

流动注射能量转移荧光素罗丹明 B 化学发光法测定法莫替丁

李婧¹, 谢强¹, 徐兰琴², 邱建¹, 汪敬武^{1*}

(1. 南昌大学化学系, 南昌 330031; 2. 广州医学院化学教研室, 广州 510182)

摘要 目的: 建立一种测定法莫替丁含量的化学发光新方法。方法: 在碱性条件下, *N*-溴代琥珀酰亚胺氧化法莫替丁, 其反应的能量转移给共存的荧光素物质罗丹明 B, 罗丹明 B 因此受激发而产生化学发光, 十六烷基三甲基溴化铵对此化学发光体系有强烈的增敏作用; 反应物混合后 0.5 s 可获发光强度最大值。据此结合流动注射技术, 建立了测定法莫替丁的流动注射能量转移化学发光分析新方法。结果: 化学发光信号的增加值 ΔI 与法莫替丁的质量浓度在 $1.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-2} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内呈线性关系; 检出限为 $5.0 \times 10^{-5} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; 对 $5.0 \times 10^{-4} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的法莫替丁进行了 11 次平行测定, RSD 为 2.1%。并且片剂中的共存组分和药物中常用的赋形剂不干扰样品测定。结论: 本法操作简单、快速, 适合于法莫替丁药物的质量控制。

关键词: 流动注射; 能量转移; 化学发光; 法莫替丁

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)01-0113-05

Determination of famotidine by flow injection chemiluminescence method based on energy transfer to fluorescence substance Rhodamine B

LI Jing¹, XIE Qiang¹, XU Lan-qin², QIU Jian-ding¹, WANG Jing-wu^{1*}

(1. Department of Chemistry, Nanchang University, Nanchang 330031, China)

2. Department of Chemistry, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510182, China)

Abstract Objective To establish a rapid method for determination of famotidine concentration **Method** In alkaline medium, famotidine is oxidized by *N*-bromosuccinimide to release energy which transfers to the coexisting fluorescence substance Rhodamine B. Therefore, Rhodamine B is excited to generate chemiluminescence (CL) in the presence of cetyltrimethyl ammonium bromide as an enhancer CL assay system is combined with flow injection technique, the maximum value of CL intensity can be obtained within 0.5 s after mixing of reacting substances **Results** The enhancement value (ΔI) of CL intensity has good linear relationship with concentration of famotidine in the range of $1.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-2} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. The detection limit is $5.0 \times 10^{-5} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ with completing measurement once within 10 s. The RSD is less than 2.1% for the determination of $5.0 \times 10^{-4} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ famotidine ($n = 11$). Coexisting substances in tablets and vehicle in commonly used drug do not interfere in the determination. **Conclusion** This method is convenient, rapid, accurate and may be considered for the quality control of famotidine.

Key words flow injection; energy transfer; chemiluminescence (CL); famotidine

法莫替丁 (famotidine) 又名胃舒达, 它是新一代组胺 H₂ 受体阻滞药, 有强大持久的抑制胃酸分泌作用, 并能显著抑制胃蛋白酶分泌及各种溃疡出血, 还有增加胃粘膜血流量、保护胃粘膜的作用。由于法莫替丁无抗雄激素作用及抑制药物代谢酶的作用, 故副作用很少。临床上用于治疗胃十二指肠溃疡和应激性溃疡、急性胃粘膜出血、胃泌素瘤、反流性食管炎及 Zollinger-Ellison 综合症。

目前测定法莫替丁的方法有高氯酸非水滴定法^[1]、紫外可见分光光度法^[2~4]、HPLC 法^[5~8]、毛细管电泳法^[9]等。高氯酸非水滴定法受温度影响较大, 特别是在温度低于 16 °C 时易造成冰醋酸的结冰, 给实验带来很大麻烦, 且结晶紫指示剂终点颜色变化不太明显, 影响测定结果的准确性; 紫外分光光度法不仅操作烦琐, 且灵敏度低; HPLC 法和毛细管

* 通讯作者 Tel: (0791)3950346 E-mail: nucaw0104@sina.com

电泳法不仅设备昂贵、操作费时,且其灵敏度依赖于柱后检测技术。化学发光法因其灵敏度高、线性范围宽、仪器设备简单而倍受关注^[10-11],用化学发光法并联用流动注射技术测定法莫替丁尚未见报道。

在化学发光分析中,以 *N*-溴代琥珀酰亚胺(*N*-bromosuccinimide, NBS)为氧化剂氧化法莫替丁,以荧光素接受反应转移的能量而发生化学发光虽已有报道^[12-13],但以罗丹明 B (rhodamine B, RDM B)接受反应转移的能量而产生化学发光的体系尚未见报道。经实验发现,本文指示反应为快速化学发光反应,而且发光强度与反应物的加入顺序密切相关,因此本文流动注射(FI)流路反应管道(即图1中的MN部分)长度仅有3 cm;采用双泵三道流路有利于各种试剂有序加入;整个测试系统由Remax软件(MPI-A型多参数化学分析测试系统自备)控制实现程序化操作,而且自动化操作程度也明显提高。从而建立了快速化学发光联用流动注射测定法莫替丁新方法,本法已成功用于法莫替丁片剂中法莫替丁含量的定量分析。

1 仪器与试剂

MPI-A型多参数化学分析测试系统,数控流动注射进样器,MCFL-A型多功能化学发光/生物发光分析系统(西安瑞迈电子设备有限公司)。整个分析过程中采样、注样、实验数据采集、处理均由Windows XP系统下设备自带的Remax软件完成。AB 104-N型电子天平(Mettler Toledo公司)。改装的RF540荧光分光光度计(日本岛津)。

系列标准溶液:准确称取法莫替丁化学对照品(中国药品生物制品检定所)0.0500 g用0.1 mol·L⁻¹醋酸溶解,用二次水定容至50 mL棕色量瓶中(当天配制并避光保存),即得1.0 mg·mL⁻¹的法莫替丁标准溶液储备液,再由此逐级稀释成浓度为1.0×10⁻²~1.0×10⁻⁴ mg·mL⁻¹的系列标准溶液;5×10⁻³ mol·L⁻¹罗丹明 B储备液:准确称取罗丹明 B 0.2396 g用二次水定容至100 mL量瓶中,使用时浓度为0.1 mol·L⁻¹的氢氧化钠溶液逐级稀释;0.01 mol·L⁻¹十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethyl ammonium bromide, CTMAB)储备液:准确称取十六烷基三甲基溴化铵0.9112 g用二次水定容至250 mL量瓶中,使用时逐级稀释。

本文所用试剂均为分析纯,水为二次蒸馏水。

2 试验方法

按图1所示流路将十六烷基三甲基溴化铵、罗丹明 B的碱性溶液、*N*-溴代琥珀酰亚胺溶液均以

4.6 mL·min⁻¹的流速泵入,待基线稳定后,通过进样阀向载流中注入法莫替丁标准溶液或样品溶液50 μL,分别记录空白和试样峰高,以其差值ΔI定量。光电倍增管负高压为800 V。

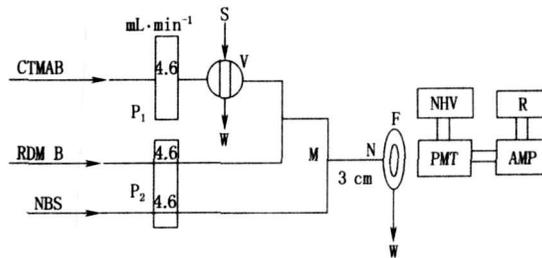


图1 流动注射分析流程图

Fig 1 Schematic diagram of FIA

P₁, P₂: 蠕动泵(peristaltic pump) V: 进样阀(sampling valve) W: 废液(waste) F: 流通池(flow cell) PMT: 光电倍增管(photomultiplier tube) AMP: 放大器(amplifier) NHV: 负高压(negative high voltage) R: 记录仪(recorder) CTMAB: 十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethyl ammonium bromide) RDM B: 罗丹明 B(rhodamine B) NBS: *N*-溴代琥珀酰亚胺(*N*-bromosuccinimide)

准确称取法莫替丁50片(标示量:20 mg·片⁻¹),将其研磨成均匀粉末,准确称取该样品粉末0.0200 g用0.1 mol·L⁻¹醋酸溶液20 mL溶解,再加水定容至50 mL,超声振荡15 min,用干燥滤纸过滤,弃去最初滤液,收集续滤液(约30 mL),摇匀备用。

3 实验条件选择与讨论

3.1 流路的选择 静态实验表明,反应物混合后0.5 s发光强度即可达到最大,2 s后衰减为零,因此本文指示反应是一个快速化学发光反应;而且反应物加入顺序对发光强度的影响很大,在指示反应尚未发生之前,碱性介质必须与氧化剂*N*-溴代琥珀酰亚胺分开,且*N*-溴代琥珀酰亚胺应最后加入,发光强度才能到达最大。为此,本文针对性地尝试了8种流路,发现*N*-溴代琥珀酰亚胺只有等待携带样品的十六烷基三甲基溴化铵与碱性的罗丹明 B先期混合后,最后注入*N*-溴代琥珀酰亚胺才能获得最强的发光强度。因此,本文设计了双泵三道流路系统(如图1所示),并且反应管道的长度仅有3 cm长(即:图1中MN段),只有这样才能捕捉到最强的发光信号,并且10 s内可完成一次测定。

3.2 泵速对化学发光反应的影响 泵速的快慢对捕捉最强化学发光信号起到了关键作用。泵速太慢,化学发光反应在进入流通池之前就已经进行;泵速太快,化学发光反应在检测器后发生,这2种泵速均不能捕捉到最强的发光信号。本文试验了10~

80 r·m⁻¹的泵速,在泵速为 60 r·m⁻¹(即相当于体积流速为 4.6 mL·m⁻¹)时,发光信号最强,且峰形最佳,故本文选定泵速为 4.6 mL·m⁻¹。

3.3 荧光物质及其浓度的选择 荧光物质在本文中作为能量转移的接收试剂,其激发态的能级必须同化学发光反应释放的能量相匹配。在此前提下,荧光物质的量子产率越高,则化学发光强度也越强。本文对 6 种不同的荧光试剂(浓度均为 5 × 10⁻⁵ mol·L⁻¹)进行了分析对比,它们分别是:罗丹明 B、丁基罗丹明 B、罗丹明 6G、荧光素、硫酸奎宁、曙红等不同的荧光试剂。实验表明:罗丹明 B、丁基罗丹明 B、曙红、荧光素均有化学发光作用,但曙红的基线过高,信噪比较小,在更低浓度范围内考察曙红对发光的影响,虽然基线有所下降,但增强值却无明显提高。为此,进一步的实验在 1 × 10⁻⁶ ~ 5 × 10⁻⁴ mol·L⁻¹ 浓度范围内考察罗丹明 B、丁基罗丹明 B (butyl rhodamine B, BRDM B) 和荧光素 (fluorescein, FRC)。这 3 种物质的发光效果如图 2 所示,罗丹明 B 的信噪比最大,基线较稳定,相对发光强度(峰值)最高,至此,本文选定发光试剂为罗丹明 B。

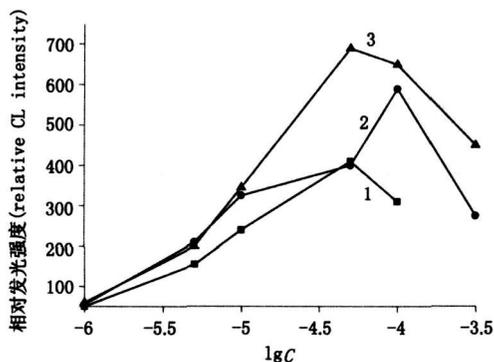


图 2 荧光物质浓度对化学发光强度的影响

Fig 2 Effect of fluorescence concentration on the CL intensity
 十六烷基三甲基溴化铵 (cetyltrimethyl ammonium bromide): 2.5 × 10⁻³ mol·L⁻¹; N-溴代琥珀酰亚胺 (N-bromosuccinimide): 0.01 mol·L⁻¹; 氢氧化钠 (sodium hydroxide): 0.1 mol·L⁻¹; 流速 (flow rate): 4.6 mL·m⁻¹; 光电倍增管负高压 (negative high voltage of photomultiplier tube): 800 V; 进样体积 (injection volume): 50 μL
 1 荧光素 (fluorescein) 2 丁基罗丹明 B (butyl rhodamine B) 3 罗丹明 B (rhodamine B)

更进一步的实验考察了 1 × 10⁻⁵ ~ 1 × 10⁻⁴ mol·L⁻¹ 范围内罗丹明 B 的浓度对化学发光的影响,如图 3 所示,当罗丹明 B 浓度为 5 × 10⁻⁵ mol·L⁻¹ 时,在其他实验条件不变的情况下,可得最大发光强度,故本文选定发光试剂为罗丹明 B,其浓度为 5 × 10⁻⁵ mol·L⁻¹。

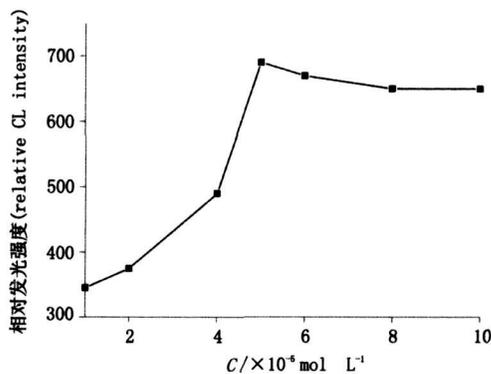


图 3 罗丹明 B 浓度对化学发光强度的影响

Fig 3 Effect of rhodamine B concentration on the CL intensity
 十六烷基三甲基溴化铵 (cetyltrimethyl ammonium bromide): 2.5 × 10⁻³ mol·L⁻¹; N-溴代琥珀酰亚胺 (N-bromosuccinimide): 0.01 mol·L⁻¹; 氢氧化钠 (sodium hydroxide): 0.1 mol·L⁻¹; 流速 (flow rate): 4.6 mL·m⁻¹; 光电倍增管负高压 (negative high voltage of photomultiplier tube): 800 V; 进样体积 (injection volume): 50 μL

3.4 氢氧化钠浓度对发光强度的影响 氢氧化钠为发光体系提供了碱性的介质环境,既影响 N-溴代琥珀酰亚胺与法莫替丁的氧化还原反应,又影响罗丹明 B 的量子产率。研究了 0.01 ~ 0.4 mol·L⁻¹ 氢氧化钠对发光强度的影响,实验发现,发光强度随氢氧化钠浓度增大而先增后减,在 0.1 mol·L⁻¹ 时发光强度最大。所以,选择氢氧化钠浓度为 0.1 mol·L⁻¹。

3.5 表面活性剂及其浓度的影响 考察了十六烷基三甲基溴化铵、曲拉通 X-100 (TritonX-100)、十二烷基硫酸钠、十二烷基磺酸钠、十六烷基吡啶基氯、聚乙二醇 6000 共 6 种表面活性剂对化学发光的影响。实验表明:十六烷基三甲基溴化铵及十六烷基吡啶基氯对 N-溴代琥珀酰亚胺-罗丹明 B-法莫替丁化学发光体系具有强烈的增敏作用, TritonX-100 对体系的化学发光有抑制作用,而其他 3 种表面活性剂对化学发光无影响。比较十六烷基三甲基溴化铵及十六烷基吡啶基氯对发光的影响,尽管两者对发光的增强程度相差无几,但十六烷基吡啶基氯的基线较高,反应的信噪比小,故本文选用十六烷基三甲基溴化铵表面活性剂为增敏剂。并考察了 1 ~ 10 mmol·L⁻¹ 范围内十六烷基三甲基溴化铵对化学发光信号的影响,当其浓度为 2.5 mmol·L⁻¹ 时,化学发光信号最强,故本文选定十六烷基三甲基溴化铵的浓度为 2.5 mmol·L⁻¹。

3.6 N-溴代琥珀酰亚胺浓度的影响 实验考察了 1 ~ 50 mmol·L⁻¹ 范围内 N-溴代琥珀酰亚胺对化学发光信号的影响,发光强度随 N-溴代琥珀酰

亚胺浓度增大而先增后减,浓度为 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时化学发光信号最强,故本文选定此浓度的 *N*-溴代琥珀酰亚胺用于后续实验。

3.7 进样环体积的选择 研究了采样环体积为 20 ~ 100 μL 时对发光强度的影响。当进样体积为 60 μL 时,可得最强的发光强度,且峰形最佳;当进样体积超过 60 μL 后峰形开始变差,超过 80 μL 时出现了双峰,“双峰”意味着进样体积过大而试剂相对不足所致。故本文选择注样体积为 60 μL 。

4 标准曲线、精密度与检出限

按实验方法,在优化的实验条件下,增强的化学发光信号强度 (ΔI) 与法莫替丁浓度在 $1.0 \times 10^{-4} \sim 1.0 \times 10^{-2} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内呈良好线性关系,其回归的线性方程为:

$$\Delta I = 4.13 \times 10^5 C + 195.63 \quad r = 0.9991$$

对浓度为 $5 \times 10^{-4} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的法莫替丁标准溶液连续进行 11 次平行测定,得 RSD 小于 2.1%;并用 3 倍空白值的标准差除以灵敏度(即:工作曲线的斜率),计算出本法的检出限为 $5.0 \times 10^{-5} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

5 干扰实验

研究药物中常见的赋形剂和共存物质的干扰情况,结果表明:在相对偏差小于 5% 的情况下,对于 $5 \times 10^{-4} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的法莫替丁标准溶液,500 倍量的醋酸钠、300 倍量的硝酸钙、200 倍量的淀粉、200 倍量的乳糖、200 倍量的葡萄糖和硫酸镁、200 倍量的蔗糖、100 倍量的酒石酸、100 倍量的环糊精、50 倍量的草酸钠、20 倍量的硫酸钠、1 倍的抗坏血酸不干扰本测定。

6 机理初探

法莫替丁分子中有多个还原性的胺基和取代胺基,其结构式如图 4 所示,在碱性条件下,*N*-溴代琥珀酰亚胺的氧化性来自其新产生的水解产物—次溴酸(HBrO)^[14],次溴酸具有氧化性而将法莫替丁氧化。该氧化—还原反应释放的能量转移并激发共存的物质罗丹明 B,从而产生化学发光。实验中用改装的 RF-540 荧光光度计,观察了连续流动注射扫描发光光谱,发现其最大发射波长为 578 nm,与罗丹明 B 自身的荧光发射光谱相同。

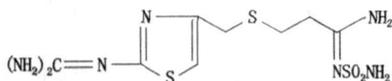


图 4 法莫替丁结构式

Fig 4 Structural formula of famotidine

根据上述实验情况,可推测本发光体系可能的反应机理如下:

N-溴代琥珀酰亚胺 + 水 \longrightarrow *N*-溴代琥珀酰亚胺 + 次溴酸

法莫替丁 + 次溴酸 + $\text{OH}^- \longrightarrow$ 产物*

产物* + 罗丹明 B \longrightarrow 罗丹明 B* + 产物

罗丹明 B* \longrightarrow 罗丹明 B + $\text{h}\nu$

7 样品分析

按照实验部分所述方法,对法莫替丁片剂中法莫替丁的含量进行了测定,并将本法与药典法对照,结果列于表 1。实验证明,本法测定结果与药典法基本一致,并且在测定速度、操作过程、试剂及样品消耗等方面优于药典法。取样品适量,加一定量标准溶液,进行回收率试验,结果见表 2。

表 1 本法与药典法对照

Tab 1 The assay of famotidine tablets by proposed method compared with pharmacopoeia method

样品号 (sample No.)	标示量 (labeled) / mg per tablet	本法 (proposed method) /mg per tablet (n = 5)	药典法 (pharmacopoeia method) /mg per tablet	相对误差 (relative error) %
1	20	19.81 (1.8)	20.12	-1.54
2	20	19.93 (2.5)	20.21	-1.39

注 (note): 括号内为 RSD (RSD in the parentheses %)

表 2 法莫替丁片的回收率试验 (n = 7)

Tab 2 Recovering results for famotidine in tablets

初始浓度 (original) /mg · mL ⁻¹	加入浓度 (added) /mg · mL ⁻¹	回收率 (recovery) %	RSD %
1.06	1	102	2.3
	2	103	2.2
2.8	1	97	2.5
	2	101	1.8

参考文献

- 1 ChP(中国药典). 2005. II (二部): 361
- 2 Abu Zuhri AZ, Shubietah RM, Badah GM. Extractional- spectrophotometric determination of famotidine in pharmaceutical formulations *J Pharm Biomed Anal*, 1999, 21(2): 459
- 3 Rahman N, Kashif M. Application of ninhydrin to spectrophotometric determination of famotidine in drug formulations *Farmaco*, 2003, 58 (10): 1045
- 4 Ayad MM, Shakaby A, Abdellatef HE, et al. New colorimetric methods for the determination of trazodone HCl, famotidine, and diltiazem HCl in their pharmaceutical dosage forms *Anal Bioanal Chem*, 2003, 376(5): 710
- 5 Helali N, Daighouth F, Mousser L. RP- HPLC determination of famotidine and its potential impurities *Chromatographia*, 2004, 60(7-8): 455

- 6 Campanero MA, Bueno I, Arango MA, *et al*. Improved selectivity in detection of polar basic drugs by liquid chromatography - electrospray ionization mass spectrometry illustration using an assay method for the determination of famotidine in human plasma. *J Chromatogr B*, 2001, 763(1-2): 21
- 7 Zendejbska D, Stafilov T. Development of an HPLC method for the determination of ranitidine and cimetidine in human plasma following SPE. *J Pharm Biomed Anal*, 2003, 33(2): 165
- 8 Nasser S, Brunet M, Lavoie P, *et al*. HPLC - DAD method for studying the stability of solutions containing morphine, dexamethasone, haloperidol, midazolam, famotidine, metoclopramide and dimenhydrinate. *J Liq Chromatogr*, 2001, 24(2): 265
- 9 Perez-Ruiz T, Martinez-Lozano C, Tamas V, *et al*. Direct determination of ranitidine and famotidine by CE in serum, urine and pharmaceutical formulations. *J Pharm Biomed Anal*, 2002, 30(4): 1055
- 10 Wang Zhouping, Zhang Zhuji, Fu Zhifeng, *et al*. Flow injection chemiluminescence determination of an inhomethylbenzoic acid and an inophylline based on *N*-bromosuccinimide-luminal reaction. *Talanta*, 2004, 62(3): 611
- 11 Song Zhenghua, Hou Shuang. Sub-picogram determination of vitamin B₁₂ in pharmaceuticals and human serum using flow injection with chemiluminescence detection. *Anal Chim Acta*, 2003, 488(1): 71
- 12 FU Zhi-feng(付志锋), ZHANG Zhu-jun(章竹君), WANG Zhou-ping(王周平), *et al*. Flow injection chemiluminescence analysis of 2-aminobutyric acid based on energy transfer(流动注射能量转移化学发光法测定 2-氨基丁酸). *Chin J Anal Chem*(分析化学), 2004, 32(4): 516
- 13 LUO Wan-fen(罗万芬), ZHANG Zhu-jun(章竹君), WANG Zhou-ping(王周平), *et al*. Flow injection energy transfer chemiluminescence analysis of tobramycin based on *N*-bromosuccinimide-fluorescein system(*N*-溴代琥珀酰亚胺-荧光素体系流动注射能量转移化学发光法测定妥布霉素). *Chin J Anal Chem*(分析化学), 2004, 32(1): 5
- 14 Halvatzis SA, Meropi M, Potamia T, *et al*. Kinetic study of *N*-bromosuccinimide reactions and kinetic determination of pyridoxine using a bromide-selective electrode. *Talanta*, 1993, 40(8): 1213

(本文于 2007 年 7 月 4 日收到)

第十五届全国药学史本草学术研讨会征文通知

中国药学会药学史专业委员会组织的“第十五届全国药学史本草学术研讨会定于 2009 年 8 月上旬在我国红山文化的发祥地——内蒙古赤峰市召开。在此衷心希望得到国内外广大医药学工作者、药学史、社会学等相关学科研究者的广泛关注,特别期盼关注我国民族药事业发展的专家学者热情赐稿。同时要求本专业委员会的各位委员积极参与、推荐本专业或相关专业的学术论文。以论文参会代表可按国家相关规定享受继续教育学分。有关征文的具体事宜通知如下:

一、本次会议的主题:“蒙药历史、现状及加速蒙药产业化进程的研讨”。

二、征文范围(请查询: <http://www.cpa.org.cn>)

三、论文要求:

论文立意要有创新性,引证资料可靠。字数除特约稿外,一般在 3000 字以内,并附 400 字以内的摘要。原则上要求投送电子 Word 文档,个别无条件者也可投送手写稿。但要求字迹工整清楚。论文入选后,将统一编印论文集。

四、论文截止日期:2009 年 6 月 15 日。

五、会议时间地点:2009 年 8 月上旬,内蒙古赤峰市。

六、论文请寄:

100700 纸质文稿请寄:北京东直门南小街 16 号中国中医科学院中国医史文献研究所 万芳

电子文稿请发: jinda@cpa.org.cn

详情请查询: <http://www.cpa.org.cn>