

## 在线扫集-胶束毛细管电动色谱法测定金感胶囊中的 绿原酸、脱水穿心莲内酯和马来酸氯苯那敏

吴美艳<sup>1</sup>, 李利军<sup>\*1</sup>, 胡大春<sup>1</sup>, 高文燕<sup>2</sup>, 李彦青<sup>1</sup>

(1. 广西工学院生物与化学工程系, 广西柳州 545006;

2. 广西大学化学化工学院, 广西南宁 530004)

**摘要:**建立了在线扫集-胶束毛细管电动色谱法(Sweeping-MEKC)测定金感胶囊中的绿原酸、脱水穿心莲内酯和马来酸氯苯那敏的新方法。考察了 pH 值、四硼酸钠浓度、硼酸浓度、十二烷基硫酸钠(SDS)浓度、电压、有机溶剂和进样时间对分离效果的影响。以 12 mmol/L 四硼酸钠-50 mmol/L 硼酸-50 mmol/L SDS 为缓冲溶液(含 10% 甲醇, pH=9.1), 进样时间 60 s, 分离电压 20 kV, 检测波长 220 nm, 采用未涂层熔融石英毛细管(55 cm×50 μm, 有效柱长 42 cm), 环境温度 25℃的条件下, 达到最佳的分离效果。结果表明, 方法富集能力强, 对绿原酸、脱水穿心莲内酯和马来酸氯苯那敏的富集倍数分别为 850、320 和 760 以上。在优化条件下, 3 种有机物均在 14 min 内出峰, 峰面积的相对标准偏差(RSD)均小于 4%。线性范围分别为 2.91~46.56 μg/mL、2.79~44.64 μg/mL 和 3.98~63.68 μg/mL; 回收率分别为 93%~103%, 96%~110% 和 97%~111%; 基于 3 倍信噪比(S/N=3)计算得到检出限分别为 142.92 和 106 μg/L。

**关键词:**胶束电动毛细管色谱; 扫集法; 绿原酸; 脱水穿心莲内酯; 马来酸氯苯那敏

中图分类号: O657.8 文献标识码: A

金感胶囊为中西结合的感冒药, 其主要成分为金银花、穿心莲、板蓝根、蒲公英、对乙酰氨基酚、盐酸金刚烷氨和马来酸氯苯那敏, 具有清热解毒, 疏风解表功效。金感胶囊成分复杂多样, 其中绿原酸为金银花的主要有效成分, 对本方的临床疗效具有重要的作用, 因此, 建立准确、可靠的金感胶囊成分的定量分析方法对控制产品质量、保证药物疗效具有重要的意义。

目前, 绿原酸的检测方法主要有高效液相色谱(HPLC)法<sup>[1]</sup>和高效毛细管电泳(HPCE)法<sup>[2]</sup>等。穿心莲中的脱水穿心莲内酯检测方法较多, 主要有高效液相色谱法<sup>[3]</sup>及毛细管电泳法<sup>[4]</sup>。马来酸氯苯那敏的检测方法已报道较多, 主要有高效液相色谱法<sup>[5]</sup>。目前, 尚没有看到绿原酸、脱水穿心莲内酯和马来酸氯苯那敏三种物质同时检测的报道。

与 HPLC 相比 CE 技术具有分离速度快、分离效率高、样品及试剂消耗少和毛细管柱寿命长、易清洗等优点, 近年来在中药有效成分分析中得到广泛应用。由于一般的毛细管内径较小, 进样体积小、检测光程短, 从而使得毛细管电泳的检测灵敏度较低。在线富集技术<sup>[6]</sup>操作简便, 是解决该问题的较好方法。常用的在线富集技术有等速电泳<sup>[7]</sup>, 样品堆积技术<sup>[8]</sup>, 扫集技术<sup>[9-10]</sup>。本实验采用在线扫集-胶束毛细管电动色谱法(Sweeping-MEKC), 可以同时分离阳离子、阴离子和中性物质, 利用带电胶束在电场的驱动下, 扫过样品区带, 捕集并富集样品, 随后通过电动色谱分离。在文献<sup>[2,11]</sup>基础上, 在缓冲溶液的选择上进行更深入的研究和探索, 同时在物质的组成上更加多样。用该方法分离和测定金感胶囊中绿原酸、脱水穿心

收稿日期: 2010-12-16 修回日期: 2011-03-14

基金项目: 广西自然科学基金(No. 0832062)

\* 通讯作者: 李利军, 男, 博士, 教授, 从事电化学分析研究。

莲内酯和马来酸氯苯那敏的含量,其灵敏度较高,准确,操作简单快速。这三种物质分别为阴离子物质、中性物质和阳离子物质,验证了该方法的可行性和优点。

## 1 实验部分

### 1.1 主要仪器、试剂与材料

ACS2000 型高效毛细管电泳仪(北京彩陆科学仪器有限公司),未涂层毛细管(55 cm×50 μm,有效长度 42 cm);UV-2102PC 型紫外-可见分光光度计(UNICO instruments Co., LTD);DL-60D 型超声波清洗器(上海之信仪器有限公司);EF20 型 pH 计(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司)。

绿原酸、脱水穿心莲内酯和马来酸氯苯那敏对照品(中国药品生物制品检定所);四硼酸钠,硼酸,甲醇,氢氧化钠,十二烷基硫酸钠(SDS),以上试剂均为分析纯。实验用水为二次蒸馏水。

金感胶囊购于广西柳州桂中大药房。

### 1.2 标准溶液及样品溶液的制备

准确称取适量绿原酸、脱水穿心莲内酯和马来酸氯苯那敏对照品,用甲醇溶解后,分别定容至 25 mL,分别配制成 388、372 和 796 mg/L 的对照品储备液,稀释待用。取金感胶囊样品三粒(0.45 克/粒)倾出粉末研细后,过 80 目筛,取 1.3077 g 用甲醇溶于 25 mL 试剂瓶中,过夜,超声萃取 60 min,过滤,定容至 25 mL,使用时稀释 10 倍。以上溶液均置冰箱 4℃ 保存。

### 1.3 实验条件

电泳条件:12 mmol/L 四硼酸钠-50 mmol/L 硼酸-50 mmol/L SDS 为缓冲溶液(10% 甲醇, pH = 9.1);检测波长为 220 nm;环境温度 25℃。

在线扫集-胶束毛细管电动色谱法:分离电压为 20 kV;重力进样;进样高度 16 cm;进样时间 60 s。

每天实验前毛细管柱依次用 1 mol/L NaOH 溶液、二次蒸馏水冲洗 15 min,实验 5 h 后更换缓冲液。实验结束后用二次蒸馏水冲洗。

## 2 结果与讨论

### 2.1 检测波长的选择

以缓冲溶液为参比液,在波长 200~400 nm 下,对 3 种物质的对照品溶液分别进行扫描,3 种物质在 220 nm 处均有较高的吸收峰,因此检测波长选取为 220 nm。

### 2.2 四硼酸钠与硼酸浓度及 pH 值的选择

考察了不同浓度四硼酸钠(8、12、16、20 和 24 mmol/L)对分离效果的影响。实验表明,四硼酸钠浓度越低,分离时间越短;四硼酸钠浓度越高,离子强度越大分离时间越长,且电流变大。因而用硼酸来控制离子强度,稳定电流,改善峰形。实验考察发现当硼酸浓度为 50 mmol/L 时,峰形最佳。同时,随着四硼酸钠浓度增加, pH 值也增大,当四硼酸钠浓度为 8 mmol/L 时,此时分离效果较差,色谱峰有拖尾;四硼酸钠浓度为 12 mmol/L 时, pH ≈ 9.1,此时分离效果较好,3 种物质峰均能较好地分开,出峰时间在 14 min 内。当四硼酸钠浓度再增大时,分离效果改善不大且出峰时间较长。综合考虑,确定四硼酸钠的最佳浓度为 12 mmol/L,硼酸的最佳浓度为 50 mmol/L。

### 2.3 有机溶剂的选择及浓度优化

考察了乙腈和甲醇两种溶剂对分离效果的影响。实验表明,以乙腈为溶剂时,脱水穿心莲内酯和马来酸氯苯那敏的分离效果差,故选择甲醇为溶剂。考察了甲醇的浓度为 8%、10%、12% 和 14%(V/V)时的分离度,当采用 10% 甲醇时,3 种物质的峰形、出峰时间和分离度均较理想,实验选用 10% 甲醇为溶剂。

### 2.4 SDS 浓度的优化

考察了不同浓度的 SDS(20、30、40、50 和 60 mmol/L)对分离和富集效果的影响,见图 1。结果表明,随着 SDS 浓度的增加,样品的迁移时间逐渐缩短,底峰宽变小,峰高在 50 mmol/L 时达到最高,但由于 SDS 浓度的增加,电流变大,产生的焦耳热增多,导致峰面积逐渐减小。综合考虑底峰宽、峰高、峰面积,出峰时间和分离效果,最后选择 50 mmol/L 的 SDS 为最佳浓度。

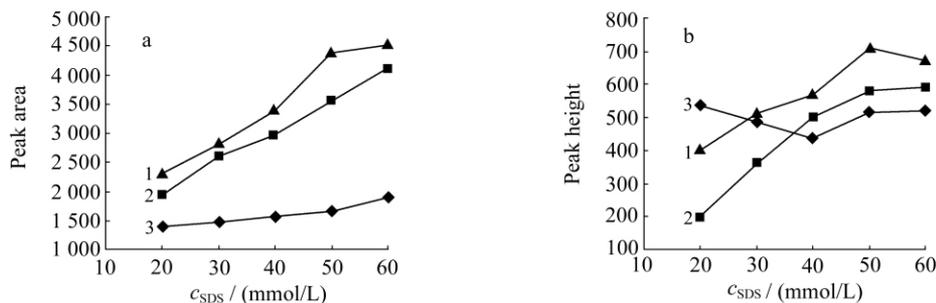


图 1 SDS 浓度对峰面积(a)和峰高(b)的影响  
 Fig. 1 Effect of SDS concentration on peak area (a) and peak height (b)  
 1. chlorphenamine maleate; 2. dehydroandrographolide; 3. chlorogenic acid.

### 2.5 分离电压的选择

考察了分离电压为 16~24 kV 时对分离效果的影响。实验表明,随着电压的增加,出峰时间缩短,但分离度下降。当电压为 20 kV 时,出峰时间和分离效果较理想,因此,分离电压选择为 20 kV。

### 2.6 进样时间对分离的影响

考察了进样时间为 40、60、80、100 和 120 s 时对峰面积的影响。实验表明,在 40~120 s 之间,3 种化合物的进样时间与峰面积呈线性关系。当进样时间为 60 s 时,样品峰理论塔板数最大,此时柱效最高。因此样品的进样时间选定为 60 s。

### 2.7 富集倍数

以单组分标准样品推过检测窗口时产生的吸收强度  $H_{push}$  为基准,用胶束扫集法出峰峰高  $H_{sw}$  与之比较,计算公式为:  $SE = H_{push} / H_{sw} \times k$ , 其中  $k$  为稀释倍数。经计算,绿原酸、脱水穿心莲内酯和马来酸氯苯那敏的富集倍数分别为 850、320 和 760 以上。

### 2.8 方法的线性关系及检出限

配制绿原酸、脱水穿心莲内酯和马来酸氯苯那敏的系列标准溶液,在优化条件下,以平均峰面积 ( $y$ ) 对质量浓度 ( $x, \mu\text{g}/\text{mL}$ ) 绘制标准曲线,3 种化合物的线性方程、相关系数及检出限 ( $S/N=3$ ) 见表 1。

表 1 在线扫集-胶束毛细管电动色谱法性能  
 Table 1 Linearity, regression equation, LODs by sweeping-MEKC

Compound	Linear range ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Regression equation	Correlation coefficient	Detection limits ( $\mu\text{g}/\text{L}$ )	RSD ( $n=5, \%$ )
Chlorogenic acid	2.91~46.56	$y = 44.3x - 52.2$	0.9995	142	2.1
Dehydroandrographolide	2.79~44.64	$y = 84.7x - 52.8$	0.9996	92	2.6
Chlorphenamine maleate	3.98~63.68	$y = 64.6x - 33.6$	0.9997	106	2.3

### 2.9 样品测定及回收率实验

用在线扫集-胶束毛细管电动色谱法对样品进行测定,平行测定 3 次。样品及样品加标电泳图见图 2。

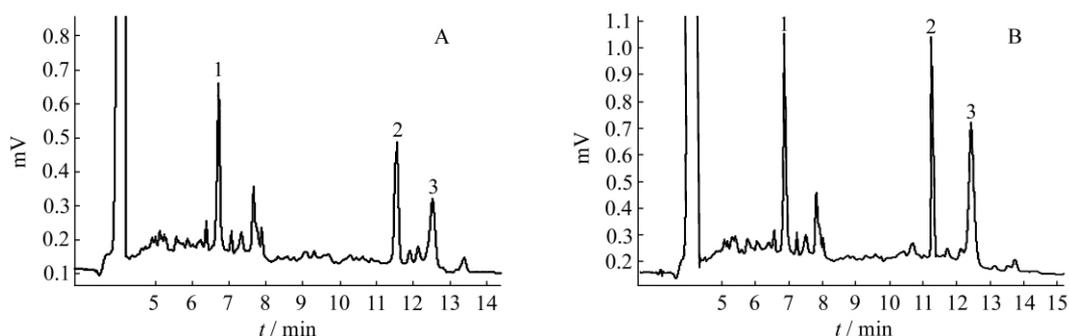


图 2 样品(A)及加标样品(B)的在线扫集-胶束毛细管电动色谱法电泳图谱  
 Fig. 2 Sweeping-MEKC electropherograms of real sample(A) and real sample spiked standard(B)  
 1. chlorogenic acid; 2. dehydroandrographolide; 3. chlorphenamine maleate.

回收率实验结果见表 2。经计算,金感胶囊中绿原酸、脱水穿心莲内酯和马来酸氯苯那敏的回收率分别为 93%~103%、96%~110%、97%~111%,RSD 均小于 4%。每粒胶囊中绿原酸、脱水穿心莲内酯和马来酸氯苯那敏的含量分别为 3.028、1.012 和 1.164 mg。

表 2 回收率实验结果  
Table 2 Results of recovery test

Compound	Added ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Found ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Recovery (%)	RSD ( $n=5, \%$ )
Chlorogenic acid	5.82	4.31	94	3.8
	11.64	12.01	103	
	23.28	21.54	93	
Dehydroandrographolide	5.58	5.53	96	2.2
	11.16	12.25	109	
	22.32	24.53	110	
Chlorphenamine maleate	7.96	7.73	97	3.5
	15.92	17.7	111	
	31.84	34.21	107	

### 3 结论

本文应用在线扫集-胶束毛细管电动色谱法测定金感胶囊中的绿原酸、脱水穿心莲内酯和马来酸氯苯那敏的含量。该实验所测三种物质(阴离子物质、中性物质和阳离子物质),验证了在线扫集-胶束毛细管电动色谱法的优点,可以同时测定三种荷电性物质。本文方法简便、快速、灵敏度高、重现性好,可用于金感胶囊的质量监控。

### 参考文献:

- [1] CHEN Yong(陈 勇),CAI Min(蔡 敏),HAN Feng-mei(韩凤梅). Chinese Journal of Analytical Science(分析科学学报)[J],2001,17(5):440.
- [2] LI Li-jun(李利军),HAO Xue-chao(郝学超),CHEN Hao(程 昊),WU Qi-tao(吴启涛). Chinese Journal of Analysis Laboratory(分析实验室)[J],2009,(12):119.
- [3] GAO Wei-dong(高卫东),HUANG Wan-feng(黄婉锋),XU Zhen-qiu(徐振球). Natural Product Research and Development(天然产物研究与开发)[J],2009,21(B10):431.
- [4] Zhao Yangfang, Ming Yongfei, Zhang Hongli, Luo Xingping, Chen Liren, Li Yongmin. Chromatogr. A[J],2005,62,611.
- [5] MA Chun-ting(马春婷),LI Hong-yan(李红艳),DENG Zhi-huan(邓智怀). China Pharmaceuticals(中国药业)[J],2008,17(15):39.
- [6] LI Min(李 敏),HE You-zhao(何友昭),GAN Wu-er(淦五二),LIN Xiang-qin(林祥钦). Journal of Analytical Science(分析科学学报)[J],2002,18(2):169.
- [7] Takeda S, Fukushi K, Chayama K. Chromatogr. A[J],2004,1051:297.
- [8] Mikkers F E P, Everaerts F M, Verheggen T. Chromatogr. [J],1979,169:1.
- [9] Quirino J P, Terabe S. Science[J],1998,282:465.
- [10] Quirino J P, Terabe S. Anal. Chem. [J],1999,71:1638.
- [11] LI Li-jun(李利军),WU Feng-min(吴锋敏),YU Lai-bo(喻来波). Chinese Journal of Analysis Laboratory(分析实验室)[J],2008,27(12):55.

## Determination of Chlorogenic Acid, Dehydroandrographolide and Chlorphenamine Maleate in Jingan Capsule by Sweeping-Micellar Electrokinetic Chromatography

WU Mei-yan<sup>1</sup>, LI Li-jun<sup>\*1</sup>, HU Da-chun<sup>1</sup>, GAO Wen-yan<sup>2</sup>, LI Yan-qing<sup>1</sup>

(1. Department of Biological and Chemical Engineering, Guangxi University of Technology, Liuzhou 545006;

2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Guangxi University, Nanning 530004)

**Abstract:** A sweeping-micellar electrokinetic chromatography (sweeping-MEKC) was used for the simultaneous separation and determination of chlorogenic acid, dehydroandrographolide and chlorphenamine maleate in Jingan capsule. The determination conditions including pH in background solution, concentration of sodium tetraborate, boric acid, sodium dodecylsulfate (SDS) and methanol were optimized. The result indicated that a best separation of the three organic compounds was obtained on a uncoated fused silica capillary column (55 cm×50 μm, effective length 42 cm) by using the background electrolyte containing 12 mmol/L sodium tetraborate, 50 mmol/L boric acid, 50 mmol/L SDS and 10% (by volume) methanol at pH=9.1 with a constant temperature of 25°C. The detection wavelength was set at 220 nm, sample injection voltage was 20 kV, and injection time was 60 s, respectively. The result showed that the enhancement of chlorogenic acid, dehydroandrographolide and chlorphenamine maleate was above 850, 320 and 760 times by sweeping-MEKC. Under the optimum conditions, the separation of the three organic compounds was performed within 14 minutes with relative standard deviations (RSDs) of peak area less than 4%. The calibration curves showed good linearity in the range of 2.91~46.56 μg/mL for chlorogenic acid, 2.79~44.64 μg/mL for dehydroandrographolide and 3.98~63.68 μg/mL for chlorphenamine maleate with detection limits (S/N=3) of 136 μg/L, 71 μg/L and 93 μg/L, and the spiked recoveries were 93%~103%, 96%~110% and 96%~110%, respectively.

**Keywords:** Micellar electrokinetic chromatography; Sweeping; Chlorogenic acid; Dehydroandrographolide; Chlorphenamine maleate