

毛细管电泳法测定吡罗昔康的含量

江银枝, 张 丽, 周利强
(浙江理工大学化学系, 杭州 310018)

摘 要: 建立高效毛细电泳法来测定吡罗昔康含量。采用毛细管电泳仪进行实验:弹性石英毛细管柱 $75\ \mu\text{m}\times 60\ \text{cm}$, 进样压力 $100\ \text{mPa}$, 电动进样 $5\ \text{s}$, 分离电压 $24\ \text{kV}$, 毛细管温度 $20\ ^\circ\text{C}$, 检测波长为 $254\ \text{nm}$, 运行缓冲液为 $0.01\ \text{mol/L}$ 硼砂溶液。采用 t 法和 F 法进行与 HPLC 法的显著性检验。吡罗昔康样品的线性范围: $1.0\times 10^{-6}\sim 1.0\times 10^{-2}\ \text{mol/L}$, 回收率: 98.66% , $\text{RSD}=2.1\%$, 与 HPLC 法无显著性差异。实验表明毛细管电泳法分离效率高、分析速度快、样品和试剂用量少。

关键词: 吡罗昔康; 毛细管电泳法; 含量测定

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A

0 引言

20 世纪 80 年代毛细管电泳法得到迅速发展^[1], 目前广泛应用于生化医药等领域^[2], 特别是在药物分析和分离方面的应用有着广阔的前景^[3]。

吡罗昔康是一种非甾体抗炎药物, 主要用于缓解各种关节炎及软组织病变的疼痛和肿胀的对症治疗。目前测定吡罗昔康含量的方法有: 无水滴定法^[4]、紫外分光光度法^[5]、HPLC 法^[6]、荧光分光光度法^[7]以及流动注射化学发光抑制法^[8]。目前中国药典^[5]选用的方法为紫外分光和无水滴定。紫外分光光度法受溶剂、辅料的影响较大; 无水滴定法使用大量有机溶剂、用样量大、慢且杂质干扰测定; 流动注射化学发光抑制法和荧光分光光度法线性范围低 ($0.1\sim 2.0\ \mu\text{g/mL}$)、稳定性较差; 而反相 HPLC 综合效果较好, 但也需要有机溶剂, 对环境有一定的污染。本文采用毛细管电泳仪, 来建立一种测定吡罗昔康含量的高效毛细电泳方法。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

仪器: CAPEL 105M 型, LUMEX 公司生产(毛

细管: 长 $600\ \text{mm}$, 内径 $0.075\ \text{mm}$; 电压: 正极高电压; 酸度计; HPLC, 岛津公司生产(泵: LC-20AT; 检测器: SPD-M20A; 柱: Inertsil ODS-SP C18 $5\ \mu\text{m}\ 4.6\ \text{mm}\times 250\ \text{mm}$; 保温箱: CTO-10AS VP; 自动进样器: SIL-20A)。

试剂: 硼砂(配置成 $10\ \text{mmol/L}$ 的缓冲溶液); 超纯水; $0.1\ \text{M}$ 氢氧化钠; 吡罗昔康标准(用缓冲溶液配成 $1.00\times 10^{-2}\ \text{mol/L}$ 的溶液, 用前稀释)。

样品: 合成粗产品(准确称取粗产品 $0.1154\ \text{g}$, 用缓冲溶解定容为 $100.00\ \text{mL}$)。

1.2 实验方法

毛细管电泳条件: 测定波长 $220\ \text{nm}$; 进样压力 $100\ \text{mPa}$; 分析电压 $24\ \text{kV}$; 分析温度 $20\ ^\circ\text{C}$; 分析时间为 $400\ \text{s}$; 运行缓冲溶液, $10\ \text{mmol/L}$ $\text{pH}=9.28$; 每次进样前用去离子水、缓冲溶液冲洗毛细管各 $5\ \text{min}$ 。

HPLC 条件: 进样量 $20\ \mu\text{L}$; 流速 $0.80\ \text{mL/min}$; 柱温 $30\ ^\circ\text{C}$; 检测波长 $\lambda=254\ \text{nm}$ 。

1.2.1 进样时间的选择

改变进样时间进行拖尾因子和峰面积的测定, 确定最佳进样时间。

收稿日期: 2012-11-28

基金项目: 化学工程与技术浙江省重中之重(一级)学科的资助项目(11110032241103)

作者简介: 江银枝(1973-), 女, 湖北鄂州人, 副教授, 博士, 主要从事有机化学、药物化学的研究。

1.2.2 CE方法的建立、评价与样品的测定

在固定最佳进样时间的前提下,对方法的定性限、定量限进行了测定。进而进行了线性区间的测定,进行了工作曲线的制作。

利用标准回收法进行了准确度、精密度的测定。

对合成粗品进行分离测定。利用柱色谱分离回收率进行验证。

1.2.3 CE法与HPLC法之间的显著性评价

采用 t 法和 F 法进行两种方法之间显著性评价,置信度水平位95%。

2 结果与讨论

2.1 进样时间的选择

配置 7.00×10^{-3} mol/L的吡罗昔康标准,改变进样时间为5、7、9、11 s进行实验,查看谱图峰型和峰面积,实验结果列于表1。

表1 不同时间条件下峰面积与峰不对称性

进样时间/s	5	7	9	11
峰面积	2 389	3 380	4 430	5 758
拖尾因子	1.01	1.2	1.4	1.5

从表1的数据发现,进样时间改变,峰面积增加,说明灵敏度增加;但是峰的拖尾因子增加,说明分离度下降,峰的纯度下降,根据药典等标准要求 $0.95 \leq t \leq 1.05$,于是选择进样时间为5 s进行试验。

2.2 方法建立与方法评价

固定进样时间5 s,测定了定性限 6.50×10^{-7} mol/L($S/N=3$),定量限 1.00×10^{-6} mol/L($S/N=10$);进行了线性考查,结果见图1。

从图1发现在 $1.00 \times 10^{-6} \sim 1.00 \times 10^{-2}$ mol/L之间积分面积与浓度线性良好, $y = 331\,902x + 14.082$, $R^2 = 0.999$ 。

为此,笔者选择 1.00×10^{-4} mol/L的标准,重复毛细电泳实验5次,进行加标回收率的测定,平均回收率分别为:98.66%,标准偏差 S 为 2.1×10^{-6} ,相对标准偏差 RSD 为2.1%。说明方法准确、重现性好。

对合成的吡罗昔康初产品进行分析,得到图2下色谱图。

图2显示吡罗昔康与杂质有效分离,通过工作曲线计算粗产品的回收率为64.55%。粗产品采用柱色谱分离纯化回收率为64.3%,与实验分析结果相符,说明方法是准确的。

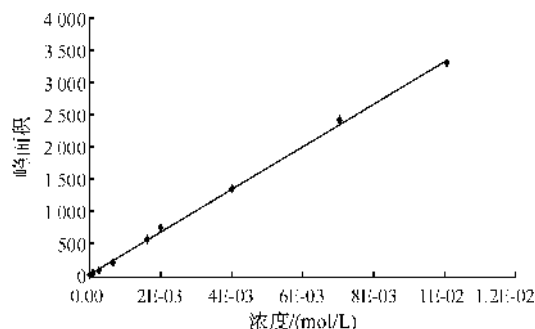


图1 积分面积与浓度关系曲线图
($1.00 \times 10^{-6} \sim 1.00 \times 10^{-2}$ mol/L)

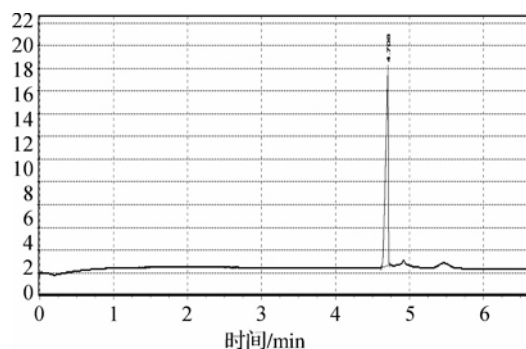


图2 粗产品的CE色谱图

2.3 CE与HPLC之间的显著性检验

为了进一步说明方法的可行性,利用文献方法对该方法进行了显著性评价,选择文献报道的HPLC法,利用HPLC法对吡罗昔康粗产品进行了含量分析(图3),粗产品含量为64.72%。选择 1.00×10^{-4} mol/L的标准,重复HPLC实验5次,进行了加标回收率、 S 和 RSD 的测定,分别为99.80%、 1.2×10^{-6} 、1.2%。

利用统计处理的 F 判断和 T 判断进行CE法与HPLC法的显著性评价,置信度为95%。首先进行 F 判断:

$$F_{\text{计算}} = \frac{S_{\text{大}}^2}{S_{\text{小}}^2} = 3.06, \text{按 } 95\% \text{ 置信度查表 } F_{\text{表}} = 6.39.$$

所以 $F_{\text{计算}} < F_{\text{表}}$,说明CE法和HPLC法精密度不存在显著性差异。

进一步进行 T 判断:

$$t_{\text{计算}} = \frac{|0.9866 \times 10^{-4} - 0.9980 \times 10^{-4}|}{S} \times \sqrt{n}$$

$$S = \sqrt{\frac{(5-1) \times (2.1 \times 10^{-6})^2 + (5-1) \times (1.2 \times 10^{-6})^2}{5+5-2}}$$

$$= 1.7 \times 10^{-6}, n = \frac{5 \times 5}{5+5} = 2.5.$$

所以 $t_{\text{计算}} = 1.21$,按95%置信度查表 $t_{\text{表}} = 2.31$ 。

所以 $t_{\text{计算}} < t_{\text{表}}$,说明CE法和HPLC法平均值不存在显著性差异。说明CE法与HPLC法的不存在显

著性差异,说明两种方法是等效的。

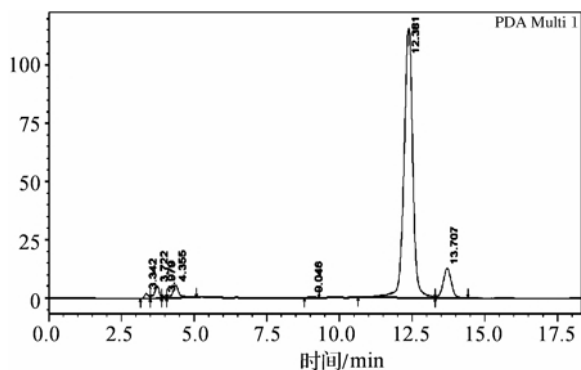


图3 初产品的HPLC色谱图

注: ODS-SP C18 $5\ \mu\text{m}$ $4.6\ \text{mm} \times 250\ \text{mm}$ 进样量: $20\ \mu\text{L}$; 流速: $0.80\ \text{mL/min}$; 柱温: 30°C ; 检测波长: $\lambda = 254\ \text{nm}$, $V_{\text{甲醇}} : V_{\text{水}} : V_{\text{三氟乙酸}} = 60 : 40 : 0.1$

3 结论

利用毛细电泳仪建立了吡罗昔康的含量测定的CE法: 弹性石英毛细管柱 $75\ \mu\text{m} \times 60\ \text{cm}$, 进样压力 $100\ \text{mPa}$, 电动进样 $5\ \text{s}$, 分离电压 $24\ \text{kV}$, 毛细管温度 20°C , 检测波长为 $254\ \text{nm}$, 运行缓冲液为 $0.01\ \text{mol/L}$ 硼砂溶液, 线性范围: $1.0 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-2}\ \text{mol/L}$, 回收率: 98.66% , $RSD = 2.1\%$ 。通过统计处

理与文献 HPLC 方法进行了显著性差异分析, 通过 F 判断和 t 判断发现 CE 法和 HPLC 法之间不存在显著性差异。说明 CE 法准确且重现性好, 环保高效。

参考文献:

- [1] Jorgenson J W, Lukacs K D. Application of capillary electrophoresis[J]. Anal, Chem, 1981, 53(4): 1298.
- [2] Kevin A. Analysis of metal ions by capillary electrophoresis[J]. LC-GC Europe, 2010, 11(2): 543-545.
- [3] 楚国栋, 胡显智. 毛细管电泳及在金属阳离子分析中的应用[J]. 现代矿业, 2009, 2(2): 126-129.
- [4] 余之杰. 吡罗昔康及其片剂含量的紫外分光光度测定法[J]. 药学通报, 1987, 22(3): 136-137.
- [5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 第2部[M]. 北京: 化学工业出版社, 1995: 280.
- [6] 黄丽萍, 刘忠, 陈冠容. HPLC测定吡罗昔康凝胶中吡罗昔康的含量[J]. 药物分析杂志, 1999, 19(1): 48-49.
- [7] 郝巧艳, 张远馥, 王金中. 吡罗昔康的荧光分光光度法测定[J]. 宝鸡文理学院学报, 2007, 27(4): 291-294.
- [8] 王金中, 刘波, 周艳梅. 流动注射化学发光抑制法测定吡罗昔康[J]. 分析测试学报, 2005, 24(5): 110-112.

Determination of Piroxicam Content with Capillary Electrophoresis

JIANG Yin-zhi, ZHANG Li, ZHOU Li-qiang

(Department of Chemistry, Zhejiang Sci-Tech University, Hongzhou 310018, China)

Abstract: To establish high-efficiency capillary electrophoresis to determine the content of piroxicam. Capillary electrophoresis apparatus is used for experiment; elastic quartz capillary vessel column $75\ \mu\text{m} \times 60\ \text{cm}$, injection pressure $10\ \text{mbar}$, electrokinetic injection $5\ \text{s}$, separation voltage $24\ \text{kV}$, capillary temperature 20°C , measurement wavelength $254\ \text{nm}$ and running buffer solution $0.01\ \text{mol/L}$ borax solution. t method and F method are used to conduct the test of significance with HPLC method. The test results show that: Linear range of piroxicam sample: $1.0 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-2}\ \text{mol/L}$, recovery rate: 98.66% , $RSD = 2.1\%$. No significant difference from HPLC method. The experiment shows that capillary electrophoresis has a high separation efficiency, fast analysis speed and low dose of sample and reagent.

Key words: piroxicam; capillary electrophoresis; content determination

(责任编辑: 许惠儿)