

荧光离子对测定叔胺类药物的研究

张立明 俞永祥

(军事医学科学院,北京)

提要 本文研究了用荧光试剂 9,10-二甲氧基蒽-2-磺酸钠 (MAS) 与叔胺类药物作用生成离子对, 经溶剂萃取, 测定叔胺的方法。对影响生成荧光离子对的主要因素, 如萃取介质 pH 的影响, 试剂用量和合适有机溶剂的选择等进行了研究。用本法测定了 9, 10-二甲氧基蒽-2-磺酸钠的量子产率和六种叔胺类药物低浓度范围(10^{-8} ~ 10^{-7} M) 的线性区间、最低检出限以及方法的精密程度。本法操作简便、灵敏度高, 最低检出限为 1 ng/ml, 变异系数小于 5%。同紫外分光光度法和酸性色素离子对法相比, 灵敏度分别高出 1000 和 100 倍。

关键词 9,10-二甲氧基蒽-2-磺酸钠; 叔胺; 荧光离子对; 萃取

荧光分光光度法用于胺类药物分析一般有三种类型: (一) 胺类药物本身有荧光, 可以直接进行测定; (二) 通过衍生化反应, 导入有荧光的基因; (三) 加入某种试剂进行化学反应, 通过改变结构, 使原来无荧光的样品变为有荧光。对于大多数叔胺类药物, 未能采用以上方法, 或者难以得到满意的结果。酸性色素离子对法方法简便, 应用范围广泛, 结果良好。但对测定体内药物以及低浓度范围的药物尚嫌灵敏度不高, 若用荧光对偶离子, 将能提高灵敏度能适应体内测定的需要。七十年代初, Westerlund 等人报道了用荧光试剂蒽-2-磺酸钠与胺类药物作用生成离子对, 经溶剂萃取进行测定的方法^(1,2)。后经改进, 用 9,10-二甲氧基蒽-2-磺酸钠试剂, 据报道结果比蒽-2-磺酸钠的荧光强度和萃取能力更好^(3,4)。由于该试剂无商品出售, 作者进行了合成改进研究, 制备了此试剂, 并用它进行了叔胺类药物的测定研究。

荧光离子对法的优点在于具有很高的灵敏度, 它不仅可用于一般叔胺类药物的微量测定, 而且还可以用于生物体内的药物分析研究⁽⁵⁾。作者用 9,10-二甲氧基蒽-2-磺酸钠试剂对六种叔胺类药物进行了低浓度范围(10^{-8} ~ 10^{-7} M) 的定量测定。方法简便、灵敏, 检出限可达 1 ng/ml, 线性范围 5~100 ng, 变异系数小于 5%。

实 验 部 分

(一) 仪器

日立 MPF-4 型荧光分光光度计、日立-557 型双光束双波长分光光度计、1 cm 石英比色杯、YKH-I 型液体快速混合器 (江西医疗器械厂)。

(二) 试剂

1,2-二氯乙烷、二氯甲烷、三氯甲烷, 均为分析试剂。经酸碱处理重蒸馏, 溴百里酚蓝检验合格。

pH 1~2, HCl-KCl 缓冲液; pH 3~4, KH_2PO_4 -HCl 缓冲液; pH 5~7, KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 缓冲液; 0.1 NH_4SO_4 溶液。

9,10-二甲氧基蒽-2-磺酸钠 (MAS), 参考文献^(6,7), 经研究合成条件, 改进了还原与甲

基化方法而制备。其结构经核磁、红外、质谱、元素分析鉴定，纯度通过薄层展开检查。

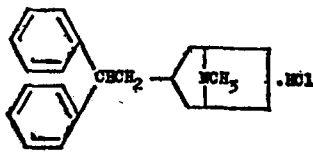
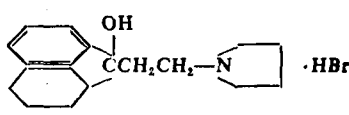
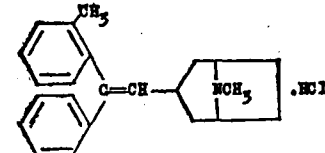
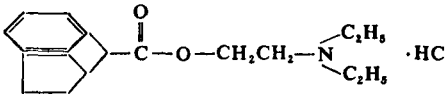
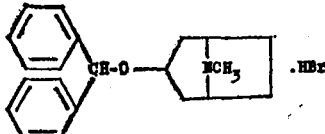
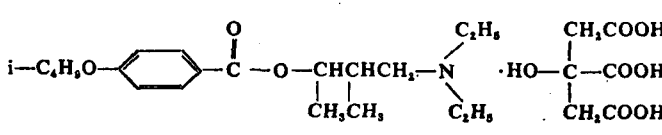
(三) 操作方法

1. 9, 10-二甲氧基萘-2-磺酸钠(MAS)荧光量子产率的测定 配制 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 硫酸奎宁的 0.1 N H_2SO_4 溶液和 0.1 $\mu\text{g/ml}$ MAS 的 0.1 N H_2SO_4 溶液,先在 λ 256 nm 处,分别测定两者的吸收度值。再选择激发波长 (EX) 256 nm, 激发狭缝 (Sex) 10 nm, 发射狭缝 (Sem) 10 nm, 扫描速度 60 nm/min, t 为 25°C, 测量硫酸奎宁和 MAS 溶液的校正发射光谱面积。硫酸奎宁的发射波长 (EM) 扫描范围为 380~560 nm, MAS 的 EM 扫描范围为 400~580 nm。

2. 叔胺类药物测定 配制 0.2 mg/ml 的 MAS 试剂水溶液。取各种 pH 的缓冲液 4 ml, 加入有机溶剂 6 ml, 再加入药物水溶液和 MAS 试剂水溶液各 1 ml, 置于 30 ml 试管中, 在快速液体混合器上振荡 1.5 min, 待溶液分层澄清后, 用吸管将下层有机溶液移入 10 ml 带塞离心管中, 离心 2 min (1000 r/min), 将离心后的清液移入 10 ml 试管中, 供测定用。

3. 测定条件 EX 383 nm, EM 446 nm, Sex 6 nm, Sem 10 nm, t 25°C (用 LB 801 型超级恒温器控制)。六种叔胺类药物的名称、结构式和测定浓度见表 1。

Tab 1. Drugs, its chemical structure and concentration

No	Drug	Chemical structure	Concentration (ng/ml)
1	Benethtropine		35
2	Kemadrine		45
3	Methylbenethtropine		30
4	Caramiphen		40
5	Benztropine		50
6	Gangleron		60

结 果 与 考 察

(一) 9,10-二甲氧基蒽-2-磺酸钠的校正发射光谱和量子产率

9,10-二甲氧基蒽-2-磺酸钠在水溶液中的校正发射光谱见图1,其最大EX/EM为383/468 nm,与苯甲氧托品生成离子对经1,2-二氯乙烷萃取的发射光谱见图1*,其最大EX/EM为383/452 nm。

量子产率的计算^(8,9)

以硫酸奎宁作标准,由5次实验测定的结果得出,9,10-二甲氧基蒽-2-磺酸钠在水溶液中的荧光量子产率为0.36, CV% < 2。

(二) 荧光试剂空白值的降低

因荧光离子对萃取测定法的灵敏度高,荧光试剂空白值的大小对此影响较大。为了降低试剂空白,用三氯甲烷溶剂将9,10-二甲氧基蒽-2-磺酸钠溶液萃取数次,除去溶于卤代烷的荧光成份,可使空白值大为降低,如图2。按上述方法操作,结果是未经萃取试剂空白值的1/6。

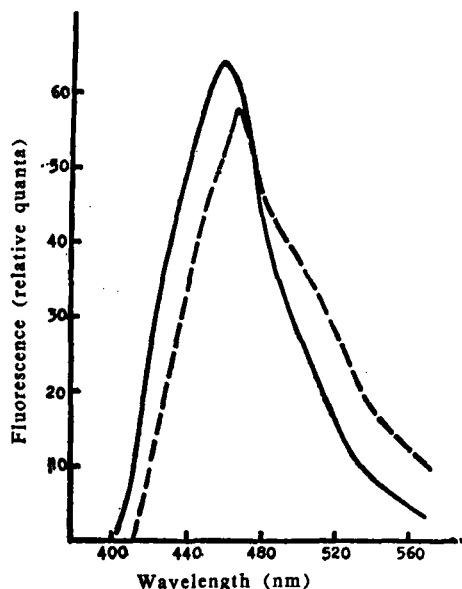


Fig 1. Corrected fluorescence spectrum of 9, 10-dimethoxyanthracene-2-sulphonate (MAS)
 ---- MAS in aqueous solution
 — MAS and benztropine ion pair in 1,2-dichloroethane

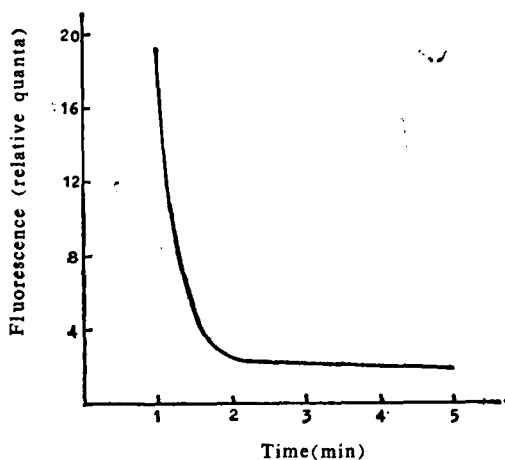


Fig 2. Relation between fluorescence intensity of MAS blank and times of chloroform extraction

(三) 不同 pH 值与离子对对荧光强度的关系

苯乙托品 (I)、开马特灵 (II)、甲苯烯托品 (III)、卡拉密分 (IV)、苯甲氧托品 (V) 和节断龙 (VI) 与MAS作用生成离子对,在 pH 1~7 的缓冲溶液中,经 1, 2-二氯乙烷萃取后的荧光强度如图3所示。

很明显, pH 2~4 范围内,有利于离子对生成,荧光强度值高。当 pH > 5 时,荧光强度随着 pH 的增大明显下降。由图中得出, I 的最佳 pH 值为 4; II 为 pH 3, III 为 pH 2; IV 为 pH 2; V 为 pH 4; VI 为 pH 2。

(四) 试剂用量对荧光强度的影响

* 其它几种叔胺药物同法测得的校正发射光谱形状与之基本相同

I~VI 六种药物测定时浓度如表 1, pH 值用上述最佳值, 1,2-二氯乙烷为萃取剂, 测定加入不同量试剂时, 测得离子对的荧光强度如图 4。

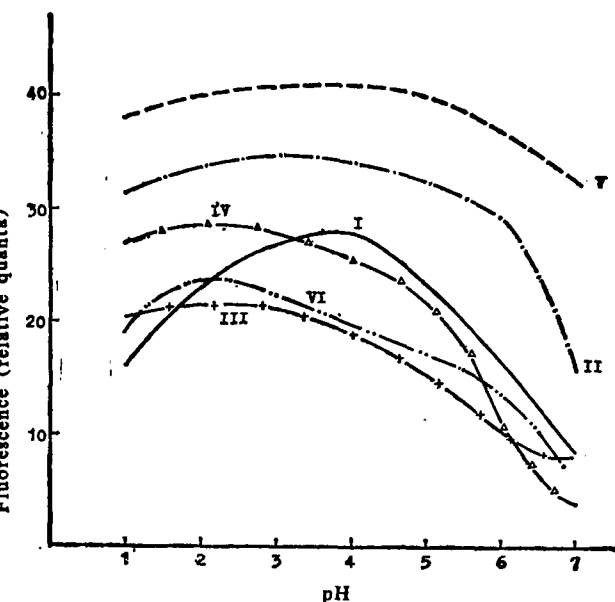


Fig 3. Change of fluorescence intensity of several drugs in various pH media

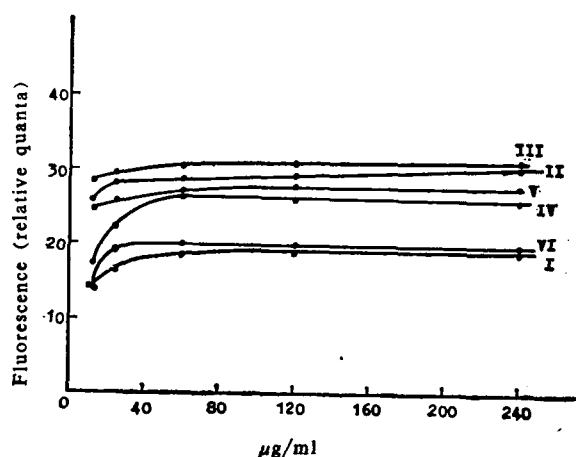


Fig 4. Influence of the reagent quantity on the fluorescence intensity

图 4 表明, 9, 10-二甲氧基萘-2-磺酸钠的加入量大于 $60 \mu\text{g/ml}$ 时, 荧光强度值的变化不大, 基本趋向水平。本实验中实际加入的浓度为 $200 \mu\text{g/ml}$, 过量约 3.3 倍左右。

(五) 萃取溶剂与荧光测值的关系

以 1,2-二氯乙烷、二氯甲烷、三氯甲烷三种溶剂为萃取剂, 按照上述的浓度、pH 值和荧光试剂用量, 分别测定 I-VI 的荧光强度, 其结果见表 2。

由表 2 可以看出, 三种溶剂对六种叔胺药物的结果是一致的。1, 2-二氯乙烷的萃取能力最强, 二氯甲烷次之, 三氯甲烷最弱。萃取率也依卤代烷介电常数的大小而增减⁽¹⁰⁾。

Tab 2. Influence of different solvents on fluorescence intensity

Solvent	Benethropine	Kemadrine	Methylbenethentropine	Caramiphen	Benztropine	Gangleron
Chloroform	9.9	9.7	7.6	6.8	8.8	4.2
Methylene chloride	28.1	23.0	22.0	20.3	23.7	12.5
1,2-Dichloroethane	35.6	31.8	28.6	31.4	29.0	20.3

(六) 线性范围的测定

根据以上实验结果, 选择最佳测定条件, 得出六种叔胺药物的线性关系如图 5 所示。

它们的线性范围、直线方程和相关系数如下: 苯乙托品(I): $7 \sim 80 \text{ ng}$, $y = 0.4360x - 2.000$, $\gamma = 0.9999$; 开马特灵(II): $7 \sim 70 \text{ ng}$, $y = 0.7498x - 3.749$, $\gamma = 0.9995$; 甲苯烯托品(III): $5 \sim 70 \text{ ng}$, $y = 0.8371x - 1.336$, $\gamma = 0.9998$; 卡拉密分(IV): $10 \sim 75 \text{ ng}$, $y = 0.6672x - 4.765$, $\gamma = 0.9999$; 苯甲氧托品(V): $10 \sim 80 \text{ ng}$, $y = 0.5901x - 6.682$, $\gamma = 0.9999$; 节断龙(VI): $15 \sim 110 \text{ ng}$, $y = 0.3588x - 4.092$, $\gamma = 0.9998$ 。以上均为四次实验结果的平

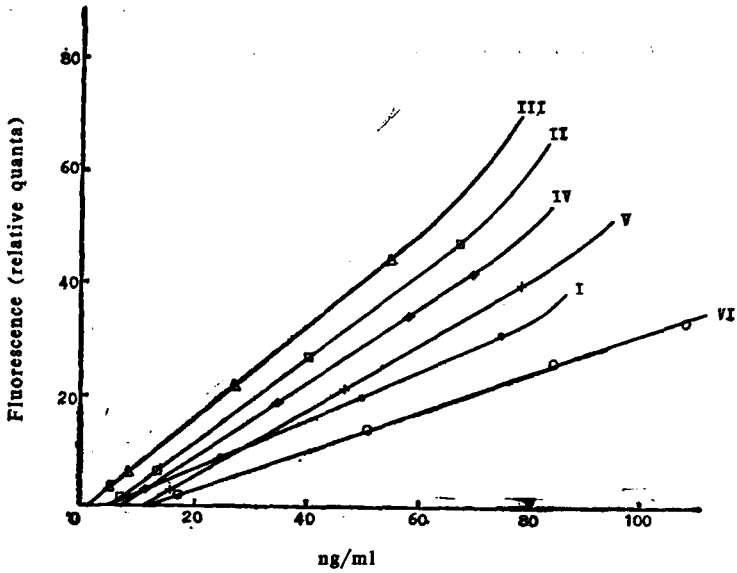


Fig 5. Relation between drug concentration and fluorescence intensity

均值, 每次实验用 MAS 标准溶液调整仪器灵敏度。由上述结果可知, 在所测线性范围内, 相关性较好。

(七) 精密度测定

上述六个叔胺药物, 每个选择二种不同浓度, 每一浓度测 5 份, 其荧光强度如表 3。从表 3 中的数据可以看出, 荧光离子对法的精密度良好, 变异系数(CV%) < 5%。

Tab 3. The precision of determinations for six tertiary amines

Drug	Conc. (ng/ml)	Analytical data					Average	SD	CV%
Benethtropine	50	20.5	19.5	20.1	19.5	20.2	20.0	0.45	2.2
	75	30.5	29.4	30.5	30.7	30.8	30.4	0.56	1.9
Kemadrine	14	6.3	6.3	5.8	6.3	6.6	6.3	0.29	4.6
	41	25.4	26.3	24.0	26.1	26.2	25.6	0.96	3.8
Methylbentropine	27	19.8	21.6	20.6	20.1	20.9	20.6	0.70	3.4
	55	44.3	42.8	45.0	45.1	44.0	44.2	0.93	2.1
Caramiphen	35	18.8	18.1	19.2	19.3	19.1	18.9	0.49	2.6
	58	33.4	34.7	35.1	34.1	33.8	34.2	0.68	2.0
Benztropine	47	19.9	19.8	20.7	21.6	21.7	20.7	0.90	4.4
	78	39.5	38.8	38.6	40.1	40.5	39.5	0.82	2.1
Gangleron	51	13.9	14.2	13.8	14.5	14.3	14.1	0.29	2.0
	85	25.3	26.6	25.5	25.9	25.0	25.7	0.62	2.4

(八) 荧光离子对法与紫外分光光度法和酸性色素离子对法的比较

根据 IUPAC 推荐的公式, 测定出了六种叔胺药物的检出限。以此检出限与紫外分光光度法和酸性色素离子对测值为 $1(A \times 100)$ 时的量($\mu\text{g/ml}$)的比较结果见表 4。

由表 4 得出, 紫外分光光度法的检出限为几 μg , 酸性色素法为 $0.1 \sim 0.2 \mu\text{g}$, 荧光离子对法为 $1 \sim 2 \text{ ng}$ 。荧光离子对法与紫外法相比高 $10^3 \sim 10^4$ 倍, 与酸性色素法相比高 10^2 倍。

(九) 荧光强度值与测定时间的关系

为明了荧光离子对的稳定程度与测定时间的关系, 以卡拉密分为代表, 与 MAS 作用生成离子对 (浓度如表 1, 其余条件同前), 经萃取后, 观察其荧光强度随时间的变化, 见图 6。

Tab 4. Comparison of the fluorometric ion pair (FIP) method with ultraviolet absorption and acid dye methods

Drug	Detection limit			Ratio of detection limit	
	UV ($\mu\text{g/ml}$)	Acid dye ($\mu\text{g/ml}$)	FIP (ng/ml)	UV/FIP	Acid dye/FIP
Benethtropine	6.6	0.14	0.8	8.3×10^3	1.8×10^2
Kemadrine	16.2	0.16	1.4	1.2×10^4	1.1×10^3
Methylbenethtropine	0.3	0.15	2.0	1.5×10^3	7.5×10
Caramiphen	17.3	0.13	1.2	1.4×10^4	1.1×10^3
Benztropine	9.0	0.13	1.4	6.4×10^3	9.3×10
Gangleron	0.3	0.22	1.8	1.7×10^3	1.2×10^4

Notes: Acid dye is bromocresol purple. Determination value of UV and acid dye is $A \times 100$, and $A \times 100 = 1$ is regarded as detection limit. The value of FIP is based on the formula recommended by IUPAC.

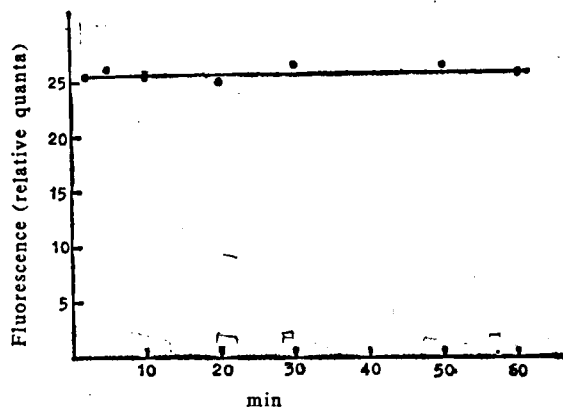


Fig 6. Relation between fluorescence intensity of caramiphen and determination time

从图 6 看出, 在 1 小时以内, 荧光强度测值基本保持不变。由此可知, 在一定时间内是稳定的。

讨 论

1. 荧光离子对萃取测定法是通过荧光试剂与叔胺药物以弱酸、弱碱离子对的形式结合, 经溶剂萃取进行定量测定的方法, 要求荧光试剂本身不被或很少被萃取。本法的荧光强度由离子对生成的难易和萃取率的高低决定, 影响的内在因素有(1)叔胺药物的碱性和荧光试剂的酸性大小, 两者差距大, 有利于离子对的生成;(2)叔胺药物含亲脂性基团多时, 萃取率高, 若含有极性基团, 萃取率降低。由表 2 知, 萃取溶剂本身的介电常数大小对萃取率也有很大影响。(3)叔胺基周围空间位阻大时不利于离子对生成。反之, 有利于荧光试剂的结合。例如, 节断龙中的叔胺基空间位阻比卡拉密分大(结构式见表 1), 灵敏度亦低。

2. pH 值对荧光离子对萃取测定法有较大影响。但对分配率高, pH 值较宽的叔胺药物影响较小。与酸性色素的曲线相比⁽¹²⁾, 荧光强度值高的曲线 pH 值范围较宽, 这也可能由于 MAS 亲脂性强之故。pH 值较低时, 有利于叔胺基的离子化, 易与荧光试剂结合成离子对。但 pH 值过低, 使得荧光试剂难以电离, 而以分子状态存在, 空白值却大大增高。当 pH 高于一定值时, 叔胺基又很难离子化, 荧光强度值大为降低。因此, 只在适宜的 pH 范围内, 才能生成离子对。故曲线呈中间高, 两边降低的形状。

参 考 文 献

1. Westerlund D and Borg KO. Fluorimetric determinations by ion pair extraction. Part 1. Extraction of ammonium compounds as ion pairs with anthracene-2-sulphonate. *Acta Pharm Suecica* 1970; 7:267.
2. Westelund D, et al. Fluorimetric determinations by ion pair extraction. Part 3. Extraction constants of ion pair between anthracene-2-sulphonate and mono- and divalent amines. *Ibid* 1972; 9:47.
3. Westerlund D and Borg KO. Fluorimetric determinations by ion pair extraction. part V. Studies on ion-pair extraction with the fluorescent anion 9,10-dimethoxyanthracene-2-sulphonate. *Anal Chim Acta* 1973; 67:89.
4. Gfeller JC and Frey G. Investigation and automation of the fluorometric ion pair method for the determination of several amines in low dosage pharmaceuticals. *Fresenius Z Anal Chem* 1978; 291:332.
5. Westerlund D and Karset KH. Fluorimetric determination of propantheline in human blood plasma by an ion-pair extraction method. *Anal Chim Acta* 1973; 67:99.
6. Meyer KH. Zur Kenntnis des Anthracens. I. Über Anthranol und Anthrahydrochionon. *Ann Chem* 1911; 379:37.
7. Fieser LF and Fieser M. *Reagents for Organic Synthesis*. New York: Jone Wiley & Sons Inc, 1967: 1082.
8. 郭尧君. 荧光实验技术在分子生物学中的应用. 第一版. 北京: 科学出版社, 1979:25~27.
9. Melhuish WH. Quantum efficiencies of fluorescence of organic substances: Effect of solvent and concentration of the fluorescent solute. *J Phys Chem* 1961; 65:229.
10. 俞永祥等. 溶剂抽提法分离胺类药物的研究. *药理学报* 1981; 16:594.
11. IUPAC. Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis I. General atomic emission spectroscopy. *Pure Appl Chem* 1972; 30:651. II. Data interpretation. *Ibid* 1976; 45:99. III. Analytical flame spectroscopy and associated non-flame procedures. *Ibid* 1976; 45:105.
12. 俞永祥等. 酸性色素萃取法测定胺类的研究. *药物分析杂志* 1984; 4:333.

STUDIES ON THE FLUOROMETRIC ION PAIR METHOD FOR THE DETERMINATION OF SEVERAL TERTIARY AMINES

ZHANG Li-Ming and YU Yong-Xiang

(Academy of Military Medical Sciences, Beijing)

ABSTRACT This paper reports studies on the quantitative method of fluorescent ion pair extraction for the determination of nonfluorescent tertiary amines with a fluorescent reagent sodium 9,10-dimethoxyanthracene-2-sulphonate (MAS). The primary factors, e. g. the effects of pH value of extraction media, quantity of fluorescence reagent and selection of appropriate organic solvent, etc. which influence the ion pair formation and fluorescence intensity are investigated.

The following tertiary amines in low concentration range (10^{-8} ~ 10^{-7} mol) are studied, i. e. benethropine, kemadrine, methylbenethentropine, caramiphen, benztropine, and gangleron. These drugs are dissolved in 4 ml of phosphate buffer (pH 2~4), treated with 1 ml of fluorescent reagent (MAS) (20 mg in 100 ml H₂O), extracted with 6 ml of 1,2-dichloroethane and measured at 25°C with fluorescence spectrophotometer using excitation and emission wavelength of 383 and 446 nm respectively.

The linearity of calibration curve is within the range of 5~100 ng/ml, the detection limit is 1 ng/ml and the coefficient of variation is <5%. The experimental procedure of this method is simple and of high sensitivity, which is 1000 and 100 times higher than that of ultraviolet absorption method and acid dye extraction method respectively.

Key words Sodium 9,10-dimethoxyanthracene-2-sulphonate; Extraction; Tertiary amines; Fluorescent ion pair