

体液中吡罗昔康的高压液相测定法¹

蒋新国、戈顺娣、王孝俊、奚念朱 (上海医科大学生物药剂学研究室, 上海 200032, 中国)

A HPLC method for determining piroxicam in body fluids

JIANG Xin-Guo, GE Shun-Di, WANG Xiao-Jun, XI Nian-Zhu

(Division of Biopharmaceutics, Shanghai Medical University, Shanghai 200032, China)

ABSTRACT Minimal detectable concentration of serum piroxicam by using HPLC reported in literature was mostly around $50 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ serum. Though the sensitivity was enough for pharmacokinetics study, it could not meet the needs of drug formulation screen study in developing precision drug delivery system (DDS) such as transdermal delivery system. A new HPLC method providing a detection limit of 0.75 ng , sensitive enough to quantify low concentrations of serum piroxicam down to $5 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ was reported in this paper. A Waters Model 481 instrument was used throughout the experiment. Isoxicam was proved to be the most suitable internal standard at maximum absorption wave length of 360 nm . A mixture of methanol and ammonium acetate $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (1 : 0.9 vol · vol⁻¹) was selected as mobile phase with a flow rate of $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$. 0.025% tetramethyl ethylene diamine was added to ammonium acetate solution and adjusted to pH 4.5 with citric acid before mixing. Calibration curve was linear ($r = 0.9999$) in the concentration range of $10 - 5000 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$. The within-day and day-to-day precisions (CV) of this method were 2.88% and 2.89% respectively, with average recoveries of 96.0-102.4% ($10 - 5000 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$). No interference was found in the body fluids of subjects who took piroxicam concomitantly with other commonly used non-steroidal anti-inflammatory medicines such as indomethacin, ibuprofen, naproxen, phenylbutazone and acetylsalicylic acid.

KEY WORDS piroxicam; high pressure liquid chromatography; pharmacokinetics

提要 伊索昔康为内标, 酸化血样乙醚提取. YWG-C₁₈ 为固定相, 流动相为 1 : 0.9 (vol · vol⁻¹) 的甲醇-醋酸铵溶液 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (加四甲基乙二胺 0.025%, 柠檬酸调 pH 至 4.5), uv 360 nm 检测. 最低检测浓度 $5 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$, 仅文献报道浓度的 1/10. 可用于体液中低浓度吡罗昔康的检测和药动学研究以及多种给药系统的处方筛选研究.

关键词 吡罗昔康; 高压液相色谱法; 药物动力学

HPLC 法测定吡罗昔康 (piroxicam, Pir) 的血药浓度, 国内外报道的最低检测浓度均为 $50-500 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ (1-5). 在开展多种给药系统的新剂型研究中, 上述方法的灵敏度尚嫌不足. 为此我们建立了一个检测限为 0.75 ng 的新方法, 血清中其最低检测浓度为 $5 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$.

MATERIALS

Waters 481 系列 HPLC 仪, 岛津 uv 250 型分光光度仪. Pir 样品, mp $198-201^\circ\text{C}$, 含量 > 99% (上海第六制药厂, 840101); 伊索昔康 (isoxicam, Iso) 样品, 含量 > 99% (重庆医药工业研究所, 870516). 健康人空白血清 (上海市中心血站). 甲醇为色谱纯, 乙醚、醋酸铵、柠檬酸、四甲基乙二胺、盐酸均为 AR 级.

METHODS AND RESULTS

血药浓度测定方法

1 色谱条件 色谱柱: $150 \times 5 \text{ mm}$ 不锈钢柱, 内填 YWG-C₁₈ 化学键合相 ($10 \mu\text{m}$, 天津试剂二厂). 流动相: 1 : 0.9 (vol · vol⁻¹) 的甲醇-醋酸铵溶液 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (内加四甲基乙二胺 0.025% 并用柠檬酸调节至 pH 4.5).

Received 1990 May 5

Accepted 1991 Mar 23

¹ Project supported by the Science Fund for Doctoral Program from State Education Commission. No 8915

流速 $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$, 纸速 $0.5 \text{ cm} \cdot \text{min}^{-1}$, 检测波长先用岛津 uv 250 型分光光度仪扫描定为 360 nm , 检测器灵敏度 0.02 AUFS , 数据处理仪衰减 16, 环境温度 $20\text{--}25^\circ\text{C}$, 内标为 Iso.

2 标准溶液及内标溶液的配制 配制 Pir $0.5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 甲醇溶液为标准溶液, Iso $0.06 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ 甲醇溶液为内标溶液. 冰箱保存, 用时稀释至所需浓度.

3 内标的选择 HPLC 法定量中内标的选择至关重要. 从提高检测灵敏度这一目的出发, 我们对多个化合物进行了比较. 其中非那西丁、噻吗心安在一定的流动相条件下虽能与 Pir 分离, 但是在 Pir 最大吸收峰 (360 nm) 处, 它们的吸收值甚小. 而 Iso 的分子结构与 Pir 极为相似, 两者的 uv 最大吸收峰相近 (Fig 1), 且绝对回收率都超过 90%, 选作内标可提高分析方法的灵敏度和精密密度.

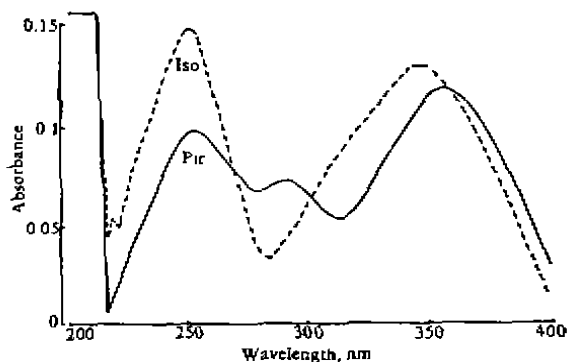


Fig 1. Absorption spectra of piroxicam (Pir) and isoxicam (Iso) in mobile phase.

4 流动相的选择 通过改变流动相的醇、水比例, 选用不同种类的缓冲盐及流动相的 pH, 以选择最佳条件, 保证 360 nm 处 Pir 峰与 Iso 峰的良好分离. 结果表明: 流动相的 pH 对两者的分离影响最大, pH 4.5 时两者完全分离 (Fig 2). 此外, 醋酸铵、柠檬酸、四甲基乙二胺对 Pir 及 Iso 的峰形和分离度均有较好影响, 由此确定了流动相条件. 该条件下 Pir 的保留时间 $T_R = 6.9 \text{ min}$, Iso 的

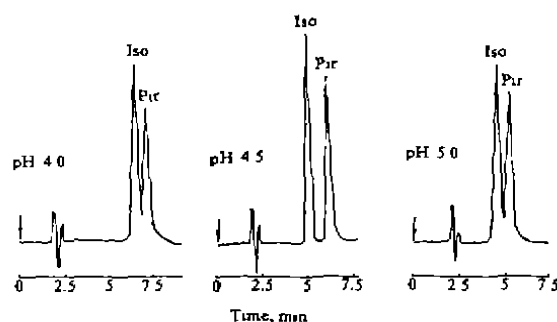


Fig 2. Effects of pH values of mobile phase on isolation of piroxicam and isoxicam.

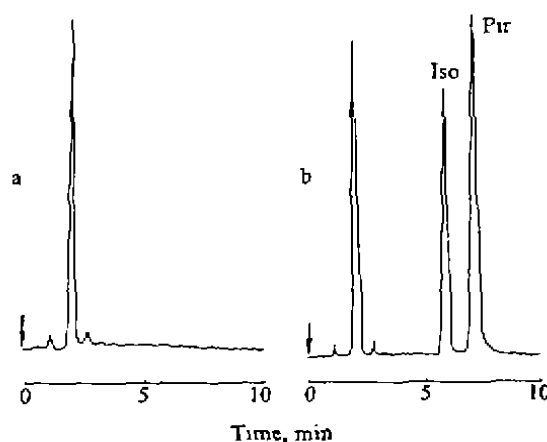


Fig 3. Chromatograms of human serum. a) blank serum; b) serum spiked with piroxicam and internal standard isoxicam.

$T_R = 5.7 \text{ min}$ (Fig 3).

5 血清中药物的提取 参考文献⁽¹⁾方法, 稍加修改, 方法如下: 取志愿者(或动物)血清 1 ml , 加入 Iso $0.30 \mu\text{g}$ 为内标, 用 0.1 ml $\text{HCl } 1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 酸化, 摇匀, 加乙醚 7 ml , 在旋涡混合器上振摇 2 min , 离心 3 min ($1600 \times g$). 取醚层于尖底试管, 45°C 水浴中通 N_2 吹干, 残留物用 $100 \mu\text{l}$ 流动相溶解, 量取 $20 \mu\text{l}$ 进样. 经提取后, 血清中的杂质对 Pir 测定无干扰 (Fig 3), 并且 Pir 及 Iso 的绝对回收率都大于 90%.

检测限与最低检测浓度 根据信噪比 $S/N > 2$ 的规定, Pir 的检测限为 0.75 ng. 经提取后测得最低检测浓度为 $5 \text{ ng} \cdot \text{ml}^{-1}$ 血清.

线性范围 分别于 1 ml 空白血清中加入 Pir 0.01、0.02、0.05、0.10、0.20、0.50、1.00、2.00、5.00 μg , 各加内标 0.30 μg , 按上述方法提取后色谱测定. 每一浓度配制三份样品, 每份样品进样二次, 取其平均值. 以 Pir 浓度(X轴)对 Pir 与 Iso 的峰高比(Y轴)进行线性回归, 线性范围为 0.01–5.00 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 血清($r = 0.9999$), 回归方程为 $\hat{Y} = 0.007 + 3.315X$.

精密度试验 天内精密度: 分别于 1 ml 空白血清中加入一定量的 Pir, 各加内标 0.30 μg , 天内提取测定. 日间精密度: 方法同上, 连续测定 5 d, 结果可见 Tab 1.

Tab 1. Precision of the method. $n = 5$. $\bar{x} \pm \text{SD}$.

Treatment	Theoretical ($\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$)	Experimental ($\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$)	CV (%)
Within-day	50	49.3 ± 1.2	2.43
	200	199 ± 5	2.51
	1 000	982 ± 43	4.38
	3 000	$2 955 \pm 71$	2.40
Day-to-day	50	49.9 ± 1.9	3.81
	200	197 ± 5	2.54
	1 000	987 ± 20	2.03
	3 000	$2 910 \pm 86$	2.96

回收率测定

1 绝对回收率 Pir 绝对回收率测定: 分别于 1 ml 空白血清中加入 Pir 0.05、3.00 μg , 经提取后残留物中加入内标 0.30 μg , 用流动相溶解后色谱测定, 与不经提取 Pir 样品比较, 求得 Pir 的绝对回收率为 $93.2 \pm 1.8\%$, $n = 4$.

Iso 绝对回收率的测定: 于 1 ml 空白血清中加入 Iso 0.30 μg , 经提取后残留物中加入 Pir 0.30 μg 作内标, 用流动相溶解后色谱测

定, 与不经提取的 Iso 样品比较, 求得 Iso 的绝对回收率为 92%, $n = 2$.

2 方法回收率 分别于 1 ml 空白血清中加入不同量的 Pir 及内标 0.30 μg , 经提取后色谱测定, 结果见 Tab 2.

Tab 2. Recovery by the method. $n = 5$. $\bar{x} \pm \text{SD}$.

Piroxicam ($\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$)	Determined ($\text{ng} \cdot \text{ml}^{-1}$)	Recovery (%)
10	9.6 ± 1.0	96.0
50	51.2 ± 1.7	102.4
200	198 ± 6	99.0
1 000	998 ± 20	99.8
3 000	$2 973 \pm 21$	99.1
5 000	$4 957 \pm 74$	99.1

干扰试验 将临床上常用的几种非甾体抗炎药如吲哚美辛、布洛芬、萘普生、保泰松、乙酰水杨酸分别与 Pir 合并给药, 经 2 h 后采血, 按上述方法进行色谱分析, 结果表明这些药物对 Pir 的测定均无干扰(未发表资料).

APPLICATIONS OF METHOD

本方法灵敏度较高, 能测定体内外低浓度的 Pir, 故可用于精密给药系统的处方筛选及体内药物动力学研究.

精密给药系统体外筛选测定 用于测定 Pir 透膜给药系统(如透皮吸收制剂)的量及浓度. 将生物膜夹于扩散双池间, 每隔一定时间从接受池中取样直接作 HPLC 分析, 测定透过生物膜的 Pir 量(Tab 3). 这种测定可明显地分辨出处方组成对药物透膜性的影响, 为处方筛选提供依据.

Tab 3. Concentrations of Pir ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) in reservoir following membrane transformation.

Prepn	10 h	12 h	14 h	16 h	18 h
A	30	38	43	53	59
B	73	95	122	154	174
C	1 017	1 450	1 945	2 443	2 943

体内药动学测定 测定一种 Pir 透膜制剂给药后的血药浓度, 结果见 Fig 4, 算得消除 $T_{1/2}$ 为 43 h, 与文献⁽⁶⁾相近, 本方法可检测出经 6-7 个 $T_{1/2}$ 的血药浓度, 而文献方法仅能测至 4 个 $T_{1/2}$.

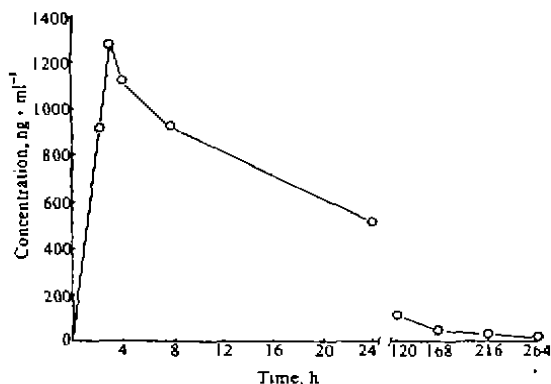


Fig 4. Serum concentrations of piroxicam membrane preparation (piroxicam 30 mg) after adhering to mucous membrane administration.

DISCUSSION

分析方法的灵敏度直接关系到应用. HPLC 法测定 Pir 血药浓度的报道较多, 其中有些以 uv 254 nm 为检测波长, 由于测定不在最大吸收峰处进行, 因此检测灵敏度不够理想. 本文针对波长问题, 决定选用 Pir 最大吸收峰 360 nm 为检测波长. 然后广泛筛选适宜的内标, 最后选用最大吸收峰相近的 Iso 为内标, 这样, 使检测灵敏度得以提高. 另外, 醋酸铵在流动相中的浓度也影响 Pir 的 uv 吸

收值, 当浓度从 0.01 mol · L⁻¹ 提高到 0.1 mol · L⁻¹ 时, Pir 的峰高值又可提高 36% 左右. 但浓度继续提高时可影响 Pir 与内标的分离度.

ACKNOWLEDGMENTS 重庆医药工业研究所赠予伊索昔康, 重庆西南制药三厂曾德惠高级工程师对本研究给予支持.

REFERENCES

- 1 Chen XL, Xi NZ, Ge SD, Sun SL. HPLC determination of piroxicam in human serum and its pharmacokinetic parameters. *Acta Pharm Sin* 1986; 21: 692
- 2 Lin L, Wu RJ, Dong SS, An DK. HPLC determination of piroxicam in plasma. *J Chin Pharm Univ* 1988; 19: 97
- 3 Twomey TM, Bartolucci SR, Hobbs DC. Analysis of piroxicam in plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr Biomed Appl* 1980; 183: 104
- 4 Richardson CJ, Ross SG, Blocka KL, Verbeeck RK. High-performance liquid chromatographic analysis of piroxicam and its major metabolite 5'-hydroxy-piroxicam in human plasma and urine. *J Chromatogr Biomed Appl* 1986; 382: 382
- 5 Boudinot FD, Ibrahim SS. High-performance liquid chromatographic assay for piroxicam in human plasma. *J Chromatogr Biomed Appl* 1988; 430: 424
- 6 Fourtillan JB, Dubourg D. Etude pharmacocinétique du piroxicam chez l'homme sain, après administration d'une dose unique égale à 20 mg par voie orale. *Thérapie* 1983; 38: 163