后通过分子内能量转移的方式将吸收的能量传递给稀土离子,从而发射稀土离子的特征荧光。因为稀土离子荧光探针具有斯托克斯位移大、荧光寿命长、发光强度大、选择性好、荧光稳定以及受外界影响小等优点,使一些本来不发荧光,或者量子产率很低的荧光测试成为可能,所以稀土离子荧光探针法成为一种非常重要的定量检测手段。

李文静等^[10]研究发现,在 pH 8.10 的条件下, Eu^{3+} 和依诺沙星能形成配合物,配合物内发生分子间能量转移,镧离子发射特征荧光,加入阴离子表面活性剂十二烷基硫酸钠后,体系的荧光强度增强,其最大激发和发射波长分别为 273, 615 nm, 依诺沙星的检出限为 $1.2 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。王磊等^[11]研究了加替沙星-镧-十二烷基苯磺酸钠三元体系的荧光光谱,选择的测定条件为 $\lambda_{\text{ex}} = 338 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 617 \text{ nm}$ 处,最佳 pH 7.5。加替沙星的检出限可达 $1.0 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.4 同步荧光分析法 同步荧光分析法可有效消除背景的干扰,特别是克服了样品繁琐的预处理过程,不经分离就可测定。由于该方法具有很高灵敏性和选择性,已成为检测多组分体系的最有效手段。

马丽英等^[12]研究发现由于乙酰丙酮-甲醛与盐酸普鲁卡因的发射峰有部分重叠,存在严重干扰,采用正常荧光方法无法进行盐酸普鲁卡因的测定,而利用同步荧光法可解决此问题。代刚等^[13]研究发现在 pH 6.3 的 $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ 缓冲溶液介质中,铝离子对依诺沙星荧光具有增敏作用,在此基础上用 $\Delta\lambda = 60 \text{ nm}$ 的同步荧光技术建立了测定人体尿液中依诺沙星含量的同步荧光光谱法。张先廷等^[14]研究发现,在中性水溶液中加入加替沙星的荧光较弱,并且加替沙星与尿样背景荧光的发射波长部分重叠,采用通常的荧光光谱法无法测定。而当 pH 4.1 时,加替沙星发射的荧光显著增强,荧光发射波长由 450 nm 红移至 478 nm,同时尿样背景荧光则由中性水溶液中的 370 nm 紫移到 355 nm。选择 $\Delta\lambda = 90 \text{ nm}$, 测定其荧光强度,加替沙星的检出限为 $0.04 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

目前,同步荧光分析法与导数技术连用成为该方法的主要发展方向,这将进一步促进同步荧光技术在药物分析领域的发展和运用。张敏等^[15]利用导数-同步荧光法测定了三月泡叶中总黄酮的含量。应用该方法可避免散射光对测定的干扰,使结果更清晰、准确,总黄酮的检出限可达 $1.27 \times 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2 新型的荧光分析法

2.1 荧光猝灭分析法 对于某些药物,可以利用其对某一特定体系的荧光猝灭作用进行定量测定。庞志功等^[16]利用苦参碱和氧化苦参碱对荧光试剂乙酸乙烯酯的定量猝灭作用,建立了测定苦参碱和氧化苦参碱的荧光分析方法。阿娟等^[17]利用甲硝唑可使十二烷基硫酸钠的荧光强度猝灭,建立了荧光猝灭分光光度法测定甲硝唑含量的方法。

2.2 化学计量学方法 化学计量学是数学、统计学、计算机技术和化学相结合的交叉学科。荧光分析法易受到散射光的干扰,无法同时分析多组样品,化学计量学方法可以借助“数学分离”代替复杂的化学分离,很好地解决这个问题。江军朵等^[18]利用化学计量学交替惩罚三线性分解二阶校正算法结合荧光分析,在有干扰药物及牛奶中干扰组分共存下,对牛奶中的洛美沙星进行快速分析测定。韩清娟等^[19]利用化学计量学三维数据校正方法中的交替三线性分解算法和自加权交替三线性分解算法,不经化学分离,对采用激

发-发射矩阵荧光法所得到的三维响应数据阵进行三线性成分分解,再基于标样已知浓度,利用简单回归法直接测定了尿液中利血平的含量。王雪梅等^[20]发现香蕉提取液中的内源物质背景光谱与待测组分双苯三唑醇(BIT)的荧光光谱严重重叠,给BIT的直接定量测定带来系统误差。选用具有“二阶优势”的化学计量学方法与三维荧光分析相结合的方法,可以很好地对香蕉提取液中BIT的含量进行直接快速测定。

2.3 色谱-荧光联用技术 色谱分离模式多种多样,适用范围广,是解决复杂体系中混合物分离分析的高效手段。色谱-荧光联用技术是色谱技术和荧光技术的结合,具有色谱的快速分离和荧光的检测灵敏的特点。陈晓玲等^[21]建立了应用高效液相色谱联合荧光分析法测定血浆中替米沙坦浓度的新方法。该法可用于替米沙坦的血药浓度测定和药代动力学研究。马建明等^[22]应用高效液相色谱-荧光分析法测定了河鲫鱼中残留的诺氟沙星含量。

2.4 流动注射-荧光检测技术 基于流动注射分析本身所具有的分析速度快等优点,再结合光化学荧光法灵敏性、简便性和选择性等优点,形成了流动注射光化学荧光法。高瑞等^[23]研究了流动注射时间扫描荧光分析法测定青霉素V钾的新方法。肖忠柏等^[24]研究了十二烷基苯磺酸钠胶束介质中盐酸小檗碱的荧光性质,应用流动注射技术测定盐酸小檗碱的浓度。赵一兵等^[25]提出了流动注射碱性降解分光法快速测定微量金霉素的方法。

3 展望

荧光分析法具有经济、简便、灵敏度高和选择性好的优点,是一种重要且用途广泛的光谱分析手段。随着新药的不断出现以及生命科学的快速发展,常规的荧光分析法面临着新的挑战,开发更加高效、灵敏、痕量和自动化的新型荧光分析技术是药物分析工作的迫切需要。目前,荧光分析法的主要发展趋势是:进一步寻找对药物荧光增强效果更好的胶束体系;详细研究荧光探针的作用机理,寻求专属性强、灵敏度更高、制备更简便的稀土荧光探针;联合多种检测技术,探索多组分复杂组成的样品的快速、准确检测的方法;加强与计算机技术结合,研制出更加自动化和智能化的荧光分析仪器,以便更加迅速简便地完成药物的定性和定量分析。

[参考文献]

[1] 陈国珍,王贤智,郑朱梓. 荧光分析法[M]. 北京:科学出版社,1990.
 [2] 陶玉龙. 喹诺酮类药物和生物大分子的荧光分析方法研究与应用[D]. 呼和浩特:内蒙古大学,2007:6.
 [3] 敖登高娃,刘惠民. 氟罗沙星在胶束体系中的荧光特性研究及应用[J]. 内蒙古大学学报,2006,37(5):513.
 [4] 王晓霞,敖登高娃,阿娟. 胶束增敏荧光法测定氟比洛芬的含量[J]. 内蒙古大学学报:自然科学版,2009,40(4):431.

[5] 梁丽华,王静萍,杜黎明. 胶束增敏荧光光谱法测定吡哌酸[J]. 分析科学学报,2003,19(3):237.
 [6] 齐岩松,代钢,敖登高娃. 胶束增敏荧光光谱法测定加替沙星及其制剂[J]. 药物分析杂志,2006,26(6):767.
 [7] 张莹,敖登高娃. 环丙沙星-Al络合物在胶束体系中的荧光特性研究及环丙沙星片的含量测定[J]. 药物分析杂志,2004,24(3):339.
 [8] 白小红,魏雁声,刘长松. 反相胶束增敏荧光法测定兔血浆中痕量盐酸小檗碱的研究[J]. 分析科学学报,1999,15(5):363.
 [9] 白小红,魏雁声,齐竹华,等. 反相胶束增敏室温荧光法测定中药痕量有效成分氟原酸的研究[J]. 分析试验室,1999,18(1):35.
 [10] 李文静,敖登高娃,张佩麟. 以铈离子为荧光探针测定痕量依诺沙星[J]. 稀土,2005,26(4):46.
 [11] 王磊,郭常川. 稀土离子-加替沙星配合物荧光新体系的研究与分析应用[D]. 济南:山东大学,2009:23.
 [12] 马丽英,姜吉刚,冯霞光,等. 乙酰丙酮-甲醛为荧光衍生试剂同步荧光法测定胺类物质[J]. 化学工程师,2009,23(3):24.
 [13] 代钢,敖登高娃. 同步荧光光谱法测定尿液中依诺沙星含量[J]. 光谱学与光谱分析,2005,25(10):1634.
 [14] 张先廷,赵惠玲,杜黎明. 同步荧光光谱法测定人体尿液中加替沙星[J]. 分析科学学报,2008,24(3):344.
 [15] 张敏,阳艳,高中松,等. 导数-同步荧光法测定三月泡叶中总黄酮含量的研究[J]. 化学工程师,2006,20(3):22.
 [16] 庞志功,汪宝琪,王翔,等. 用荧光猝灭法测定苦参碱和氧化苦参碱[J]. 药物分析杂志,1998,18(6):378.
 [17] 阿娟,刘惠民. 荧光猝灭法测定甲硝唑片剂中的药物含量[J]. 内蒙古农业大学学报,2005,26(4):105.
 [18] 江军朵,吴海龙,夏阿林,等. 交替惩罚三线性分解二阶校正荧光分析法快速测定牛奶中洛美沙星含量[J]. 精细化工中间体,2007,37(1):69.
 [19] 韩清娟,吴海龙,聂瑾芳,等. 三维荧光校正法直接测定尿液中的利血平[J]. 高等学校化学学报,2007,28(5):827.
 [20] 王雪梅,吴海龙,聂瑾芳,等. 三维荧光二阶校正方法快速检测香蕉中双苯三唑醇含量[J]. 分析化学,2009,37(6):811.
 [21] 陈晓玲,龙恩武. 高效液相色谱-荧光分析法测定血浆中替米沙坦浓度[J]. 中国药业,2007,16(23):48.
 [22] 马建明,龚文杰,邹晨阳. 高效液相色谱-荧光法测定河鲫鱼中诺氟沙星残留[J]. 中国卫生检验杂志,2008,18(5):817.
 [23] 高瑞,马红燕. 流动注射时间扫描荧光分析法测定青霉素V钾[J]. 分析试验室,2009,28(11):10.
 [24] 肖忠柏,宋功武. 流动注射荧光分光法测定盐酸小檗碱的研究[J]. 咸宁师专学报,2001,21(3):53.
 [25] 赵一兵,余志雄,郑祥群,等. 流动注射碱性降解荧光法快速测定微量金霉素[J]. 高等化学学报,1992,13(10):1233.

[责任编辑 顾雪竹]