

## 流动注射-毛细管电泳分流式电动进样歧视效应特征的研究

罗金文<sup>1</sup>, 朱海霖<sup>2</sup>, 李会林<sup>1</sup>

(1. 浙江省药品检验所, 浙江 杭州 310004; 2. 浙江理工大学, 浙江 杭州 310028)

**摘要** :以碱性药物盐酸伪麻黄碱和酸性药物布洛芬为对象研究了分流式电动进样(一种用于流动注射-毛细管电泳(FI-CE)联用系统的新进样方法)歧视效应的特性。结果发现:在样品介质与运行缓冲液一致的条件下,FI-CE分流式电动进样产生的歧视效应与电动进样相似,但获得的校正曲线的线性明显优于电动进样,而与没有歧视效应的压力进样所获得的线性相似。利用这些特征提高了同时测定复方布洛芬片中少量组分盐酸伪麻黄碱和主要组分布洛芬的分析性能。在24次/h的采样频率下,盐酸伪麻黄碱的检测限为0.7 mg/L,比采用压力进样的毛细管电泳法所得的检测限低30%。连续进样11次分析含有13.1 mg/L盐酸伪麻黄碱和81.4 mg/L布洛芬的试样溶液,峰面积的相对标准偏差分别为2.8%(盐酸伪麻黄碱)和1.2%(布洛芬),明显优于采用压力进样的毛细管电泳法。用该法测定了两批复方布洛芬片中两种组分的含量,所得结果与高效液相色谱法的测定结果一致。

**关键词** :毛细管电泳;流动注射;电动进样;压力进样;分流式电动进样;盐酸伪麻黄碱;布洛芬;复方布洛芬片

中图分类号 :O658 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8713(2005)02-0189-04

## Study on Characteristics of Bias Caused by Flow Injection-Capillary Electrophoresis with Split-Flow Electrokinetic Injection

LUO Jinwen<sup>1</sup>, ZHU Hailin<sup>2</sup>, LI Huilin<sup>1</sup>

(1. Zhejiang Institute for Drug Control, Hangzhou 310004, China;

2. Zhejiang University of Science, Hangzhou 310028, China)

**Abstract** : The characteristics of bias caused by split-flow electrokinetic injection (SEKI), a new sample injection method applied in coupled flow injection-capillary electrophoretic system (FI-CE), was investigated using pseudoephedrine hydrochloride, a basic drug and ibuprofen, an acidic drug, as model analytes. It was found that bias imposed by SEKI under the conditions of continuous sample matrix/running buffer was similar to that did by electrokinetic injection (EKI). The linearity of calibration curve provided by SEKI was similar to that offered by non-bias hydrodynamic injection (HDI) but significantly better than that obtained by EKI. These features were exploited to improve analytical performances in simultaneous determination of the minor ingredient of pseudoephedrine hydrochloride and the major ingredient of ibuprofen in pharmaceutical preparation. Detectability of 0.7 mg/L for pseudoephedrine hydrochloride, was achieved at a sample throughput rate of 24 times per hour which is 30% lower than that obtained by HDI-based conventional CE. Eleven runs of a test solution containing 13.1 mg/L pseudoephedrine hydrochloride and 81.4 mg/L ibuprofen produced relative standard deviations (RSDs) of 2.8% for the minor ingredient and 1.2% for the major ingredient, which were improved in comparison to that obtained by HDI-based conventional CE. Analytical results for two batches of compound ibuprofen tablets by the SEKI-based FI-CE approach were in good agreement with that obtained by a conventional high performance liquid chromatographic method.

**Key words** : capillary electrophoresis; flow injection; electrokinetic injection; hydrodynamic injection; split-flow electrokinetic injection; pseudoephedrine hydrochloride; ibuprofen; compound ibuprofen tablet

压力进样(hydrodynamic injection)和电动进样(electrokinetic injection)是毛细管电泳(CE)最常用的两种进样方式。Krivacsy 等<sup>[1]</sup>对这两种进样方式进行了比较,指出在电动进样中带不同电荷的组分进样量不同(称为歧视),故导致定量分析时精密度差和线性范围窄。但由于电动进样操作简单且不需要其他的附加设备,故也用于 CE 与流动注射分析(FIA)等方法中。

最近,Fang 小组<sup>[2,3]</sup>报道了流动注射进样(FI)与毛细管电泳以分流式电动进样(split-flow electrokinetic injection)为接口的联用技术(FI-CE)。这种 FI-CE 分流式电动进样不但可以提高分析速度,且能改善进样的精密度。但分流式电动进样对带不同电荷的组分仍存在歧视效应,而到目前为止,还未见对电动进样和分流式电动进样歧视效应的特征进行比较的报道。

复方布洛芬片(又称复方布洛芬伪麻黄碱片)是一种抗感冒的复方制剂,内含布洛芬(每片含 200 mg)和盐酸伪麻黄碱(每片含 30 mg)两种有效成分。通常采用高效液相色谱法(HPLC)测定其有效成分的含量<sup>[4]</sup>,也有用双波长紫外分光光度法测定两组分的报道<sup>[5]</sup>。我们用压力进样毛细管区带电泳法快速测定了复方布洛芬制剂中布洛芬和盐酸伪麻黄碱的含量<sup>[6]</sup>,但由于这两种组分含量相差悬殊(质量比约为 7:1),分析所得盐酸伪麻黄碱的峰面积太小,导致对它的测定误差较大。

本文以布洛芬(负离子)和盐酸伪麻黄碱(正离子)为分析对象对由分流式电动进样和电动进样所引起的歧视效应进行了比较,结果发现分流式电动进样不仅能产生有利于正离子进样的歧视效应而且可获得比电动进样更宽的线性范围。利用这些特征,我们应用以分流式电动进样为接口的 FI-CE 方法同时测定了复方布洛芬剂中布洛芬和盐酸伪麻黄碱两种有效成分的含量,获得了比压力进样毛细管区带电泳法更准确的测定结果。

## 1 实验部分

### 1.1 仪器

P/ACE 2100 型毛细管电泳仪(美国 Beckman 公司),数据的采集与处理由装有 Gold System 软件的计算机完成;9323 型高压直流电源(北京新技术研究所)(正极接地);LZ-2000 型流动注射分析仪(沈阳肇发自动分析研究所),配有 2 个可变速的蠕动泵和 1 个八通阀,由单板机按所设置的程序控制泵和阀的动作;流通池的制作见文献<sup>[7]</sup>。FI-CE 联用系统装置如图 1 所示。

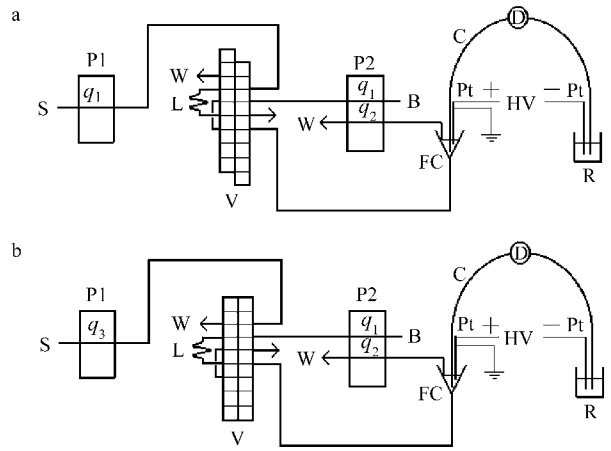


图 1 FI-CE 联用系统示意图

Fig. 1 Experimental set-up of coupled FI-CE system

a. loading; b. injection.

C: capillary; D: UV-detector; FC: the flow-through-cell for the split-flow injection; B: running buffer solution; L: sampling loop, 40  $\mu$ L; P1, P2: peristaltic pumps; R: buffer reservoir; S: sample solution; V: 8-channel valve; W: waste; HV: high-voltage supplier.  $q_1 = 0.5$  mL/min;  $q_2 = 0.6$  mL/min;  $q_3 = 0$ .

### 1.2 试剂及溶液

布洛芬和盐酸伪麻黄碱对照品由中国药品生物制品检定所提供,复方布洛芬片为浙江迪耳药业有限公司生产,其他试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

标准储备液:将布洛芬对照品溶解于 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液中,制得 1 400 mg/L 的布洛芬标准储备液;将盐酸伪麻黄碱对照品溶解在水中,制得 1 000 mg/L 的盐酸伪麻黄碱标准储备液。

标准工作溶液:用水将上述两种标准储备液按一定比例稀释,配制成含 700 mg/L 布洛芬和 100 mg/L 伪麻黄碱的标准工作溶液。

运行缓冲液:0.025 mol/L 磷酸盐缓冲溶液(pH 8.1)。

### 1.3 操作

#### 1.3.1 样品处理

取复方布洛芬片 20 片,精密称定,研细后精密称取约 0.15 g,置于 100 mL 量瓶中,加入 30 mL 0.1 mol/L 的氢氧化钠溶液,超声振荡 20 min 后用蒸馏水稀释至刻度,过滤,精密量取续滤液 5 mL 置于 50 mL 量瓶中,用运行缓冲液稀释至刻度,摇匀,备用。

#### 1.3.2 FI-CE 分析程序

测定开始前依次用 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液和蒸馏水反向冲洗毛细管各 2 min,然后用运行缓冲液冲洗 5 min。加分离电压,待基线稳定后启动 FI 程序。第一步,采样(30 s):切换阀(V)处于采样位(图 1-a),启动泵 1(P1),以 0.5 mL/min 的流速使

试样溶液充满采样环(L),同时用泵 2(P2)将运行缓冲液(即载流)送入接口 FC;第二步,进样(30 s);阀切换至注入位(图 1-b),停止泵 1,泵 2 以 0.5 mL/min 的流速将采样环(L)中的试样带送入接口(FC),受电渗流和电迁移作用,试样带的一小部分被导入毛细管而进入分离过程,大部分试样则经接口上部的排液管被泵 2 抽入废液缸(W);第三步,待命(90 s);当所有组分经过毛细管检测窗口后,第三步结束,本次循环完成。紧接着可开始下一次循环,每次循环约需 2.5 min。

### 1.3.3 分离条件

FI 系统:载流(即运行缓冲液)流速 0.5 mL/min;CE 系统:分离毛细管为 75  $\mu\text{m}$  i. d.  $\times$  27 cm(有效长度 20 cm)未涂层石英毛细管柱(河北永

年光纤厂)。分离温度 20  $^{\circ}\text{C}$ ,分离电压 10 kV,检测波长 214 nm。

## 2 结果与讨论

### 2.1 歧视效应的比较

以压力进样为参照标准,考察了电动进样和分流式电动进样的歧视效应。为强化歧视效应,除采用运行缓冲液作为试样介质外,还以稀释 10 倍的运行缓冲液作为试样介质,做连续介质(即样品介质与运行缓冲液相同)和场放大(样品介质的电导小于运行缓冲液电导)<sup>[8]</sup>条件下的对比。为增强可比性,对各种进样条件,如进样的压力、电压和时间等进行了仔细的选择,力求使不同进样方式下进入毛细管的被分析物的量相当。结果见表 1。

表 1 不同进样方式下盐酸伪麻黄碱与布洛芬的峰高比和峰面积比<sup>1)</sup>

Table 1 Peak height ratios and peak area ratios of pseudoephedrine hydrochloride to ibuprofen observed with various injection modes<sup>1)</sup>

Injection mode <sup>2)</sup>	Peak height ratios		Peak area ratios	
	injection in continuous sample matrix <sup>3)</sup>	field amplified injection <sup>4)</sup>	injection in continuous sample matrix <sup>3)</sup>	field amplified injection <sup>4)</sup>
Hydrodynamic injection	1.00	1.00	1.00	1.00
Electrokinetic injection	1.79	- <sup>5)</sup>	2.73	-
Split-flow electrokinetic injection	1.48	14.07	2.57	16.00

1) The concentrations of both pseudoephedrine and ibuprofen are 120 mg/L. 2) Condition for hydrodynamic injection: 3.45 kPa  $\times$  4 s; condition for electrokinetic injection: 10 kV  $\times$  3 s; condition for split-flow electrokinetic injection: 40  $\mu\text{L}$  test solution was driven to pass the flow-through cell at the flow rate of 0.5 mL/min and under a 10 kV voltage. 3) Sample solution prepared with running buffer. 4) Sample solution prepared by diluting 10-fold with running buffer. 5) Not detected because ibuprofen failed to be introduced into the capillary by electrokinetic injection under the condition of discontinuous sample matrix/running buffer.

可见,在连续介质条件下,歧视效应使电动进样方式下的盐酸伪麻黄碱与布洛芬的峰高之比值和峰面积之比值明显大于压力进样方式下的比值,而分流式电动进样歧视效应略小于电动进样。在场放大条件下,电动进样的歧视效应更为显著,作为负离子的布洛芬无法进入分离毛细管,因此记录不到它的峰,而分流式电动进样的歧视效应则小得多。这可

能是由于试样带在 FI 系统的传输过程中与载流发生了部分混合,这种混合减少了试样带和载流(即运行缓冲液)的电导差异,从而降低了分流式电动进样在场放大条件下歧视效应的程度。

### 2.2 3 种进样方式的线性比较

在 3 种进样方式下,分别考察了连续介质和场放大条件下所测组分的线性,试验结果见表 2。

表 2 不同进样方式获得的外标法校正曲线的线性相关系数<sup>1)</sup>

Table 2 Correlation coefficients of linear regression of external standard curves obtained with different injection methods<sup>1)</sup>

Injection mode <sup>2)</sup>	Pseudoephedrine		Ibuprofen	
	injection in continuous sample matrix <sup>3)</sup>	field amplified injection <sup>4)</sup>	injection in continuous sample matrix <sup>3)</sup>	field amplified injection <sup>4)</sup>
Hydrodynamic injection	0.9996	0.9980	0.9975	0.9947
Electrokinetic injection	0.9999	0.9893	0.9936	- <sup>5)</sup>
Split-flow electrokinetic injection	0.9997	0.9972	0.9973	0.9775

1) The concentrations of both pseudoephedrine and ibuprofen in standard series are 10, 60, 120, 200, 240, 300 mg/L. 2) Injection conditions are the same as described in Table 1. 3) Sample solutions prepared with running buffer. 4) Sample solution prepared by diluting 10-fold with running buffer. 5) Not detected because ibuprofen failed to be introduced into the capillary by electrokinetic injection under the condition of discontinuous sample matrix/running buffer.

可见,对盐酸伪麻黄碱而言,在连续介质条件下,在 10 ~ 300 mg/L 质量浓度范围内 3 种进样方式均可获得良好的线性。在场放大条件下,3 种进

样方式的线性均变差,然而分流式电动进样的线性与压力进样相当,明显好于常规电动进样。对布洛芬而言,在相同的浓度范围内,线性明显更差,即使

在连续介质条件下所获得的校正曲线也是弯曲的,其中电动进样的线性最差。分流式电动进样的线性明显好于常规电动进样,这可能是由于在 FI-CE 分流式电动进样时,毛细管入口处的样品溶液处于流动状态,能不断更新,而常规电动进样时样品溶液是静态的,进样时在毛细管入口附近可能发生部分离子耗尽现象。

### 2.3 应用

歧视效应通常被视为电动进样的主要缺陷,文献[9,10]报道了采用不同的方法来校正歧视效应。常规的 CE 分析多采用压力进样,这可能是由于电动进样所获得的精密度和线性相对较差的缘故。然而,从以上的讨论可见,在连续介质条件下,分流式电动进样不仅能产生有利于正离子进样的歧视效应,而且可获得与压力进样相当的线性,因此,采用基于分流式电动进样的 FI-CE 系统同时测定复方布洛芬片中带正电的微量组分盐酸伪麻黄碱和带负电的主要组分布洛芬可获得更准确的结果,同时具有采样频率高和精密度好的优点。

#### 2.3.1 分析性能

采用分流式电动进样的 FI-CE 系统连续 11 次测定含有盐酸伪麻黄碱 13.1 mg/L 和布洛芬 81.4 mg/L 供试液所得盐酸伪麻黄碱和布洛芬峰面积的相对标准偏差(RSD)分别为 2.8% 和 1.2%,而采用压力进样的 CE 方法<sup>[6]</sup>所得峰面积的 RSD 分别为 5.9% 和 3.8%,可见本法的精密度明显优于采用压力进样的 CE 方法。盐酸伪麻黄碱在 5~40 mg/L 范围内的线性回归方程为  $Y = 5.0 \times 10^{-3} C$  ( $r = 0.9996$ );布洛芬在 30~240 mg/L 范围内的线性回归方程为  $Y = 8.6 \times 10^{-3} C + 1.2 \times 10^{-2}$  ( $r = 0.9993$ ) ( $Y$ : 峰面积;  $C$ : 被分析物的质量浓度, mg/L)。盐酸伪麻黄碱和布洛芬的加标回收率( $n = 4$ )分别为(103 ± 0.8)% 和(100 ± 1.9)%。盐酸伪麻黄碱和布洛芬的检测限( $S/N = 3$ )分别为 0.7 mg/L 和 0.8 mg/L,而采用压力进样的 CE 方法<sup>[6]</sup>测定的盐酸伪麻黄碱和布洛芬的检测限分别为 1.0 mg/L 和 0.8 mg/L。可见本方法提高了对盐酸伪麻黄碱的检测能力。采用分流式电动进样的 FI-CE 系统和采用压力进样的 CE 系统分析同一供试液所测得的电泳图谱见图 2。

#### 2.3.2 样品分析结果

用所建的 FI-CE 法测定了 2 个批号的复方布洛芬片,结果为:盐酸伪麻黄碱的含量( $n = 3$ )分别为(32.1 ± 0.7) mg/片、(29.4 ± 0.4) mg/片;布洛芬的含量( $n = 3$ )分别为(201.0 ± 0.9) mg/片、(208.0 ± 2.1) mg/片。采用 HPLC 法<sup>[4]</sup>测定所得

结果为:盐酸伪麻黄碱的含量( $n = 3$ )分别为(32.0 ± 0.5) mg/片、(30.7 ± 0.3) mg/片;布洛芬的含量( $n = 3$ )分别为(201.0 ± 1.4) mg/片、(207.0 ± 1.1) mg/片。可见两种方法所得结果一致。

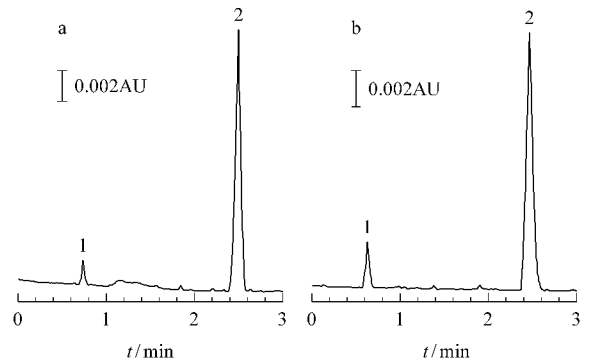


图 2 采用压力进样(a)和分流电动进样(b)方式测定的供试液电泳图

Fig.2 Electropherograms of the test solution with hydrodynamic injection (a) and with split-flow electrokinetic injection (b)

The test solution containing 13.1 mg/L pseudoephedrine hydrochloride and 81.4 mg/L ibuprofen.

a.  $H_1/H_2 = 0.092$ ; b.  $H_1/H_2 = 0.16$ .  $H_1$  means peak height of pseudoephedrine hydrochloride and  $H_2$  that of ibuprofen.

1. pseudoephedrine hydrochloride; 2. ibuprofen.

## 3 结论

在连续介质条件下,FI-CE 联用系统采用分流式电动进样方式产生的歧视效应与常规 CE 采用电动进样方式产生的歧视效应相似,但线性和精密度明显优于常规 CE 电动进样,而与压力进样相当,同时兼具采样频率高、分析速度快的优点。歧视效应提高了对阳离子的检测能力,同时更好的线性保证了外标法定量分析的准确性。利用这些特征同时测定复方布洛芬片中含量相差悬殊的两组分获得了比压力进样更准确的结果。

### 参考文献:

- [1] Krivacsy Z, Gelencser A, Hlavay J, Kiss G, Sarvari Z. J Chromatogr A, 1999, 834: 21
- [2] Fang Z-L, Liu Z-S, Shen Q. Anal Chim Acta, 1997, 346(2): 135
- [3] Liu Z-S, Fang Z-L. Anal Chim Acta, 1997, 353: 199
- [4] WS-308(X-263)-95
- [5] Li Huilin. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy (李会林. 中国现代应用药学杂志), 1995, 2(Suppl): 171
- [6] Chen Hengwu, Huang Dihua, Chen Qingjun, Li Huilin. Chinese Journal of Chromatography (陈恒武, 黄棣华, 陈青俊, 李会林. 色谱), 1998, 16(4): 289
- [7] Chen H-W, Fang Z-L. Anal Chim Acta, 1999, 394(1): 13
- [8] Chien R L, Burgi D S. J Chromatogr, 1994, 657: 409
- [9] van der Moolen J N, Boelens H F M, Poppe H, Smit H C. J Chromatogr A, 1996, 744: 103
- [10] Qi S Z, Huang A J, Sun Y L. Anal Chem, 1996, 68(8): 1342