

# 用光纤化学传感器连续在位监测甲硝唑片的体外溶出度

朱 滨 邢君芬\* 陈 坚

(新疆医学院药理学系, 乌鲁木齐 830054)

**摘要** 采用80年代发展的新技术——光纤化学传感器连续在位监测了甲硝唑片的体外溶出过程, 溶出曲线用三参量双指数函数拟合。方法的回收率为99.7~102.3%, 日内、日间精密度的相对标准偏差(RSD)均小于3.0%。经与 USP(XXII)方法对照, 各时间甲硝唑累积溶出量和拟合后提取的参数(除延迟时间  $T_{lag}$ )均无显著差异( $P > 0.05$ )。甲硝唑片的主要溶出方式为未崩解片剂表面直接溶出。

**关键词** 光导纤维; 化学传感器; 甲硝唑; 溶出度; 三参量双指数函数

药物制剂溶出度的研究意义重大<sup>(1)</sup>。在体外溶出试验中, 有时瞬间的药物溶出量就有很大差异, 因此取样的位置、快慢以及取样的时间间隔将直接影响试验结果。自动取样系统等自动化技术的应用使上述问题有所改善, 但又带来了诸如滤膜的阻塞以及管壁对药物的吸附等问题。

本文采用80年代发展的新技术——光纤化学传感器(fiber-optic chemical sensor, FOCS)<sup>(2)</sup>, 连续在位监测了甲硝唑片的体外溶出度, 溶出曲线采用三参量双指数(three parameter biexponential, TPBE)函数<sup>(3)</sup>拟合。实验结果表明, 该法准确、可靠、简便、快速, 能成功地解决上述诸问题。

## 基本 原 理

已有文献<sup>(4)</sup>述及典型的 FOCS 的工作原理。本文采用固定有荧光分子探针(fluoroprobe)芘丁酸(pyrenebutyric acid)的醋酸纤维素膜做为 FOCS 的固定化试剂相。膜中荧光物质吸收辐射后将发射荧光, 但膜的相对荧光强度(F)却受到荧光试剂芘丁酸所处的物理和化学环境影响。光环境中存在荧光猝灭剂甲硝唑时, 膜的相对荧光强度将下降, 其对猝灭剂浓度的依赖关系符合假定猝灭剂与生荧光分子之间发生的是双分子碰撞而导出的动力学定律 Stern-Volmer 公式:

$$F_0/F = 1 + K_{sv}[Q]$$

式中:  $F_0$  为无猝灭剂存在时膜中荧光试剂的相对荧光强度,  $F$  为猝灭剂(甲硝唑)浓度为  $[Q]$  时的相对荧光强度,  $K_{sv}$  为 Stern-Volmer 猝灭常数。

如有二种或二种以上猝灭剂共存时, 上式修正为:

$$F_0/F = 1 + K_1[Q_1] + K_2[Q_2] + \dots$$

假如仅有一种猝灭剂浓度为变量, 则  $F_0/F$  与该猝灭剂浓度仍呈线性关系, 但截距大于1<sup>(5)</sup>。

本文于1993年9月15日收到。

本课题为国家自然科学基金和新疆自然科学基金共同资助项目

\* 新疆临床药学研究所, 乌鲁木齐 830001

## 实验部分

### 仪器试剂

RF-540荧光分光光度计(日本 Shimazu);UV-365紫外可见分光光度计(日本 Shimazu);4503 MP6微量电子天平(德国 Sartorius);80-II 型药物释放度测定仪(江苏武进精密仪器厂)。

醋酸纤维素(美国 Scientific Polymer Products Inc.);苾丁酸(美国 Molecular Probes Inc.);甲硝唑(武汉制药厂,900624);甲硝唑片(天津力生制药厂,8312043)。

其它试剂均为分析纯。

### 实验装置

**固定化试剂相的制备** 称取0.5 g 醋酸纤维素加丙酮—二氧六环(1:5)使溶,然后加入苾丁酸288  $\mu\text{g}$  和磷酸三丁酯(以增加膜的弹性和韧性)0.1 ml,溶解、振荡混匀后倾入2 cm $\times$ 8 cm的水平皿中,置通风橱中挥干溶剂,即得厚约0.05 mm的薄膜状化学试剂相,切割成1.0 cm $^2$ 小片备用。该膜片的激发、发射光谱如图1所示。为克服散射光等的干扰,测定中以280 nm 光激发膜的荧光,荧光的检测波长为380 nm。

**FOCS 系统** 取下 RF-540荧光分光光度计样品室中样品池支架,将一石英分支光纤(北京玻璃研究所)的两个支端( $\varnothing$  2.5 mm)分别固定于适宜位置,使入射光最大限度地进入光纤的一支,而从光纤另一支返回的光信号最大限度地到达检测器。在分支光纤的总端( $\varnothing$  4.5 mm)套一端部具凹槽(以确保样品溶液与膜充分接触)的聚氯乙烯塑料管(50 mm $\times$ 5.0 mm),将制好的化学试剂相膜片剪成圆形( $\varnothing$  5.0 mm),用二氧六环粘在套管端部,移动套管以调整膜片与光纤端的距离,固定套管即可。有文献<sup>(6)</sup>指出对于光纤束,上述距离的改变将影响测定的灵敏度和线性范围。经试验,膜片距光纤端1.0 mm 时,系统具有较大的灵敏度和线性范围。图2为测定装置示意图。

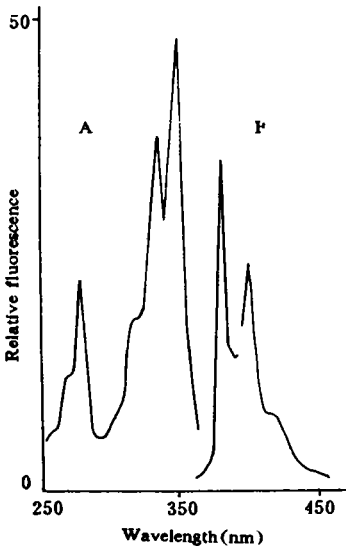


Fig 1 Fluorescent spectra of membrane.  
A. Excitation spectrum; B. Emission spectrum.

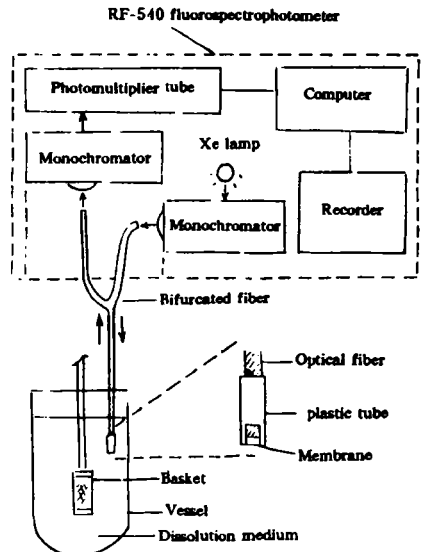


Fig 2 Schematic diagram of FOCS apparatus.

**FOCS 的性能** 测定甲硝唑时,FOCS 的主要性能指标为:(1)可逆度 相继测定空白溶液、20  $\mu\text{g/ml}$  甲硝唑溶液、空白溶液的相对荧光强度( $F_0, F, F_0$ ),按可逆度 $\% = ((F_0 - F)/(F_0 - F)) \times 100$ 计算,百分可逆度为 $100.4 \pm 0.5\%$ ;(2)响应时间 传感器插入待测液至读数稳定约需1 s;(3)重现性 20  $\mu\text{g/ml}$  甲硝唑溶液5次重复测定的RSD为1.2%;(4)检出限 采用文献<sup>(7)</sup>方法,以下式求得检出限为3.5  $\mu\text{g/ml}$ ;

$$\text{检出限} = t_{\alpha, \psi} S_x [(1/n_s) + (1/n_b)]^{1/2}$$

式中 $\alpha$ 为规定的置信水准(99%), $\psi$ 为测定空白的标准偏差 $S_x$ 的自由度, $n_s$ 和 $n_b$ 为样品和空白实际测定次数;(5)pH为2~11,温度为15~50 $^{\circ}\text{C}$ 时,不影响测定。

### 溶出度测定

**工作曲线的制备** 用0.1 mol/L 盐酸配制0,10,40,80,160,240  $\mu\text{g/ml}$  的甲硝唑系列溶液,水浴加热至37 $^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ,将传感器插入上述溶液中,读取各自的相对荧光强度,以 $F_0/F$ 为纵坐标,甲硝唑浓度 $C$ 为横坐标绘制工作曲线(图3)。从图3可知,在高浓度区域, $F_0/F$ 与 $C$ 的关系偏离了Stern-Volmer公式,而呈对数曲线状(原因有待探讨), $\lg(F_0/F)$ 与 $C$ 有如下线性关系:

$$\lg(F_0/F) = 0.019 + 6.06 \times 10^{-3} C \quad (r=0.9990)$$

为便于应用,将上式作为工作曲线的回归方程。

**测定方法** 释放池中加入已脱气的0.1 mol/L 盐酸液900 ml,预热至37 $^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ,恒温。将传感器探头插入介质中,位置介于转篮与液面之间,距池壁10 mm(图2)。将RF-540荧光分光光度计条件设定如下:激发光波长280 nm,荧光检测波长380 nm,入射狭缝10 nm,出射狭缝5 nm。调节转篮转速为100 r/min,读取 $F_0$ 值。取甲硝唑片1片放入转篮中,当药片接触溶媒时开始计时,由仪器自动读取不同时间的 $F$ 值。将不同时间的 $\lg(F_0/F)$ 值代入工作曲线回归方程,计算得不同时间甲硝唑片的累积释放量。共测定6片,各片累积溶出百分率列入表1。另取甲硝唑片6片用USP(XXII)方法<sup>(8)</sup>在1,2,3,10,30,60 min 取样测定甲硝唑的累积溶出百分率,结果一并列入表1。两种方法平均累积溶出曲线见图4。

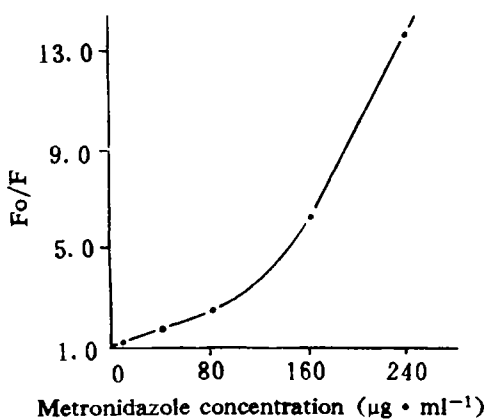


Fig 3 Calibration curve for FOCS.

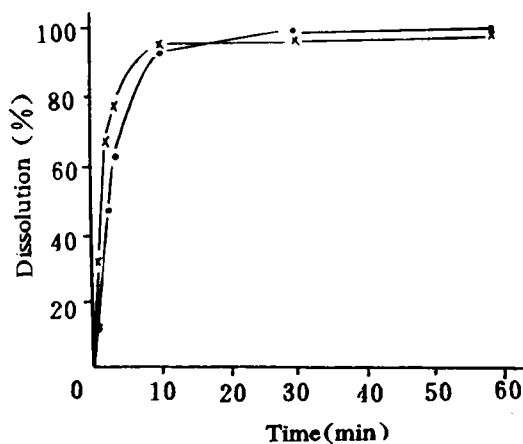


Fig 4 Comparison of percent dissolution between FOCS and USP(XXII) methods.  $\times$ — $\times$  FOCS;  $\cdot$ — $\cdot$  USP(XXII).

**Tab 1 Comparison of the percentage of metronidazole released between fiber-optic chemical sensor (FOCS) and USP(XXII) methods**

Time (min)	Method	Percentage of metronidazole released (%)							
		1	2	3	4	5	6	$\bar{x} \pm s$	<i>P</i>
1	FOCS	34.0	51.4	20.3	27.7	43.6	20.6	33.0±6.7	>0.05
	USP	32.6	33.0	33.6	36.0	18.3	13.8	27.9±9.3	
2	FOCS	77.6	89.5	42.6	56.5	86.7	43.8	66.1±12	>0.05
	USP	48.4	58.1	58.5	51.4	39.1	33.2	48.1±10	
3	FOCS	90.3	95.7	55.8	75.3	96.0	59.9	78.8±17	>0.05
	USP	65.7	75.3	73.7	62.2	50.8	50.1	63.0±11	
10	FOCS	91.4	98.7	93.9	98.8	98.0	96.1	96.4±2.8	>0.05
	USP	99.4	99.9	100	99.0	95.4	73.6	94.8±10	
30	FOCS	91.4	99.3	93.9	99.3	98.5	96.1	96.6±2.9	>0.05
	USP	99.4	102	100	99.2	95.4	96.1	98.9±2.6	
60	FOCS	92.5	99.3	93.9	99.4	98.5	96.1	96.6±2.9	>0.05
	USP	99.9	108	102	99.2	96.0	96.6	99.9±5.2	

**数据处理** 采用三参量双指数函数式对两种方法测得溶出曲线拟合,并提取下列参数列入表2。指数相系数  $Q_d, Q_s$ ; 未崩解片剂表面溶出速率常数  $K_i$ ; 崩解速率常数  $K_d$ ; 颗粒溶出速率常数  $K_s$ ; 延迟时间  $T_{lag}$  以及相关指数  $R$  等。

## 结 果

### 两种方法测定结果的比较

对表1、表2数据进行  $t$  检验,结果表明两种方法在不同时间测得的甲硝唑累积溶出百分率无显著差异 ( $P > 0.05$ ),经 TPBE 函数拟合后提取的参数(除  $T_{lag}$  外)亦无显著不同 ( $P > 0.05$ )。

**Tab 2 Dissolution testing parameters**

Method	Parameter ( $\bar{x} \pm s$ )						
	$Q_d$	$Q_s$	$K_i$	$K_d$	$K_s$	$T_{lag}$	$R$
FOCS	0.935	0.348	1.01	$3.83 \times 10^{-2}$	$3.20 \times 10^{-2}$	0.567	0.996
	±0.062	±0.43	±0.64	± $2.1 \times 10^{-2}$	± $2.5 \times 10^{-2}$	±0.45	0.01
USP(XXII)	0.819	0.396	0.524	$4.19 \times 10^{-2}$	$5.97 \times 10^{-2}$	0.00	0.994
	±0.16	±0.39	±0.21	± $4.9 \times 10^{-2}$	± $2.3 \times 10^{-2}$	±0.14	±0.01

### 精密度和回收率试验

精密称取已知含量的甲硝唑片粉适量,用0.1 mol/L 盐酸分别配制成含甲硝唑40,80,160  $\mu\text{g}/\text{ml}$  3个浓度水平的标准样品溶液,用 FOCS 法测得日内、日间精密度的 RSD 均小于3.0%,回收率为99.7%~102.3%(见表3)。

Tab 3 Precision and recovery of FOCS method ( $\bar{x} \pm s$ )

Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	Within-day (n=6)		Day-to-day (n=6)		Recovery (%)
	Amount found ( $\mu\text{g/ml}$ )	RSD (%)	Amount found ( $\mu\text{g/ml}$ )	RSD (%)	
40	39.9 $\pm$ 1.0	2.4	42.2 $\pm$ 1.2	2.8	99.7 $\pm$ 2.4
80	81.7 $\pm$ 0.8	1.0	73.2 $\pm$ 1.6	2.2	102.1 $\pm$ 1.0
160	163.7 $\pm$ 1.0	0.6	--	--	102.3 $\pm$ 0.6

## 讨 论

为便于同 USP(XXII)方法比较,表1中 FOCS 法监测数据仅选取1,2,3,10,30,60 min 数据列入。两种方法的试验数据均表明该批号甲硝唑片10 min 的溶出度超过90%,符合 USP(XXII)规定<sup>(8)</sup>,表2数据表明其主要溶出方式为未崩解片剂的表面直接溶出。

由于该批号甲硝唑片溶出速率很快,用 USP(XXII)法测定其溶出度时,用移液管吸取5 ml 溶液约需20 s,测得溶出度应为20 s 内的平均值,这使其溶出曲线与真实情况有微小差异,考虑这是造成两种方法所得延迟时间  $T_{lag}$  显著不同的主要原因。用 FOCS 监测时发现,6片甲硝唑片均在15~30 s 开始有程度不同的溶出行为,提示用 FOCS 法测得  $T_{lag}$  更接近实际情况。

从理论上分析,FOCS 法也存在一些潜在的问题,如 FOCS 的探头始终置于介质中,有可能影响介质的层流性质,使溶出度改变;介质中不溶性颗粒(如赋形剂等)可能会产生干扰等。在本研究中,因甲硝唑含量大(约占片重的70%),溶出快,试验证明上述影响不显著( $P>0.05$ ),但将该法用于其它药物制剂溶出度测定时,应考虑如何消除上述影响。Josefson M 等<sup>(9)</sup>在用光纤光度计测定非洛地平片溶出度时应用多变量校正程序通过计算机克服了不溶性颗粒的干扰,但对前者尚无令人满意的解决办法。

与 USP(XXII)方法的对比试验表明,用 FOCS 在位、连续动态监测药物制剂的体外溶出度,不仅解决了目前体外溶出度测定中存在的许多问题,而且监测中不需取样、过滤、补液等操作,简便易行,极大地节省了劳动强度,提高了测定的精密度和准确度,增加了信息量。FOCS 与计算机技术结合起来将使制剂体外溶出试验的研究自动化、智能化,前景光明。

致谢 醋酸纤维素和茚丁酸为美国 New Hampshire 州立大学的 Seitz WR 教授赠予。

## 参 考 文 献

- 1 刘国杰,等. 药剂学进展. 中国药学杂志 1991;26:387.
- 2 Seitz WR. Chemical sensors based on immobilized indicators and fiber optics. *CRC Crit Rev Anal Chem* 1988;19:135.
- 3 敖秉臣,等. 用 TPBE 函数研究磺胺嘧啶片的溶出度. 医药工业 1986;17:162.
- 4 朱滨、陈坚. 光纤化学传感器及其在药学领域的应用. 国外医学药学分册 1991;19:209.
- 5 Wolfbeis OS. Fiber optical fluorosensors in analytical and clinical chemistry. In: Schulman SG. *Molecular Luminescence Spectroscopy: Method and Application*. Part 2. New York; Wiley, 1988:202~212.
- 6 章竹君. 光导纤维化学传感器. 化学通报 1986;1:9.
- 7 于如娥主编. 分析化学. 第二版. 北京:人民卫生出版社 1986:31.

- 8 The United States Pharmacopeia. 22nd ed. Rockville; US Pharmacopeia Convention, Inc. 1990: 891.
- 9 Josefson M, et al. Optical fiber spectrometry in turbid solution by multivariate calibration applied to tablet dissolution testing. *Anal Chem* 1988;60:2666.

## CONTINUOUS IN SITU MONITORING OF THE DISSOLUTION RATE OF METRONIDAZOLE TABLETS USING A FIBER-OPTIC CHEMICAL SENSOR

B Zhu, JF Xing and J Chen

(*Department of Pharmacy, Xinjiang Medical College, Urumqi 830054*)

**ABSTRACT** A new approach to the continuous monitoring *in situ* of the dissolution rate of metronidazole tablets using fiber-optic chemical sensor (FOCS) without filtering and sampling is reported. It provided increasing amount of information on the dissolution test of tablets. The range of recovery (%) of the proposed method was 99.7~102.3%. The precision (RSD) of within-day and day-to-day was less than 4%. The three parameter biexponential (TPBE) function was used to fit the dissolution curve. The results of measurement for the dissolution test of metronidazole tablets using FOCS were in agreement with those of USP(XXII) method, and the FOCS method was simple and accurate.

**Key words** Fiber-optic; Chemical sensor; Metronidazole; Dissolution test; Three parameter biexponential function