

毛细管电泳法测定血清中的双氯芬酸钠^{*}

林伟丰¹, 康信煌¹, 陈缙光², 李全文², 杨琳¹, 蔡沛祥¹

(1. 中山大学化学与化学工程学院, 广东 广州510275;

2. 中山大学药学院, 广东 广州510089)

摘要:建立了血清中双氯芬酸钠毛细管电泳高频电导分析法。对电泳介质的种类、浓度以及操作电压和进样量等影响因素进行了优化。实验采用5 mmol/L 乳酸-NaOH (pH 3.8) 为缓冲溶液, 分离电压为22.0 kV, 可在7 min内实现对双氯芬酸钠的分离检测。在最佳实验条件下, 双氯芬酸钠的线性范围为1.5~220 $\mu\text{g/mL}$, 检出限为0.5 $\mu\text{g/mL}$, 回收率为92.0%~108%。

关键词:毛细管电泳; 高频电导检测; 非接触式电导检测; 双氯芬酸钠; 血清; 体液

中图分类号: O657.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2005) 06-0058-03

双氯芬酸钠是一种强效消炎镇痛药, 具有抗风湿、镇痛、消炎和退热的效用, 是目前治疗各种风湿关节炎、缓解轻中度疼痛的主要用药^[1]。但是, 当用药过量时, 也会出现肝肾功能损害等症^[2]。建立对血液中双氯芬酸钠含量快速简便的检测方法, 有着重要的意义。双氯芬酸钠含量测定主要有分光光度法^[3,4]、示差导数光谱法^[5]、高效液相色谱法^[6-8]和伏安法^[9]等。分光光度法操作简便但准确度不高; HPLC法准确度较好, 但是仪器设备昂贵、试剂成本高、操作繁琐、分析时间长。近年来, 毛细管电泳(CE)技术得到迅猛的发展, 它具有高效、快速、灵敏、低耗等优点。在前期工作中, 我们建立了CE对双氯芬酸钠药剂中的双氯芬酸钠的检测方法^[10], 但目前尚未见CE测定血清中双氯芬酸钠的文献报道。本文建立了对双氯芬酸钠的毛细管电泳高频电导检测法, 并用于血清中双氯芬酸钠的测定。所采用的高频电导法即非接触式电导检测法^[11], 避免了检测电极与待测溶液接触, 有效地消除了分离电场对检测的干扰和电极中毒等问题, 电极寿命长, 仪器成本低, 检测灵敏度较高, 使用非常方便。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

高压电源(自制^[12]), 高频电导检测器(自制^[11]), 如前报导。石英毛细管(150 μm i.d., 河北永年锐洋色谱器件有限公司)。数据工作站, 本

实验室研制。信号采集使用台湾EVOC出品的PCL-711B型A/D卡; 数据记录与处理在普通P4微机上完成; 超声波提取器(昆山市超声仪器有限公司)。

双氯芬酸钠对照品(中国药品生物制品检定所), 三(羟甲基)氨基甲烷(Tris, GR香港分装), 其他试剂均为分析纯, 所用水为二次重蒸水, 新鲜血清(中山大学附属二院提供)。

1.2 对照品溶液的制备和样品的提取

称取双氯芬酸钠对照品0.0100 g, 加无水甲醇溶解后定容于10.0 mL棕色容量瓶中, 得浓度为1.00 mg/mL的对照品溶液。

吸取正常人血清0.50 mL, 加入一定量双氯芬酸钠标准品, 用3×2.0 mL乙醚提取, 分液, 减压蒸干有机相。用乙醇稀释至1.00 mL, 为待测血清样品。

1.3 实验方法

毛细管柱在使用前, 先用0.1 mol/L NaOH和H₂O各冲洗10 min, 再用运行缓冲溶液冲洗20 min。以后每次进样前用运行缓冲溶液冲洗2 min, 以提高分析结果的重现性。

采用位差方式进样, 分离电压为22.0 kV, 进样时间为20.0 s, 进样高度为23.0 cm。高频电导检测器的输出信号经数据工作站采集到微机中进行实时数据处理、图形显示和数据文件存储。实验在恒温(25℃)、恒湿(相对湿度60%)的条件下进行。

* 收稿日期: 2005-04-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20375049); 广东省自然科学基金重点资助项目(021808)

作者简介: 林伟丰(1981年生), 男, 硕士研究生; 通讯联系人: 陈缙光; E-mail: chenzg@gzsums.edu.cn

2 结果与讨论

2.1 实验条件优化

双氯芬酸钠难溶于水，易溶于醇类。比较了用甲醇和乙醇作溶剂的提取效果，发现甲醇提取时，出峰较快，且峰形较好，故选择用甲醇做溶剂。

缓冲溶液的选择是毛细管电泳实现分离检测的重要因素。比较了一系列缓冲体系。在 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - \text{NaH}_2\text{PO}_4$ 、 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 - \text{H}_3\text{PO}_4$ 、 $\text{NaAc} - \text{HAc}$ 体系中，双氯芬酸钠不出峰；醋酸、草酸、三乙胺 - H_3BO_3 、 $\text{Tris} - \text{H}_3\text{BO}_3$ 体系中，双氯芬酸钠出峰较慢，灵敏度低，峰拖尾严重。乳酸 - NaOH 体系电泳电流较小，具有较高的稳定性而且对样品组分有很好的分离检测效果，双氯芬酸钠出峰快，峰形好。实验选择乳酸作为分离缓冲体系。比较了不同浓度的乳酸体系对分离的影响。结果发现，缓冲液浓度的加大，分离度变大，灵敏度降低，出峰延迟。优化的缓冲液浓度为 5 mmol/L 乳酸体系。考察了溶液 pH 值对分离的影响，发现当 pH 为 3.8 时分离效果最好。其原因可能是该 pH 值下，乳酸与双氯芬酸钠分子中的仲氨基结合，使整个分子带上正电荷，有利于双氯芬酸钠的电泳分离。实验用 NaOH 溶液调节乳酸溶液 pH 3.8。

此外，对分离电压、毛细管内径、毛细管有效长度和进样时间等实验参数进行了优化。实验选择的最佳条件为：分离介质为 5 mmol/L 乳酸， pH 3.8，分离电压 22.0 kV ， 23.0 cm 位差虹吸进样 20.0 s ，毛细管总长 65.0 cm ，有效长度 55.0 cm 。在优化条件下，双氯芬酸钠对照品的毛细管电泳图见图 1。

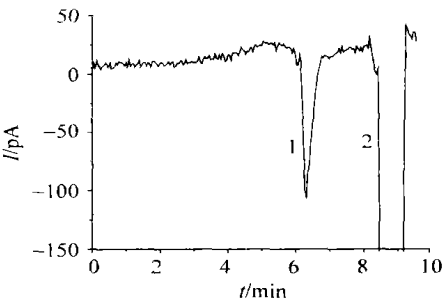


图 1 双氯芬酸钠的毛细管电泳色谱图
Fig 1 Electropherogram of diclofenac sodium
1: 双氯芬酸钠; 2: 甲醇

2.2 分析方法及其有效性评价

将已进行样品前处理的双氯芬酸钠血清，在选定实验条件下测定，所得毛细管电泳谱见图 2。在优化条件下，测得在血清体系中双氯芬酸钠的线性

方程为 $Y = 42.9 + 1.16X$ (峰高为 Y ，浓度为 X ， $\mu\text{g/mL}$)， $r = 0.998$ ，线性范围为 $1.5 \sim 220 \mu\text{g/mL}$ ，检出限为 $0.5 \mu\text{g/mL}$ ， $RSD = 2.3\%$ ($n = 6$)。

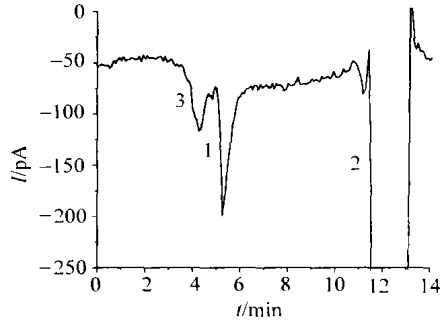


图 2 血清中的双氯芬酸钠毛细管电泳色谱图
Fig 2 Electropherogram of diclofenac sodium in blood serum
1: 双氯芬酸钠; 2: 甲醇; 3: 未知物

为考察本法的可靠性，进行了回收率实验。分别配制不同浓度的双氯芬酸钠样品血清溶液，并将对照品溶液与样品溶液按不同比例混合，对其进行样品前处理，测得标准加入回收率如表 1 所示。

表 1 样品回收率测定结果 ($n = 6$)
Tab 1 Determination results in sample

$\rho / (\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$			回收率 %	RSD %
本底值	加标量	检出量		
40.0	20.0	61.2	106	2.2
80.0	20.0	98.4	92.0	2.0
120.0	20.0	142	108	2.3

对体液中双氯芬酸钠测定，本方法依然保持良好的线性关系、重现性和回收率，但检出限有所增高，原因可能是在样品处理时受溶剂提取方法影响。

3 结 论

本文所建立的方法适用于对血清样品中双氯芬酸钠的测定。在血清体系中，双氯芬酸钠的出峰时间稍有差别，原因可能是血清样品中其他成分对电泳过程有所影响，但仍能达到基线分离，不影响定量检测。肌肉注射 75 mg 该药后，双氯芬酸钠在血液中的峰值浓度为 $2.73 \mu\text{g/mL}$ ^[13]，本法的检出限远低于此值，故本法能满足临床检验要求。

参考文献:

[1] 龙盘. 临床药物手册[M]. 北京: 金盾出版社, 1992: 390.
[2] 罗明生, 高天惠, 劳家华, 等. 现代临床药物大典[M]. 成都: 四川科学出版社, 2000: 254.
[3] 王巨存, 邢国胜, 朱铁梁. 紫外分光光度法测定双氯芬

酸钠肠溶缓释胶囊的含量[J]. 天津医科大学学报, 2002, 8(2): 162.

[4] 安哲, 朱玲, 王学斌. 亚甲基蓝分光光度法测定双氯芬酸钠[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2002, 36(5): 396.

[5] 徐楚鸿, 张冬泉, 王虎. 一阶导数分光光度法测定双氯芬酸钠栓的含量[J]. 医药导报, 2001, 20(9): 587.

[6] 陆步实, 徐斌, 周卫. 高效液相色谱法同时测定双氯芬酸钠和利多卡因的含量[J]. 中国医院药学杂志, 2003, 23(3): 147.

[7] 杨光, 詹学锋, 沈明昭. 高效液相色谱法测定双氯芬酸钠栓含量的研究[J]. 医药导报, 2001, 20(11): 708.

[8] 姜雯, 白凤清, 孙德伟. 高效液相色谱法测定复方庆大霉素滴眼液中双氯芬酸钠的含量及有关物质[J]. 中国药事, 2003, 17(9): 582.

[9] 杨运发, 师宏新. 双氯芬酸钠在 GCE 上的脉冲伏安测定[J]. 分析试验室, 1995, 14(4): 5.

[10] 林伟丰, 翟海云, 陈缙光. 毛细管电泳测定双氯芬酸钠制剂中的双氯芬酸钠[J]. 分析试验室, 2005, 24(9): 30.

[11] 陈缙光, 莫金垣. 毛细管电泳高频电导检测器的研制[J]. 高等学校化学学报, 2002, 23(5): 801.

[12] CHEN Z G, MO J Y, YANG X Y, et al. A new capillary electrophoresis apparatus with piezoelectric ceramics high voltage source and amperometric detector[J]. Chin Chem Lett, 1999, 10(3): 231.

[13] 张石革, 孙定人. 新药临床药理与应用手册[M]. 第 2 版. 北京: 化学工业出版社, 2001: 96.

Determination of Diclofenac Sodium in Blood Serum by Capillary Electrophoresis

LIN Wei feng¹, KANG Xin huang¹, CHEN Zuan guang², LI Quan wen², YANG Lin¹, CAI Pei xiang¹
(1.School of Chemistry and Chemical Engineering, Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China;
2 School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat sen University, Guangzhou 510089, China)

Abstract: A method based on capillary electrophoresis with high frequency conductivity detection was developed for determination of diclofenac sodium in blood serum. Major factors for separation and determination were studied and the optimal analysis conditions were obtained. In the buffer of 5 mmol/L lactic acid NaOH (pH 3. 8) and separation potential of 22. 0 kV, complete separation of diclofenac sodium was achieved. Under the chosen conditions, Diclofenac sodium was eluted within 7 min, the linear range of diclofenac sodium was $1. 5 \times 10^2 \sim 2. 2 \times 10^2 \mu\text{g/mL}$, the limit of detection reached $0. 5 \mu\text{g/mL}$. The method was used for the analysis of diclofenac sodium satisfactorily with a recovery of 92. 0% ~ 108%.

Key words: capillary electrophoresis; high frequency conductivity detection; contactless conductivity detection; diclofenac sodium; blood serum; body fluid