

· 药品检验 ·

薄层荧光扫描法及其在药物分析中的应用

沈阳药学院制剂研究室 潘卫三 胡 晋

随着薄层色谱扫描仪的开发和应用,薄层扫描法(TLCS)在色谱分析中愈来愈占有重要的地位。在药物分离、鉴定、定量分析中发挥着重要的作用^[1]。

根据薄层扫描的检测原理,可把TLCS分为两大类,即薄层紫外扫描法(TLCUS)和薄层荧光扫描法(TLCFS),其中TLCUS已应用的广泛,日臻完善^[2];而TLCFS的应用目前尚不够广泛,然而,TLCFS具有灵敏度高,选择性好的优点^[3],对普通薄层板的检出灵敏度为0.1~1 ng,对高效薄层板的检出灵敏度为0.01~0.1 ng,比TLCUS的灵敏度高 $10^1 \sim 10^3$ 倍^[4]。本文试图对这种方法做一讨论与述评。

(一)

TLCFS法,就是选择一定波长的激发光照射薄层板上的斑点,而发射出荧光,此荧光强度与激发光强度及样品的浓度呈线性关系^[4],就可以得到定量分析的结果。TLCFS不够普及的原因,就在于这种方法要求被测的斑点能够发射出荧光来,而天然具有荧光的物质并不很多。为了扩大应用范围,不少学者,从两个方面(样品有荧光与样品无荧光)进行了许多实验,从而拓宽了这种方法的应用范围。

1. 样品本身具有荧光

在这种情况下,只需要适当地选择激发波长 λ_{EX} 和发射波长 λ_{EM} ,就可以直接用TLCFS进行定性、定量分析。一般含硫、氮、氧原子的芳香杂环以及含-NH的杂环

化合物常具有荧光^[6],比如部分生物碱、黄酮、胺类、甾体类、维生素、氨基酸、蛋白质、酶类等等。Katic等以 $\lambda_{EX} = 380 \text{ nm}$, $\lambda_{EM} = 450 \text{ nm}$ 测定了罗美木碱和利血平^[6];还有人用TLCFS测定了硫酸奎尼丁^[7]、黄曲霉素^[8],均获得了满意的结果。

2. 样品本身不具有荧光

在这种情况下,可以用一定的方法进行处理,使之能发出荧光,许多学者发展了用化学反应和光化学反应引导样品转变为荧光化合物的各种方法^[6],比如氧化还原法、水解法、缩合法、络合法;开发出很有实用价值的荧光衍生化试剂,其中最常用的为荧光胺,它可以把伯、仲胺或潜在胺基的药物制备成具有颇强荧光的荧光衍生物^[9]。另一种较为常用的为丹酰氯,它适用于含胺基羟基的药物^[10]。Funk等把血浆提取物中的皮质醇,先制成丹酰氯荧光衍生物后,在硅胶HPTLC板上展开,以TLCFS进行定量分析,检测可达2.5 Pg/斑点^[11]。

除了上述外,也可以先进行薄层展开,然后再适当处理,使化合物斑点在板上转化为荧光物质,进行TLCFS测定。显然这种方法比上述方法更为简捷。这种板上衍生化的方法有碳酸氢铵蒸气处理法^[12]、气体高压放电法^{[13][14]}、氯化氧锆法^[15]。Zhou等在比较了上述方法的利弊之后,介绍了一种更为简便迅速的酸蒸气处理法,即把展开后的薄层板在盐酸、氢溴酸或硝酸的蒸气中放10分钟,再于60℃加热10分钟。此法可使多种物质产生荧光,并且灵敏度很高^[16]。Zhou

等后来把卵磷脂及神经鞘磷脂在硅胶 HPTLC 板上分离后,用硝酸进行处理,测定可达 ng 级水平^[17]。

使本身没有荧光的样品能够进行 TLCFS 测定的第三种方法是荧光熄灭法。这种方法是在吸附剂中加入无机荧光物质(这类物质能在 254 nm 或 366 nm 的紫外光照射下产生强烈的荧光),铺成荧光板,薄层展开后,当进行荧光扫描时,在此荧光熄灭点,荧光强度减弱,测得的是荧光减弱值,进行定量。有人用这种方法测定了穿心莲片中穿心莲内酯的含量,回收率为 96%^[18]。

(二)

上述内容明显地看出:由于有了能使本身无荧光的样品产生荧光(或荧光熄灭)的各种方法,突破了 TLCFS 原理的局限性,所以 TLCFS 已经开始在各个领域得到应用。许多学者对下列诸方面进行了深入的探讨。

1. 薄层荧光扫描法和紫外扫描法的比较

由于 TLCUS 法应用较广,所以把 TLCFS 与之比较,考察 TLCFS 法的灵敏度、精密度、准确度和线性范围,王慕邹等在比较了不同来源的黄连质量时,用硅胶 HPTLC 板测得了黄连中生物碱的含量。对其中的巴马亭碱,进行了荧光薄层扫描,与紫外法相比,其灵敏度更高,变异系数为 2.48%,线性范围 0~1 μg,并得出 TLCFS 具有薄层背景干扰小,基线平稳,峰形好的特点^[19]。也有人对四环素样品中只要含有 0.04 μg 的差向四环素就可以定量,灵敏度明显优于紫外法^[20]。朱敏等在硅胶 HPTLC(Merck)板上进行了不同品种的元胡中生物碱的含量。进行了荧光扫描,测得浙江延胡索中黄连碱的含量为东北延胡索中的 2 倍;介绍了用碘薰的方法使叔胺碱转化为季铵碱后进行荧光

扫描测定的方法,使灵敏度大大提高^[21]。

2. 体液中药物的薄层荧光扫描测定

由于生物体液成分复杂,杂质繁多,浓度一般很低,采用 TLC 分离较为方便,分离后的薄层板用 TLCUS 常常不能检出。因此,考察了用 TLCFS 进行测定的可能性。Merwe 等用硅胶 HPTLC 分离荧光扫描测定了入血浆中螺旋内酯及代谢物的含量^[22],李丙阳等为卡马西平的血药浓度监测提供了一种常规的方法,在硅胶 TLC(酸蒸气处理后)板上荧光扫描测定了血清中卡马西平及二个主要代谢物的含量,检出浓度为 2 ng/μl,并且苯巴比妥、利眠宁等近 20 种药物对于测定无干扰^[23]。叶晓炜等首次报道了 TLCFS 测定盐酸木防己碱血浆浓度的方法^[24]。他们用统计的方法,比较了用盐酸、硫酸、硝酸、高氯酸蒸气处理硅胶 HPTLC 的时间、加热温度、加热时间的关系,最终选定:硝酸处理 20 分钟,170℃ 加热 20 分钟。又根据石蜡油可增强荧光的报道^[25],用 5% 石蜡油的环己烷溶液浸渍,吹干后,进行荧光扫描测定,检出限和最小检出浓度分别为 2 ng 和 5 ng/ml 血浆。

由此可见, TLCFS 的实用价值。

3. 中草药和中成药的定性定量分析

TLCFS 作为中草药和中成药定性定量的一种检测手段,能够根据荧光扫描光谱进行定性定量的分析,是一种非常实用的方法。再举一二实例:林明美等对柴胡进行了薄层分离($\lambda_{EX} = 370 \text{ nm}$, $\lambda_{EM} = 500 \text{ nm}$),获得了指纹一样具有鉴定意义的荧光扫描光谱。据此,可以区别不同品种、不同产地的柴胡^[26]。李骏等对天麻丸进行了 TLCFS 鉴定。通过阴、阳对照液,用 TLCFS 鉴定了羌活、川牛膝、独活和当归这四味药,其余各味药用紫外法检测。不必更换薄层板和展开剂,可同时得到实验结果^[27]。

(三)

笔者在查阅文献中注意到:近年来高效薄层色谱(HPTLC)的发展异常迅速,TLCFS绝大多数是在高效薄层板上进行的。这是因为高效薄层板具有点样量少,斑点集中,展距短,分离效率高的特点^[19]。因此,高效薄层预制板的商品化,将为TLCFS的应用开辟出广阔的道路。

另一方面,使本身没有荧光的物质能够进行荧光分析的方法也愈来愈多。Adlercreutz等利用辅酶的氧化型与还原型的荧光强度的不同,测定体液中甾体激素的含量,称之为酶荧光分析法^[28]。还有免疫荧光分析法,其特点是采用荧光化合物作为抗原的标记物,通过荧光的测定来求算抗原—抗体结合率,从而兼具荧光分析的高灵敏性和免疫分析的专一性,且没有放射性同位素所带来的安全性问题^[29]。Sterojny等使用谱线强度大、单色性好的激光作为激发光源,结果灵敏度比用氙灯为光源时提高10倍以上^[30],随着上述方法的深入发展必将使TLCFS在药物分析中,发挥重要的作用。

参 考 文 献

- [1] 王延琮:薄层扫描法及在药物分析中的应用
沈阳药学院 1985年9月
- [2] 吕湘林等:中草药 1980, 11(6):284
- [3] 张莅峡等:药物分析杂志1986, 6(3):173
- [4] 王慕邹等:同上 1984, 4(5):314
- [5] 王杰民等:同上 1985, 5(3):185

- [6] Katic M, et al.: J High Resol Chromatogr 1980, 3, 149
- [7] Joel O Covinsky, et al.: J Clin Pharmacol 1979, 19, 261
- [8] Issaq H J, et al.: J Liq Chromatogr 1981, 4, 1087
- [9] Sterling J M, et al.: J Pharm Sci 1974, 63, 1448
- [10] Dvir R, et al.: J Chromatogr 1969, 45:76
- [11] Funk W, et al.: Ibid 1981, 217, 349
- [12] Segura R, et al.: Ibid 1974, 99, 643
- [13] Shanfield H, et al.: J Chromatogr 1976, 126, 457
- [14] Ibid 1977, 142, 387
- [15] Segura R, et al.: Ibid 1981, 217, 329
- [16] Zhou L, et al.: Ibid 1981, 217, 341
- [17] Ibid 1982, 239, 259
- [18] 赵体慧等:南京药学院学报 1985, 16(1):38
- [19] 王慕邹等:药物分析杂志 1984, 4(1):12
- [20] 李敬涵等:同上 1983, 3(1):53
- [21] 朱敏等:同上 1985, 5(3):139
- [22] Van der Merwe PJ, et al.: J Chromatogr 1979, 171, 519
- [23] 李丙阳等:药学报 1986, 21(8):633
- [24] 叶晓炜等:药物分析杂志1987, 7(2):77
- [25] Davis C M, et al.: J Chromatogr Biomed Appl 1983, 272, 157
- [26] 林明美等:药物分析杂志1987, 7(1):13
- [27] 李骏等:同上 1986, 6(3):173
- [28] Adlercreutz H, et al.: J Steroids Biochem 1980, 13, 507
- [29] Steffes M L: Clin Chem 1981, 27, 1093
- [30] Sterojny N, et al.: Anal Chem 1980, 52, 154