

非水毛细管电泳法分离分析非甾体抗炎药物

肖玉秀,廖晓燕,梅洁,程伟 (武汉大学药学院,武汉 430072)

摘要:目的 建立一种非水毛细管电泳法 (NACE) 分离非甾体抗炎药物,并对奥沙普秦肠溶片进行定量分析。方法 以含醋酸铵 15 mmol/L 的甲醇-乙腈 (3:7) 混合液为电泳缓冲液,运行电压 20 kV,柱温 20℃,进样压力 2.5 kPa,进样时间 10 s,UV 检测波长 200 nm;内标法 (内标:布洛芬) 定量奥沙普秦肠溶片。结果 NACE 能有效分离布洛芬、萘普生、奥沙普秦、舒林酸和双氯芬酸钠五种非甾体抗炎药物。奥沙普秦与布洛芬的峰面积比对奥沙普秦浓度 $C(\mu\text{g/mL})$ 的线性回归方程为 $Y = 0.0434C - 7.1 \times 10^{-3}$ ($R = 0.9999$, $n = 9$),线性范围 0.8 ~ 80 $\mu\text{g/mL}$,加样回收率 99.05% ~ 101.48%,日内、日间精密度分别为 0.54% ~ 0.83%,0.55% ~ 0.92%。结论 NACE 用于奥沙普秦等非甾体抗炎药物的分离分析,选择性高,重现性好,准确,快速,可作为该类药物及其制剂的质量控制手段。

关键词:非水毛细管电泳;非甾体抗炎药物;奥沙普秦

中图分类号: R917.799.1 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2006)06-0480-03

Separation and analysis of non-steroidal anti-inflammatory drugs by nonaqueous capillary electrophoresis

XIAO Yu-xiu, LIAO Xiao-yan, MEI Jie, CHENG Wei (College of Pharmacy, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method of nonaqueous capillary electrophoresis (NACE) to separate non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and determine the content of oxaprozin in enteric-coated tablet. **METHODS** Methanol-acetonitrile (3:7) mixture containing 15 mmol/L ammonium acetate was used as running buffer. The applied voltage was 20 kV and temperature 20℃. The samples were injected for 10 s at the pressure of 2.5 kPa. UV detection was set at 200 nm. The internal standard method (ibuprofen as internal standard substance) was used to determine the content of oxaprozin in enteric-coated tablet. **RESULTS** Five NSAIDs i.e. ibuprofen, naproxen, oxaprozin, sulindac and diclofenac sodium were efficiently separated. The regression equation of calibration curve for determining oxaprozin was $Y = 0.0434C - 7.1 \times 10^{-3}$ ($R = 0.9999$, $n = 9$) with a linear range of 0.8 ~ 80 $\mu\text{g/mL}$. The intra-day RSD and inter-day RSD were 0.54% ~ 0.91% and 0.55% ~ 0.92%, respectively. **CONCLUSION** The established NACE method is simple, fast, accurate, precise, and can be used to separate NSAIDs and control the quality of NSAIDs and their preparations.

KEY WORDS: nonaqueous capillary electrophoresis; non-steroidal anti-inflammatory drugs; oxaprozin

非甾体抗炎药物 (non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs) 是临床上常用的解热镇痛抗炎药,广泛应用于风湿性疾病、关节炎以及各种发热、痛性疾病。该类药物治疗肯定,但不良反应严重,对胃肠道、肾脏和肝脏有较大影响,因此,临床上通常需要测定此类药物在体液中的浓度以评估其用药安全性。

非甾体抗炎药物的分离分析多数采用 HPLC。毛细管电泳法近年来也逐步被采用,分离模式主要为毛细管区带电泳 (CZE)、胶束电动毛细管色谱、毛细管电色谱和非水毛细管电泳 (NACE)^[1]。由于 NACE 可增加分析对象范围,改善分离度,增加选择性,提高灵敏度,且易于与质谱检测器联用^[2],因此对水难溶性非甾体抗炎药物的分离分析有更大优势。奥沙普秦是一种新型长效非甾体抗炎药物,近年来临床应用越来越广泛,其含量测定一般采用 HPLC、UV 和中和法^[3]。关于奥沙普秦的毛细管电泳分析,笔者均未见有国内

外报道。

笔者采用 NACE 法对五种非甾体抗炎药物 (布洛芬、萘普生、奥沙普秦、舒林酸和双氯芬酸钠) 进行了良好分离,建立了奥沙普秦的 NACE 定量分析方法,并用于奥沙普秦肠溶片的含量测定。

1 仪器和试剂

CAPEL-105 型毛细管电泳仪 (Russia, LUMEX), 配有可调波长的紫外检测器; Chrom&Spec 1.5X 数据处理系统; 未涂层熔融石英毛细管 (60.8 cm × 50 μm I.D. × 375 μm O.D., 有效长度 51.0 cm, 河北永年光纤厂); pH 计 (上海雷磁公司)。

奥沙普秦肠溶片 (批号: 020108 030606 030607, 湖北百科亨迪药业有限公司); 布洛芬、舒林酸、双氯芬酸钠、奥沙普秦、萘普生对照品由各药厂友好提供; 甲醇、乙腈为色谱纯; 醋酸铵为分析纯; 实验用水为双蒸水。

作者简介: 肖玉秀, 博士, 副教授, E-mail: yuxiuxiao@yahoo.com.cn

2 溶液的配制

2.1 对照品贮备液的配制

精密称取适量布洛芬、舒林酸、双氯芬酸钠、奥沙普秦、萘普生对照品，分别用甲醇溶解配制成 1mg/mL 的对照品贮备液。实验时取各对照品贮备液适量，混合并用甲醇稀释至各组分浓度均为 20μg/mL 的混合溶液。

2.2 供试品溶液的配制

取不同批号的市售片剂各 10 片，精密称重，计算平均片重后研磨成细粉，精密称取细粉适量（约相当于奥沙普秦 0.2g）置 50mL 量瓶中，加甲醇充分溶解后定容，摇匀，过滤，精密量取续滤液 0.25mL 置于 50mL 量瓶中，同时精密量取内标（布洛芬对照品）贮备液 1mL 至量瓶中，用甲醇稀释至刻度，摇匀，作为供试品溶液。

2.3 电泳缓冲液的配制

称取适量醋酸铵溶解于不同体积比的甲醇-乙腈混合液中，作为电泳缓冲液。所有缓冲液使用前均用 0.45μm 有机滤膜过滤。

3 方法与结果

3.1 非甾体抗炎药物的分离

以含醋酸铵 15mmol/L 的甲醇-乙腈混合液为电泳缓冲液；柱温 20℃；运行电压 20kV；2.5kPa 压力进样，进样时间 10s；检测波长 200nm。每次实验前，毛细管分别用 0.1mol/L NaOH 溶液、双蒸水、甲醇和电泳缓冲液冲洗 10、10、5、10min，两次分析之间用电泳缓冲液冲洗 2min。五种药物在上述电泳条件下被完全分离，且柱效高，电泳峰形良好。分离图谱见图 1。

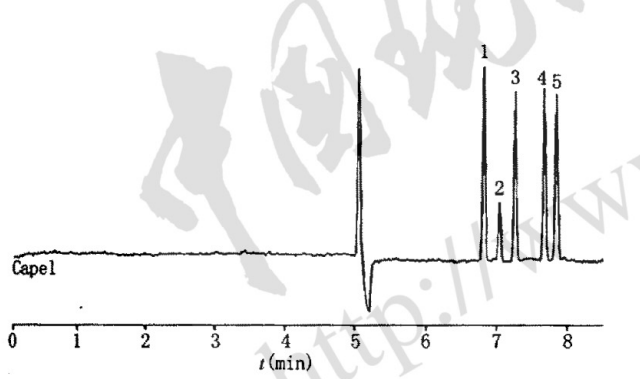


图 1 五种非甾体抗炎药物的 NACE 分离图谱
Fig 1 Separation of the five NSAIDs by NACE
1. 布洛芬; 2. 萘普生; 3. 奥沙普秦; 4. 舒林酸; 5. 双氯芬酸钠
1. Ibuprofen; 2. naproxen; 3. oxaprozin; 4. sulindac; 5. diclofenac sodium

3.2 奥沙普秦肠溶片的定量分析

3.2.1 线性关系考察及检测限、定量限 取奥沙普秦对照品贮备液适量，配制成以 20μg/mL 布洛芬为内标的一系列浓度对照品溶液（0.8、1.4、4、10、20、30、40、60、80μg/mL）。按“3.1”描述的 NACE 电泳条件分析，以奥沙普秦与布洛芬的峰面积比对奥沙普秦浓度 C (μg/mL) 作标准曲线，其方程为 $Y = 0.0434C - 7.1 \times 10^{-3}$ ($R = 0.9999$, $n = 9$)，并求得检测限（信噪比 S/N = 3）为 0.09657μg/mL，定量限（S/N = 10）为 0.3219μg/mL。

3.2.2 精密度试验 取奥沙普秦对照品贮备液适量配制成以 20μg/mL 布洛芬为内标的低、中、高三个浓度（0.8、20、80μg/mL）对照品溶液，每个浓度于同日内分别平行操作 5 次，并连续测量 5d，测得峰面积比的日内精密度为 0.65%（低）、0.83%（中）、0.54%（高）；日间精密度为 0.91%（低）、0.92%（中）、0.55%（高）。

3.2.3 加样回收率试验 在已知含量的样品溶液中分别加入适量奥沙普秦贮备液配制成低、中、高三个浓度的溶液，每个浓度平行操作 5 次，根据 NACE 标准曲线方程计算奥沙普秦浓度，进而计算回收率，结果见表 1。

表 1 加样回收率试验结果 (n = 5)

原样品浓度 (μg/mL)	加入浓度 (μg/mL)	测得浓度 (μg/mL)	回收率 (%)	RSD (%)
0.6574	1.2	1.8487	99.05	0.68
	20	20.9561	101.48	0.51
	78	78.5023	99.47	0.66

3.2.4 样品测定 取三个批号的奥沙普秦肠溶片（标示量为 0.2g/片），按照“3.2”方法处理后测定，每个批号样品重复测定 5 次，计算平均标示百分含量。另采用紫外法中的对照品比较法对各样品进行了含量测定。结果见表 2。可见，NACE 和 UV 都适于奥沙普秦肠溶片的定量分析；NACE 法的重现性稍逊于 UV，但专属性更高。

表 2 奥沙普秦肠溶片含量测定结果 (n = 5)

样品批号	NACE		UV	
	标示含量 %	RSD %	标示含量 %	RSD %
020108	98.85	0.93	98.61	0.08
030607	103.75	0.59	103.86	0.08
030606	102.16	0.72	103.53	0.11

4 讨论

4.1 电泳条件的优化

4.1.1 有机溶剂及其组成的选择 NACE 中，有机溶剂的选择会显著影响溶质的迁移时间和分离选择性。综合考虑有机溶剂的挥发性、介电常数、黏度等特性参数，本实验选择甲醇-乙腈混合溶液作为非水介质。同时，混合溶剂中两种溶剂体积比的变化同样会影响溶质的分离效率。本实验考察了甲醇-乙腈混合溶液的体积比从 1:9 至 1:1 变化时对各溶质迁移时间及分离度的影响，结果见图 2。由于所选用的醋酸铵电解质在乙腈中的溶解度较小，故未考察纯乙腈。

由图 2 可知，随着甲醇体积分数的增大，五种药物的迁移时间均逐渐增大。这主要是通过改变体系的 ϵ/η 值（ ϵ 为相对介电常数， η 为介质黏度）使电渗流发生改变而实现的。当甲醇-乙腈比为 3:7 时，五种药物均达到基线分离（分离度大于 1.5），因此选择甲醇-乙腈体积比为 3:7。

4.1.2 电解质及其浓度的选择 有机溶剂中加入电解质使其具有一定的导电性能是实现非水毛细管电泳的必要条件。

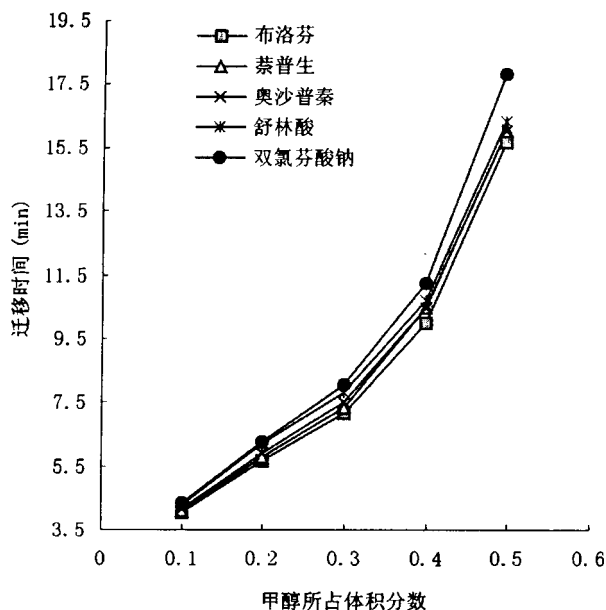


图 2 甲醇所占体积比对迁移时间的影响

Fig 2 Effect of methanol percentage on migration time
电泳缓冲液: 含有 10 mmol/L 醋酸铵的甲醇-乙腈混合溶液; 运行电压 20 kV; 柱温 20℃; 检测波长 200 nm。

Running buffer: methanol-acetonitrile mixture containing 10 mmol/L ammonium acetate; applied voltage 20 kV; temperature 20℃; detection at 200 nm.

由于电解质溶解度及挥发性的限制, 常被选用的电解质为醋酸铵。实验中曾尝试加入醋酸调节 pH, 但分离效果不佳。本实验考察了甲醇-乙腈 (3:7) 混合溶液中含醋酸铵 5 ~ 30 mmol/L 时五种药物的分离情况, 结果如图 3。可见, 五种药物的迁移时间随醋酸铵浓度增大而增大。综合各组分分

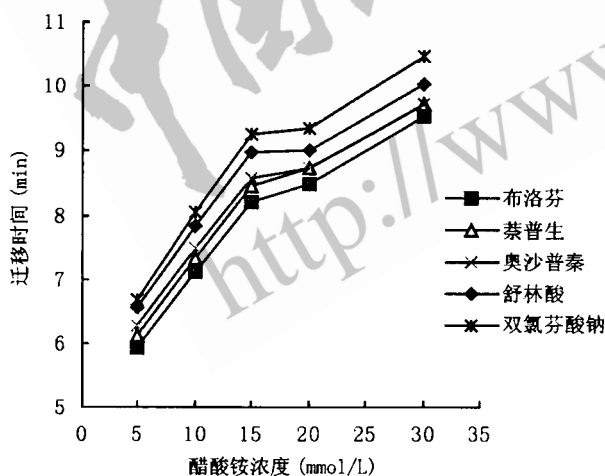


图 3 醋酸铵浓度对迁移时间的影响

Fig 3 Effect of ammonium acetate concentration on migration time

电泳缓冲液: 含不同浓度醋酸铵的甲醇-乙腈 (3:7) 混合溶液; 运行电压 20 kV; 柱温 20℃; 检测波长 200 nm。

Running buffer: methanol-acetonitrile (3:7) mixture containing different concentration ammonium acetate; applied voltage 20 kV; temperature 20℃; detection at 200 nm.

离度的大小, 以含 15 mmol/L 醋酸铵的甲醇-乙腈 (3:7) 混合溶液的分离效果为佳, 故选择 15 mmol/L 醋酸铵。

4.1.3 温度的选择 NACE 中, 柱温主要影响电泳缓冲液的黏度, 从而影响电渗流。实验中考察了 4 个温度下五种药物的分离情况, 结果见图 4。随着温度升高, 各组分的迁移时间均缩短; 所有温度下, 五种药物均达到基线分离, 但以 15℃ 和 20℃ 下的分离效果最佳。考虑到分析时间, 选择 20℃ 为柱温。

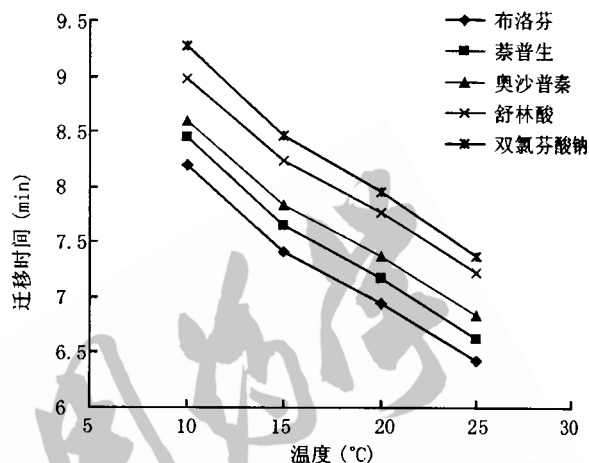


图 4 温度对迁移时间的影响

Fig 4 Effect of temperature on migration time
电泳缓冲液: 含 15 mmol/L 醋酸铵的甲醇-乙腈 (3:7) 混合溶液; 运行电压 20 kV; 检测波长 200 nm。

Running buffer: methanol-acetonitrile (3:7) mixture containing 10 mmol/L ammonium acetate; applied voltage 20 kV; detection at 200 nm.

4.1.4 运行电压的选择 高电压有利于达到最大柱效和最短分析时间, 但电压太高, 产生的焦耳热来不及散失, 则影响柱效。本实验通过绘制欧姆曲线确定最佳运行电压为 20 kV。

4.2 结论

以含 15 mmol/L 醋酸铵的甲醇-乙腈 (3:7) 混合溶液为电泳缓冲溶液, 采用 NACE 成功地分离了奥沙普秦等五种非甾体抗炎药物。非水介质的种类和组成, 电解质的种类和浓度对样品的分离选择性有显著影响。所建立的 NACE 法用于奥沙普秦肠溶片的定量分析, 灵敏度高, 重现性好, 测定结果准确, 可作为奥沙普秦等非甾体抗炎药物及其制剂的质量控制手段。

参考文献

- [1] FILLET M, BECHET I, PIETTE V, *et al.* Separation of nonsteroidal anti-inflammatory drugs by capillary electrophoresis using nonaqueous electrolytes [J]. *Electrophoresis*, 1999, 20 (9): 1907-1915.
- [2] YANG Q, BENSON L M, JOHNSON K L, *et al.* Analysis of lipophilic peptides and therapeutic drugs: on-line nonaqueous capillary electrophoresis-mass spectrometry [J]. *J Biochem Biophys Methods*, 1999, 38 (2): 103-121.
- [3] YANG G, XIANG Y, ZHEN H Q. Studies on Quantitative Determination of Oxaprozin by HPLC, UV, Spectrophotometry and Potentiometry [J]. *Chin J Pharm Analysis (药物分析杂志)*, 1994, 14 (3): 17-20.

收稿日期: 2005-09-27