

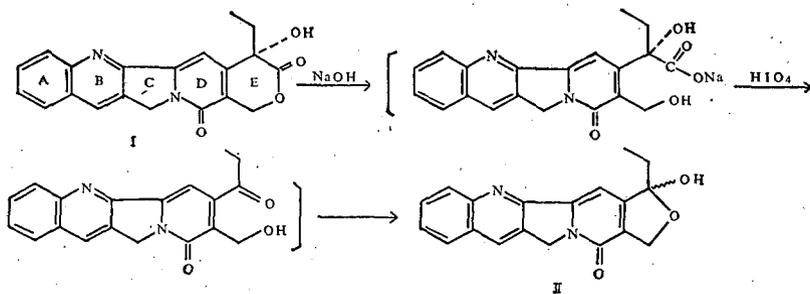
# 红外光谱定量法测定喜树碱半缩酮 中喜树碱的含量

杨树德 郭宗儒 郭积玉

(中国医学科学院药物研究所, 北京)

**提要** 本文报告了一种用于红外光谱定量分析的比例方法, 并用此法测定了喜树碱半缩酮(II)中少量喜树碱(I)的含量。在红外光谱中, II有一内酰胺羰基谱带, I有一内酰胺羰基谱带和另一内酯羰基谱带。由于此二化合物结构类似, 分子量接近, 按 Beer 定律推导, 在II中有少量I时, 红外光谱中内酯羰基谱带吸光度与内酰胺羰基谱带吸光度之比(R)应与I的含量( $C_I$ )成正比。实验结果证明, 以R对 $C_I$ 作图所得之标准曲线通过原点, 线性关系良好。测定时系用KBr压片, 样品无需称量。本法操作简便, 结果稳定, 误差小于2%。

喜树碱(I)为一有效的抗癌药物, 对其E环内酯作降解反应, 得到喜树碱半缩酮(II)。其反应为



即: I在碱性稀醇溶液中, 用过碘酸氧化, 使E环上 $\alpha$ -羟基羧酸氧化断裂脱羧, 并环化生成喜树碱半缩酮化合物II。后者的结构经元素分析、红外光谱及质谱证实, 并制备了少量纯品。

1973年曾对II进行了动物抗肿瘤实验。实验结果表明, 该化合物有较弱的抗癌活性, 毒性比喜树碱低。由于II中常杂有少量I, 为了准确地判断和评价II的药理作用, 我们建立了一个红外光谱定量测定II中所含少量I的方法。测定结果表明, II的生物活性很可能是其中所含有的少量I所致。嗣后, 用提纯的样品II进一步做抗癌实验, 证明II 50倍于喜树碱剂量时仍无活性。这也说明喜树碱结构中的E环内酯, 是必需的有效基团。

I和II羰基谱带区的红外光谱如图I<sub>a</sub>、I<sub>b</sub>所示; 图I<sub>c</sub>为II中含有少量I时其羰基谱带区的红外光谱。I在红外光谱中有一内酯峰( $5.75 \mu$ ,  $1739 \text{ cm}^{-1}$ )而II无此吸收峰。因此, 似可选择此吸收峰进行测定。但因溶剂的选择比较麻烦, 而KBr压片的方法又将不可避

免地带来较大的误差, 所以, 要成功地应用红外光谱法来定量测定 II 中少量 I 的含量, 必须对定量方法本身进行一些探索。

从图 1 中可以清楚地看到, I 有一内酯峰 ( $5.75 \mu$ ,  $1739 \text{ cm}^{-1}$ ), I 和 II 均有一内酰胺的羰基峰 ( $6.00 \mu$ ,  $1667 \text{ cm}^{-1}$ ), 当 II 中含有 I 时, 此二者的内酰胺羰基峰于  $6.00 \mu$  处叠加。根据 Beer 定律:

$$\lambda_1 = 5.75 \mu \quad A_1 = A_{I_1} = a_{I_1} b c_{I_1} \quad (1)$$

$$\lambda_2 = 6.00 \mu \quad A_2 = A_{I_2} + A_{II_2} \\ = a_{I_2} b c_{I_2} + a_{II_2} b c_{II_2} \quad (2)$$

式中  $A_{I_1}$  和  $a_{I_1}$  分别表示化合物 I 在  $\lambda_1$  的吸光度和吸收系数,  $c_{I_1}$  为化合物 I 的含量, 余类推。在  $\lambda_1$  和  $\lambda_2$  的总吸光度分别用  $A_1$  及  $A_2$  表示,  $b$  为光路长度。由于这两个化合物结构相似, 分子量接近, 而  $\lambda_2$  同为内酰胺羰基的吸收峰, 故可认为  $a_{I_2} = a_{II_2} = a_2$ , 又因  $c_{I_1} + c_{II_2} = 1$ , 则 (2) 式化为

$$A_2 = a_2 b (c_{I_1} + c_{II_2}) = a_2 b$$

由此可得:

$$R = \frac{A_1}{A_2} = \frac{a_{I_1}}{a_2} c_{I_1} = m c_{I_1} \quad (3)$$

即内酯羰基谱带 ( $\lambda_1 = 5.75 \mu$ ) 吸光度与内酰胺羰基谱带 ( $\lambda_2 = 6.00 \mu$ ) 吸光度之比  $R$ , 应与欲测组分化合物 I 的含量成正比, 亦即以  $R$  对  $c_{I_1}$  作图时, 应为一通过原点的直线。因此, 扫描一系列已知含量的样品, 用测得之  $R$  对  $c_{I_1}$  作一标准曲线, 然后测定未知样品的  $R$  值就可求出样品中化合物 I 的含量。这样, 仅需制备少量供绘制工作曲线需要的化合物 II 的纯品即可进行测定。

## 实 验 部 分

### (一) 红外定量条件的试验

#### 1. 比例法的测量条件

取适量样品, 按常法用 KBr 压片, 在 Perkin-Elmer 21 型红外光谱仪上于羰基谱带区重复扫描 10 次, 结果见表 1。吸光度的测量系采用基线法。

从表 1 结果可以看到, 虽然由于红外光谱仪本身所带来的测量误差, 同一样品在重复扫描时, 其内酯羰基谱带吸光度 ( $A_1$ ) 和内酰胺羰基谱带吸光度 ( $A_2$ ) 有所波动, 但此二者的比值 ( $R$ ) 却较稳定。这就证明本文所采用的方法可在一定程度上消除仪器本身所带来的误差。

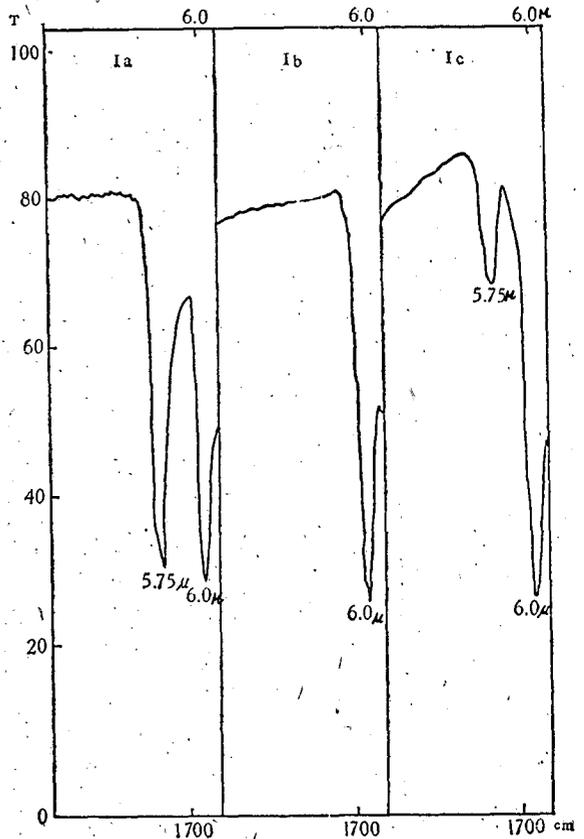


图 1 喜树碱 (I)、喜树碱半缩酮 (II) 及此二者混合物羰基谱带区的红外光谱

表 1 同一红外测样重复扫描10次的结果

测定结果	扫描次数									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$A_1$	0.122	0.114	0.117	0.120	0.120	0.120	0.118	0.118	0.124	0.116
$A_2$	1.070	1.010	1.023	1.052	1.055	1.050	1.060	1.054	1.110	1.010
$R \times 100$	11.4	11.3	11.4	11.4	11.3	11.4	11.2	11.2	11.3	11.5

## 2. 测定结果的精密度

分别取适量同一样品按常法用 KBr 压片, 并分别测定之, 结果见表 2。

表 2 测定结果的精密度

测定次数	测定结果 ( $R \times 100$ )	相对偏差 (%)
1	11.2	0
2	11.0	-1.8
3	11.2	0
4	11.0	-1.8
5	11.5	+2.7
6	11.4	+1.8
平均	11.2	$\pm 1.4$

标准偏差: 1.85%

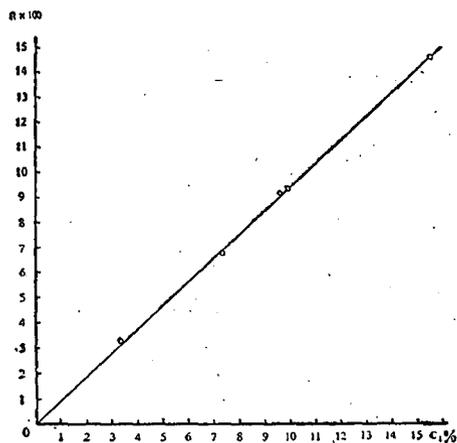


图 2 测定喜树碱含量的工作曲线

表 2 结果表明, 同一样品分别测定六次, 其相对标准偏差为 1.85%, 与一般比色法的误差比较, 此结果可称满意。

## (二) 标准曲线的绘制及样品测定结果

### 1. 标准曲线的绘制

用微量天平分别精密称取化合物 I 和化合物 II 的纯品, 按不同比例混合均匀, 取适量按常法用 KBr 压片, 并记录其羰基谱带区的红外光谱图。由光谱图中内酯羰基峰 ( $5.75 \mu$ ) 和内酰胺羰基峰 ( $6.00 \mu$ ) 的吸光度, 计算  $R$  值。以  $R$  值对  $c_I$  作图, 即得工作曲线, 见图 2。

### 2. 样品测定结果

样品测定结果见表 3。

表 3 样品测定结果

样品编号	$R \times 100$	$c_I$ % (喜树碱含量)
1	11.2	11.8
2	1.5	1.6
3	4.4	4.7
4	4.7	5.0
5	14.3	15.1
6	4.6	4.9

## 讨 论

(一) 由于红外光谱, 特别是红外光谱仪本身所固有的特点, 使之难以测得准确的吸收系数, 因而也就使红外光谱的定量工作不可能像紫外定量工作那样通过其吸收系数来计算欲测物质的含量。但在实践上, 只要尽可能保证测定工作是在相同条件下进行, 那么, 这实际上无损于标准曲线的应用<sup>[1]</sup>。在此情况下的红外定量工作则与一般的分光法或比色法相似。可是在实际工作中, 选择合适的溶剂往往是一个困难的问题, 因此, 对许多样品来说, 仍然只能用 KBr 压片的方法。但用此方法时, 不仅样品的称量和定量转移十分麻烦, 而且因光谱

的吸收度在相当大程度上与样品的处理情况（研磨的时间和力量，压片的时间和压力等）有关，而后者显然很难在每一次的操作中完全重复，这就不可避免地影响了测定结果的准确度。在这种情况下，往往采用一些特殊的方法或技术，其中则以比例法(Ratio Method)最为常用<sup>[2,3]</sup>。对于两个组分的样品，此法一般均要求在红外光谱中必须对每一组分各找到一个另一组分没有干扰的谱带。这种要求虽然在一些场合可以满足，但对某些结构极为类似的化合物来说，有时亦非易事。本文报告的方法，仅要求在一个波长组分之一有吸收而组分之一无吸收，而在另一波长组分之一和组分之一均有吸收且其吸光度相近（对于结构类似的化合物，后一条件是不难满足的）即可得出满意的结果。

(二) 红外光谱定量分析的优点，除了它可用于结构类似的化合物或多组分的样品分析之外，还在于它具有简便、快速、微量、不破坏样品并能回收等特点。本文的工作表明，按照我们所建立的方法，标准曲线一经制作，样品的分析就仅仅要求在所选择的波长记录其红外光谱图（样品无需称量），然后经过极简单的运算即可从标准曲线中读出欲测物质的含量。这种方法对于同一测定对象来说，显然比其他一些定量方法有较多优点。应当指出，虽然我们使用的是型号较老的 Perkin-Elmer 21 型红外光谱仪而又采用 KBr 压片的方法，但标准曲线线性关系良好，测定结果的准确度尚称满意。这就证明，红外光谱定量分析中误差较大的问题，只要条件选择适当，是可以克服的。

(三) 喜树碱降解产物(II)初次动物试验表明，腹腔注射 II 剂量为 20 mg/kg，对小鼠 L-615 生命延长时间与喜树碱(I) 2 mg/kg 剂量的延长时间相近。后用精制的 II 以 20、50、100 mg/kg 三个剂量水平做实验治疗，均未延长生存时间。以上实验说明，初次实验显示 II 的生物活性系其中所含少量 I 所致，后者含量按药理实验数据推算应为 10% 左右，此结果与红外定量测定的数据基本相符。

### 参 考 文 献

- [1] 刘培楠等：仪器分析及其在生理科学中的应用，96 页，科学出版社，1965。
- [2] Kendall N: *Applied Infra-red Spectroscopy*, Reinhold, p 64, New York, 1966.
- [3] 董庆年：红外光谱法，249 页，石油化学工业出版社，1977。

## THE DETERMINATION OF CAMPTOTHECIN IN ITS HEMI-KETAL COMPOUND BY IR METHOD

Yang Shude, Guo Zongru and Guo Jiyu

*(Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing)*

### ABSTRACT

In this paper, a "ratio method" of quantitative analysis by infrared spectrophotometry was reported. This method was applied to the determination of small amounts of Camptothecin (I) which was present as a contaminant in synthetic camptothecin hemi-ketal (II). Compound II showed an absorption band of lactam carbonyl group in the IR spectrum while compound I had in addition a  $\delta$ -lactone absorption band. Because of the similarity in structure and the closeness of the molecular weights of these two compounds, it was derived from Beer's law that the ratio (R) of the  $\delta$ -lactone band to that of the lactam band should be proportional to the amount of compound I present in compound II. Experimental results confirmed this and the plot of R vs  $C_1$  (concentration of compound I) gave a straight line passing through the origin. Pressed KBr disks were used for the analyses. The samples need not be weighed. This method is simple and the results are reproducible to better than  $\pm 2\%$ .