

## 甲硝唑注射液共聚焦显微拉曼光谱法定性与定量分析

杨明华<sup>1</sup>, 孙雪妹<sup>1</sup>, 陈桂良<sup>2</sup>, 张予敏<sup>3</sup> (1. 上海市浦东食品药品检验所, 上海 201203; 2. 上海市食品药品检验所, 上海 201203; 3. 上海市食品药品监督管理局, 上海 200010)

**[摘要]** 目的 研究拉曼光谱在甲硝唑注射液定性、定量分析中的应用。方法 分析甲硝唑注射液在酸性至碱性条件下 (pH 1~12) 拉曼光谱的变化, 并检测甲硝唑注射液中的有关物质 2-甲基-5-硝基咪唑的含量。采用偏最小二乘法 (PLS) 和主成分回归法 (PCR) 对甲硝唑注射液进行定量, 并将检测结果与紫外分光光度法进行比较。结果 酸性条件下甲硝唑注射液在拉曼光谱图上有明显差别, 碱性条件下, 差异不明显, 但在 pH 12 以上甲硝唑注射液变为暗红色。由于 2-甲基-5-硝基咪唑在甲硝唑注射液中的浓度过低 (1 mg/L), 因此拉曼光谱图中无法检测到它的存在。结论 PLS 和 PCR 两种方法在甲硝唑注射液的定量上都能得到满意的结果。拉曼光谱与紫外分光光度法得出的含量测定结果, 根据 *t* 检验, 没有显著差异 ( $\alpha = 0.05$ )。

**[关键词]** 拉曼光谱; 甲硝唑注射液; 定性分析; 定量分析

**[中图分类号]** R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2013)04-0273-04

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2013.04.009

## Qualitative and quantitative analysis of metronidazole injection solutions by confocal microprobe Raman spectroscopy

YANG Ming-hua<sup>1</sup>, SUN Xue-mei<sup>1</sup>, CHEN Gui-liang<sup>2</sup>, ZHANG Yu-min<sup>3</sup> (1. Shanghai Pudong Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China; 2. Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203, China; 3. Shanghai Municipal Food and Drug Administration, Shanghai 200010, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the application of Raman spectroscopy in metronidazole injection solution analysis. **Methods** The variation of metronidazole (MET) injections' Raman spectra was analyzed when the pH varied from 1 to 12, and the related substances (2-methyl-5-nitroimidazole) in MET injection were detected. Two quantitative analysis techniques, multivariate partial least squares (PLS) and principal component regression (PCR) were compared in MET sample quantification. The quantification results of commercial MET injection product were compared with pharmacopoeias suggested UV Spectrometry method. **Results** The pH differences were reflected in Raman spectra. Because of the low concentration of the related substance in Commercial MET injection (1 mg/L), the related substance could not be detected by Raman spectrum. **Conclusion** Both PLS and PCR could reach satisfactory prediction, and the concentrations found from Raman and UV spectrometry showed no significant differences according to *t*-test ( $\alpha = 0.05$ ).

**[Key words]** Raman spectroscopy; metronidazole injection; qualitative analysis; quantitative analysis

近来拉曼光谱在科学领域中的应用显得日益重要, 比如在法医学、生物学、诊断学、材料科学和药学等领域<sup>[1]</sup>。由于水的拉曼散射较弱, 许多研究人员对拉曼光谱在注射液检测中的应用进行了大量的考察<sup>[2, 3]</sup>。但对于活性成分浓度较低的注射液, 如质量体积浓度小于 5 g/L 的注射液采用显微共聚焦拉曼进行定量定性分析的研究较少。

为探索拉曼光谱在注射液的快速检验方面的应用, 笔者从定量和定性两方面研究了甲硝唑注射液的拉曼光谱。甲硝唑化学名为 2-甲基-5-硝基咪唑-1-乙醇 (图 1), 临床上主要用于厌氧菌感染的治疗。甲硝唑注射液是甲硝唑加氯化钠适量制

成的等渗灭菌水溶液。中国药典 2010 年版和英国药典 2010 中甲硝唑注射液项下分别采用高效液相色谱法和紫外-可见分光光度法测定甲硝唑的含量, 采用高效液相色谱法测定有关物质 2-甲基-5-硝基咪唑 (图 2) 的含量。许莉莉等研究了甲硝唑粉末在 514.5、1 064、325 nm 激发波长下的拉曼光谱, 结果发现, 紫外光源激发的谱图只能见到一个宽峰, 可见光源与近红外光源激发的光谱图型几乎完全相同, 而且峰型复杂可以分析出甲硝唑的结构信息<sup>[4]</sup>。杨玉平等研究了甲硝唑、替硝唑、奥硝唑 3 种成分的拉曼光谱谱图特征<sup>[5]</sup>, 并运用密度泛函理论计算了 3 种化合物在气态单分子情况下的优化结构及其正则振动频率。目前, 采用拉曼光谱法对甲硝唑注射液进行的定性、定量研究尚未见报道。

**[作者简介]** 杨明华 (1978-), 女, 主管药师。Tel: (021) 51320016, E-mail: yangjinminghua@gmail.com.

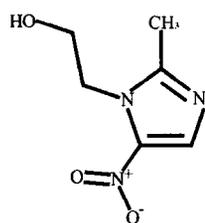


图1 甲硝唑分子式

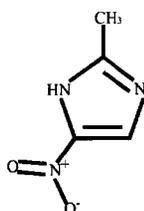


图2 2-甲基-5-硝基咪唑分子式

## 1 材料与方 法

**1.1 材料和仪器** 甲硝唑注射液(上海百特医疗用品有限公司,规格 100 ml : 0.5 g,批号 S1004051),甲硝唑对照品(中国药品生物制品检定所 100191-200305),甲硝唑原料(上海百特医疗用品有限公司提供,批号 TM2010029)。纯化水自制(电阻率 > 18 MΩcm)。

DXR 激光共焦显微拉曼光谱仪(Thermo Scientific 公司)。配科研级 BX51 奥林巴斯显微镜:明暗场照明,物镜 10X(工作距离 10.6 mm, 0.25 数值孔径),XYZ 三维自动平台。普析通用 TU1901 紫外分光光度仪,安捷伦 1100 液相色谱仪,梅特勒-托利多 DELTA320pH 计,赛多利斯 BP211D 天平。

### 1.2 样品配制与含量测定

**1.2.1 样品制备** 甲硝唑对照品溶液的制备:取甲硝唑对照品适量,用自配的生理盐水振摇使其溶解,分别制成浓度为 1.002、1.503、2.004、2.505、3.006、3.507、4.008、4.509、5.010、5.511、6.012、6.513、7.014 g/L 的溶液。甲硝唑样品溶液的制备:取甲硝唑原料适量,用自配的生理盐水振摇使其溶解,制成一系列浓度的样品溶液。

不同 pH 值甲硝唑溶液样品的制备:取配制好的甲硝唑溶液样品,分别用稀盐酸和氢氧化钠溶液调节 pH 值,得到 pH 值为 1~12 的一系列溶液。

含 1% 2-甲基-5-硝基咪唑的甲硝唑溶液的制备:精密称取 2-甲基-5-硝基咪唑对照品适量加入配制好的市售浓度甲硝唑溶液中,振摇使其溶解,使甲硝唑溶液样品中 2-甲基-5-硝基咪唑的含量为 1%。

不含 2-甲基-5-硝基咪唑的甲硝唑溶液:按中国药典 2005 年版甲硝唑注射液项下有关物质检查方法测定市售甲硝唑注射液中 2-甲基-5-硝基咪唑的含量,结果发现样品中未检测出 2-甲基-5-硝基咪唑,因此直接采用市售甲硝唑注射液。

**1.2.2 含量测定** 紫外分光光度法测定甲硝唑溶液含量:按中国药典 2005 年版甲硝唑注射液项下含量测定方法,配制甲硝唑对照品溶液,在 277 nm 波长处测定并计算出样品含量。

拉曼光谱法测定甲硝唑溶液含量:取样品溶液适量置于显微拉曼光学平台上,显微镜下聚焦成像,激发波长 780 nm,到达样品表面功率为 14 mW,狭缝宽度 25 μm,仪器分辨率 3~4/cm,光谱测试范围 50~3 300/cm。曝光时间 20 s,为保证光谱代表性,每个样品扫描 5 次。

**1.3 化学计量学方法** 定量过程采用 Thermo Scientific TQ 分析化学计量学软件。主要应用的方法是偏最小二乘法(PLS)和主成分回归法(PCR)。采用预测均方差(RMSEP)、判定系数( $R^2$ )等参数对两种方法结果进行比较。

## 2 结果

**2.1 不同 pH 甲硝唑溶液拉曼光谱** 在 pH 1~5 范围内,随着 pH 值减少 1 500~1 600/cm 范围内拉曼峰发生较大变化,1 200~1 300/cm 内峰逐渐消失。1 300~1 400/cm 与 1 200/cm 处峰高逐渐变小(见图 3)。经 Gaussian03 软件计算,1 533/cm 和 1 266/cm 处峰属于环变形,1 487/cm 处峰属于 C-H 变形,1 188/cm 峰属于 N-H 面内摇摆。甲硝唑样品光谱图在碱性不断增强(pH 6~12)的过程中,拉曼光谱图变化不明显,但甲硝唑溶液在 pH 12 以上,溶液颜色变为暗红。

**2.2 2-甲基-5-硝基咪唑的拉曼光谱检测** 2-甲基-5-硝基咪唑与甲硝唑溶液的拉曼光谱图差别主要表现在 1 600/cm 与 1 320/cm 两波数处光谱峰,在 900~1 100/cm 范围内峰形更加复杂,但以上的差别在含有 1% 2-甲基-5-硝基咪唑的甲硝唑溶液和不含 2-甲基-5-硝基咪唑甲硝唑溶液的拉曼光谱图比较中不能辨别(见图 4)。

**2.3 拉曼光谱定量分析** 在进行拉曼光谱含量测定中,采用如前所述 13 个浓度的甲硝唑对照品溶液进行校正,取两个已知浓度的样品进行确证,以 1 160~1 290/cm 区域内拉曼光谱峰面积进行定量。PLS 和 PCR 两种拟和方式均能得到满意结果,但预测均方差结果显示,PCR 在甲硝唑样品的检测中略好于 PLS(见表 1)。

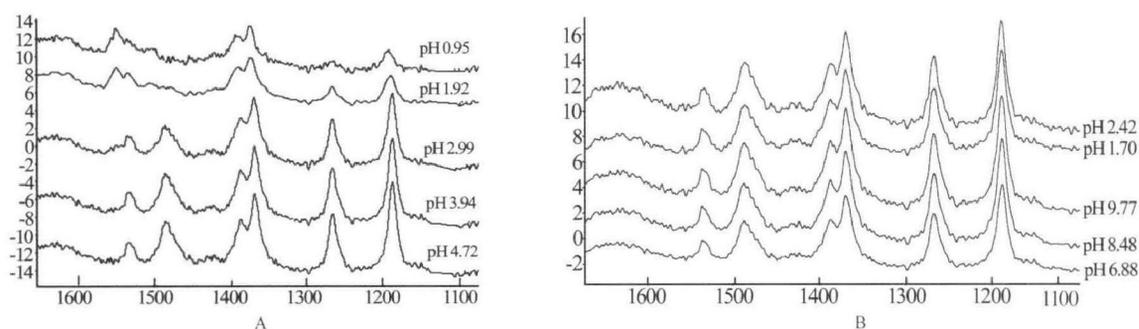


图3 不同pH值甲硝唑溶液拉曼光谱图比较

A-pH1 ~ pH5; B-pH6 ~ pH12

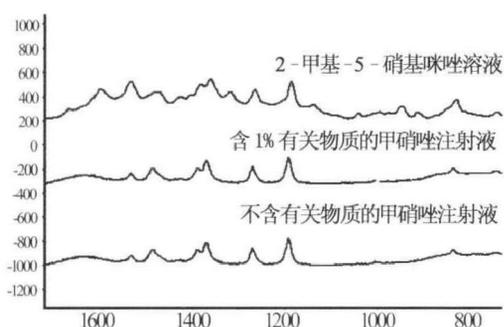


图4 有关物质(2-甲基-5-硝基咪唑)溶液拉曼光谱图比较

表1 PLS与PCR两种拟合方式参数的比较

计算方式	预测均方差 (%)	判定系数	校正均方差 (%)	运行指数
PLS	0.069 4	1.000 0	0.005 32	99.8
PCR	0.050 5	0.999 3	0.071 4	99.8

**2.4 拉曼光谱与紫外光谱含量测定结果比较** 分别采用拉曼光谱法与紫外分光光度法测定3个配制成市售浓度(100 ml : 500 mg)的甲硝唑溶液样品,结果见表2。采用配对样本均数  $t$  检验,  $t_{0.05,2} = 4.303$ ,  $t = 0.26$ ,  $P > 0.05$ ,说明两均数差别没有统计学意义。

表2 拉曼光谱与紫外光谱两种含量测定方法的结果比较

样品	拉曼光谱法 配制量 (%)	紫外分光光度法 配制量 (%)
1	102.2	100.6
2	98.9	99.9
3	100.1	100.1
平均	100.4	100.2

### 3 讨论

**3.1 甲硝唑在酸性条件下生成盐,并进而失去一个**

水分子和质子。这些变化可在拉曼光谱图谱变化中显示。

**3.2 过低浓度样品的拉曼光谱检测信噪比小,采用拉曼光谱检测有困难。**本试验中配制的含1% 2-甲基-5-硝基咪唑的甲硝唑溶液中,2-甲基-5-硝基咪唑的浓度约为1 mg/L,试验结果表明,此浓度的甲硝唑注射液有关物质无法在拉曼光谱中检出。中国药典2010年版二部甲硝唑注射液有关物质项下2-甲基-5-硝基咪唑的限度为0.5%,采用常规拉曼光谱进行检测的可行性更低。尽管表面增强技术可以显著提高样品的检测灵敏度,但由于目前表面增强操作方式的限制,在进行定量方面存在困难。

**3.3 根据 Mazurek 等<sup>[2]</sup>的经验,本研究直接比较了PCR和PLS两种定量方式。**PCR和PLS都是基于最小二乘法,PCR首先通过主成分分析的方法对光谱数据进行降维,以排除众多化学图谱相互重叠的信息,但因为PCR选出的主成分与待测属性不一定相关,因而PCR有可能造成光谱信息丢失。PLS是改进的PCR,将因子分析与回归分析相结合,在进行光谱矩阵分析时考虑了待测属性特征的光谱区域,有了更大的权重。

**3.4 由于水的拉曼光谱很弱,因此采用拉曼光谱可以对甲硝唑注射液进行检测。**虽然拉曼峰强度与样品浓度有线性比例关系,但由于峰强度依赖许多因素,如光谱仪的准直、激光功率、收集光学系统的效率和试样折射率等,因此在进行定量分析时须先用已知浓度样品进行校正。

### 【参考文献】

- [1] Ruchita SD, Agrawal YK. Raman spectroscopy: recent advancements, techniques and applications[J]. Vib Spectrosc, 2011, 8: 3.
- [2] Sylwester M, Roman S. Quantitative determination of diclofenac sodium and aminophylline in injection solutions by FT-Raman spectroscopy[J]. J Pharma & Bio Analy, 2006, 40: 1235.

- [3] Orkoulou MG, Kontoyannis CG, Markopoulou CK. Validation of a direct non-destructive quantitative analysis of amiodarone hydrochloride in Angoron formulations using FT-Raman spectroscopy [J]. *Talanta*, 2007, 73: 258.
- [4] 许莉莉, 丁库克, 郭学谦, 等. 水杨酸、对甲氧基苯甲酸和甲硝唑的拉曼光谱[J]. 首都医科大学学报, 2006, 27(6): 785.
- [5] 杨玉平, 陈笑, 姚飞, 等. 甲硝唑、替硝唑和奥硝唑的拉曼光谱研究[J]. 中央民族大学学报(自然科学版), 2010, 19(4): 26.

[收稿日期] 2012-07-04

[修回日期] 2012-10-29

(上接第 272 页)

试验中的受试者损害进行相应的补偿是伦理原则的必然要求。然而, 目前我国这方面做的工作基本上是一片空白, 受试者在临床试验中受到损害, 不知向谁追究赔偿责任, 受试者赔偿权往往难以落实到位。因此, 政府应尽快建立健全受试者损害补偿机制, 以保障受试者的正当权益。本研究根据对美国药物临床试验受试者的损害补偿现状进行分析, 认为我国建立受试者损害补偿机制的主要任务是解决两大问题: 损害归责和补偿机制。

**3.1 损害归责** 根据侵权法理论, 侵权行为有两种归责原则: 过错责任原则和无过错责任原则。在药物临床试验中, 如果试验申办者和研究者由于存在过错而导致的受试者的人身损害, 可适用“过错责任原则”由过错方来承担责任, 对受试者进行赔偿。但有时对临床试验中的行为进行过错认定时, 往往存在困难; 或者对于无过错行为而导致的受试者的人身损害, 若依然适用“过错责任原则”, 使得受试者受到损害后得不到应有的赔偿, 不利于保护受试者的合法权益。

为此, 建议我国确立临床试验损害的无过错归责原则。在药物临床试验中如果受试者受到损害, 只要不能明确排除该损害与药物试验的关系, 无论临床试验申办者或研究者是否有无过错, 都必须对受试者的损害后果给予赔偿。试验者不得以其对于损害无过错、损害是不可预见的等一般民法侵权免责事由, 作为理由来进行抗辩<sup>[10]</sup>。对临床试验受试者损害适用“无过错责任”, 由于无需考虑试验申办者和研究者的过错, 而减轻了受试者的举证责任, 扩大了法律保护的损害范围, 更有利于保护受试者的权利。同时, 为保证受试者明晰其在临床研究中的权利义务, 各种救济措施应该明确地在知情同意书中告知受试者。

**3.2 补偿机制** 可以借鉴美国的做法, 建立强制补偿机制和自愿补偿机制。在一些特殊情况下, 可以建立国家强制补偿机制, 如美国的疫苗补偿机制, 从而使受试者能够迅速、及时、有效地获得相关救济。还可以建立机构与申办者自愿的补偿机制, 他们可

以为受试者购买临床试验保险, 也可以由申办方自己提供资金作为受试者的损害补偿资金。此外, 还可以为受试者提供医疗救助活动。因此在借鉴美国受试者补偿方案的同时, 建立具有我国自身特色的补偿机制, 可以最大限度地保障受试者权益, 促进我国临床试验质量管理规范的切实实行。

医学进步是以研究为基础的, 受试者对医学进步做出的贡献是不言而喻的。因此, 在涉及人类受试者的药物临床试验研究中, 必须始终将受试者权益保护放在首要位置, 必须以受试者生命健康为核心, 以受试者知情同意为前提, 以获得及时治疗 and 赔偿为保障目标, 明确参与临床试验各方的法律责任和义务, 合理分散试验风险。从而使之为促进医学科学的良性发展发挥重要作用。

## 【参考文献】

- [1] 赫尔辛基宣言. 2008.
- [2] Lynn BG, Joe KG, Leslie AM. *et al.* Redesigning a large school-based clinical trial in response to changes in community practice [J]. *Clin Trials*, 2011, 8(3): 311.
- [3] Gregori D, Foltran F, Verduci E. *et al.* A genetic perspective on nutritional profiles: do we still need them [J]. *J Nutrigenet Nutrigenomics*, 2011, 4(1): 25.
- [4] 李本富. 护理伦理学[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 126.
- [5] 国家食品药品监督管理局. 药物临床试验质量管理规范[EB/LO]. <http://www.sda.gov.cn/WS01/CL0053/24473.html>. 2003-08-06.
- [6] 姜萍, 殷正坤. 知情同意再探[J]. *中国医学伦理学*, 2002, 15(5): 20.
- [7] Corrigan O. Empty ethics: the problem with informed consent [J]. *Social Health Illn*, 2003, 25(3): 238.
- [8] 满洪杰. 人体试验法律问题研究[D]. 上海: 复旦大学, 2009.
- [9] Paasche-Orlow MK, Brancati FL. Assessment of medical school institutional review board policies regarding compensation of subjects for research-related injury [J]. *Am J Med*, 2005, 118(2): 175.
- [10] 曹永高. 论完善我国人体药物试验法律制度的几个问题 [J]. *法律与医学杂志*, 2006, 13(4): 276.

[收稿日期] 2012-06-21

[修回日期] 2013-02-21