

双氯灭痛血药浓度的高效液相色谱分析

杜迎翔 陈玉英 李康乐¹ 郑朝华 陈文佳

(中国药科大学分析化学教研室, ¹ 分析计算中心, 南京 210009)

摘要 研究了反相高效液相色谱测定双氯灭痛血药浓度的新方法, 考察了蛋白沉淀剂乙腈用量、流动相 pH 值等对血药色谱行为的影响。优化的色谱条件为: C₁₈ Hypersil (5 μ m, 100 mm \times 4.6 mm) 不锈钢柱, 甲醇-乙腈-pH 6.0 磷酸盐缓冲液(25:20:55)作流动相, 检测波长 280 nm, 进样量 50 μ l。采用乙腈沉淀蛋白后直接进样, 操作简便快速, 回收率达 99.18%~103.6%, 日内 RSD 为 3.4%~3.7%, 日间 RSD 4.4%~4.9%, 血药浓度在 0.25~8.0 μ g/ml 线性关系良好, $r=0.9994$, 血药最低检测浓度为 200 ng/ml。

关键词 双氯灭痛; 药物分析; 高效液相色谱

双氯灭痛是一种新型的非甾体强效抗炎镇痛药^[1], 其抗炎作用比氟灭酸、甲灭酸强, 镇痛作用比阿司匹林、消炎痛强。但由于双氯灭痛尚存在胃肠道不良反应, 生物半衰期短, 有效血药浓度维持时间短等缺点^[2], 近年来国内外越来越多的药学工作者开始致力于双氯灭痛的经皮给药系统和控速释药体系的研制^[3]。而有关双氯灭痛的血药浓度测定方法中, 分光光度法灵敏度低、选择性差, HPLC 法样品预处理需要萃取分离, 不仅繁琐费时, 而且容易带来样品损失及定量误差^[4,5]。我们采用乙腈沉淀蛋白质后直接进样, 大大简化了预处理操作, 研究了蛋白沉淀剂乙腈用量、流动相 pH 等对双氯灭痛血药色谱行为的影响, 建立了反相高效液相色谱测定双氯灭痛血药浓度的新方法, 为双氯灭痛的药动力学和药效学研究及新剂型研制提供了可靠的分析手段。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

岛津 LC-4A 型高效液相色谱仪, SPD-2AS 紫外检测器, SIL-1A 进样器, C-R2Ax 色

谱数据处理机; XH-89 旋涡混合器; 800 型高速离心沉淀器。

双氯灭痛对照品(广州明兴制药厂); 空白血清、血清样品由南京铁道医学院提供; 重蒸馏水; 乙腈(光谱纯, 中科院上海脑研究所); pH 6.0 磷酸盐缓冲液: 取磷酸二氢钾 8.34 g 与磷酸氢二钾 0.87 g, 加水使溶解成 1000 ml, 用 0.1 mol/L NaOH 调至 pH 6.0, 即得, 其他试剂除特别说明外均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 色谱条件 色谱柱: C₁₈ Hypersil (100 mm \times 4.6 mm, 5 μ m) 不锈钢柱, Guard-PakTM C₁₈ 保护柱, 柱温: 室温, 流动相: 甲醇-乙腈-pH 6.0 磷酸盐缓冲液(25:20:55), 流速 1 ml/min, 检测波长 280 nm, 进样量 50 μ l。

1.2.2 双氯灭痛标准溶液的配制 精密称取双氯灭痛标准品 0.1000 g, 置于 100 ml 容量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得 1 mg/ml 贮备液。取上述贮备液适量用甲醇稀释成 100 μ g/ml 的标准溶液, 临用时将标准溶液用甲醇稀释成所需浓度。

1.2.3 血样处理 准确吸取人血清样品 0.5 ml 于尖底具塞离心管中, 加 0.5 ml 乙

收稿日期 1994-04-23

臍,置漩涡振荡器上振荡 1 min,离心 10 min (2000 r/min)后,取上清液 50 μ l 进样。

2 实验结果

2.1 色谱行为

取空白血清、血清模拟样品和血清样品各 0.5 ml,按“血样处理”项下方法操作,并进行 HPLC 测定,得色谱图 1。在本文色谱条件下,双氯灭痛保留时间为 4.0 min,而空白血清和双氯灭痛代谢产物于 2.5 min 内全部出峰,与前者达到良好分离,不干扰双氯灭痛的测定。

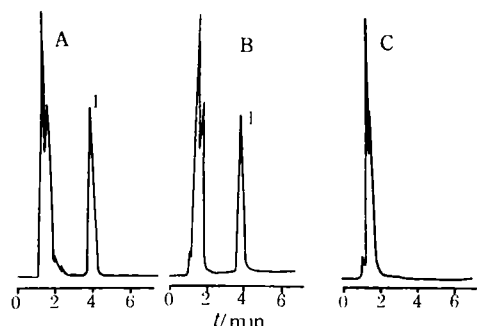


Fig 1. Chromatograms of diclofenac in human serum

A: serum of a healthy volunteer after administration of diclofenac tablet; B: blank human serum spiked with diclofenac; C: blank human serum; peak 1: site of diclofenac

2.2 线性关系

2.2.1 双氯灭痛的标准曲线 准确配制浓度为 0.05, 0.10, 0.20, 0.40, 0.80, 1.6, 3.2, 6.4, 12.8 μ g/ml 的双氯灭痛甲醇溶液,分别进样 50 μ l,以峰面积(A)对浓度(C)进行线性回归,得回归方程为 $A = 325.0 + 1.125 \times$

$10^5 C$ ($r = 0.9997$),说明浓度在 0.05~12.8 μ g/ml,双氯灭痛的线性关系良好(未测最高和最低值)。

2.2.2 血清中双氯灭痛的标准曲线和最低检测限 精密量取浓度为 2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0, 80.0 μ g/ml 的双氯灭痛甲醇溶液各 50 μ l,分别置于 6 个尖底具塞离心管中,用 N_2 吹干,加入空白血清 0.5 ml,按“血样处理”项下方法操作,进行 HPLC 测定,然后以双氯灭痛的峰面积(A)为纵坐标,双氯灭痛的血药浓度(C)为横坐标,求得回归方程为 $A = -451.2 + 5.136 \times 10^4 C$ ($r = 0.9994$),可见,双氯灭痛的血药浓度在 0.25~8.0 μ g/ml 线性关系良好(未作最高限)。当 $S/N=3$ 时,血清中双氯灭痛的最低检测浓度为 200 ng/ml。

2.3 回收率试验

2.3.1 绝对回收率 按“血清中双氯灭痛的标准曲线”项下方法配制三种不同浓度(0.5, 2.0, 6.0 μ g/ml)的双氯灭痛血清模拟样品,按“血样处理”项下方法操作,测定峰面积,结果与对应条件下含相同浓度的双氯灭痛甲醇溶液直接进样时相比,得绝对回收率分别为 88.7%, 90.6%, 91.1% ($n=5$),由此可见,用乙腈沉淀血清蛋白,双氯灭痛的纯化率较高。

2.3.2 方法回收率 按上法配制三种浓度(0.5, 2.0, 6.0 μ g/ml)的双氯灭痛血清模拟样品,按“血样处理”项下方法操作,由双氯灭痛的峰面积,从血清中双氯灭痛的标准曲线求得含量,计算回收率,结果见表 1。

Tab 1. Recovery of determination of diclofenac in human serum

Added, μ g/ml	Found, μ g/ml	$\bar{x} \pm s$, μ g/ml	Recovery, %	RSD, %
0.5000	0.5122, 0.5248, 0.4953, 0.4877, 0.5136	0.5067 ± 0.015	101.3	3.0
2.000	2.048, 2.156, 1.965, 2.087, 2.102	2.072 ± 0.071	103.6	3.4
6.000	5.874, 5.903, 6.054, 6.120, 5.806	5.951 ± 0.13	99.18	2.2

2.4 精密度试验

按“血清中双氯灭痛的标准曲线”项下方法配制三种不同浓度(0.5, 2.0, 6.0 μ g/ml)的双氯灭痛血清模拟样品,按“血样处理”项

下方法操作,1 天内进样 10 次,由血清中双氯灭痛的标准曲线计算双氯灭痛浓度,测得日内标准偏差。另于 1 周内每天进样 1 次,计算日间标准偏差。结果见表 2。

Tab 2. Precision of method within-day and between-day

Added, μg/ml	Within-day, n=10		Between-day, n=7	
	Found, μg/ml	RSD, %	Found, μg/ml	RSD, %
0.5000	0.5098±0.019	3.7	0.4912±0.024	4.9
2.000	2.049±0.072	3.5	2.023±0.097	4.8
6.000	5.876±0.20	3.4	5.902±0.26	4.4

2.5 人血清样品的测定

4 名健康志愿者,各口服适量双氯灭痛片,分别于数小时后静脉取血约 3 ml,分离血细胞,取血清 0.5 ml,按“血样处理”项下方法操作,进行 HPLC 测定,由双氯灭痛的峰面积计算血药浓度,结果见表 3。

Tab 3. Assay of diclofenac in human serum samples

No.	Content of diclofenac, μg/ml	\bar{x} , μg/ml	RSD, %
1	4.213, 4.308, 4.354, 4.152, 4.061	4.218	2.8
2	1.034, 1.076, 1.093, 1.132, 1.058	1.079	3.4
3	3.428, 3.490, 3.501, 3.376, 3.329	3.425	2.1
4	5.765, 5.901, 5.872, 5.653, 5.594	5.757	2.3

3 讨 论

3.1 蛋白沉淀剂用量、流动相 pH 对血药色谱行为的影响

用有机溶剂作蛋白沉淀剂去除血蛋白后直接进样,具有快速简便之特点,在体内药物分析中已得到了广泛的应用。Blanchard^[6]认为,在乙腈、丙酮、乙醇、甲醇四种溶剂中,乙腈的沉淀效果最好。本文以乙腈沉淀血清蛋白后直接进样,取得了较好的结果。但实验中发现乙腈用量和流动相 pH 对双氯灭痛血药色谱行为有较大的影响(图 2,3)。图 2 表示用不同量乙腈沉淀蛋白后,双氯灭痛的色谱行为。当乙腈-血清(1.2:1)时,双氯灭痛色谱峰即开始形变,乙腈:血清达 2:1 时,色谱峰峰顶裂分。显然,乙腈用量太小,蛋白沉淀作用不完全,而太大则导致双氯灭痛色谱峰形变或分裂,而且也浪费试剂。故选用乙腈-血清(1:1)。同时,为了防止少量未除去的血清蛋白被分析柱所吸附,造成色谱柱的堵塞,我们在分析柱前又增加了一个 Guard-Pak™ C₁₈ 保护柱。图 3 则表示用不同 pH 的磷酸盐缓冲液配制流动相时,双氯灭痛的色谱

行为。当流动相 pH 为 7.0 时,双氯灭痛的色谱峰有较大的分裂,故选择 pH 6.0 磷酸盐缓冲液-甲醇-乙腈体系作流动相,此时不仅峰形对称而且也较尖锐。

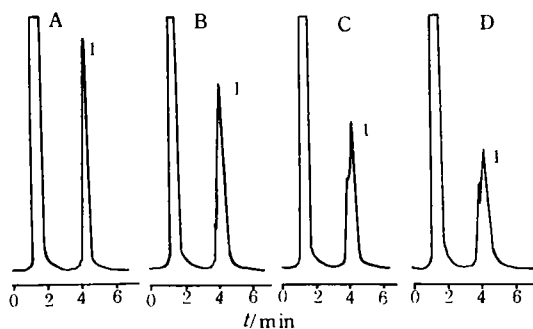


Fig 2. Effect of the proportion of precipitant on the peak shape of diclofenac in serum
mobile phase: CH₃OH-acetonitrile-pH6.0 phosphate buffer (25:20:55); acetonitrile-serum: A=1:1, B=1.2:1, C=1.5:1, D=2:1; peak 1: site of diclofenac

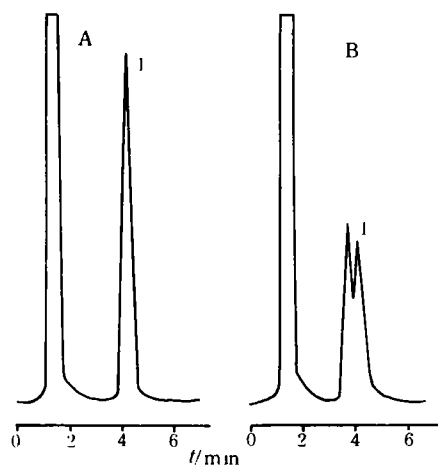


Fig 3. Effect of the pH of mobile phase on the peak shape of diclofenac in serum
acetonitrile-serum (1:1); mobile phase: A=CH₃OH-acetonitrile-pH6.0 phosphate buffer (25:20:55), B=CH₃OH-acetonitrile-pH7.0 phosphate buffer (25:20:55); peak 1: site of diclofenac

血药色谱峰的形变和分裂是体内药物分析中存在的一个较为普遍的问题^[7,8],产生峰形变的原因较为复杂,故至今仍未被完全阐明。Wahlund 等^[8]认为,血浆蛋白中白蛋白与药物间存在的络合平衡是导致药物色谱峰形变的根本原因,而 Woollard^[9]则提出了另一种观点,认为药物色谱峰形变的产生并不是

由于血样中存在蛋白质,而是流动相的干扰所致。但从血药色谱峰形变和分裂的表现形式来看,两者虽然都可以从各自的角度解释某些现象,但还不尽完善,所以血药色谱峰形变和分裂的产生机理尚待进一步研究。

3.2 色谱条件的优化

用紫外检测器检测血药浓度,最大的缺点是灵敏度较低,而采用乙腈沉淀血清蛋白后直接进样也将使血样得到稀释而导致检测限的提高,故在不影响双氯灭痛色谱峰形和蛋白沉淀率的前提下,采用了较大的进样量(50 μ l)和较小的蛋白沉淀剂用量(乙腈:血清=1:1)。另外,通过改变流动相中乙腈含量,降低双氯灭痛保留时间,从而使方法的灵敏度得到了较大的提高,流动相中乙腈含量

变化对双氯灭痛保留时间的影响情况见图4。双氯灭痛保留时间随流动相中乙腈含量的降低而增大。考虑到分析速度、方法灵敏度、双氯灭痛和代谢物及血清空白峰的分离度等多种因素,选择流动相比比例为甲醇-乙腈-pH 6.0 磷酸盐缓冲液(25:20:55)。

参考文献

- 1 中国药物大全编辑委员会. 中国药物大全:西药卷. 北京:人民卫生出版社,1991. 76
- 2 Ralph ES. Diclofenac sodium. *Clin Pharm*, 1989,8(8):545
- 3 Vyas SP, Jain NK. Formulation and performance evaluation of controlled release diclofenac tablet. *J Control Release*, 1989,10:219
- 4 Krishna DR, Suryakumar J. High performance liquid chromatographic determination of diclofenac sodium in human plasma. *Indian J Pharm Sci*, 1991,53(5):212
- 5 Lansdorp D, Janssen TJ, Guelen PJM, et al. High-performance liquid chromatographic method for the determination of diclofenac and its hydroxy metabolites in human plasma and urine. *J Chromatogr*, 1990,528:487
- 6 Blanchard J. Evaluation of the relative efficiency of various techniques for deproteinizing plasma samples prior to high-performance liquid chromatographic analysis. *J Chromatogr*, 1981,226:455
- 7 Robert AG, Lilliana L, Helena M. Optimized liquid-chromatographic determination of metronidazole and its metabolites in plasma. *Clin Chem*, 1984,30(5):784
- 8 Wahlund KG, Arvidsson T. Elimination of peak deformation in the liquid chromatographic separation of a strongly protein-bound drug from directly injected blood plasma samples. *J Chromatogr*, 1983,282:527
- 9 Woollard GA. Effect of precipitating agents on the analysis of metronidazole by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr*, 1984,303:222

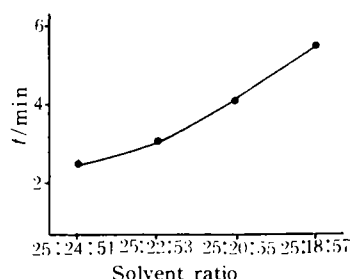


Fig 4. Effect of the proportion of acetonitrile in the mobile phase (CH_3OH -acetonitrile-phosphate buffer) on the retention time of diclofenac

Study on HPLC Analysis of Diclofenac in Serum

Du Yingxiang, Chen Yuying, Li Kangle¹, Zheng Zhaozhua, Chen Wenjia

Department of Analytical Chemistry, ¹Analysis and Computer Center, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009

Abstract A sensitive and selective RP-HPLC procedure has been developed to determine diclofenac in human serum. A 100 mm \times 4.6 mm C_{18} Hypersil(5 μ m) column with a mobile phase consisting of methanol-acetonitrile-pH6.0 phosphate buffer(25:20:55) was used. Effect of the proportion of protein precipitant acetonitrile and the pH of mobile phase on the peak shape of diclofenac in serum was studied. The serum sample was deproteinized by adding acetonitrile and a 50 μ l portion of the supernatant after centrifugation was directly chromatographed. Standard curve was linear over the concentration range of 0.25~8.0 μ g/ml and the detective limit in serum was 200 ng/ml using ultraviolet detection at 280 nm. The proposed method was simple and accurate, and the recoveries were 99.18%~103.6% with the within-day RSD from 3.4%~3.7% and the between-day RSD from 4.4%~4.9%.

Key words diclofenac; pharmaceutical analysis; HPLC