

抗肿瘤药物代谢的荧光光谱分析

孟继武¹, 许力军², 任新光³, 掌蕴东¹, 侯尚公³

(1. 哈尔滨工业大学 可调谐激光技术国家重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150001;

2. 白求恩医科大学 第一临床学院, 吉林 长春 130021; 3. 中国科学院长春光学精密机械与物理研究所, 吉林 长春 130021)

摘要: 采用水作为溶剂模拟尿液中药物并对其进行定量分析, 探讨了荧光分析法对人体内药物代谢程度的研究。阐述了荧光猝灭剂、敏化剂及浓度效应对其的干扰, 描述了荧光分析法药物定量分析的规程。从 1×10^{-7} g/mL 血嘧啶水溶液的荧光光谱实验中观察到含 Fe^{+} 化合物浓度在 10^{-4} g/mL 足以产生严重影响, 引起荧光猝灭; 图 1、图 2 分别示出了浓度为 1×10^{-3} g/mL 和 1×10^{-4} g/mL 的盐酸阿霉素荧光光谱和激发光谱。比较可以看到低于 1 个数量级的盐酸阿霉素的发光强度却高。浓度猝灭现象可以从光谱的移动来判断, 随着样品浓度的降低, 发光强度却增强, 光谱发生蓝移或红移。排除浓度效应干扰的方法是增加不同浓度发光强度的测量点, 找出线形区域后, 应用实验结果和 (1) 式来分析; 采用 Förster 理论讨论了能量施、受主之间的敏化机制。实验给出了嘧啶、盐酸阿霉素、丝裂霉素、依托泊甙、硫酸醛长春碱的荧光光谱和激发光谱; 检测限分别达到 $10^{-3} \sim 10^{-7}$ g/mL; 表明其完全可以满足此类药物对检测灵敏度的要求。

关键词: 抗肿瘤药物; 荧光光谱; 激发光谱

中图分类号: Q599

文献标识码: A

文章编号: 1000-7032(2000)04-0376-04

1 引 言

药物代谢研究和药物的半衰减期分析是体现药物性能的重要指标。通常对药物代谢和药物半衰减期分析是对人血清和尿液采用化学分析得到的。化学分析法的检测限一般可达 $10^{-3} \sim 10^{-6}$ g/mL, 分析过程中需要分离, 因此操作复杂。西药分子大多含有共轭结构和羟基或其它亲水基团。具有共轭结构的分子在光照下能被激发, 分子从激发态跃迁到基态时, 会释放出能量产生发光。单重态之间电子跃迁所发出荧光的强度, 在稀溶液状态下与发光物质的浓度间的关系为

$$I = I_0 K \phi \epsilon L C \quad (1)$$

式中 I_0 : 激发光强度, K : 仪器常数, ϕ : 发光物质的荧光量子产率, ϵ : 克分子消光系数, L : 样品池的光程长度, C : 发光物质的浓度。由上式可以看到, 物质的发光强度与该物质的浓度呈线形关系。因此可以用荧光强度来表示发光物质的含量。荧光分析法具有高的选择性, 高灵敏度和高分辨率, 其检出极限可达 10^{-12} g/mL; 因此荧光分析是很好的检测方法之一。通过选择激发且可以检测出复杂混合物中单一分子的含量。本文采用荧光光谱法进行了药物代谢研究。注射用药要求水溶性

好, 大部分西药均具有亲水基团, 因此我们采用水作为溶剂模拟尿液进行药物痕量分析, 为尿液荧光法药物代谢研究奠定了理论和实验依据。

2 材料与 方法

2.1 药物水溶液的制备

采用去离子水作为溶剂, 配制浓度依药物的实际使用量 (1g/10kg)。水溶液静置 30min 后进行荧光光谱测量。

2.2 光谱测量

采用日本日立公司产 F-4000 型荧光分光光度计进行荧光光谱、激发光谱的测量。

3 结果与 讨论

3.1 发光中心的分析

稀溶液中有机分子的发光大多属于分立中心发光, 由于分子存在着振动弛豫, 依据能量守恒定律和 Stokes 定律, 分子的激发光谱与荧光光谱呈镜像对称。通过镜像对称分析, 可以鉴别出所测得到荧光光谱是否是其它杂质的发光, 以便排除杂质发光的干扰。有机共轭分子的发光主要来源于 π 电子跃迁, Hückel 分子轨道理论分别给出了单环、多核环状、直链共轭分子的能量 $E^{[1]}$

$$E = \alpha + 2\beta \cos(2p\pi/m) \quad (p = 0, \dots, m-1) \quad (2)$$

式中 α 为碳原子轨道能量, β 为相邻原子间的交换积分, m 为环中 π 电子数。

$$E = \alpha + 2\beta \cos(p\pi/n) \quad (p = 1, \dots, n) \quad (3)$$

上式中 n 为核中 π 电子数。

$$E = \alpha + 2\beta \cos(p\pi/k+1) \quad (p = 1, \dots, k) \quad (4)$$

上式中 k 为直链中 π 电子数。采用 Hückel 近似, 可以通过苯的光谱数据得到 α 、 β 数值, 再根据药物的激发光谱、通过(1)式的计算可以得到电子跃迁类、得到分子的 π 电子数。由于溶剂与药物分子之间的相互作用、药物分子之间的相互作用、不同分子之间的相互作用往往使光谱发生红移或蓝移, 通过实验和经验积累可分析排除这两种效应的干扰。药物分子之间相互作用的干扰可以分为3种类型: 1. 溶液中存在猝灭中心; 2. 浓度效应; 3. 溶液中存在其它有机分子的敏化作用。

3.2 荧光猝灭中心的干扰

Fe 离子是荧光猝灭剂, 溶液中含有铁离子会引起荧光猝灭。猝灭剂的存在可以显著地减弱被测分子的荧光强度, 含 Fe 化合物浓度在 10^{-4} g/mL 量级足以对浓度为 1×10^{-7} g/mL HpD 溶液的荧光强度产生严重影响, 引起荧光猝灭^[4]。

3.3 浓度效应的干扰

(1) 式仅适用于稀溶液, 药物浓度过高能够发生积聚, 等效减少了发光粒子数, 引起荧光猝灭。图1、图2分别示出了浓度为 1×10^{-3} g/mL 和 1×10^{-4} g/mL 的盐酸阿霉素的荧光光谱和激发光谱。比较可以看到低于1个数量级的盐酸阿霉素的发光强度却高。浓度猝灭现象可以从光谱的移动来判断, 随着样品浓度的降低发光强度却增强, 光谱发生蓝移或红移。排除浓度效应干扰的方法是增加不同浓度发光强度的测量点, 找出线形区域后方能应用(1)式。有机分子随着浓度的提高容易形成复合物, 引起分子能隙的改变, 使其荧光光谱发生大的变动甚至移出探测范围; 另外随着浓度的提高分子碰撞失活几率上升亦可引起荧光猝灭。溶剂的 pH 值和溶剂极性对发光强度也有明显的影响。我们曾详细地研究了溶剂的 pH 值和溶剂极性对血卟啉发光的影响^[4], 结果表明溶剂理、化环境的影响具有一定的规律性。

3.4 敏化中心的干扰

溶液中如果含有敏化剂能够使样品的发光强

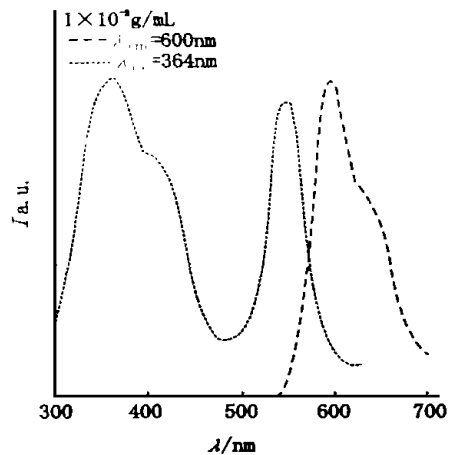


图1 盐酸阿霉素的荧光光谱和激发光谱

Fig. 1 Fluorescence and excitation spectrum of doxorubicin hydrochloride.

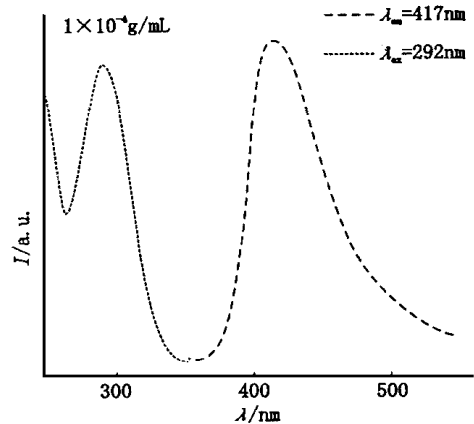


图2 盐酸阿霉素的荧光光谱和激发光谱

Fig. 2 Fluorescence and excitation spectrum of doxorubicin hydrochloride.

度增强造成被测分子浓度升高的干扰。Forster 详细地讨论能量施、受主之间的敏化机制, 给出了施、受主之间的共振能量传递效率 T ^[2]

$$T = R_0^6 / (R_0^6 + r^6) \quad (5)$$

$$R_0^6 = 8.8 \times 10^{-25} \Phi_s k^2 n^{-4} \bar{\omega}^4 F \quad (6)$$

$$F = \int S(\nu) \epsilon_A(\nu) d\nu \quad (7)$$

式中 R_0 : 施、受主之间的能量传递的临界距离; r : 施、受主之间的相互作用距离, 与施、受主的浓度相关; Φ_s : 施主荧光量子产率; F : 施主的荧光光谱与受主的激发光谱的重叠积分。由(6)式可以看到施主的荧光光谱与被测分子的激发光谱重叠面积越大对测量的影响越严重。有机分子的光谱呈带状很容易造成一个分子的荧光光谱同另一个分子的激发光谱重叠。测量尿样中的嘌呤含量

时要注意蛋白质的敏化效应^[3]。溶液中是否存在敏化剂可从被测分子的激发光谱观察到, 激发光谱中除了分子自身的光谱外尚叠加以敏化剂的光谱, 这从血卟啉牛血清溶液的激发光谱可以清楚地观察到^[3]。

3.5 药物代谢水平的分析

通常药物代谢是通过尿样的化学分析进行的, 尿液的成分 99% 以上为水, 因此采用药物的水溶液来模拟尿液中药物进行光谱分析是可行的。抗肿瘤药物大多含有苯环, 具有荧光性, 均可采用荧光光谱法进行其代谢水平的分析。盐酸阿霉素、丝裂霉素、依托泊甙、硫酸醛长春碱的荧光光谱分别示于图 1、图 2、图 3、图 4 和图 5。

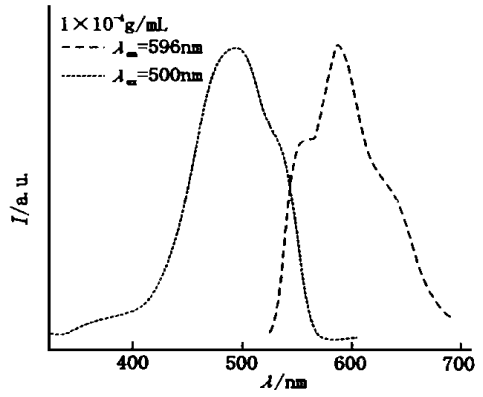


图 3 丝裂霉素的荧光光谱和激发光谱
Fig. 3 Fluorescence and excitation spectrum of C Mitomycin-c for injection.

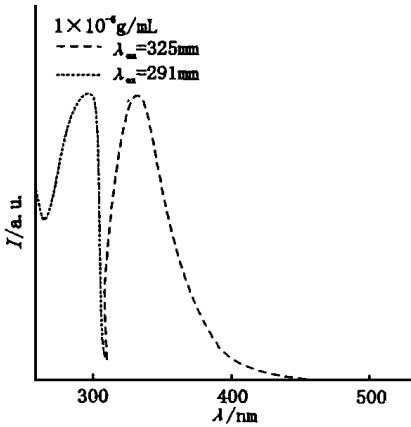


图 4 依托泊甙的荧光光谱和激发光谱

Fig. 4 Fluorescence and excitation spectrum of etoposide.

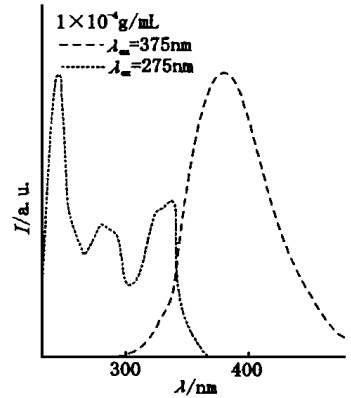


图 5 硫酸醛基长春碱的荧光光谱和激发谱

Fig. 5 Fluorescence and excitation spectrum of vincristinal sulfas.

临床用西药大多具有共轭结构, 在低浓度状态下多具荧光性, 均可以采用荧光光谱法进行其代谢水平的分析。荧光分析操作简单、检测速度

快、不损伤标本。由于存在以上优点, 荧光光谱分析法还可被广泛应用于工、农业和环保等方面。

参 考 文 献:

[1] 藤永茂. 分子轨道法 [M]. 东京: 岩波书店, 1987.
 [2] Forster T. *Modern Quantum Chemistry* [M]. Part III, New York, Academic Print, 1965, p93.
 [3] Hou Shangong, Meng Jiwu, Lin Jiuling, et al. The energy transmission between bovine albumin and hematoporphyrin [J]. *Chin. J. Lumin.*, 1986, 7: 117-122.
 [4] Meng Jiwu, Liu Zhiguang, Hou Shangong, et al. Study on the electronic spectrum of hematoporphyrin [J]. *Chin. J. Norman Bethune University of Medical Sciences*, 1987, 13: 12-15.

Fluorescence Analysis for the Anti-tumour Medicaments Metabolized in the Patients Body

MENG Ji-wu¹, XU Li-jun², REN Xin-guang³, ZHANG Yun-dong¹, HUO Shang-gong³

(1. National Key Laboratory of Tunable Laser Technology, Harbin Institute of Technology, Harbin 150001, China;

2. First Clinical Hospital, Norman Bethune University of Medical Sciences, Changchun 130021, China;

3. Changchun Institute of Optics, Fine Mechanics and Physics, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130021, China)

Abstract: The metabolic level of medications which treat cancer was studied by fluorescence spectroscopic analysis in the patients body, the medications were quantitatively analyzed in the urine that was simulated with water as solvent. The measuring conditions were discussed, including the effects of fluorescence quenching, sensitization medium and the medication concentration change. The method of quantitative analysis was researched for the medication metabolizing in body by fluorescence spectroscopy, and the sensitizing pattern between donor and acceptor of energy was discussed with Forster theory in this paper.

The results show that fluorescence is quenched as the compound containing Fe^{2+} concentration is $1 \times 10^{-4} \text{g/mL}$ in $1 \times 10^{-7} \text{g/mL}$ HPD (hematoporphyrin); the luminescence intensity of poxorubicin hydrochloride is higher as its concentration is lower from contrasting concentration $1 \times 10^{-3} \text{g/mL}$ to $1 \times 10^{-4} \text{g/mL}$ for fluorescence and excitation spectra, respectively, and the spectra are shifting red or blue when the concentration quenching arise, then can get rid of the interference of concentration effect by changing the point of measuring luminescence intensity on the line area, and the fluorescence and excitation spectra of Poxorubicin Hydrochloride; Etoposide; Vincristinal Sulfas and Mitomycin-c for injection could also be obtained from this experiment.

The detection limit of this method can achieve $10^{-3} \sim 10^{-7} \text{g/mL}$, and this results show that detection sensitivity of fluorescence spectroscopy is higher than those of other analytic methods.

Key words: treat medications for cancer; fluorescence spectrum; excitation spectrum