

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.07.07

高效液相色谱法测定柴辛注射液中有效组分含量的研究

林灵超, 金 迁, 陈卿卿, 杜 强

(浙江福立分析仪器股份有限公司, 浙江台州 317500)

[收稿日期] 2021-10-08 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2022) 07-0035-05 [中图分类号] S859.79

[摘 要] 为同时测定柴辛注射液中有效组分甲基丁香酚、细辛脂素的含量,建立了以核壳型分离填料为色谱柱,乙腈和水为流动相,检测器波长为 287 nm,流量为 1.0 mL/min 的高效液相色谱方法。结果显示,在 0.15 ~ 150 $\mu\text{g/mL}$ 的质量浓度范围内,甲基丁香酚的线性曲线为 $Y = 7243X - 258$, $R^2 = 0.9999$,检测限为 0.025 $\mu\text{g/mL}$,平均回收率为 97.47% ~ 100.53%, RSD 为 0.92% ~ 2.17%;细辛脂素的线性曲线为 $Y = 18853X - 676$, $R^2 = 0.9999$,检测限为 0.012 $\mu\text{g/mL}$,平均回收率为 88.47% ~ 92.23%, RSD 为 1.48% ~ 3.55%。该方法操作简单,准确度、重复性、精密度好,可适用于柴辛注射液的质量控制。

[关键词] 柴辛注射液;甲基丁香酚;细辛脂素;高效液相色谱法;核壳填料

Study on Simultaneously Determination Method of Methyleugenol and Asarinin in Chaixin Injection by High Performance Liquid Chromatography

LIN Ling - chao, JIN Qian, CHEN Qing - qing, DU Qiang

(Zhejiang Fuli Analytical Instruments Inc., Taizhou, Zhejiang 317500, China)

Abstract: In order to determine the methyleugenol and asarinin in Chaixin Injection, a high performance liquid chromatography (HPLC) method was established. Under the optimized conditions, the analyte was carried out with acetonitrile - water as a mobile phase at a flow rate of 1.0 mL/min and a wavelength of 287 nm on a coreshell column. The results showed good linear relationships of methyleugenol and asarinin within the mass concentrations of 0.15 to 150 $\mu\text{g/mL}$ and the correlation coefficients were all more than 0.9999. The detection limits of methyleugenol and asarinin were 0.025 $\mu\text{g/mL}$ and 0.012 $\mu\text{g/mL}$, while the average recoveries of them were between 88.47% and 100.53%, with the relative standard deviations between 0.92% and 3.55%. The purposed method is simple to operate with good accuracy, repeatability, precision, which is suitable to the quality control.

Key words: Chaixin Injection; methyleugenol; asarinin; high performance liquid chromatography; coreshell

柴辛注射液,主要处方组成为柴胡和细辛,具有解表退热、祛风散寒、镇痛抗炎的药效,在马、牛、羊、猪、犬等的感冒发热的治疗上被广泛使用^[1-2]。柴辛注射液的现行质量控制标准收载于《兽药质量标准(2017 年版,中药卷)》^[3]中,为基于校正因子-气相色谱法对甲基丁香酚进行含量测定与控制,但易出现准确度低、峰型差、可操作性不强等缺点^[4-5]。同时仅将甲基丁香酚作为柴胡的有效成分进行含量测定,忽略对细辛药效成分的分析,造成无法全面而准确地对柴辛注射液的质量控制做出评价,最终可能会导致因临床疗效的差异而产生对柴辛注射液价值的错误判断。

本文参考《中国药典》2020 年版第一部细辛^[6]及相关文献方法^[7-14],确定了以甲基丁香酚、细辛脂素为研究对象,建立了高效液相色谱法同时测定柴辛注射液中甲基丁香酚、细辛脂素含量的方法,为柴辛注射液产品质量的控制和质量标准的完善提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂及仪器 主要试剂有:甲基丁香酚标准品(批号:111642-200301),细辛脂素标准品(批号:111889-201705),均购自于中国食品药品检定研究所;纯乙腈,色谱纯,购自于美国 TEADIA;水,Millipore 超纯水。

主要仪器有:LC5090 型高效液相色谱系统,配置为自动进样器、输液泵、柱温箱、紫外检测器等,购自于浙江福立分析仪器股份有限公司;SQP 型电子天平,购自于赛多利斯(上海)贸易有限公司产品;色谱分析柱 Coreshell C₁₈, 5 μm, 150 mm × 4.6 mmID,购自于日本 ChromaNik Technologies。

柴辛注射液,10 mL(相当于原生药 30 g),批号为 20200502,山东德信生物科技有限公司。

1.2 标准溶液的配制 分别精确称取甲基丁香酚和辛脂素标准品适量,用纯乙腈-纯水(5:5, v/v)溶解配制浓度为 150 μg/mL 的标准储备液。

临用前,用纯乙腈-纯水(5:5, v/v)稀释成浓度为 0.15、1.5、7.5、15、75、150 μg/mL 的系列混合标准工作溶液。

1.3 供试品溶液配制 精密移取柴辛注射液供试品 2 mL,置于 50 mL 容量瓶中,加纯乙腈-纯水(5:5, v/v)稀释至刻度,过滤待进样。

1.4 高效液相色谱方法 色谱柱为 Coreshell C₁₈, 5 μm, 150 mm × 4.6 mmID,流动相为纯乙腈-纯水(5:5, v/v),流量为 1.0 mL/min,柱箱温度为 40 ℃,紫外检测器检测波长为 287 nm,进样量为 5 μL。

2 结果与分析

2.1 专属性试验 依次注入混合标准溶液、供试品溶液及空白溶液。结果显示,混合标准溶液中甲基丁香酚和细辛脂素的保留时间分别为 5.41 min、8.92 min;供试品溶液中甲基丁香酚和细辛脂素与混合对照品色谱峰的保留时间保持一致,分离度分别为 5.5、1.6,理论塔板数分别为 18123、26644,拖尾因子均为 1.10,同时经光谱扫描得到峰纯度较高;空白溶液中,在甲基丁香酚和细辛脂素的保留时间位置均未见有杂质峰的干扰。

2.2 方法学试验

2.2.1 方法标准曲线、检测限和定量限 将上述系列混合标准工作溶液进样,测定各组分的峰面积。以混合标准系列工作溶液的浓度为横坐标(X),不同浓度下所得峰面积为纵坐标(Y),得甲基丁香酚、细辛脂素的拟合曲线分别为为 $Y = 7243X - 258$, $R^2 = 0.9999$; $Y = 18853X - 676$, $R^2 = 0.9999$ 。结果表明在 0.15 ~ 150 μg/mL 质量浓度范围之内,甲基丁香酚、细辛脂素的溶液浓度与峰面积线性关系良好。

按照 3 倍噪音计算检测限,10 倍噪音计算定量限,得到甲基丁香酚、细辛脂素的检测限为 0.025 μg/mL、0.012 μg/mL,定量限为 0.083 μg/mL、0.040 μg/mL。

2.2.2 精密度试验 取 20200502 号柴辛注射液适量,以纯乙腈-纯水(5:5, v/v)稀释并定容得到供试品溶液,连续进样 7 次,记录甲基丁香酚、细辛脂素的峰面积值。结果得到甲基丁香酚、细辛脂素峰面积 RSD 分别为 0.15%、0.20%,表明分析方法精密度良好。

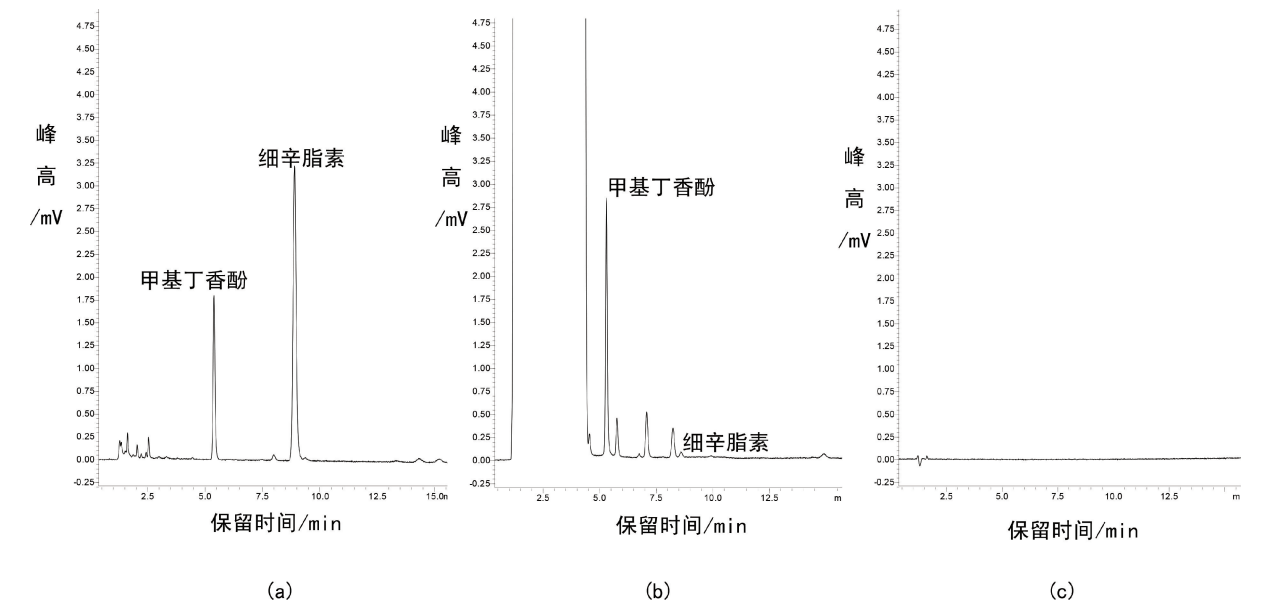


图 1 混合标准溶液 (a)、供试品溶液 (b)、空白溶液 (c)

Fig 1 Chromatograms of standard solution (a) , sample solution (b) ,blank solution (c)

表 1 加标回收率试验

Tab 1 Results of recovery test

分析物	本底含量 (μg/mL)	添加量 (μg/mL)	测得量 (μg/mL)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	相对标准偏差 (%)
甲基丁香酚	43.05	7.5	50.42	98.27%	97.47%	2.17%
	43.31	7.5	50.44	95.07%		
	43.52	7.5	50.95	99.07%		
	43.14	15	58.21	100.47%		
	43.78	15	58.44	97.73%		
	43.31	15	58.22	99.40%		
	43.46	50	94.26	101.60%		
	43.53	50	93.48	99.90%		
细辛脂素	43.22	50	93.27	100.10%	92.23%	1.48%
	1.12	7.5	7.52	85.33%		
	1.09	7.5	7.96	91.60%		
	1.11	7.5	7.72	88.13%		
	1.08	15	15.07	93.27%		
	1.08	15	15.15	93.80%		
	1.09	15	14.68	90.60%		
	1.12	50	46.96	91.68%		
	1.07	50	48.28	94.42%	92.23%	1.48%
	1.09	50	47.73	93.28%		

2.2.3 稳定性试验 取 20200502 号柴辛注射液适量,以纯乙腈-纯水(5:5, v/v)稀释并定容得到供试品溶液,分别在 0、2、6、12、24、48 h 各进行测定,记录甲基丁香酚、细辛脂素的峰面积,其 *RSD* 分别为 0.51%、0.42%,表明供试品溶液在 48 h 内稳定性良好。

2.2.4 加标回收率 取柴辛注射液适量,依次添加 3 个浓度水平的甲基丁香酚、细辛脂素混合标准溶液,后以纯乙腈-纯水稀释定容。每个浓度水平平行测定 3 份,计算平均回收率。结果显示,甲基丁香酚的平均回收率为 97.47%~100.53%,*RSD* 为 0.92%~2.17%;细辛脂素的回收率为 88.47%~92.23%,*RSD* 为 1.48%~3.55%,表明方法回收率良好。

2.2.5 样品检测 取平行配制的 6 份不同批次的柴辛注射液供试品溶液进样,依据线性拟合曲线,计算含量。结果每 1 mL 供试品中甲基丁香酚、细辛脂素的平均含量为 43.37 μg 、1.21 μg ,*RSD* 分别为 0.52%、1.65%。

3 讨论

目前对柴辛注射液中有有效成分的检测,主要为校正因子-气相色谱法对甲基丁香酚进行含量测定,极易出现准确度低、峰型差、可操作性不强等缺点^[3-6],未见其他检测方法的报道。本研究选择甲基丁香酚、细辛脂素分别代表柴辛注射液的两剂处方柴胡、细辛的有效物质,通过高效液相色谱法同时进行其含量测定,以全面评价柴辛注射液的质量。

研究对甲基丁香酚、细辛脂素在 210~370 nm 的波长范围内进行波长扫描,虽然两者在 230 nm 也有较大吸收峰,但根据主成分的含量最终确定检测波长为 287 nm。其次通过对比相同规格的 Coreshell C₁₈ 和其他全多孔型色谱柱,如₅unniest C₁₈、Xtimate C₁₈、Eclipse Plus C₁₈、Wondasil C₁₈ 等的效果,以保留时间、分离度、拖尾因子、理论塔板数等参数做为评价指标,得到当使用 Coreshell C₁₈ 色谱柱时甲基丁香酚峰、细辛脂素的理论塔板数最高、分离度最大、最低检出限最低、分析速度最短,因此

确定 Coreshell C₁₈ 为本研究的色谱柱,此时分析方法具有更好的分离、更高的灵敏度和更快的分析速度的优点,可以有效节省洗脱溶剂、降低分析成本。最后根据甲基丁香酚、细辛脂素的性质,分别对比了甲醇-纯水、乙腈-纯水等洗脱体系作流动相时的分离效果。使用纯甲醇作有机溶剂时,随着纯甲醇的组成比例的增加,流动相洗脱强度增加,甲基丁香酚峰会与溶剂峰共洗脱,同时细辛脂素与杂质干扰物的分离度下降;当纯甲醇的组成比例逐渐降低,溶剂峰拖尾会增大,将甲基丁香酚峰包覆在溶剂峰中;所以纯甲醇-纯水作洗脱体系时,无法实现甲基丁香酚、细辛脂素的有效分离和准确定量;当使用纯乙腈作有机溶剂时,溶剂峰的峰宽明显缩小。当纯乙腈的组成比例小于 50% 时,细辛脂素的保留时间过长、甚至无法被洗脱;当纯乙腈的组成比例大于 50% 时,流动相的洗脱强度较大,导致甲基丁香酚峰与溶剂峰共洗脱,细辛脂素与杂质干扰物的分离度下降,方法的定量准确度受到影响;只有在纯乙腈的组成比例为 50% 时,甲基丁香酚与溶剂峰、细辛脂素与杂质干扰物的分离度均达到基线分离,且分析时间较短,两者的峰形对称。因此最终确定“纯乙腈-纯水(5:5, v/v)”为研究的流动相。

研究建立了高效液相色谱方法同时测定柴辛注射液中甲基丁香酚、细辛脂素含量的方法,方法的准确度 *RSD* 小于 1%、精密度 *RSD* 值小于 0.3%,平均回收率在 88% 以上,被测样品溶液放置 48 h 后含量 *RSD* 仍小于 0.6%,准确度高、峰形佳、色谱方法简单、操作性极强。上述表明本方法适应于检测柴辛注射液中的有效组分的含量。

试验已经对 3~5 家的柴辛注射液产品进行了分析检测,但仍需收集更多的同类产品,用于扩大方法的适用范围,以最优优化现有方法。

4 结论

研究选择甲基丁香酚、细辛脂素作为研究对象,建立了高效液相色谱法同时测定柴辛注射液中两种有效成分的方法,方法操作简单,准确性、精密度高,可以适用于其质量控制,可为后续标准的完

善和产品疗效的研究提供科学依据。

参考文献:

- [1] 李英超, 谢小倩, 王梦真, 等. 甲基丁香酚药理及毒理作用的研究进展[J]. 中南药学, 2018, 16(9): 1249 – 1253.
Li Y C, Xie X Q, Wang M Z, *et al.* Research progress in pharmacological effect and toxicology of methyleugenol [J]. Central South Pharmacy, 2018, 16(9): 1249 – 1253.
- [2] 魏朝法, 杜佳, 翟煦, 等. 细辛在防治新型冠状病毒肺炎方剂中的应用安全性思考[J]. 医学争鸣, 2020, 11(3): 15 – 19.
Wei C F, Du J, Zhai X, *et al.* Safety consideration of asarum in the prevention and treatment of COVID – 19 [J]. Negative, 2020, 11(3): 15 – 19.
- [3] 中国兽药典委员会. 兽药质量标准: 中药卷[S]. 北京: 中国农业科技出版社, 2017: 221 – 222.
Chinese Veterinary Pharmacopoeia Committee. Quality Standards for Veterinary Drugs Chinese [S]. Beijing: China Agricultural Press, 2017: 221 – 222.
- [4] 江西天施康中药股份有限公司. 一种柴辛感冒注射液的检测方法: 201610511572. 5[P]. 2016 – 12 – 07.
Jiangxi Herbi – sky Co., Ltd. A Detection Method of Chaixin Ganmao Injection: 201610511572. 5[P]. 2016 – 12 – 07.
- [5] 中国兽医药品监察所. 柴辛注射液中柴胡和细辛的质检方法: 201910911332. 8[P]. 2019 – 09 – 25.
China Institute of Veterinary Drug Control. Quality Control Method of Bupleurum and Asarum in Chaixin Injection: 201910911332. 8[P]. 2019 – 09 – 25.
- [6] 王知斌, 李晶, 雷印廷, 等. GC – MS 同时测定石菖蒲挥发油中 β – 细辛醚、 α – 细辛醚和甲基丁香酚的含量[J]. 中医药学报, 2014, 42(6): 22 – 24.
Wang Z B, Li J, Lei Y T, *et al.* Simultaneous determination of β – asarone, α – asarone and methyl eugenol in volatile oil from *acorus tatarinowii* schott by GC – MS[J]. Acta Chinese Medicine and Pharmacology, 2014, 42(6): 22 – 24.
- [7] 国家药典委员会. 中国药典: 2020 年版, 一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 240 – 242.
Chinese Pharmacopoeia Commission. The Pharmacopoeia of the People's Republic of China 2020 Edition [S]. Beijing: China Medical Science Press, 2020: 240 – 242.
- [8] 王志清, 宋佳, 马海琴, 等. 不同产地细辛中主要有效成分含量测定与比较[J]. 中草药, 2020, 51(3): 748 – 756.
Wang Z Q, Song J, Ma H Q, *et al.* Analysis and evaluation on main active ingredients of asarum heterotropoides var. mandshuricum from different habitats [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2020, 51(3): 748 – 756.
- [9] 张晓宇, 袁子民, 张会宗. 高效液相色谱法测定大气 PM_{2.5} 防护微孔壳聚糖膜甲甲基丁香酚的含量[J]. 中华中医药学刊, 2019, 37(4): 1018 – 1020.
Zhang X Y, Yuan Z M, Zhang H Z. Content determination of methyleugenol in PM_{2.5} protective porous chitosan membrane with drug by HPLC [J]. Chinese Archives of traditional Chinese medicine, 2019, 37(4): 1018 – 1020.
- [10] 刘杰, 刘广学, 尚明英, 等. 华细辛和北细辛 HPLC 特征图谱识别与抗炎靶点及抗炎成分分析[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(6): 1374 – 1383.
Liu J, Liu G X, Shang M Y, *et al.* Identification based on HPLC and anti – inflammatory targets as well as related constituents analysis of asarum heterotropoides var. mandshuricum and A. sieboldii [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2020, 45(6): 1374 – 1383.
- [11] 葛玉松. HPLC 法同时测定丁细牙痛胶囊中细辛脂素、原儿茶醛和原儿茶酸的含量[J]. 药学与临床研究, 2019, 27(4): 261 – 263.
Ge Y S. Determination of Asarinin, Protocatechuic Aldehyde and Protocatechuic Acid in Dingxi Yatong Capsules by HPLC [J]. Pharmaceutical and Clinical Research, 2019, 27(4): 261 – 263.
- [12] 曹洒, 李亚敏, 戴王强, 等. 高效液相色谱法测定细辛不同药用部位细辛脂素的含量[J]. 湖北中医药大学学报, 2018, 20(4): 42 – 44.
Cao S, Li Y M, Dai W Q, *et al.* Content determination of asarinin in different parts of asarum by HPLC [J]. Journal of HuBei University of Chinese Medicine, 2018, 20(4): 42 – 44.
- [13] 龚旭昊, 杨星, 张璐, 等. HPLC 法同时测定清瘟解毒口服液中梔子苷、黄芩苷的含量[J]. 中国兽药杂志, 2020, 54(8): 47 – 53.
Gong X H, Yang X, Zhang L, *et al.* The contents of geniposide and baicalin in Qingwen Jiedu Oral Liquid were determined simultaneously by HPLC [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2020, 54(8): 47 – 53.

(编辑:陈希)