

盐酸丙哌维林缓释胶囊体外释放度及体内外相关性

郭俊平¹, 田媛^{2,3}, 黄美花^{2,4}, 曹静^{2,3}, 张尊建^{2,3*}

(¹江苏省宜兴市人民医院, 宜兴 214200; ²中国药科大学分析测试中心, 南京 210009; ³中国药科大学药物质量与安全预警教育部重点实验室, 南京 210009; ⁴上海医药工业研究院化学制药新技术中心, 上海 200437)

摘要 建立了盐酸丙哌维林缓释胶囊体外释放度的 HPLC-UV 测定方法, 色谱柱为 Shim-pack VP-ODS C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.05 mol/L 磷酸盐缓冲溶液 (70:30), 检测波长为 230 nm。对影响盐酸丙哌维林缓释胶囊体外释放的各种因素进行了考察, 最终确定采用小杯法, 以蒸馏水 250 mL 为溶剂, 转速为 50 r/min, 介质温度为 (37 ± 0.5) °C。对体外释放度数据进行多种模型拟合, 确定盐酸丙哌维林缓释胶囊体外释放的最佳拟合模型为威布尔模型。采用 Loo-Riegelman 法计算盐酸丙哌维林缓释胶囊在健康受试者体内的吸收度, 与体外释放度进行点对点相关水平分析。结果表明, 其体内外相关性良好。

关键词 盐酸丙哌维林; 高效液相色谱-紫外检测; 体外释放度; 体内外相关性

中图分类号 R944 **文献标识码** A **文章编号** 1000-5048(2011)06-0522-05

Dissolution and *in vitro-in vivo* correlations of propiverine hydrochloride sustained-release capsulesGUO Jun-ping¹, TIAN Yuan^{2,3}, HUANG Mei-hua^{2,4}, CAO Jing^{2,3}, ZHANG Zun-jian^{2,3*}

¹Jiangsu Yixing People's Hospital, Yixing 214200; ²Center for Instrumental Analysis; ³Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance (Ministry of Education), China Pharmaceutical University, Nanjing 210009; ⁴Novel Technology Center of Pharmaceutical Chemistry, Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 200437, China

Abstract An HPLC-UV method was developed to determine the concentration of propiverine hydrochloride in the dissolution medium. The analyte was chromatographically separated on a Shimadzu Shim-pack VP-ODS C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) using a mixture of methanol-phosphate buffer (0.05 mol/L) (70:30) as mobile phase. An appropriate method was established for the dissolution testing. The small beaker method of dissolution testing in Chinese Pharmacopoeia was chosen. 250 mL distilled water was used as the dissolution medium at 50 r/min and (37 ± 0.5) °C. Weibull model was selected as the description of propiverine hydrochloride sustained release capsule's releasing mechanism. *In vitro-in vivo* correlation evaluation was studied by Loo-Riegelman method, which proved that *in vitro-in vivo* correlation was significant.

Key words propiverine hydrochloride; HPLC-UV; dissolution; *In vitro-in vivo* correlations

盐酸丙哌维林 (propiverine hydrochloride, 图 1) 具有抗胆碱和钙离子拮抗双重作用, 临床上用于神经原性膀胱、不稳定膀胱、膀胱刺激状态 (如慢性膀胱炎和慢性前列腺炎) 等引起的尿频、尿急和尿失禁的治疗, 具有良好的耐受性^[1-3]。1981 年, 德国 (前民主德国) 首先批准了盐酸丙哌维林速释片剂 (15 mg/片)。为了提高患者的依从性, 德国

Apogepha Arzneimittel GmbH 研制了盐酸丙哌维林缓释胶囊。本品目前尚未在国内上市, 其在中国人体内的药代动力学行为尚不明确。本研究对拟进口的盐酸丙哌维林缓释胶囊进行了体外释放度考察, 测定了其累积释放度, 对释放度数据进行模型拟合; 并对本品的体外释放百分率与其在中国受试者给药后各相应时间点的体内吸收百分率进行相

相关性研究。结果表明,二者具有良好的相关性。

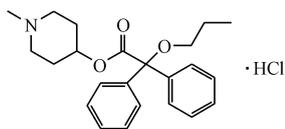


Figure 1 Chemical structure of propiverine hydrochloride

1 材料

1.1 药品与试剂

盐酸丙哌维林缓释胶囊(规格:30 mg/粒)、盐酸丙哌维林对照品(纯度 99.96%) (德国 Apogepha Arzneimittel GmbH); 甲醇(色谱纯,德国 Merck 公司); 其余试剂均为分析纯; 双蒸水(自制)。

1.2 仪器

1100 LC/DAD 系统(美国 Agilent 公司); ZRS-8G 智能溶出试验仪(天津市光学仪器厂); Finnigan™ TSQ Quantum Discovery MAX™ 液质联用系统(美国 Thermo Fisher 公司)。

2 方法与结果

2.1 体外释放度试验方法的建立与验证^[4-5]

2.1.1 溶液的配制 盐酸丙哌维林标准贮备液: 精密称取盐酸丙哌维林对照品适量, 甲醇溶解, 定量配制成 1.0 mg/mL 标准贮备液。使用时再精确稀释至所需浓度的标准工作液。

按中国药典(2010 版)附录方法配制 pH 4.5 的醋酸盐缓冲液和 pH 6.8 的磷酸盐缓冲液。

2.1.2 色谱条件 色谱柱: Shim-pack VP-ODS C₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-0.05 mol/L 磷酸盐缓冲溶液(70:30); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 230 nm; 柱温: 40 °C; 进样量: 20 μL; 理论塔板数: 按盐酸丙哌维林峰计算不低于 6 500。

2.1.3 专属性 将相当于 1 粒盐酸丙哌维林缓释胶囊所含的辅料与 1 粒空白胶囊壳、30 mg 盐酸丙

哌维林对照品和 1 粒盐酸丙哌维林缓释胶囊均分别溶于蒸馏水、0.1 mol/L HCl 溶液、pH 4.5 和 pH 6.8 缓冲液中, 超声溶解, 0.45 μm 滤膜滤过, 取续滤液进样分析, 在选定的测定条件下, 辅料和胶囊壳对盐酸丙哌维林的测定均无干扰。

2.1.4 标准曲线的制备 精密吸取盐酸丙哌维林标准工作液适量, 分别用蒸馏水、0.1 mol/L HCl 溶液、pH 4.5 和 pH 6.8 缓冲液稀释成浓度分别为 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200 μg/mL 的系列溶液, 进样分析, 记录样品色谱峰面积。以峰面积 A 对浓度(c, μg/mL) 进行线性回归, 回归方程见表 1。结果表明, 在 4 种介质中, 盐酸丙哌维林浓度在 2 ~ 200 μg/mL 范围内线性关系均良好。

Table 1 Regression equations of propiverine hydrochloride in four mediums

Medium	Regression equation ($w = 1/c$)
Distilled water	$c = 0.076 \times A + 0.045, r = 0.999 6$
Hydrochloric acid (0.1 mol/L)	$c = 0.083 \times A - 0.122, r = 0.999 9$
Acetate buffer (pH 4.5)	$c = 0.082 \times A - 0.013, r = 0.999 9$
Phosphate buffer (pH 6.8)	$c = 0.083 \times A - 0.047, r = 0.999 9$

2.1.5 批内和批间精密度 按标准曲线测定方法配制含盐酸丙哌维林 5、20 和 100 μg/mL 3 种不同浓度的蒸馏水、0.1 mol/L HCl 溶液、pH 4.5 和 pH 6.8 缓冲液溶液, 进样分析。在一个分析批内测定 5 次, 计算批内精密度; 在不同天制备并测定 3 个分析批, 计算批间精密度。测定结果表明, 在 4 种介质中, 盐酸丙哌维林样品分析的精密度良好, RSD 均小于 2%。

2.1.6 加样回收率 将 1 粒盐酸丙哌维林缓释胶囊分别溶于蒸馏水、0.1 mol/L HCl 溶液、pH 4.5 和 pH 6.8 缓冲液 1 000 mL 中, 使盐酸丙哌维林浓度约为 30 μg/mL, 以此作为本底溶液, 测得本底浓度; 再向本底中精密加入盐酸丙哌维林对照品适量, 配制成低、中、高 3 个浓度的溶液(盐酸丙哌维林加入浓度分别约为 30、60 和 90 μg/mL), 进样测定, 计算得加样回收率, 结果见表 2。

Table 2 Recovery of propiverine hydrochloride in four mediums ($n = 3$)

Medium	30		60		90 mg	
	Mean	RSD/%	Mean	RSD/%	Mean	RSD/%
Distilled water	101.78	0.55	98.05	0.76	98.68	0.68
Hydrochloric acid (0.1 mol/L)	98.65	0.56	98.68	0.58	98.45	0.45
Acetate buffer (pH 4.5)	99.43	0.64	99.56	0.63	98.38	0.58
Phosphate buffer (pH 6.8)	99.38	0.65	99.23	0.49	101.07	0.69

2.1.7 稳定性 按标准曲线测定方法配制含盐酸丙哌维林 5、20 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 3 种不同浓度的蒸馏水、0.1 mol/L HCl 溶液、pH 4.5 和 pH 6.8 缓冲液溶液,室温放置,分别于 0, 8, 16, 24 h 进样分析。测定结果表明,盐酸丙哌维林在 4 种介质中室温放置 24 h 稳定。

2.2 体外释放度测定

2.2.1 体外释放度测定条件确定 转速设定为 50 r/min 并固定其它条件,分别以蒸馏水、0.1 mol/L HCl 溶液、pH 4.5 缓冲液和 pH 6.8 缓冲液为释放介质,测定和比较盐酸丙哌维林缓释胶囊释放度。对不同释放介质中盐酸丙哌维林缓释胶囊释放曲线进行 f_2 因子检验,结果表明,在蒸馏水中和在 0.1 mol/L HCl 溶液、pH 4.5 缓冲液、pH 6.8 缓冲液中的释放曲线间的 f_2 分别为 61.57、60.21 和 57.53,在 0.1 mol/L HCl 溶液中和在 pH 4.5 缓冲液、pH 6.8 缓冲液中的释放曲线间的 f_2 分别为 72.20 和 81.92,在 pH 4.5 缓冲液中和在 pH 6.8 缓冲液中的释放曲线间的 f_2 为 72.86。相似因子 f_2 均大于 50,说明盐酸丙哌维林缓释胶囊在不同释放介质中的体外释放曲线相似,即释放介质不影响盐酸丙哌维林缓释胶囊的体外释放度。参考中国药典(2010 版)二部附录“缓释、控释制剂指导原则”中“释放溶剂”项下规定“以去空气的新蒸水为最佳溶剂”,因此选择超声脱气的蒸馏水为溶出介质。

以蒸馏水为释放介质,分别进行盐酸丙哌维林缓释胶囊在 50、75 和 100 r/min 转速中的释放度测定,采用美国 FDA 推荐的相似因子法评价两种不同转速下体外释放度差异。对不同转速下盐酸丙哌维林缓释胶囊释放曲线进行 f_2 因子检验,结果表明,50 r/min 与 75 r/min 比较, f_2 等于 59.75,50 r/min 与 100 r/min 比较, f_2 等于 53.17,75 r/min 与 100 r/min 比较, f_2 等于 59.48,均大于 50,说明 3 种不同转速下盐酸丙哌维林缓释胶囊释放度测定结果无差异,其释放特性受释放介质的流动形态影响较小。为较好地模拟人体内环境,最终确定转速为 50 r/min。

2.2.2 测定方法 采用中国药典(2010 版)二部附录中溶出度测定法第三法(小杯法),取盐酸丙哌维林缓释胶囊 1 粒,以蒸馏水 250 mL 为溶剂,转速为 50 r/min,介质温度为 $(37 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ 。依法操

作,在 1, 2, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 13 和 24 h 时分别取溶液 3.0 mL 滤过,并及时补充空白溶出介质 3.0 mL,取续滤液,按上述建立的 HPLC-UV 法进样分析,计算累积释放度 ($F_{\text{dissolution}}$),平行操作 6 次,平均释放度曲线见图 1。

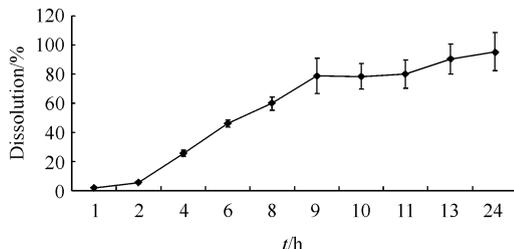


Figure 1 Dissolution of propiverine hydrochloride sustained-release capsule ($\bar{x} \pm s, n=6$)

2.3 释放模型拟合

对以蒸馏水为溶出介质,转速为 50 r/min 时测得的体外释放度数据分析,进行盐酸丙哌维林缓释胶囊体外释放度规律研究。采用单指数模型、威布尔(Weibull)模型、Higuchi 模型、Ritger-Peppas 方程、零级释放和 Hixcon Crowell 模型对释放度数据进行拟合,以各模型拟合方程预测各时间点的累积释放百分率,与实测值进行比较,计算实测值和拟合值的绝对偏差和相对偏差。以各模型拟合方程的 r 值、AIC 值及拟合绝对偏差和相对偏差,确定盐酸丙哌维林缓释胶囊体外释放的最佳拟合模型^[6-7]。

AIC (Akaike's Information Criterion) 的计算公式为: $AIC = n \ln Re + 2P$, 式中 n 为实验数据的个数, P 为所设模型参数的个数, Re 按下式计算: $Re = \sum W_i (F_{\text{实测}} - F_{\text{拟合}})^2$ 。

各模型拟合结果见表 3。由表可知,各模型拟合以威布尔模型方程拟合的 r 最大, AIC 及拟合绝对偏差和相对偏差最小,因此为最佳拟合模型。

Table 3 Regression equations of release curve in distilled water

Model	Regression equation	r	AIC
Monoexponential	$\ln(F_{\infty} - F) = -0.1474 \times t + 4.7003$	0.9629	67.82
Weibull	$\ln[1/(1-F)] = 1.7669 \times \ln t - 3.8181$	0.9842	60.54
Higuchi	$F = 29.03 \times t^{0.5} - 24.185$	0.9406	75.32
Ritger-Peppas	$\ln F = 1.3787 \times \ln t + 1.002$	0.9587	100.85
Zero order	$F = 4.486 \times t + 16.681$	0.8539	136.77
Hixcon Crowell	$(100 - F)^{1/3} = -0.1435 \times t + 4.5257$	0.9318	73.75

2.4 盐酸丙哌维林体内血药浓度的测定^[8]

盐酸丙哌维林体内血药浓度测定试验以盐酸西替利嗪为内标,乙酸乙酯提取后, HPLC-MS/MS

分离、分析。质谱采用电喷雾离子化-正离子选择性检测方式,盐酸丙哌维林测定离子: m/z 368.3→116.1,盐酸西替利嗪测定离子: m/z 389.2→201.0。盐酸丙哌维林在0.2~200 ng/mL浓度范围内线性关系良好(r 大于0.99),最低检测限为0.05 ng/mL,高、中、低3种浓度的平均提取回收率均大于90%,批内、批间精密度良好(RSD < 15%),分析方法符合生物样本测定要求。

试验经国家药物临床试验机构南京医科大学第一附属医院伦理委员会批准后实施。12名健康志愿者(男女各半)签定试验知情同意书后参加试验。受试者单剂量口服盐酸丙哌维林缓释胶囊1粒(30 mg/粒),分别于服药前(0 h)和服药后2, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 13, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96 h肘静脉采血3 mL,置肝素抗凝管中,3 000 r/min离心10 min,分离血浆,-20 °C冷冻保存,备测。应用所建立的分析方法测定了12名健康志愿者的血药浓度(图2),根据血药浓度数据计算出12名受试者平均的药代动力学参数如下: AUC_{0-96h} 为(1410.92 ± 519.49) ng·h/mL, $AUC_{0-\infty}$ 为(1467.36 ± 547.64) ng·h/mL, c_{max} 为(44.38 ± 11.88) ng/mL, t_{max} 为(8.75 ± 1.55) h, V 为(621.51 ± 264.47) L。

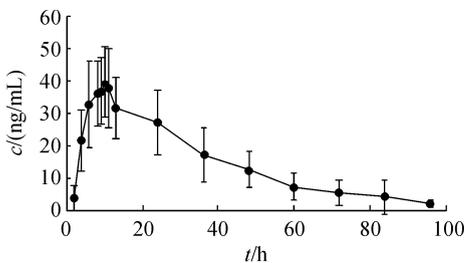


Figure 2 Mean plasma concentration-time curve of propiverine hydrochloride sustained release capsule in 12 male volunteers ($\bar{x} \pm s, n=12$)

2.5 体内外相关性

按中国药典(2010版)规定,用简化的Loo-Riegelman法计算体内吸收度。计算公式如下:

$$F_a = (X_A)_t / (X_A)_\infty \\ = [c_t + k_{10} AUC_{0-t} + (X_p)_t / V_c] / k_{10} AUC_{0-\infty}$$

其中, F_a 为 t 时药物吸收百分数, X_A 为体内已吸收药量, c_t 为 t 时体内血药浓度, k_{10} 为从中央室消除的表观一级消除速率常数, V_c 为中央室表观分布容积, X_p 为周边室药量。

选择以蒸馏水为溶出介质,转速为50 r/min

时测得的盐酸丙哌维林缓释胶囊的体外累积释放度6次平均数据($F_{dissolution}$)与12名受试者各对应时间点的体内吸收百分数平均数据(F_a)进行相关性研究。回归方程为 $F_a = 0.8976 F_{dissolution} + 0.0993$, $r = 0.9733$ 。根据相关系数临界值表: $r_{(0.001,7)} = 0.8982 < 0.9733$, $P < 0.001$,说明盐酸丙哌维林缓释胶囊体外累积释放度与体内吸收百分数显著相关,体内外具有良好的相关性^[9-11]。

3 讨论

3.1 释放度测定条件的优化

对于仪器装置的选择,应考虑具体的剂型及可能的释药机制。因盐酸丙哌维林缓释胶囊的规格为每粒30 mg,故考虑选择所需溶出介质较少的小杯法,溶出介质体积为250 mL,此时所建立的HPLC-UV测定方法能完全满足浓度测定的要求。

实验分别考察了50、75和100 r/min 3种不同转速以及蒸馏水、0.1 mol/L HCl溶液、pH 4.5和pH 6.8缓冲液4种不同的释放介质对盐酸丙哌维林缓释胶囊体外释放度的影响。结果表明,转速和释放介质均不影响其体外释放。经综合考虑,选定转速为50 r/min,释放介质为蒸馏水。

3.2 体内外相关性

体内外相关性水平可以归纳为3种(三级水平)^[12],本文采用了相关性水平最高的点对点相关性分析。结果表明,回归方程的相关系数 $r = 0.9733$,盐酸丙哌维林缓释胶囊体外累积释放度与体内吸收百分数相关性显著,体内外具有良好的相关性。说明本试验建立的体外释放度测定方法合理,可用于盐酸丙哌维林缓释胶囊的质量控制与评价,并能在一定程度上预测其体内过程,指导临床合理用药。

4 结论

本文建立了盐酸丙哌维林缓释胶囊体外释放度的HPLC-UV测定方法,所建立的方法操作简便、专属性强、准确性好。利用该方法测定了本品的体外释放度并对其进行了多种模型拟合,确定盐酸丙哌维林缓释胶囊体外释放的最佳拟合模型为Weibull模型。采用Loo-Riegelman法计算盐酸丙哌维林缓释胶囊在健康受试者体内的吸收百分数,与体外释放度进行点对点相关水平分析。结

果表明,其体内外相关性良好,即可以用体外释放度试验结果间接反映盐酸丙哌维林的体内吸收情况。

参考文献

- [1] 王涛(Wang T),刘延(Liu Y),李强(Li Q),等.液相色谱-质谱法测定人血浆中丙哌维林[J].药物分析杂志(*Chin J Pharm Anal*),2008,28(11):1 823-1 826.
- [2] 赫立恩(He LE),张淑慧(Zhang SH).高效液相色谱法测定盐酸丙哌维林片含量[J].河北医药(*Hebei Med J*),2004,26(1):67-68.
- [3] Ban E, Maeng JE, Woo JS, et al. Sensitive column-switching high-performance liquid chromatography method for determination of propiverine in human plasma [J]. *J Chromatogr B*, 2006, 831: 230-235.
- [4] 王俊锋(Wang JF),孙英华(Sun YH),钱一鑫(Qian YX),等. HPLC 测定盐酸文拉辛缓释胶囊的释放度[J]. 中国药学期刊(*Chin Pharm J*), 2008, 43(6): 476-480.
- [5] 耿东升(Geng DS),兰建国(Lan JG),李新霞(Li XX),等. 光纤药物溶出度实时测定布洛芬缓释胶囊的释放度[J]. 中国医院药学杂志(*Chin Hosp Pharm J*), 2009, 29(18): 1 545-1 547.
- [6] 金朝辉(Jin ZH). HT 缓释片的研制及体内外相关性评价[D]. 成都:四川大学,2005.
- [7] 杨俊毅(Yang JY). TP 缓释片的研制及体内外相关性评价[D]. 成都:四川大学,2003.
- [8] Huang MH, Tian Y, Zhang ZJ, et al. Determination of propiverine hydrochloride in human plasma by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: application to the pharmacokinetic study of a sustained release formulation [J]. *Arzneim-Forsch/DrugRes*, 2011, 61(9): 494-501.
- [9] 和凡(He F). 氯化钾缓释片人体生物等效性及体内外相关性研究[D]. 天津:天津医科大学,2004.
- [10] 高杨(Gao Y),黄钦(Huang Q),马玉楠(Ma YN). 化学药物口服缓释制剂体内外相关性研究[J]. 中国新药杂志(*Chin J New Drugs*), 2010, 19(10): 827-831.
- [11] Guldner P, Heschel M, Pamperin D, et al. Oral dosage form for propiverine or its pharmaceutically acceptable salts with an extended release of the active ingredient: US, 10/492270 [P]. 2004-12-23 [2011-05-01].
- [12] 常翠(Chang C),杨宏图(Yang HT),董淳(Dong C),等. 缓释控释制剂的释放度测定方法的研究进展[J]. 广东药学报(*Guangdong Pharm J*), 2003, 13(2): 16-18.

· 征订启事 ·

欢迎订阅 2012 年《中国药科大学学报》

《中国药科大学学报》是由国家教育部主管、中国药科大学主办的药学中文核心期刊,主要刊登合成药物化学、天然药物化学、生药学、中药学、药剂学、药物分析、药物生物技术、药理学、药代动力学等学科的创新研究论著。

《中国药科大学学报》在药学界享有较高的学术声誉,目前已被国际上多家著名权威数据库(CA, IPA, SCOPUS, JST, IC, EMBASE/Excerpta Medica, CAS)等所收录,被国内权威数据库:《中文核心期刊要目总览》、中国科技论文统计源数据库、中国科学引文数据库(CSCD)等列为药学类核心期刊,屡获国家新闻出版总署、教育部、科技部等各种优秀期刊奖。

2008年,《中国药科大学学报》被评为中国精品科技期刊,2006、2008、2010年连续3次被教育部评为中国高校精品科技期刊。据中国知网,中国学术期刊(光盘版)电子杂志社《中国学术期刊影响因子年报(2010版)》公布的最新数据,《中国药科大学学报》复合影响因子为1.171,位居中国药学期刊第4位。据2010年中国科学技术信息研究所统计,本刊5年影响因子为0.874,名列中国药学期刊第6位,学术影响力极高,在高等院校、科研机构、制药企业、医院等单位拥有众多读者。

本刊为双月刊,96页。国际标准开本,国内外公开发行。欢迎到当地邮局订阅,漏订者可直接与编辑部联系。

国内刊号:CN 32-1157/R

ISSN:1000-5048

国内邮发代号:28-115

定价:20元/期,全年120元

地址:南京童家巷24号

邮政编码:210009

电话:025-83271566/562

传真:025-83271279

E-mail:cpuxuebao@sohu.com

cpuxuebao@yahoo.com.cn

http://www.zygdxxb.cn

荧光共振能量转移淬灭法测定维生素 B₂ 的含量钟文英^{1,2*}, 黄斌^{1,2}, 陈琳^{1,2}, 舒畅^{1,2}¹中国药科大学分析化学教研室; ²中国药科大学药物质量与安全预警教育部重点实验室, 南京 210009

摘要 以 L-谷胱甘肽(GSH)为稳定剂合成了性能良好的水溶性 ZnSe 量子点, 并利用其与维生素 B₂(VB₂)组成荧光共振能量转移体系, 考察 ZnSe 量子点(供体)和 VB₂(受体)之间荧光共振能量转移的最佳条件, 建立了荧光共振能量转移淬灭法测定 VB₂ 的新方法。VB₂ 在 $1.54 \times 10^{-8} \sim 2.77 \times 10^{-7}$ mol/L 浓度范围内与 ZnSe 量子点的荧光强度变化 F_0/F 呈现良好线性关系($r=0.9967$), 检测下限($S/N=3$)为 1.0×10^{-8} mol/L。将 1.54×10^{-7} mol/L VB₂ 标准溶液平行测定 9 次, RSD 为 1.2%。将该方法用于 3 个不同厂家生产的 VB₂ 的含量测定, 用加标的方法测得平均回收率为 99.28% ~ 101.9% ($n=6$), 结果满意。相比紫外分光光度法, 本方法测得 VB₂ 的含量更接近于标示量, 这为痕量 VB₂ 的含量测定提供了一种简便灵敏的方法。

关键词 ZnSe 量子点; 荧光共振能量转移; 维生素 B₂; 荧光淬灭

中图分类号 0657.3 **文献标识码** A **文章编号** 1000-5048(2011)06-0527-07

Fluorescence resonance energy transfer quenching for determination of vitamin B₂ZHONG Wen-ying^{1,2*}, HUANG Bin^{1,2}, CHEN Lin^{1,2}, SHU Chang^{1,2}

¹Department of Analytical Chemistry; ²Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance of Ministry of Education, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract Water-soluble ZnSe quantum dots (QDs) were synthesized with L-glutathione (GSH) as stabilizer. These QDs were applied for ultrasensitive vitamin B₂ (VB₂) detection. It mainly discussed the FRET system constituted by the water-soluble ZnSe (donor) and VB₂ (receptor). The optimum conditions for FRET and established a VB₂ determination method based on the FRET principle were studied. The extent of fluorescence quenching (F_0/F) of ZnSe QDs was linearly proportional to the trace concentration of VB₂ from 1.54×10^{-8} to 2.77×10^{-7} mol/L with a correlation coefficient of 0.9967, a detection limit ($S/N=3$) of 1.0×10^{-8} mol/L was obtained with the relative standard deviation of 1.2% (1.54×10^{-7} mol/L, $n=9$). A novel method for selective detection of VB₂ by utilizing the prepared QDs as fluorescence probes has been developed, based on the quenching fluorescence of ZnSe QDs. The proposed method was successfully applied to the determination of VB₂ tablets from three different factors. The results were satisfactory and the recoveries could fall in 99.28% -101.9% ($n=6$). The results were reliable, good agreement compare to those of UV-Vis absorption spectrometry. It was concluded that a novel and simple method based on fluorescence resonance energy transfer quenching theory was proposed for the determination of trace vitamin B₂.

Key words ZnSe quantum dots; fluorescence resonance energy transfer; vitamin B₂; fluorescence quenching

This project was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 20975050) and the "Six-Talent Peak" Foundation of Jiangsu Province (No. FJ10120)

* 收稿日期 2011-07-18 * 通讯作者 Tel:13851664479 E-mail:wyzhong@cpu.edu.cn

基金项目 国家自然科学基金资助项目(No. 20975050)与江苏省“六大人才高峰”资助项目(No. FJ10120)

维生素 B₂ (VB₂) 由于其分子结构中含有核糖醇,且呈黄色,故又名核黄素(riboflavin)。它是生物细胞必需的,也是重要的生物氧化还原辅酶,例如参与三羧酸循环中的直接氧化磷酸化以及脂肪酸的合成与氧化等代谢过程^[1]。另外,VB₂ 暴露在光照下易降解^[2],所以建立一种简单有效成本低的测定方法具有重要的意义。目前常用于检测维生素 B₂ 的方法有高效液相色谱法^[3]、毛细管电泳法^[4-5]、荧光法^[6]、紫外分光光度法^[7]、循环伏安法^[8]等。但有些方法(如 HPLC 法和毛细管电泳法)需要较长的分析时间和大量流动相溶剂,紫外分光光度法的专属性不强,都有各自的局限性。

最近,有人提出将荧光共振能量转移(FRET)原理用于维生素的测定,通常将 VB₂ 作为受体,与合适的能量转移供体建立 FRET 体系,克服了传统荧光法测定 VB₂ 时瑞利光散射强,重复性差的缺点,为 VB₂ 的测定开辟了新思路。如 Bhattar 等^[9]利用二萘嵌苯(perylene),Vishalkumar 等^[2]利用诺氟沙星,Patil 等^[3]利用硫酸奎宁(quinine sulfate)分别作为能量转移供体和 VB₂ 组成 FRET 体系,实现了 VB₂ 的含量测定,线性范围与检测限都在微摩尔级别。由于量子点(QDs)优异的光学性能,如激发光谱宽、发射光谱窄,可将其作为 FRET 体系十分理想的能量供体,有望在进一步提高物质检测的灵敏度方面作出贡献。

本文首先合成光学性能优良的水溶性 ZnSe 量子点,通过紫外及荧光光谱、透射电镜(TEM)对其进行表征分析。利用 ZnSe 量子点(供体)和 VB₂ (受体)组成荧光共振能量转移体系,研究二者之间发生 FRET 的最佳条件,建立了荧光共振能量转移淬灭法测定 VB₂ 的新方法,检测下限能达 1.0×10^{-8} mol/L。本研究是首次利用高质量的 ZnSe 量子点来检测 VB₂,并且把这个体系应用于实际样品的含量测定,为 VB₂ 含量测定提供了一种快速、灵敏、经济的方法。

1 材料

1.1 药品和试剂

硒粉(海美兴化工股份有限公司);硼氢化钠 NaBH₄(天津市化学试剂研究所);醋酸锌 Zn(Ac)₂·2H₂O(西陇化工股份有限公司);氢氧化钠 NaOH(南京宁试化学试剂有限公司);还原型 L-谷胱甘肽

(国药集团化学试剂有限公司);巯基丙酸(阿拉丁试剂)。ZnSe 量子点(1.0×10^{-3} mol/L);维生素 B₂ 标准品(用棕色量瓶配置浓度为 1.0×10^{-4} mol/L 储备液);维生素 B₂ 片(南京白敬宇制药有限责任公司,金陵药业有限公司利民制药厂);复合维生素 B 片(金陵药业有限公司利民制药厂);十二烷基苯磺酸钠(SDBS);溴化十六烷基三甲铵(CTMAB,上海凌峰化学试剂有限公司);实验所用溶液不作特殊说明均用重蒸馏水配制。

1.2 仪器

RF-5301 荧光分光光度计(日本岛津公司);BS-124S 电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司);pHS-25 酸度计(上海雷磁仪器厂);SZCL-B 数显智能控温磁力搅拌器(南京科尔有限公司);IX71 荧光倒置显微镜(日本 Olympus 有限公司);ZF-90 暗箱式紫外投射仪(上海顾村光电仪器厂);JEM-2100 透射电镜(日本精工公司)。

2 方法

2.1 L-谷胱甘肽修饰的 ZnSe QDs 的制备^[10-11]

向密封的三颈瓶中依次加入硼氢化钠(NaBH₄)0.015 g 和硒粉 0.008 g,注入重蒸水 500 μ L,在 N₂ 环境下磁力搅拌约 45 min,待黑色硒粉全部消失后冰浴 10 min,所得的上清液即为 NaHSe 溶液。将 L-谷胱甘肽(还原型)0.151 7 g 加入到 0.004 mol/L Zn(Ac)₂·2H₂O 水溶液 100 mL 中,调节溶液 pH 至 10.5,通入 N₂ 并加热搅拌。30 min 后加入制备好的 NaHSe(1×10^{-4} mol/L)溶液,100 $^{\circ}$ C 下继续搅拌回流 90 min,得到透明无色溶液即为制备好的 1 mmol/L 的 ZnSe QDs 溶液(以 HSe⁻浓度计)。量子点溶液用异丙醇沉淀、离心,纯化 3 次,用水复溶,放 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

2.2 光谱测定

量子点与 VB₂ 荧光光谱测定:在 20 $^{\circ}$ C 温度条件下,按顺序依次移取 3.5×10^{-6} mol/L ZnSe 溶液 3 mL, 1×10^{-3} mol/L CTMAB 溶液 3.5 mL,逐次加入 1.0×10^{-5} mol/L VB₂ 标准溶液 10~180 μ L,摇匀。以 300 nm 为激发波长,激发和发射狭缝分别为 10 nm 和 5 nm,记录 450~650 nm 波长范围内荧光发射光谱变化。

紫外光谱法用于 VB₂ 的含量及回收率测定参考文献[12]进行。