

拉曼光谱法直接测定甲硝唑片含量

刘永¹, 付璐²(1.剑阁县产品质量检验中心, 四川 广元 628300; 2.剑阁县中医院内科, 四川 广元 628300)

摘要: 目的 建立拉曼光谱法直接测定甲硝唑片含量的方法。方法 从便携式激光拉曼光谱仪的标准光谱图库中选出甲硝唑标准拉曼光谱图, 再从甲硝唑标准拉曼光谱图(200~3 000 cm^{-1})中筛选出适宜用于含量测定的特征峰, 通过线性、重复性、回收率等方法学验证建立拉曼光谱直接测定甲硝唑片含量的方法, 将甲硝唑片从药瓶中取出后直接用拉曼光谱法测定含量并将测定结果与 HPLC 测定结果做比较分析。结果 甲硝唑标准拉曼光谱图中 1 533 cm^{-1} 处的特征峰未受辅料干扰, 专属性和稳定性最好, 适宜用作含量测定的特征峰。拉曼光谱直接测定甲硝唑片含量的方法在 26~1 000 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 线性良好, 线性方程为 $y=7.9895x+0.3948$, 相关系数为 0.999 4; 该方法的检测限和定量限分别为 10 和 26 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。在高、中、低 3 个含量下, 该方法的日内和日间精密度的 RSD 值分别为 0.08%, 0.12%, 0.11% 和 0.47%, 0.48%, 0.65%。同一甲硝唑片重复测定 6 次的 RSD 值为 0.41%。在回收率试验中, 该方法测定高、中、低含量的平均回收率分别为 99.87%, 100.2%, 100.1%, RSD 值分别为 0.04%, 0.07%, 0.18%。拉曼光谱法 1 测定结果的预测相对误差范围为 -0.7%~0.5%, 最大误差绝对值为 0.7%, 拉曼光谱法 2 测定结果的预测相对误差范围为 -0.7%~1.1%, 最大误差绝对值为 1.1%。结论 本法快速、简便, 可以实现甲硝唑片含量的无损检测。

关键词: 拉曼光谱; 特征峰; 甲硝唑片; 高效液相色谱

中图分类号: R917

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2023)02-0219-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2023.02.010

引用本文: 刘永, 付璐. 拉曼光谱法直接测定甲硝唑片含量[J]. 中国现代应用药学, 2023, 40(2): 219-223.

Direct Content Determination of Metronidazole Tablets by Raman Spectroscopy

LIU Yong¹, FU Lu²(1.Jian'ge Test Center for Product Quality, Guangyuan 628300, China; 2.Department of Internal Medical, Jian'ge Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangyuan 628300, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish the direct content determination method of metronidazol tablets by raman spectroscopy. **METHODS** By selecting standard raman spectrum of metronidazol from standard spectrum database in portable laser reman spectrometer and then selecting proper characteristic peak from standard raman spectrum(200~3000 cm^{-1}) of metronidazol, using of methodological verification including linear, repeatability and recovery tests, the direct content determination method of metronidazol tablets by raman spectroscopy was established. The metronidazol tablets without any pretreatment were taken from bottles for content determination directly by using of reman spectroscopy and their determination results were compared with that of HPLC. **RESULTS** The characteristic peak at 1 533 cm^{-1} in the standard raman spectrum of metronidazol was not affected by supplements, with best exclusivity and stability and proper to be used for its content determination. In the direct content determination method of metronidazol tablets, the good linear relationship was achieved in the range of 26~1 000 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, its linear equation was $y=7.9895x+0.3948$ with correlation coefficient of 0.999 4 and its detection and quantitative limits were 10 and 26 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ respectively. The determination RSDs of same-day and between-days of high, middle and low contents were 0.08%, 0.12%, 0.11% and 0.47%, 0.48%, 0.65% respectively. The RSD of 6 repeated determinations of the same metronidazol tablet was 0.41%. In recovery test, the average recoveries of reman spectroscopy in determinating high, middle and low contents were 99.87%, 100.2%, 100.1%, RSDs were 0.04%, 0.07% and 0.18% respectively. The scope and max of relative prediction error of reman spectroscopy 1 were -0.7%~0.5% and 0.7% and that of reman spectroscopy 2 were -0.7%~1.1% and 1.1%. **CONCLUSION** The method is fast and simple, which can achieve nondestructive testing of metronidazole tablets.

KEYWORDS: Raman spectroscopy; characteristic peak; metronidazol tablets; HPLC

拉曼光谱法在药学领域作为新兴技术, 已经在药物定性鉴别^[1-6]、定量检测^[7-12]、非法添加药物快速检测^[13-15]、药物晶型判别^[16-17]、药理学研究^[18-19]、制剂溶出^[20]等方面取得了一些应用研究

成果, 美国药典 41 版已收录了配对的拉曼光谱法通则和拉曼光谱法理论与实践指导原则^[21], 国内外研究都展示了拉曼光谱技术的开发价值和应用潜力。拉曼光谱技术能在一定程度上解决实验室

作者简介: 刘永, 男, 硕士, 工程师 E-mail: 3360670579@qq.com

大型仪器检验成本高、前处理繁琐、试剂污染环境等问题。目前,药学领域对拉曼光谱技术的应用研究多为定性研究,定量研究目前相对较少。采用便携式激光拉曼光谱仪直接测定甲硝唑片含量的研究尚未见报道。本研究为开发便携式快检设备在药品检测领域的应用前景提供了可行性。

甲硝唑化学名为 2-甲基-5-硝基咪唑-1-乙醇,分子结构式见图 1,临床上主要用于治疗厌氧菌感染。甲硝唑片为白色或类白色片,主要用于治疗肠道和肠外阿米巴病,还可用于治疗阴道滴虫病、小袋虫病、皮肤利什曼病、麦地那龙线虫感染等,也广泛用于厌氧菌感染的治疗。中国药典 2020 年版记载甲硝唑片的含量测定方法为高效液相色谱法^[22],该方法检测时间较长,仪器设备成本较高且污染环境。拉曼光谱法操作简单,检测时间短,不污染环境,样品可重复测定。本研究以 0.2 g 规格的甲硝唑片为例研究建立拉曼光谱快速测定甲硝唑片含量的方法。

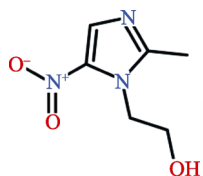


图 1 甲硝唑的分子结构式

Fig. 1 Molecular structure of metronidazole

1 仪器与试剂

HHX 便携式拉曼光谱仪(厦门海荳兴); LC-20AD 高效液相色谱仪[岛津(苏州)]; TLE204 电子天平(梅特勒-托利多); 甲硝唑对照品(坛墨质检,含量:99.2%;批号:3292012); 甲硝唑片(华中药业,规格:0.2 g,批号分别为 20181001, 20200701, 20201112, 20210203; 江苏平光制药,规格:0.2 g,批号:2007061; 山东齐都药业,规格:0.2 g,批号:1D2011245; 湖北美宝药业,规格:0.2 g,批号:190402; 双新制药,规格:0.2 g,批号:200202; 太原药业,规格:0.2 g,批号:180502; 金不换兰考制药,规格:0.2 g,批号:20200401); 纯化水(自制,电阻率 $>18\text{ M}\Omega\text{cm}$), 辅料样品(安徽山河药用辅料股份有限公司), 原料药样品(武汉贝尔卡生物医药有限公司)。

2 方法

2.1 拉曼光谱采集

拉曼光谱法 1: 将甲硝唑片从药瓶中取出后立于样品槽中,以顶面或底面朝向光源处,直接测定。

拉曼光谱法 2: 将甲硝唑片研磨成细粉,装入石英玻璃比色皿中测定。

测定条件: 拉曼激光功率为 0~500 mW, 激发光波长为 785 nm, 稳频激光, 位移范围 200~3 000 cm^{-1} 。将甲硝唑片从药瓶中取出后立于石英比色皿内,以正面或背面面向光源采集拉曼光谱图,空白片以相同方式采集拉曼光谱图。

2.2 HPLC 测定

2.2.1 色谱条件 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,以甲醇-水(20:80)为流动相,检测波长为 320 nm,进样体积 10 μL 。

2.2.2 系统适用性要求 理论板数按甲硝唑峰计算 $\geq 2\,000$ 。

2.2.3 供试品溶液制备 取甲硝唑片 20 片,精密称定,研细,精密称定细粉适量(约相当于甲硝唑 0.25 g),置 50 mL 量瓶中,加 50%甲醇溶液适量,振摇使甲硝唑溶解,用 50%甲醇溶液稀释至刻度,摇匀,滤过,精密量取续滤液 5 mL,置 100 mL 量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀。

2.2.4 对照品溶液配制 取甲硝唑对照品适量,精密称定,加流动相溶解并定量稀释制成每 1 mL 约含 0.25 mg 的溶液。

2.2.5 测定法 精密量取供试品溶液与对照品溶液,分别注入液相色谱仪,记录色谱图。按外标法以峰面积计算。

2.3 空白片的制备

国产甲硝唑片制剂处方的主要辅料为淀粉、糖粉、糊精,采用国产制剂处方(剔除主药)和湿法制颗粒压片法制备空白片。

2.4 统计分析

HPLC 测定结果与拉曼光谱法 1、拉曼光谱法 2 的测定结果的差异显著性分析使用 WPS Office 软件和配对 t 检验法。

2.5 样品选用

鉴别及拉曼光谱含量测定方法的方法学考察使用的甲硝唑片均为华中药业生产,批号: 20200701。

3 结果

3.1 鉴别

从拉曼光谱仪中调取甲硝唑标准拉曼光谱图,与甲硝唑片和空白片的拉曼光谱图进行比对分析,结果显示甲硝唑片的特征峰与甲硝唑标准拉曼光谱图中的特征峰基本一致,1 533 cm^{-1} 处的特征峰同时出现在甲硝唑片和甲硝唑标准拉曼光

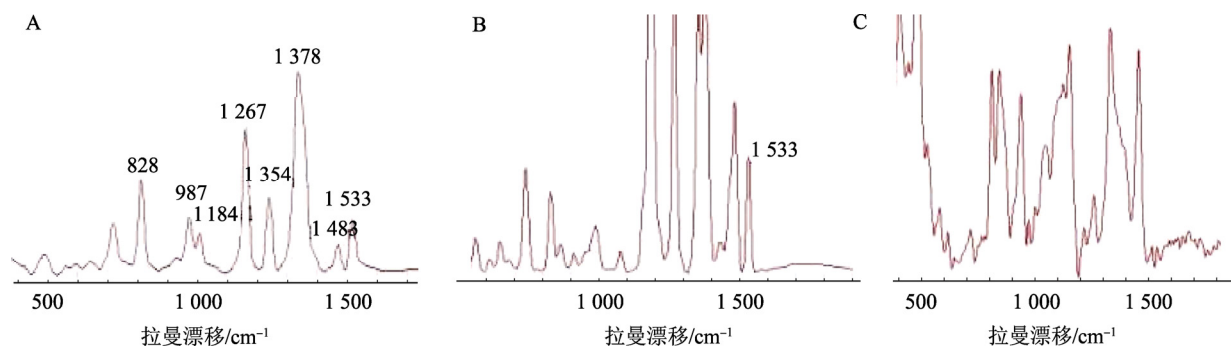


图2 拉曼光谱图

A-甲硝唑标准拉曼光谱图; B-甲硝唑片; C-空白片。

Fig. 2 Raman spectra

A-standard reman spectrum of metronidazole; B-metronidazole tablet; C-blank tablet.

谱图中,但没有出现在空白片的拉曼光谱图中,且该特征峰与空白片的特征峰分离较好,未受辅料峰的干扰,可以作为含量测定特征峰使用。结果见图2。

3.2 含量测定

3.2.1 测试稳定性 取甲硝唑片,立置于比色皿内,重复测定100次。

实验结果显示,1533 cm⁻¹处的特征峰强度稳定,选择此特征峰作为定量分析的特征峰,专属性强,稳定性好。

3.2.2 线性范围、定量限及检测限 取甲硝唑片20片,研磨成细粉,依中国药典2020年版方法测定原料药和甲硝唑片粉的含量。糊精、糖粉、淀粉、原料药和甲硝唑片粉的密度实测结果分别为1.81, 0.64, 1.53, 1.47, 1.50 g·mL⁻¹,密度相近。精密称取甲硝唑片粉、原料药和淀粉配制含量分别为1000, 840, 420, 210, 105, 52, 26 mg·g⁻¹的样品,从低含量到高含量依次将其用拉曼光谱仪测定,以1533 cm⁻¹处特征峰的强度(y)对含量(x , mg·g⁻¹)绘制标准曲线,方程为 $y=7.9895x+0.3948$,线性范围为26~1000 mg·g⁻¹,相关系数为0.9994,线性关系良好。

取含量为26 mg·g⁻¹的样品,用淀粉逐次稀释并用拉曼光谱仪测定,测得甲硝唑的定量限为26 mg·g⁻¹ ($S/N=10$),检测限为10 mg·g⁻¹ ($S/N=3$)。

3.2.3 仪器精密度试验 取“3.2.2”项下甲硝唑片粉、甲硝唑原料药和淀粉适量,配制含量分别为960, 800, 640 mg·g⁻¹的供试样品,分别于1d和1周内重复测定5次,测得出日内精密度和日间精密度。结果显示,高、中、低含量的日内精密度和日间精密度均良好,见表1。

表1 日内精密度和日间精密度结果

Tab. 1 Testing results of same-day and between-days precision

含量/mg·g ⁻¹	日内精密度		日间精密度	
	测得平均值/ mg·g ⁻¹	RSD/ %	测得平均值/ mg·g ⁻¹	RSD/ %
960	962	0.08	960	0.47
800	801	0.12	799	0.48
640	641	0.11	640	0.65

表2 回收率测定结果

Tab. 2 Determination results of recoveries

拉曼光谱法				
加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
1920.3	1917.3	99.84		
1920.4	1917.7	99.86	99.87	0.04
1919.9	1918.2	99.91		
1600.4	1605.2	100.3		
1600.2	1603.7	100.2	100.2	0.07
1599.7	1602.2	100.2		
1279.8	1283.8	100.3		
1280.2	1281.6	100.1	100.1	0.18
1280.5	1279.9	99.95		

3.2.4 重复性试验 将“3.2.1”项下甲硝唑片重复测定6次,测得的平均含量为840 mg·g⁻¹,RSD为0.41%。

3.2.5 回收率试验 精密称取“3.2.2”项下甲硝唑片粉、甲硝唑原料药和淀粉适量,配制含量分别为960, 800, 640 mg·g⁻¹的供试样品,依次测定拉曼光谱,测定结果见表2。

3.2.6 样品含量测定 从市场购买不同厂家生产的10个批次甲硝唑片,均为素片,规格均为0.2g。分别取20片用拉曼光谱法直接测定含量(拉曼光谱法1),计算平均含量($\bar{c}$)和平均片重($\bar{w}$),研磨成细粉后再次用拉曼光谱法(拉曼光谱法2)和HPLC测定含量,测定结果见表3。拉曼光谱法

表3 HPLC与拉曼光谱法含量测定结果(n=10)

Tab. 3 Results of sample determinations by HPLC and reman spectroscopy methods (n=10)

厂家	批号	HPLC	拉曼光谱法		拉曼光谱法预测 相对误差	
			1	2	1	2
华中 药业	20181001	89.3	89.5	89.7	0.2	0.2
		88.7	88.1	88.3	-0.7	0.2
		89.1	88.5	88.3	-0.7	-0.2
	20200701	98.5	98.8	98.6	0.3	-0.2
		99.3	98.9	98.5	-0.4	-0.4
		99.1	99.3	98.9	0.2	-0.4
	20201112	100.5	99.9	100.1	-0.6	0.2
		99.8	100.3	100.2	0.5	-0.1
		100.2	100.1	99.9	-0.1	-0.2
	20210203	103.2	103.0	103.2	-0.2	0.2
103.7		103.3	103.5	-0.4	0.2	
102.9		103.1	103.2	0.2	0.1	
江苏平 光制药	2007061	98.5	98.8	98.5	0.3	-0.3
	98.1	97.9	98.3	-0.2	0.4	
	97.9	98.3	98.8	0.4	0.5	
山东齐 都药业	1D2011245	101.2	100.9	100.2	-0.3	-0.7
	99.9	100.3	99.7	0.4	-0.6	
	100.7	100.1	100.5	-0.6	0.4	
湖北美 宝药业	190402	94.3	93.7	93.6	-0.6	-0.1
	93.9	93.2	93.7	-0.7	0.5	
	94.5	94.5	94.3	0.0	-0.2	
双新 制药	200202	99.8	99.2	100.3	-0.6	1.1
	100.6	100.7	100.5	0.1	-0.2	
	100.2	100.3	100.1	0.1	-0.2	
太原 药业	180502	93.5	93.6	93.5	0.1	-0.1
	93.7	93.1	93.2	-0.6	0.1	
	93.5	92.9	92.6	-0.6	-0.3	
金不换 兰考制 药	20200401	102.3	102.7	102.5	0.4	-0.2
	102.5	102.9	102.6	0.4	-0.3	
	102.2	101.9	101.5	-0.3	-0.4	

含量测定的计算公式： $C = \frac{\bar{c} \times \bar{w}}{200} \times 100\%$ 。

拉曼光谱法 1 测定结果的预测相对误差范围为-0.7%~0.5%，最大误差绝对值为 0.7%，拉曼光谱法 2 测定结果的预测相对误差范围为-0.7%~1.1%，最大误差绝对值为 1.1%。

4 讨论

实验结果显示，1 533 cm^{-1} 处的特征峰专属性较强，稳定性好，适宜作为甲硝唑片含量测定的特征峰。因此，从甲硝唑标准拉曼光谱中选择了 1 533 cm^{-1} 处的特征峰作为含量测定的特征峰。

实验结果表明，甲硝唑原料药、甲硝唑片粉

和淀粉的密度相近，淀粉为空白片中的主要辅料且空白片的拉曼光谱图不包含甲硝唑片含量测定使用的特征峰，因此选择淀粉作为稀释剂。拉曼光谱法 1 的测定结果的最大误差绝对值为 0.7%，拉曼光谱法 2 测定结果的最大误差绝对值为 1.1%，而拉曼光谱法 1(取出甲硝唑片后直接用拉曼光谱法测定含量)不需要对甲硝唑片进行研磨处理，操作过程更环保、经济、省时。因此，不需要对甲硝唑片进行预处理的拉曼光谱法 1 更适合作为甲硝唑片含量测定的方法使用。

REFERENCES

- [1] XU L J, YANG Y J, LI W Y, et al. Three-dimensional macroporous graphene-wrapped zero-valent copper nanoparticles as efficient micro-electrolysis-promoted Fenton-like catalysts for metronidazole removal[J]. Sci Total Environ, 2019(658): 219-233.
- [2] OH C M, HENG P W S, CHAN L W. Influence of hydroxypropyl methylcellulose on metronidazole crystallinity in spray-congealed polyethylene glycol microparticles and its impact with various additives on metronidazole release[J]. AAPS PharmSciTech, 2015, 16(6): 1357-1367.
- [3] VELUSAMY V, PALANISAMY S, KOKULNATHAN T, et al. Novel electrochemical synthesis of copper oxide nanoparticles decorated graphene- β -cyclodextrin composite for trace-level detection of antibiotic drug metronidazole[J]. J Colloid Interface Sci, 2018(530): 37-45.
- [4] ZHANG X, WANG S, LI J, et al. Study on a non-destructive drug testing method based on spatially offset raman spectroscopy[J]. Spectrosc Spect Anal(光谱学与光谱分析), 2018, 39(5): 1472-1476.
- [5] ZHANG S Y, CHEN H, LI R Y, et al. Raman spectroscopy and mapping technique for the identification of expired drugs[J]. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc, 2020(224): 117407.
- [6] ALI H, ULLAH R, KHAN S, et al. Raman spectroscopy and hierarchical cluster analysis for the ingredients characterization in different formulations of paracetamol and counterfeit paracetamol[J]. Vib Spectrosc, 2019(102): 112-115.
- [7] HAN Y, ZENG W S, RUAN W T, et al. Study on rapid qualitative and quantitative analysis model of chondroitin sulfate eye drops by reman spectroscopy[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2020, 37(22): 2759-2763.
- [8] GAN S, LAI Q N, LI Z C, et al. Qualitative and quantitative determination of 3 kinds of β agonist molecules by surface enhanced reman spectrometry[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2015, 32(11): 1354-1359.
- [9] HE J, ZHANG Y. Rapid identification and determination of etamsylate injection by Raman spectroscopy[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2015, 32(1): 49-54.
- [10] LÓPEZ-ÁLVAREZ M, LÓPEZ-SENRA E, VALCÁRCEL J, et al. Quantitative evaluation of sulfation position prevalence in chondroitin sulphate by Raman spectroscopy[J]. J Raman

- Spectrosc, 2019, 50(5): 656-664.
- [11] DENG B G, LUO X, ZHANG M, et al. Quantitative detection of acyclovir by surface enhanced Raman spectroscopy using a portable Raman spectrometer coupled with multivariate data analysis[J]. Colloids Surf B Biointerfaces, 2019(173): 286-294.
- [12] SALEH T A, AL-SHALALFEH M M, AL-SAAD A A. Silver nanoparticles for detection of methimazole by surface-enhanced Raman spectroscopy[J]. Mater Res Bull, 2017(91): 173-178.
- [13] LI X, TAN L L, LIU J C, et al. Rapid detection of four chemical components added illegally in slimming health food with TLC situ Raman spectroscopy[J]. Spectrosc Spectr Anal(光谱学与光谱分析), 2018, 38(3): 830-836.
- [14] LI G, LI J. Rapid screening of metronidazole illegally added to cosmetics by Raman spectroscopy[J]. Chin Pharm Aff(中国药事), 2016, 30(4): 303-305.
- [15] WANG H M, LI L L, CHEN H B, et al. Application of surface-enhanced Raman spectroscopy in the fast screening of phosphodiesterase type 5 inhibitors[J]. Chem J Chin Univ(高等学校化学学报), 2017, 38(6): 1040-1045.
- [16] NUGRAHANI I, TJENGAL B, GUSDINAR T, et al. A comprehensive study of a new 1.75 hydrate of ciprofloxacin salicylate: SCXRD structure determination, solid characterization, water stability, solubility, and dissolution study[J]. Crystals, 2020, 10(5): 349.
- [17] NOMURA K, TITAPIWATANAKUN V, HISADA H, et al. *In situ* monitoring of the crystalline state of active pharmaceutical ingredients during high-shear wet granulation using a low-frequency Raman probe[J]. Eur J Pharm Biopharm, 2020(147): 1-9.
- [18] VERMA T, ANNAPPA H, SINGH S, et al. Profiling antibiotic resistance in *Escherichia coli* strains displaying differential antibiotic susceptibilities using Raman spectroscopy[J]. J Biophotonics, 2021, 14(1). Doi: 10.1002/jbio.202000231.
- [19] GÖTZ T, DAHMS M, KIRCHHOFF J, et al. Automated and rapid identification of multidrug resistant *Escherichia coli* against the lead drugs of acylureidopenicillins, cephalosporins, and fluoroquinolones using specific Raman marker bands[J]. J Biophotonics, 2020, 13(8): e202000149. Doi: 10.1002/jbio.202000149.
- [20] ZHAO H Y, WEN S, CHEN D J, et al. Exploring the difference of dissolution profile for leflunomide tablets based on image orientation of Raman spectroscopy[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2018, 38(5): 909-914.
- [21] XU X Y, LIU Z, HONG X X. Revision plan of spectrometry general chapters of USP and enlightenment to the Chinese pharmacopoeia[J]. Chin Pharm Aff(中国药事), 2019, 33(2): 202-207.
- [22] 中国药典. 二部[S]. 2020: 254.

收稿日期: 2021-12-05
(本文责编: 陈怡心)