• 研究论文 •

某些芳香族氨基酸作探针荧光猝灭法测定安乃近及其代谢产物

甘晓娟 刘绍璞 刘忠芳 王亚琼 崔志平 胡小莉*

(发光与实时分析教育部重点实验室 西南大学化学化工学院 重庆 400715)

摘要 在 pH 3.2 的缓冲介质中, 安乃近(ANG)及其代谢产物 4-甲氨基安替比林(MAA)、4-乙酰氨基安替比林(AAA)与色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)和苯丙氨酸(Phe)等芳香族氨基酸反应并形成结合产物, 引起上述氨基酸的荧光发生猝灭, 最大猝灭波长分别位于 352 nm (ANG-Trp 体系)、304 nm (ANG-Tyr, MAA-Tyr 和 AAA-Tyr 体系)和 284 nm (ANG-Phe 体系)。其荧光猝灭值(ΔF)在一定范围内与 ANG, MAA 和 AAA 成正比。荧光猝灭反应具有较高灵敏度, 对于 ANG, MAA 和 AAA 的检出限为 13.3 ng/mL (ANG-Trp 体系)、15.8 ng/mL (ANG-Tyr 体系)、64.5 ng/mL (ANG-Phe 体系)、150.0 ng/mL (MAA-Tyr 体系)和 230.8 ng/mL (AAA-Tyr 体系)。实验研究了荧光猝灭反应的适宜条件和影响因素, 考察了共存物质的影响, 表明方法具有良好的选择性, 可用于 ANG 片剂及其代谢物尿药浓度的快速测定。从吸收光谱的变化、温度的影响以及 Stern-Volmer 作图, 判断该反应为静态猝灭反应, 氨基酸和安乃近通过静电引力和芳基堆积作用而形成 1:1 的复合物。

关键词 安乃近; 氨基酸; 4-甲氨基安替比林; 4-乙酰氨基安替比林; 荧光猝灭

Fluorescence Quenching Method for the Determination of Analgin and Metabolin with Some Aromatic Amino Acids as Probes

Gan, Xiaojuan Liu, Shaopu Liu, Zhongfang Wang, Yaqiong
Cui, Zhiping Hu, Xiaoli*

(Education Ministry Key Laboratory on Luminescence and Real-Time Analysis, School of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest University, Chongqing 400715)

Abstract In pH 3.2 Britton-Robinson (BR) buffer medium, analgin (ANG) and metabolin of 4-methylaminoantipyrine (MAA) and 4-acetylaminoantipyrine (AAA) can react with some aromatic amino acids such as tryptophane (Trp), tyrosine (Tyr) and phenylalanine (Phe) to form complexes, which lead to fluorescence quenching of above amino acids, and the maximum quenching wavelength is at 352 nm (ANG-Trp system), 304 nm (ANG-Tyr, MAA-Tyr and AAA-Tyr system), 284 nm (ANG-Phe system), respectively. Fluorescence quenching value (ΔF) is proportional to the concentration of ANG, MAA and AAA in a certain range. Fluorescence quenching methods for the determination of ANG, MAA and AAA have high sensitivity with the detection limits of 13.3 ng/mL (Trp-ANG system), 15.8 ng/mL (Tyr-ANG system), 64.5 ng/mL (Phe-ANG system), 150.0 ng/mL (MAA-Tyr system) and 230.8 ng/mL (AAA-Tyr system), respectively. The optimum conditions of the reaction, influencing factors and the effect of coexisting substances are investigated, and the results show this method has a good selectivity. This method has been successfully applied to the quick determination of ANG in tablets and its metabolin in urine samples. Judging from the change of the absorption spectra, the effect of temperature and the Stern-Volmer plots, the quenching of fluorescence of amino acids by ANG is a static quenching process. Experimental results show that a

* E-mail: xiaoli.hu@swu.edu.cn

Received June 7, 2011; revised July 31, 2011; accepted September 15, 2011.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 20875078).

国家自然科学基金(No. 20875078)资助项目.

1 : 1 compound of ANG and amino acid is formed by electrostatic attraction and aromatic stacking interaction.

Keywords analgin; amino acids; 4-methylaminoantipyrine; 4-acetylaminoantipyrine; fluorescence quenching

安乃近(ANG, 图 1), 具有较强的解热镇痛作用, 临床上广泛用于高热时的紧急对症退热和头痛、牙痛、神经痛、肌肉痛、关节痛等各类疼痛的治疗. 安乃近吸收入血液后, 迅速代谢为 4-甲氨基安替比林(MAA), MAA 继续代谢为 4-甲酰氨基安替比林(FTP)和 4-氨基安替比林(ATP), ATP 又继续代谢为 4-乙酰氨基安替比林(AAA). 安乃近也存在一定的毒副作用, 长期使用可引起粒细胞减少、再生障碍性贫血、严重的过敏、休克虚脱, 甚至导致死亡^[1]. 因此, 一些发达国家对安乃近作出了停止或限制使用的规定, 如美国、瑞典禁止该药用于食源性动物中. 目前测定安乃近的方法主要有碘量法^[2]、流动注射-荧光检测法^[3]、分光光度法^[4-8]、化学发光法^[9-16]、高效液相色谱法^[17]、液相色谱-串联质谱法^[18,19]、电化学分析法^[20]等. 相对而言, 荧光法的研究和应用较少, 因此进一步发展和建立快速、简便、高灵敏度、高选择性的检测安乃近的荧光分析法是一项有意义的工作.

图 1 安乃近的结构图

Figure 1 Constitutional formula of ANG

色氨酸(Trp)、酪氨酸(Tyr)和苯丙氨酸(Phe)是具有荧光的芳香族氨基酸, 它们也是构成蛋白质的重要氨基酸和蛋白质荧光的主要来源. 研究这些氨基酸本身与药物小分子反应时的荧光行为, 有助于深入了解药物与蛋白质的相互作用机理及药物在体内的运输和代谢过程. 本文采用荧光光谱法研究了 ANG, MAA 和 AAA 与 Trp, Tyr 和 Phe 的相互作用, 并发展了以上述氨基酸作探针的荧光猝灭法测定安乃近和代谢物的新方法.

研究表明, 在 pH 3.2 的缓冲介质中, Trp, Tyr 和 Phe 具有不同程度的荧光, 其最大激发(λ_{ex})/最大发射波长(λ_{em})分别位于 283 nm/352 nm (Trp), 277 nm/304 nm (Tyr) 和 261 nm/284 nm (Phe). 当它们与安乃近及其代谢产物反应形成 1 : 1 复合物时, 它们的荧光均发生猝灭, 其猝灭程度(ΔF)在一定范围内与药物的浓度成正比. 对于 ANG, MAA 和 AAA 的检出限分别为 13.3 ng/mL (ANG-Trp 体系), 15.8 ng/mL (ANG-Tyr 体系), 64.5

ng/mL (ANG-Phe 体系), 150.0 ng/mL (MAA-Tyr 体系)和 230.8 ng/mL (AAA-Tyr 体系). 据此提出了一种以氨基酸为探针准确、灵敏、简便、快速测定 ANG 及代谢产物的新方法. 本文研究了荧光猝灭反应的适宜条件和影响因素, 探讨了 ANG 与氨基酸相互作用机理, 讨论了荧光猝灭的类型, 表明该反应为静态猝灭过程. 并研究了共存物质的影响及分析应用, 表明方法具有良好的选择性, 适用于 ANG 片剂及其代谢物尿药浓度检测.

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

日立 F-2500 荧光分光光度计(岛津公司, 日本); 岛津 2450 紫外-可见分光光度计(岛津公司, 日本); pH SJ-3F 酸度计(上海精密科学仪器有限公司, 上海).

安乃近(ANG, 西南药业有限公司)溶液: 先配制成 200.0 $\mu\text{g/mL}$ 的储备溶液, 再用水稀释至 10.0 $\mu\text{g/mL}$ 作为工作溶液.

4-甲氨基安替比林(MAA, 武汉远大制药集团有限公司)和 4-乙酰氨基安替比林(AAA, 阿拉丁试剂), 先配制成 200.0 $\mu\text{g/mL}$ 的储备溶液, 再用水稀释至 20.0 $\mu\text{g/mL}$ 作为工作溶液.

色氨酸(Trp, 上海康达氨基酸厂)和酪氨酸(Tyr, 上海长江生化制药厂)溶液: 先配制 2.0×10^{-3} mol/L 的储备溶液, 然后用水稀释至 4.0×10^{-4} mol/L 作为工作溶液.

苯丙氨酸(Phe, Sigma 产品)溶液: 先配制成 8.0×10^{-2} mol/L 的储备溶液, 再用水稀释至 8.0×10^{-3} mol/L 作为工作溶液.

BR 缓冲溶液: 用 0.04 mol/L H_3PO_4 , H_3BO_3 和 CH_3COOH 与 0.2 mol/L NaOH 溶液按一定比例混合, 配成不同 pH 值的缓冲溶液, 并用酸度计校正其 pH 值.

其他试剂均为分析纯, 实验用水为二次蒸馏水.

1.2 实验方法

依次将 1.0 mL BR 缓冲溶液, 1.0 mL 氨基酸溶液和一定量的待测溶液加入 10 mL 比色管中, 然后用水稀释至刻度, 摇匀. 放置 10 min 后, 用荧光分光光度计记录荧光光谱. 并分别在 $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=283$ nm/352 nm (Trp 体系), $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=277$ nm/304 nm (Tyr 体系)和 $\lambda_{ex}/\lambda_{em}=261$ nm/284 nm (Phe 体系)处, 测量反应产物的荧光强度 F 及试剂空

白的荧光强度 F_0 , $\Delta F = F_0 - F$.

2 结果与讨论

2.1 荧光光谱

Trp, Tyr 和 Phe 具有强弱不同的荧光, 其最大激发 (λ_{ex})/最大发射波长 (λ_{em}) 分别位于 283 nm/352 nm (Trp), 277 nm/304 nm (Tyr), 261 nm/284 nm (Phe). 其相对强度是 Trp > Tyr > Phe. ANG 本身也有较弱的荧光, $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}}$ 为 335 nm/371 nm, 其荧光光谱与氨基酸相距较远, 且相对荧光强度仅为上述氨基酸的 0.23% (Trp), 0.58% (Tyr) 和 2.54% (Phe). 当氨基酸与 ANG 及其代谢产物相互作用并形成结合产物时, 其荧光光谱特征几乎不变, 但荧光强度却显著猝灭(如图 2). 三种氨基酸荧光猝灭程度 (ΔF) 在一定范围内与药物的浓度成正比, 从而可以发展出测定 ANG 和代谢产物的几种荧光猝灭法.

2.2 适宜的反应条件

2.2.1 溶液酸度的影响

分别用邻苯二甲酸氢钾-HCl, HCl-NaAc, HAc-NaAc,

BR 缓冲溶液实验了反应介质对荧光猝灭作用的影响. 结果表明采用 BR 缓冲溶液时, 荧光猝灭程度最大且最稳定, 故实验选用 BR 缓冲溶液作反应介质. 试验了不同 pH 值的 BR 溶液对结合产物荧光强度的影响(见图 3), 结果表明适宜的酸度 pH 2.7~4.2 (Trp)、pH 2.7~4.0 (Tyr) 和 pH 2.7~4.6 (Phe) 范围内反应产物的 ΔF 达到最大且基本一致, 当高于此 pH 值范围时, 氨基酸质子化能力降低而以中性分子甚至阴离子形态存在; 反之, 当 pH 值太低, ANG 分子结构中的磺酸根可能与氢离子结合成中性分子. 上述两种情况均不利于氨基酸与 ANG 的结合反应, 从而导致 ΔF 下降. 因此, 本实验均用 pH 3.2 的 BR 缓冲溶液作为反应介质, 用量以 1.0 mL 为宜.

2.2.2 氨基酸浓度的影响

实验了 Trp, Tyr 和 Phe 的适宜用量, 发现当浓度在 $3.0 \times 10^{-5} \sim 6.0 \times 10^{-5}$ mol/L (Trp 和 Tyr) 和 $7.0 \times 10^{-4} \sim 9.0 \times 10^{-4}$ mol/L (Phe) 范围内, ΔF 值达到最高且一致. 因此以下实验氨基酸的浓度分别采用 4.0×10^{-5} mol/L (Trp 和 Tyr) 和 8.0×10^{-4} mol/L (Phe).

图 2 荧光光谱

Figure 2 Fluorescence spectra

1~8: Excitation spectra; 1'~8': emission spectra; A: ANG-Trp system: 1 and 1': Trp 4.0×10^{-5} mol/L; 2~7 and 2'~7': ANG-Trp system, ANG: 0.50, 1.00, 1.50, 2.00, 2.50, 3.00 $\mu\text{g/mL}$ respectively; pH 3.2. B: ANG-Tyr system: 1 and 1': Tyr 4.0×10^{-5} mol/L; 2~6 and 2'~6': ANG-Tyr system, ANG: 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25 $\mu\text{g/mL}$ respectively; pH 3.2. C: ANG-Phe system: 1 and 1': Phe 8.0×10^{-4} mol/L; 2~8 and 2'~8': ANG-Phe system, ANG: 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50, 1.75 $\mu\text{g/mL}$ respectively; pH 3.2. D: MAA-Tyr system: 1 and 1': Tyr 4.0×10^{-5} mol/L; 2~6 and 2'~6': MAA-Tyr system, MAA: 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 $\mu\text{g/mL}$ respectively; pH 3.2

图3 pH的影响

Figure 3 Effect of pH

a, ANG-Tyr system; b, ANG-Trp system; c, ANG-Phe system; Trp and Tyr: 4.0×10^{-5} mol/L, Phe: 8.0×10^{-4} mol/L; ANG: $1.0 \mu\text{g/mL}$

2.2.3 反应时间和荧光强度的稳定性

试验结果表明, Trp, Trp 和 Tyr 与 ANG 及其代谢产物的反应在室温($17 \sim 25^\circ\text{C}$)下 5 min 左右即可完成. 此后 ΔF 值至少可以稳定 4 h 以上, 因此荧光信号有很好的稳定性. 以下实验均在反应 10 min 后进行荧光测量.

2.3 标准曲线

在最佳试验条件下, 测定了不同浓度的 ANG 及其代谢产物与氨基酸反应后的 ΔF , 并对它们的浓度作线性回归. 标准曲线的回归方程、线性范围、相关系数及方法的检出限列于表 1. 用三种氨基酸测定 ANG 时, Trp 和 Tyr 均具有较高的灵敏度, 对 ANG 的检出限分别为 13.3 ng/mL 和 15.8 ng/mL , 灵敏度高于某些分光光度法^[10,11]; 但测定代谢产物时, Tyr 体系的灵敏度高于其他两个体系, 因此代谢产物浓度均以 Tyr 探针进行测定.

2.4 安乃近与芳香族氨基酸的相互作用和荧光猝灭反应

2.4.1 安乃近与 Trp, Tyr 和 Phe 的相互作用

我们用等物质的量连续变化法测定了反应产物的组成比, 结果均为 1:1, 图 4 为 Tyr 与 ANG 的结合反应图. 三种氨基酸的等电点分别为 5.89 (Trp), 5.66 (Tyr) 和 5.48 (Phe), 在本实验条件(pH 3.2)下, $\text{pH} < \text{pI}$, 部分氨基酸分子的 NH_2 质子化而带上一个单位正电荷; 此时,

ANG 分子因 Na^+ 离解以 $\text{R}-\text{SO}_3^-$ 大阴离子形态存在, 它们借静电引力和芳基堆集作用形成结合产物, 导致氨基酸的荧光猝灭.

图4 Tyr 与 ANG 的结合反应

Figure 4 The combined reaction of Tyr with ANG

2.4.2 荧光猝灭作用

荧光猝灭包括动态猝灭和静态猝灭^[21]. 动态猝灭是指猝灭剂与荧光物质的激发态分子之间所发生的与扩散有关的相互作用过程. 静态猝灭是猝灭剂和荧光物质分子在基态时生成不发光的配合物, 从而导致荧光强度降低的过程.

不论是动态猝灭或是静态猝灭, 均符合 Stern-Volmer 公式.

对于动态猝灭

$$F_0/F = 1 + K_{sv}[Q] \quad (1)$$

对于静态猝灭

$$F_0/F = 1 + K[Q] \quad (2)$$

这里 K_{sv} 为猝灭常数, K 为配合物的结合常数. $[Q]$ 为猝灭剂浓度.

Stern-volmer 作图的结果列于表 2 中. 对于 ANG-Trp, ANG-Tyr 和 ANG-Phe 体系荧光猝灭反应的猝灭常数 K_{sv} 值(303 K)分别为 9.0×10^4 , 1.4×10^5 和 $2.4 \times 10^5 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1}$. 当已知荧光分子的荧光寿命 τ_0 和 K_{sv} 时, 可由公式 $K_q\tau_0 = K_{sv}$, 算出它的双分子猝灭常数 K_q . 已知 Trp, Tyr 和 Phe 的荧光寿命分别为 $3.1 \times 10^{-9} \text{ s}$, $3.6 \times 10^{-9} \text{ s}$ 和 $6.8 \times 10^{-9} \text{ s}$ ^[21]. 故它们的双分子猝灭常数均在 10^{13}

表1 标准曲线的相关系数、线性范围和检出限

Table 1 Related parameters of the calibration graphs and the detection limits

System	Measurement wavelength/nm	Linear regression equation ($c, \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Correlation coefficient (R)	Linear range/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Detection limit (3σ)/ ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)
ANG-Trp	352	$\Delta F = -26.9 + 225.2C$	0.9986	0.04~3.00	13.3
ANG-Tyr	304	$\Delta F = 18.0 + 210.1C$	0.9984	0.05~1.25	15.8
ANG-Phe	284	$\Delta F = 8.1 + 58.8C$	0.9967	0.22~1.75	64.5
MAA-Tyr	304	$\Delta F = 45.5 + 44.0C$	0.9983	0.50~10.0	150.0
AAA-Tyr	304	$\Delta F = 63.0 + 39.0C$	0.9958	0.77~10.0	230.8

表 2 Stern-Volmer 方程的参数

Table 2 Some parameters for Stern-Volmer plots

System	Temperature T/K	Stern-Volmer equation (c , $\mu\text{mol/L}$)	Correlation coefficient (R)	$K_{\text{sv}}/(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1})$	$K_q/(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1})$
ANG-Trp	297	$F_0/F=0.93+1.4\times 10^5[Q]$	0.9994	1.4×10^5	4.5×10^{13}
	303	$F_0/F=0.95+9.0\times 10^4[Q]$	0.9980	9.0×10^4	2.9×10^{13}
ANG-Tyr	303	$F_0/F=0.97+1.4\times 10^5[Q]$	0.9985	1.4×10^5	3.9×10^{13}
	313	$F_0/F=0.99+9.7\times 10^4[Q]$	0.9987	9.7×10^4	2.7×10^{13}
ANG-Phe	303	$F_0/F=0.99+2.4\times 10^5[Q]$	0.9999	2.4×10^5	3.5×10^{13}
	313	$F_0/F=0.99+2.0\times 10^5[Q]$	0.9995	2.0×10^5	2.9×10^{13}

$\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ 数量级(见表 2), 远大于猝灭剂对荧光分子的最大碰撞猝灭常数($1.0\sim 2.0$) $\times 10^{10} \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ [22,23]. 因此 ANG 对三种芳香族氨基酸的荧光猝灭应当是一种静态猝灭作用.

从温度对荧光猝灭的影响看, 随着温度的升高, 荧光猝灭的程度均逐渐降低(如图 5). 从图 5 和表 2 可以看出, 其猝灭常数 K_{sv} (对于静态猝灭这是它们的结合常数)也随着温度的升高而降低. 这与静态猝灭特征一致.

从吸收光谱(图 6)可以看出, 反应前 ANG, Trp, Tyr 和 Phe 的最大吸收波长(λ_{max})分别位于 255, 276, 273 和 255 nm, 摩尔吸光系数(ϵ)依次为 $9.03\times 10^4 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (ANG), $5.65\times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (Trp), $1.35\times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (Tyr)和 $1.81\times 10^2 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (Phe). 当氨基酸与 ANG 作用后各体系的最大吸收峰分别为 258 nm (ANG-Trp 体系)、256 nm (ANG-Tyr 体系)和 254 nm (ANG-Phe 体系), 较氨基酸分别蓝移了 18, 17 和 2 nm, 较安乃近分别红移了 3, 2 nm 和蓝移了 2 nm; 若以氨基酸为空白, 结合产物的吸光度值明显低于安乃近, 摩尔吸光系数也低于药物本身. 三个反应体系的吸收光谱特征列于表 3. 由此可见, 三种氨基酸与 ANG 相互作用时形成了基态复合物.

从双分子猝灭常数 K_q , 温度对荧光猝灭作用的影响以及吸收光谱的变化, 可以推断安乃近对三种氨基酸的荧光猝灭是一种静态猝灭.

2.5 方法的选择性及分析应用

2.5.1 共存物质的影响

以灵敏度最高的 ANG-Trp 体系为例, 探讨了共存物质对测定的影响. 当 ANG 浓度为 $1.0 \mu\text{g/mL}$, 测量误差 $\pm 5\%$ 以内时, 下列物质允许倍量为: 尿素(1000 倍); 乳糖、葡萄糖、KCl、 NH_4Cl 、 MgSO_4 (200 倍); 麦芽糖、蔗糖、淀粉、 CaCl_2 、 $\text{NH}_4\text{Fe}(\text{SO}_4)_2$ 、 MnSO_4 (100 倍); 精氨酸、赖氨酸、天冬氨酸、半胱氨酸、KI、 $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$ (50 倍); HAS, BSA, NaAc (30 倍); VB_{12} , CuSO_4 (20 倍). 表明高倍量的金属离子、糖类、氨基酸不影响测定, 该方法也允许一定量的蛋白质、维生素及大量的尿素等存在.

因此, 方法具有良好的选择性, 可用于痕量 ANG 的定量测定.

图 5 不同温度下的 Stern-Volmer 图

Figure 5 The Stern-Volmer of different temperatures

A: ANG-Trp system, Trp: $4.0\times 10^{-5} \text{ mol/L}$, ANG: 0.50, 1.00, 1.50, 2.00, 2.50 $\mu\text{g/mL}$ respectively; pH 3.2. B: ANG-Tyr system, Tyr: $4.0\times 10^{-5} \text{ mol/L}$, ANG: 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25 $\mu\text{g/mL}$ respectively; pH 3.2. C: ANG-Phe system, Phe: $8.0\times 10^{-4} \text{ mol/L}$, ANG: 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25 $\mu\text{g/mL}$ respectively; pH 3.2

表 3 反应体系的吸收光谱特征^a

Table 3 The characteristics of absorption spectra of the reaction systems

	ANG	Trp	Tyr	Phe	ANG-Trp	ANG-Tyr	ANG-Phe
$\lambda_{\max}/\text{nm}$	255	276	273	256	258	256	254
$\epsilon_{\max}/(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1})$	9.03×10^4	5.65×10^3	1.35×10^3	1.81×10^2	1.05×10^5	8.85×10^4	9.48×10^4
$\lambda_{\max}^*/\text{nm}$	—	—	—	—	250	254	254
$\epsilon_{\max}^*/(\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1})$	—	—	—	—	8.39×10^4	8.50×10^4	8.53×10^4

^a $\lambda_{\max}$ and $\epsilon_{\max}$ were measured using water blank; $\lambda_{\max}^*$ and $\epsilon_{\max}^*$ were measured using amino acid blank.

图 6 吸收光谱

Figure 6 Absorption spectra

1. ANG; 2. Trp; 3. Tyr; 4. Phe; 5. ANG-Trp; 6. ANG-Tyr; 7. ANG-Phe; 8. ANG-Trp; ANG: 10.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Trp and Tyr: 2.0×10^{-4} mol/L, Phe: 1.6×10^{-3} mol/L; pH 3.2. 1~7 were determined using water blank. 8 was determined using Trp blank.

3 分析应用

3.1 安乃近片剂中含量的测定

取市售安乃近片剂 10 片(250 mg/片), 准确称其质量, 研细. 称取相当于 1 片质量的样品, 置于 100 mL 的

容量瓶中, 加水定容, 摇匀. 过滤, 弃去初滤液, 取适量续滤液稀释后测定安乃近的含量, 并将测定结果与比色分析法^[24]对照, 结果列于表 4 中. 从表 4 可以看出, 本法的结果与文献法基本一致, 表明可用于安乃近制剂的含量检测.

3.2 人尿样的测定

5 名健康志愿者受试前晚禁食, 次晨服用 1 片 ANG(0.25 g/片), 用温开水 100 mL 送服, 收集用药后 0~10 h 尿样, 记录尿量. 过滤除去尿样中的杂质, 取适量尿液于 10.0 mL 比色管中, 依次加入 1.0 mL pH 3.2 的 BR 缓冲溶液和 1.0 mL 4.0×10^{-4} mol/L 酪氨酸溶液, 用二次蒸馏水定容至 10.0 mL, 摇匀, 然后测定 ANG 代谢产物的浓度. 已知 ANG 进入人体后迅速代谢, 尿样中检测不出安乃近原药, 但可以检测其代谢产物^[25], 从而根据代谢产物的量可以换算人体吸收安乃近原药的量. 因本实验测定几种代谢产物的线性关系曲线相似, 故以代谢产物 MAA 的浓度表示代谢产物的总浓度, 测定结果列于表 5.

由表 5 可以看出, 服药 0~1 h 后, 尿样中开始出现代谢产物, 3 h 的尿药浓度达到峰值, 与文献报道^[25]基本

表 4 安乃近片剂的测定结果

Table 4 Results for the determination of ANG in tablets

Sample	Label claim (mg/tablet)	Average found (mg/tablet) ($n=5$)		Fluorescence quenching method	Photocolorimetric method ^[24]
		Fluorescence quenching method	Photocolorimetric method ^[24]	RSD/%	RSD/%
No.1	250.0	235.7, 228.5, 231.3, 223.0, 236.9	226.7, 221.3, 233.7, 236.1, 230.5	2.4	2.5

表 5 人尿样中安乃近代谢物的测定结果

Table 5 Results for the determination of ANG metabolin in urine samples

Sample	Found (ANG metabolin)/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Added MAA/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Total found ($n=5$)	Recovery/%	RSD/%
1 ^a	13.7	10.0	24.2, 24.8, 25.0, 23.5, 23.1	104.2	3.4
2 ^b	166.4	100.0	264.0, 260.2, 258.4, 269.4, 258.6	95.7	1.8
3 ^c	22.4	15.0	38.2, 36.7, 35.8, 37.9, 35.5	96.1	3.3

^a 服用 ANG 片剂 0~1 h 的尿样; ^b 服用 ANG 片剂 1~3 h 的尿样; ^c 服用 ANG 片剂 3~10 h 的尿样.

一致。本法用于尿液中安乃近代谢产物的测定, 重复性好, 准确度高。相对标准偏差(RSD)为 1.8%~3.4%, 加标回收率在 95.7%~104.2%之间。为临床分析安乃近药代动力学的研究提供了新的方法, 为科学合理、安全有效地使用安乃近提供了有价值的依据。

References

- 1 Zheng, H. *Pharmaceutical Chemistry*, Chinese Medicine and Technology Publishing House, 1st ed., **2000**, p. 36 (in Chinese).
(郑虎, 药物化学, 中国医药科技出版社(第一版), **2000**, p. 36.)
- 2 Jiang, Z.-J.; Shao, M.-L.; Li, Z.-J. *The People's Republic of China Pharmacopoeia(II)*, Chemical Industry Press, Beijing, **2005**, p. 210 (in Chinese).
(蒋作君, 邵明立, 李振吉, 中华人民共和国药典(第二部), 化学工业出版社, 北京, **2005**, p. 210.)
- 3 Perezruiz, T.; Martinezlozano, C.; Tomas, V.; Carpena, J. *Microchem. J.* **1993**, 47(3), 296.
- 4 Huang, H.-Q.; Huang, Z.-Z. *Chin. J. Spectrosc. Lab.* **2002**, 19(6), 777 (in Chinese).
(王慧琴, 黄振中, 光谱实验室, **2002**, 19(6), 777.)
- 5 Sakiara, K.-A.; Pezza, L.; Melios, C.-B.; Pezza, H.-R.; De-Moraes, M. *Farmaco* **1999**, 54, 629.
- 6 Dine, E.; Onur, F. *Sci. Pharm.* **1999**, 67, 57.
- 7 Ma, W.-X. *Spectrosc. Spect. Anal.* **1999**, 19(3), 505 (in Chinese).
(马卫兴, 光谱学与光谱分析, **1999**, 19(3), 505.)
- 8 Vlasova, I.-V.; Shilova, A.-V.; Fokina, Y.-S. *Khim.-Farm. Zh.* **2008**, 42(10), 49.
- 9 Li, Y.-G.; Yang, S.-K. *Appl. Chem. Ind.* **2009**, 38(10), 1521 (in Chinese).
(李元岗, 杨胜科, 应用化工, **2009**, 38(10), 1521.)
- 10 Zhang, H.-G.; Zhu, X.-H.; He, Y.-H. *Chin. J. Anal. Lab.* **2005**, 24(1), 5 (in Chinese).
(张红鸽, 祝兴华, 何云华, 分析实验室, **2005**, 24(1), 5.)
- 11 Zhao, L.-X.; Li, B.-X.; Zhang, Z.-J.; Lin, J.-M. *Sens. Actuators, B* **2004**, 97, 266.
- 12 Yang, F.-Z.; Zhang, C.; Wang, J.-N. *Spectrosc. Spect. Anal.* **2004**, 24(2), 145 (in Chinese).
(杨凤珍, 张超, 王建宁, 光谱学与光谱分析, **2004**, 24(2), 145.)
- 13 Huang, Y.-M.; Zhang, C.; Zhang, X.-R.; Zhang, Z.-J. *Fresenius J. Anal. Chem.* **1999**, 365(4), 381.
- 14 Song, Z.-H.; Zhang, N. *Bioorg. Med. Chem.* **2002**, 10(7), 2091.
- 15 He, Y.-H.; Lu, J.-R.; Zhang, H.-G.; Du, J.-X. *Chem. J. Chin. Univ.* **2005**, 26(4), 642 (in Chinese).
(何云华, 吕九如, 张红鸽, 杜建修, 高等学校化学学报, **2005**, 26(4), 642.)
- 16 Huang, Y.-M.; Zhang, C.; Zhang, X.-R.; Zhang, Z.-J. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1999**, 21(4), 817.
- 17 Buhl, F.; Hachula, U.; Chwistek, M. *J. Chromatogr., A* **1981**, 219(1), 189.
- 18 Shen, J.-C.; Pang, G.-F.; Xie, L.-Q. *Chin. J. Anal. Chem.* **2007**, 35(11), 1565 (in Chinese).
(沈金灿, 庞国芳, 谢丽琪, 分析化学, **2007**, 35(11), 1565.)
- 19 Penney, L.; Bergeron, C.; Coates, B. *J. AOAC Int.* **2005**, 88, 496.
- 20 Ruiz, T.-P.; Lozano, C.-M.; Tomás, V. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1994**, 12(9), 1109.
- 21 Chen, G.-Z.; Huang, X.-Z.; Zheng, B.-Z.; Xu, J.-G.; Wang, Z.-B. *Fluorescence Analysis*, 2nd ed., Science Press, Beijing, **1990**, p. 112 (in Chinese).
(陈国珍, 黄贤智, 郑本梓, 许金钩, 王尊本, 荧光分析法(第二版), 科学出版社, 北京, **1990**, p. 112.)
- 22 Lakawicz, J.-R. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3rd ed., Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, **2006**, p. 64.
- 23 Ni, Y.-N.; Wang, S.-S.; Kokot, S. *Anal. Chim. Acta* **2010**, 663(2), 139.
- 24 Dlab, A.-M. *Die Pharmazie* **1977**, 32(4), 226.
- 25 Asmard, G.; Jamali, F. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* **1985**, 10(2), 121.

(A1106072 Cheng, F.)