

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2023.03.05

柴辛注射液中细辛含量测定法的改进

于晓辉,赵富华,杨星,马秋冉,王雷,顾进华*

(中国兽医药品监察所,北京 100081)

[收稿日期] 2022-10-10 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2023) 03-0030-06 [中图分类号] S859.79

[摘要] 以甲基丁香酚为标记物,采用气相色谱法对柴辛注射液中细辛含量测定法进行了改进。通过色谱柱筛选、提取方法比较等,对新建方法进行了优化,并对新建方法的专属性、回收率、重复性、线性及范围、耐用性进行了方法学验证。验证结果表明,新建方法准确可靠,适用于柴辛注射液的质量控制。

[关键词] 柴辛注射液;细辛;甲基丁香酚;气相色谱法

Improved Assay for the Determination of Asarum in Chaixin Injection

YU Xiao-hui, ZHAO Fu-hua, YANG Xing, MA Qiu-ran, WANG Lei, GU Jin-hua*

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

Corresponding author: GU Jin-hua, E-mail: gujinhua@sohu.com

Abstract: An improved assay for the determination of Asarum in chaixin injection was carried out by gas chromatography with Methyleugenol as marker. The new determination method was optimized by screening chromatographic columns and comparing extraction methods, and was verified by investigating the specificity, recovery, repeatability, linearity and durability of the method. The validation results show that the new method is accurate and reliable, and is suitable for the quality control of chaixin injection.

Key words: chaixin injection, Asarum, Methyleugenol, gas chromatography

兽用药柴辛注射液用于治疗马、牛、羊、猪、犬、猫的感冒发热,其生产企业众多,临床应用广泛。该制剂的质量标准现收载于农业农村部公告第 1759 号^[1]中,其中的【含量测定】项是采用气相色谱法,以甲基丁香酚为标记物对其中的细辛含量进行测定,具体的方法如下:

“【含量测定】照气相色谱法测定。

色谱条件与系统适用性试验 采用键合/交联聚乙

二醇(PEG)-20M(30),毛细管色谱柱;程序升温(170~210℃):初温 170℃保持 11 min 后,以每分钟 35℃的升温速率升至 210℃,终温保持 5 min,不分流进样。理论板数按甲基丁香酚峰计算应不低于 15000。

校正因子测定 精密称取正二十烷适量,加正己烷制成每 1 mL 含 18 μg 的溶液,摇匀,作为内标溶液。另精密称取甲基丁香酚对照品适量,加正己烷制成每 1 mL 含 25 μg 的溶液。精密量取上述两

作者简介:于晓辉,副研究员,从事化学药品检测工作。

通讯作者:顾进华。E-mail: gujinhua@sohu.com

种溶液各 5 mL, 置具塞试管中, 密塞, 摇匀, 取 1 μ L, 注入气相色谱仪, 连续注样 3 ~ 5 次, 按平均峰面积计算校正因子。

测定法 精密量取本品 5 mL, 置分液漏斗中, 精密加入正己烷与内标溶液各 5 mL, 振摇 2 min, 静置 1 h, 分取上层溶液, 精密吸取 1 μ L, 注入色谱仪, 测

定, 即得。”

在应用上述方法对柴辛注射液中的细辛进行测定时, 发现该方法存在如下问题: ①甲基丁香酚峰拖尾严重, 峰型对称性差; ②内标峰及其他相邻杂质峰与甲基丁香酚峰的分离度均小于 1.0, 严重干扰甲基丁香酚峰的准确测定。具体色谱图见图 1。

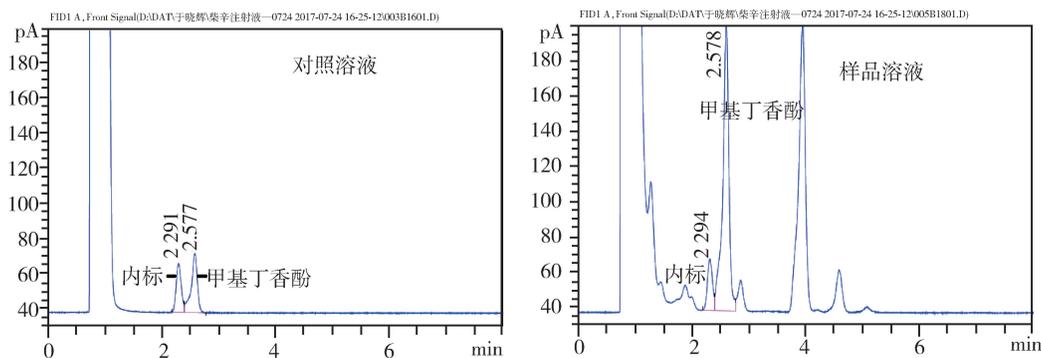


图 1 第 1579 号公告方法的测定结果

Fig 1 Results by the method in Announcement of No. 1759th

为了解决上述问题, 研究以甲基丁香酚为标记物, 新建了一种能准确测定柴辛注射液中细辛含量的方法, 以期更好的控制该类产品的质量。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 AE240 电子天平, Mettler 公司; 7890A 气相色谱仪, Agilent 公司; DB-FFAP 色谱柱, 30 m \times 0.53 mm, 1.00 μ m, Agilent 公司; HP-INNOWAX, 30 m \times 0.53 mm, 1.00 μ m 色谱柱, Agilent 公司; DB-624, 75 m \times 0.530 mm, 3.00 μ m 色谱柱, Agilent 公司; HP-5, 30 m \times 0.32 mm, 0.25 μ m 色谱柱, Agilent 公司; 7694E 顶空进样器, Agilent 公司。

正己烷和乙酸乙酯均为色谱纯, 其他试剂均为分析纯。

1.2 试药 对照品: 甲基丁香酚(批号: 111642-200301), 100%, 中国食品药品检定研究院。

供试品: 共 6 家企业生产的 8 批柴辛注射液, 规格均为 10 mL(相当于原生药 30 g)。

1.3 实验方法 气相色谱条件: 以硝基对苯二甲酚改性的聚乙二醇(FFAP)为固定相的毛细管色谱柱(柱长 30 m, 内径 0.530 mm, 膜厚 1.00 μ m), 柱

温为程序升温, 初始温度为 70 $^{\circ}$ C, 保持 1 min, 以每分钟 5 $^{\circ}$ C 的速率升温至 170 $^{\circ}$ C, 保持 10 min, 再以每分钟 5 $^{\circ}$ C 的速率升温至 240 $^{\circ}$ C, 保持 10 min; 用氢火焰离子化检测器检测, 检测器温度 250 $^{\circ}$ C; 进样口温度 210 $^{\circ}$ C; 以氮气为载气, 流速为每分钟 5 mL, 分流比 10:1。

供试品溶液、对照品溶液的制备方法及校正因子的测定方法与第 1579 号公告中的方法相同。

2 结果与分析

2.1 色谱柱的选择 分别采用 DB-FFAP、HP-INNOWAX 和 DB-624 三款色谱柱, 按照 1.3 中的气相色谱条件, 对浓度为 25 μ g/ml 的甲基丁香酚对照品溶液进样测定, 比较不同色谱柱条件下, 甲基丁香酚峰响应值的差异, 结果见表 1。

表 1 不同色谱柱时甲基丁香酚的峰面积

Tab 1 Peak area of Methyl Eugenol utilizing different chromatographic columns

色谱柱类型	DB-FFAP	HP-INNOWAX	DB-624
甲基丁香酚峰面积	112	54	27

表 1 结果表明, 三种色谱柱条件下, DB-

FFAP 色谱柱对甲基丁香酚的响应值最大,而 DB-624 的响应值最小,即甲基丁香酚的响应值与色谱柱极性之间正相关。为方便观察色谱峰,本研究选择极性最强、对甲基丁香酚响应值最大的 DB-FFAP 色谱柱。

2.2 供试品溶液制备方法的验证 为了保证供试品测定结果准确,本研究对供试品溶液制备的关键环节-提取方法进行了验证。

2.2.1 提取溶剂 以 1 号样品为研究对象,分别以乙酸乙酯和正己烷为提取溶剂,按照 1.3 中的方法进行提取并进样测定,比较提取得到的供试品溶液中甲基丁香酚的峰面积,结果见表 2。

表 2 不同提取溶剂时甲基丁香酚的峰面积

Tab 2 Peak area of Methyleugenol in different extraction solvents

提取溶剂	乙酸乙酯	正己烷
甲基丁香酚峰面积	6945	6980

表 2 结果表明,分别以乙酸乙酯和正己烷为提取溶剂时,供试品溶液中提取得到的甲基丁香酚量无明显差异,即两种溶剂对甲基丁香酚的提取效果一致。为了实验操作简便,本研究选择以正己烷为提取溶剂,即与该制剂中柴胡鉴别^[2]的提取溶剂保持一致。

2.2.2 正己烷用量 以 1、2、3 号样品为研究对象,分别取三种供试品各 5 mL,平行取样 2 次,置于 6 个分液漏斗中,向每个分液漏斗中分别加入正己烷 5 mL 和 10 mL,再加入内标溶液各 5 mL,按照 1.3 中的方法进行测定,比较供试品溶液中甲基丁香酚的峰面积,结果见表 3。

表 3 不同用量正己烷时甲基丁香酚的峰面积

Tab 2 Peak area of Methyleugenol changing with the amount of extraction solvent

样品编号	正己烷 5 mL	正己烷 10 mL
1	7252	4780
2	4743	3186
3	989	641

表 3 结果表明,随着提取溶剂正己烷用量的增加,供试品溶液中甲基丁香酚的峰面积呈现相应比例的降低;以 1 号样品为例,当正己烷用量为 5 mL 时,提取溶液中有有机溶剂的总体积为 10 mL,当正己烷用量为 10 mL 时,提取溶液中有有机溶剂的总体积为 15 mL,甲基丁香酚峰面积降低的比例与提取溶液中有有机溶剂体积增加的比例一致,即 5 mL 的正己烷和 10 mL 的正己烷对甲基丁香酚的提取效果相同。为了便于观察色谱峰,本研究以甲基丁香酚峰面积较大时正己烷的用量(5 mL)为提取溶剂的用量。

2.2.3 提取时间 以 1、2、3 号样品为研究对象,分别取三种供试品各 5 mL,平行取样 2 次,置于 6 个分液漏斗中,加入正己烷及内标溶液各 5 mL,其中一份供试品溶液振摇 2 min,另一份供试品溶液振摇 5 min,按照 1.3 中的方法进行进样测定,比较供试品溶液中甲基丁香酚峰面积的差异。结果见表 4。

表 4 不同提取时间时甲基丁香酚的峰面积

Tab 4 Peak area of Methyleugenol changing with different extraction time

样品编号	振摇 2 min	振摇 5 min
1	7252	7234
2	4743	4761
3	989	988

表 4 结果表明,振摇 2 分钟和 5 分钟得到的供试品溶液中,甲基丁香酚的峰面积基本一致,即振摇 2 分钟和振摇 5 分钟的提取效果相同。为了保证实验效率,本研究选择 2 分钟为提取时间。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性 按照柴辛注射液的制法,制备不含有细辛的阴性样品,按照 1.3 中的方法对阴性样品进行测定,记录色谱图(图 2)。结果,阴性样品在甲基丁香酚对照品色谱峰位置处无吸收峰,表明制剂中的其他成分对甲基丁香酚的测定无干扰,方法专属性良好。

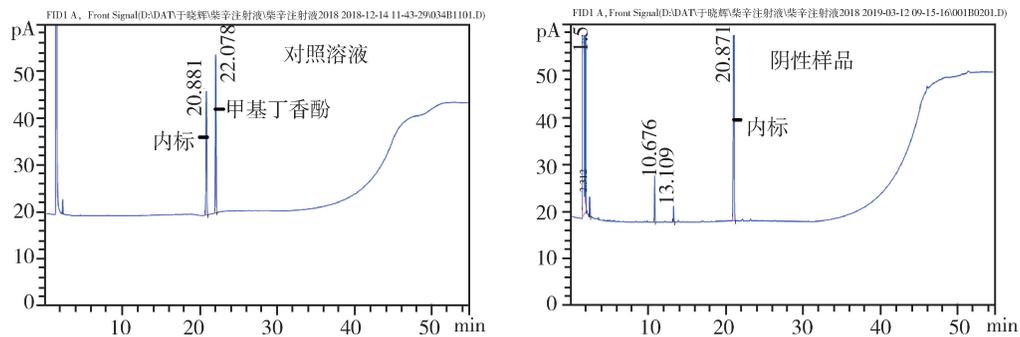


图 2 对照图谱和阴性样品图谱

Fig 2 the chromatogram of the standard solution and the negative sample solution

2.3.2 加样回收率 对 7 号样品平行测定 3 次, 得到其甲基丁香酚平均含量为 33.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。取甲基丁香酚对照品约 50 mg, 精密称定, 置于 100 mL 量瓶中, 用 N,N - 二甲基甲酰胺溶解并稀释至刻度, 即得浓度为 0.519 mg/mL 的甲基丁香酚对照品储备液; 精密量取储备液 1.5 mL、3.0 mL、4.5 mL, 分别置于 50 mL 量瓶中, 用含 0.3% 丙二醇与 0.8% 氯

化钠的溶液稀释至刻度, 即得浓度分别为 15.57、31.14 和 46.71 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 三种浓度的甲基丁香酚对照品溶液; 精密量取上述三种浓度的甲基丁香酚对照品溶液各 2.5 mL, 每种浓度平行取样 3 次, 置于 9 个分液漏斗中, 分别精密加入 7 号样品各 2.5 mL, 再分别精密加入正己烷与内标溶液各 5 mL, 按照 1.3 中的方法进行测定, 计算回收率, 结果见表 5。

表 5 甲基丁香酚回收率测定结果

Tab 5 Recovery rate of Methyleugenol

添加水平	样品中甲基丁香酚的量/ μg	添加量/ μg	测得值/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD(n=3)
50%	83.75	38.925	121.77	97.68	98.2	0.3%
			121.83、	97.82		
			122.33	99.10		
100%	83.75	77.850	164.34	103.51	101.9	0.8%
			161.45	99.81		
			163.49	102.43		
150%	83.75	116.775	204.11	103.07	102.5	0.6%
			202.06	101.31		
			204.29	103.23		

表 5 结果表明, 向浓度为 33.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的柴辛注射液中添加对照品溶液, 进行加样回收率实验时, 在 50%、100%、150% 三种添加水平下的平均回收率分别为 98.2%、101.9%、102.5%, 表明方法的准确度良好。

另外, 由于柴辛注射液的制法为, 为了保证用于添加的对照品溶液与供试品溶液配方一致, 本研究在上述回收率实验中, 分别采用 N,N - 二甲基甲酰胺和含 0.3% 丙二醇与 0.8% 氯化钠的溶液, 配

制用于添加的对照品储备液和对照品溶液, 从而保证添加回收测定结果准确。

2.3.3 重复性 配制浓度约为 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的甲基丁香酚对照品溶液, 按照 1.3“校正因子测定”中的方法进行测定, 平行操作 6 次, 计算 6 个校正因子的 RSD, 结果为 0.5%, 表明方法的重复性良好。

2.3.4 定量限 配制不同浓度的甲基丁香酚对照品溶液, 按照 1.3 中的方法进行测定, 计算甲基丁

香酚峰的信噪比。结果,当甲基丁香酚对照品溶液浓度约为 1 μg/mL 时,其信噪比为 11.2。所以,本方法的定量限为 1 μg/mL。

2.3.5 线性及范围 精密量取甲基丁香酚对照品储备液适量,置于不同的容量瓶中,用正己烷稀释至刻度,制得浓度分别为 1 μg/mL、2 μg/mL、4 μg/mL、10 μg/mL、20 μg/mL、100 μg/mL、200 μg/mL、500 μg/mL、1000 μg/mL、5000 μg/mL 的对照品溶液,按照 1.3 中的方法进样测定,记录色谱图,以浓度 X(μg/mL)对甲基丁香酚与内标峰面积之比 Y 作图,得到甲基丁香酚的回归方程为 $Y = 0.0302X + 0.1129, R^2 = 1$,线性范围为 1 μg/mL ~ 5000 μg/mL,线性关系图见图 3。

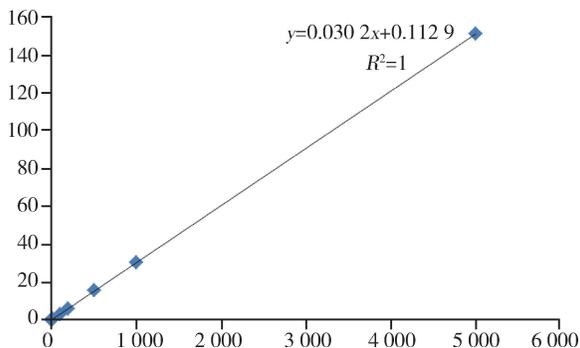


图 3 甲基丁香酚线性关系图

Fig 3 Linear relationship of Methyleugenol

2.3.6 耐用性考察 本研究对 1.3 中的气相色谱条件进行了耐用性考察,结果表明,当初始柱温在

70 °C ± 20 °C、进样口温度在 210 °C ± 20 °C、检测器温度在 250 °C ± 20 °C 范围内变化时,甲基丁香酚峰的对称性、甲基丁香酚峰与相邻峰的分度度均未见明显变化,方法的适用性良好。

另外,本研究以 1 号样品为研究对象,比较了不同升温速率条件下,供试品溶液中甲基丁香酚峰与相邻杂峰的分度度,结果如下。

表 6 升温速率的比较

Tab 6 Comparison of heating rates			
升温速率	5 °C/min	10 °C/min	25 °C/min
与相邻峰的分度度	2.5, 4.1	1.8, 3.3	1.6, 2.9

上述结果表明,升温速率越快,甲基丁香酚峰与相邻峰的分度度越差。为了兼顾时间效率和分离效果,本研究最终选择 5 °C/min 作为升温速率。

2.4 样品测定 按照 2.2 中的方法对 1.1 中的 8 批样品进行甲基丁香酚含量测定,结果见表 7。

表 7 样品中甲基丁香酚测定结果

Tab 7 Content of methyleugenol in samples								
	1	2	3	4	5	6	7	8
甲基丁香酚含量 (μg/ml)	1709	1118	228	1174	1187	1181	33.5	1762
RSD (%)	0.5	0.4	1.8	2.0	1.4	2.2	2.2	0.2

代表性色谱图如下:

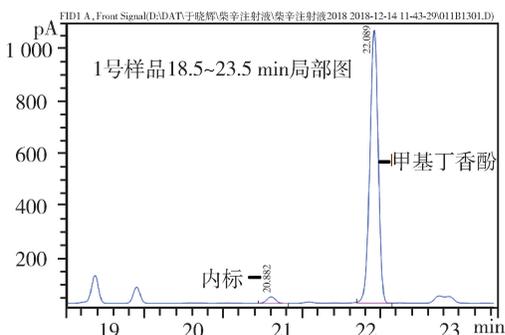
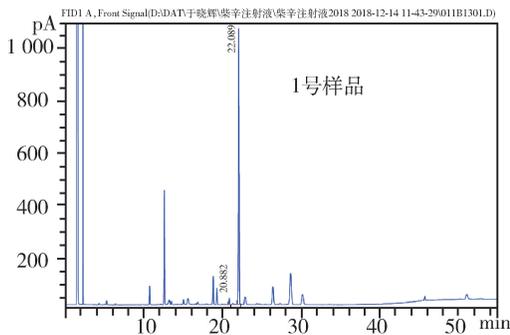


图 4 1 号样品的气相色谱图

Fig 4 Gas chromatogram of sample 1

3 讨论与结论

研究以甲基丁香酚为标记物^[2-4],新建了一种柴辛注射液中细辛含量的测定方法,解决了原方法中甲基丁香酚峰拖尾严重、其他相邻峰干扰测定等问题;并按照《中国兽药典》二部附录 9011“兽用中药质量标准分析方法验证指导原则”的要求^[5],对新建方法的专属性、回收率、重复性、线性及范围、定量限、耐用性等进行了考察,考察结果表明,新建方法专属性强、准确度高、耐用性好。

本研究开发建立的气相色谱条件,不但可以测定柴胡注射液中细辛的含量,还可以同时对其中的柴胡进行测定^[6]。本研究新建的方法适用性良好,为该类制剂质量标准提升提供了科学依据。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国农业农村部第 1759 号公告. [S]. The People's Republic of China's Ministry of Agriculture. The No. 1759th Announcement [S].
- [2] 罗小妹,魏惠珍,林苗苗,等. GC 校正因子在黄樟醚、甲基丁香酚定量分析中的应用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(21):70-74.
- LUO Xiao - mei, WEI Hui - zhen, LIN Miao - miao, *et al.* Application of GC Calibration Factors in Quantitative Analysis of

Safrole and Methyl Eugenol[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2017,23(21):70-74.

- [3] 潘磊,郑柳,牛卉,等. 细辛挥发油成分提取与甲基丁香酚含量测定的研究进展[J]. 时珍国医国药, 2015,26(4):967-970.
- PAN Lei, ZHENG Liu, NIU Hui, *et al.* Research progress in the Extraction of Volatile Oil from Asarum and the determination of eugenol and methyl eugenol[J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2015,26(4):967-970.
- [4] 陈长水,桑旭峰. 气相色谱法测定丁细牙痛胶囊中甲基丁香酚的含量[J]. 海峡药学, 2010,22(11):77-78.
- CHEN Chang - shui, SANG Xu - feng. Determination of Methyl Eugenol in Dingxi Yatong Capsules by GC [J]. Strait Pharmaceutical Journal, 2010,22(11):77-78.
- [5] 中国兽药典委员会,中华人民共和国兽药典二部,2015[S]. China Veterinary Pharmacopoeia Commission, Part 2 of the Veterinary Pharmacopoeia of the People's Republic of China, 2015[s].
- [6] 于晓辉,王雷,王琦,等. 气相色谱法鉴别“柴辛注射液”中的柴胡[J]. 中国兽药杂志, 2022, 56(10):58-63.
- YU Xiao - hui, WANG Lei, WANG Qi, *et al.* Identification of Bupleurum in Chaixin Injection by Gas Chromatograph [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2022, 56(10):58-63.

(编辑:陈希)