

顶空固相微萃取-气相色谱法测定鱼腥草注射液[△]中甲基正壬酮含量

李颖^{1*}, 郑申西², 李宗³

(1. 福建中医学院药学系, 福建 福州 350003; 2. 福州市疾病预防控制中心, 福建 福州 350003; 3. 福建省药品不良反应监测中心, 福建 福州 350001)

[摘要] 目的: 建立顶空固相微萃取-气相色谱法测定鱼腥草注射液中甲基正壬酮含量的方法, 并与传统水蒸气蒸馏法提取结果进行比较。方法: 采用固相微萃取器在样品瓶顶空吸附样品, 对鱼腥草注射液样品进行提取, 在气相色谱仪进样口高温下解吸附, 并用毛细管气相色谱法分离甲基正壬酮。色谱柱为 DB-1 毛细管柱(30m×0.25mm, 0.25 μ m); 载气: 高纯氮(纯度 $\geq 99.999\%$); 柱温 130 $^{\circ}\text{C}$; 不分流进样, 进样口温度 200 $^{\circ}\text{C}$; FID 检测器, 温度 200 $^{\circ}\text{C}$; 流速 1.0 mL $\cdot$ min⁻¹。结果: 甲基正壬酮在 1.07~25.91 μ g 呈良好线性关系, $r=0.999\ 6$; 平均加样回收率为 99.77%, RSD=2.24%。含量测定结果与水蒸气蒸馏法(SD)无显著差异。结论: 本方法简便、快速、准确、灵敏度高、重现性好, 可取代 SD-GC 法用于鱼腥草注射液中甲基正壬酮的含量分析。

[关键词] 顶空固相微萃取; 气相色谱法; 鱼腥草注射液; 甲基正壬酮

鱼腥草注射液是鲜鱼腥草(国家规定使用鲜鱼腥草,国内亦有厂家用干草)经水蒸气蒸馏的挥发油飽和水溶液经灭菌制成的注射液。鱼腥草注射液的主要有效成分为甲基正壬酮、月桂烯、癸醛等^[1,2], 具有抗病毒、抗菌、增强机体免疫功能、抑制炎症导致的毛细血管通透性增加、镇痛、抗过敏、平喘、止咳祛痰等作用^[3-5]。

以往鱼腥草注射液含量测定的前处理方法主要有液-液萃取法及水蒸气蒸馏法等, 传统方法操作繁琐、成分提取不够完全、重现性较差, 在应用、推广上存在较多局限。故笔者考虑改进其前处理方法, 采用顶空固相萃取(HS-SPME)法^[6,7]。该技术 1990 年由加拿大 Waterloo 大学的 Arthurhe 和 Pawlischyn 首创^[8], 具有操作简便、耗时少、经济实用, 不用或极少用有机溶剂, 能有效地减少底物及液态基质中干扰物质的影响, 集样品采集、萃取、浓缩、进样、分析于一体, 易自动化, 易与多种仪器联用等优势, 已在中药制剂分析领域得到越来越广泛的应用^[9,10]。

笔者采用固相微萃取器在样品瓶顶空吸附, 对鱼腥草注射液的主要有效成分甲基正壬酮进行纯化、富集, 并以甲基正壬酮含量作为质量监控指标, 用

毛细管气相色谱法进行含量测定, 大大缩短了样品预处理时间, 简化了操作步骤。结果证明该方法灵敏度高, 结果准确、可靠。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

GC7900 气相色谱仪(上海天美科学仪器有限公司); D-7900 色谱工作站; SPME 萃取手柄及聚二甲基硅氧烷(PDMS, 100 μ m)萃取头(美国 Supelco 公司); 601 数显超级恒温水浴(江苏金坛市华欧实验仪器厂)。

1.2 试剂

甲基正壬酮对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 110834-200502); 正十五烷(供含量测定内标用, 中国药品生物制品检定所, 批号 111677-200401); 鱼腥草注射液(福建省三爱药业股份有限公司, 规格: 10mL, 批号 050604, 050611, 060502); 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 顶空固相微萃取条件

样品经超级恒温水浴加热至 55 $^{\circ}\text{C}$, 预平衡 40min, 使用聚二甲基硅氧烷(PDMS, 100 μ m)固相

[△][基金项目] 陈可冀中西医结合发展基金、福建省高校中药学重点实验室开放课题基金资助项目(3000-905012020)

[通讯作者] *李颖, E-mail: Liying830221@163.com。

微萃取头顶空萃取 30min (55℃), 在气相色谱进样口 (温度 200℃) 解吸附 15s。

2.2 水蒸气蒸馏条件

精密量取供试品 25mL, 加入 1mL 正己烷溶液和 200mL 蒸馏水, 置挥发油提取器中提取 5h, 收集正己烷溶液置 2mL 容量瓶中, 定容至刻度, 以无水硫酸钠脱水, 吸取 5μL 进样。

2.3 色谱条件

色谱柱 DB-1 毛细管柱 (30m × 0.25mm, 0.25μm); 载气: 高纯氮 (纯度 ≥ 99.999%); 柱温 130℃; 不分流进样, 进样口温度 200℃; FID 检测器, 温度 200℃; 流速 1.0mL·min⁻¹。

2.4 辅料溶液的制备

按本品处方配制不加鱼腥草的阴性溶液。取氯化钠 7g, 聚山梨酯-80 5g, 混匀, 加注射用水使成 1 000mL, 即得。

2.5 内标物溶液的制备

取正十五烷内标物适量, 精密称定, 加辅料溶液制成每 1mL 含 0.10mg 的溶液, 作为内标物溶液。

2.6 对照品溶液的制备

精密称取甲基正壬酮对照品 5.82mg, 置 1 000mL 容量瓶中, 加辅料溶液溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 1mL, 置顶空取样瓶中, 精密加入内标物溶液 50μL, 摇匀, 作为对照品溶液。

2.7 供试品溶液的制备

精密量取鱼腥草注射液 1mL, 置顶空取样瓶中, 精密加入内标物溶液 50μL, 摇匀, 密封, 作为供试品溶液。

2.8 系统适应性试验

精密吸取未加内标物的对照品溶液、对照品溶液、供试品溶液及未加内标物的供试品溶液各 1mL, 分别置顶空取样瓶中, 按 2.1、2.3 所述顶空固相微萃取条件和气相色谱条件进样, 记录气相色谱图, 观察供试品在内标物保留时间处是否有杂质峰, 见图 1~4。图谱表明, 供试品溶液中其他成分对实验无干扰。

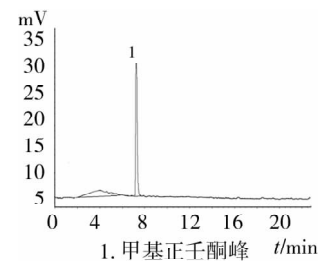


图 1 未加内标的对照品溶液 GC 图

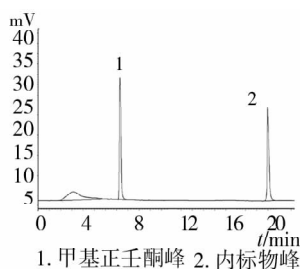


图 2 对照品溶液 + 内标的 GC 图

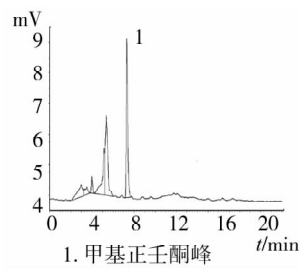


图 3 未加内标的供试品溶液 GC 图

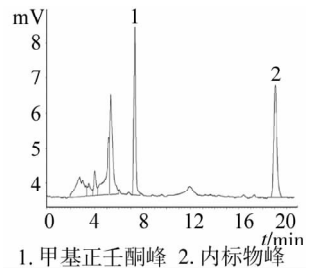


图 4 供试品溶液 + 内标的 GC 图

2.9 线性关系考察

精密称取甲基正壬酮对照品 1.07, 3.16, 5.82, 12.44, 25.91mg 分别置 1 000mL 容量瓶中, 加辅料溶液溶解, 并稀释至刻度, 摇匀, 分别精密量取以上不同浓度的甲基正壬酮溶液 1mL, 置顶空取样瓶中, 精密加入内标物溶液 50μL, 摇匀, 密塞, 按 2.1、2.3 项下顶空固相微萃取条件和气相色谱条件分别进样。以 $M_{\text{对}}/M_{\text{内}}$ 为横坐标, 以对照品与内标物峰面积比 ($A_{\text{对}}/A_{\text{内}}$) 为纵坐标绘制标准曲线, 得甲基正壬酮线性回归方程 $Y = 1.15114X - 0.0121$, $r = 0.9996$, 表明甲基正壬酮在 1.07 ~ 25.91μg 呈良好线性关系。

2.10 精密度试验

精密吸取甲基正壬酮对照品溶液 1mL 置顶空取样瓶中, 按 2.1 项下顶空固相微萃取条件进行提取, 注入气相色谱仪, 按 2.3 条件连续进样 5 次, 测得甲基正壬酮与内标物峰面积比 ($A_{\text{对}}/A_{\text{内}}$), 计算 RSD = 1.17%, 表明精密度良好。

2.11 重复性试验

取同一批号 (批号 060502) 供试品 5 份, 每份精密吸取 1mL, 按 2.7 项下供试品溶液制备方法制备, 并按 2.1、2.3 所述顶空固相微萃取条件和气相色谱条件分别提取、测定, 甲基正壬酮含量分别为 2.91, 2.82, 2.86, 2.77, 2.80μg·mL⁻¹, 计算 RSD = 1.92%, 表明该法重复性良好。

2.12 稳定性试验

取鱼腥草注射液供试品溶液在 0, 8, 24h 分别进样, 记录色谱图, 供试品溶液中甲基正壬酮与内标物峰面积比值 ($A_{\text{样}}/A_{\text{内}}$) 分别为 0.6413, 0.6546, 0.6484, 计算 RSD = 1.03%。可见供试品溶液在 24h 内基本稳定。

2.13 加样回收率试验

精密吸取已知含量的同一批号供试品 (批号 060502) 5mL, 置 10mL 容量瓶中, 进行加样回收试验。取甲基正壬酮对照品 3.0mg, 精密称定, 置

1 000mL容量瓶中，加辅料溶液溶解，定容，再加入浓度为 $58.75\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的内标物溶液 $50\mu\text{L}$ ，摇匀，制成对照品溶液。用以上对照品溶液将供试品溶液定容至刻度，摇匀，精密吸取以上溶液 1mL ，置顶空取样瓶中，按 2.1、2.3 项下方法提取并进行测定。甲基正壬酮的平均回收率为 99.77% ， $\text{RSD} = 2.24\%$ ，结果见表 1。

表 1 甲基正壬酮回收率试验结果

编号	样品含量 / μg	加入对照 品量/ μg	测得量 / μg	回收率 /%	平均回 收率/%	RSD /%
1	1.43	1.46	2.91	101.37	99.77	2.24
2	1.43	1.46	2.85	97.26		
3	1.43	1.46	2.88	99.32		
4	1.43	1.46	2.93	102.74		
5	1.43	1.46	2.90	100.68		
6	1.43	1.46	2.85	97.26		

2.14 样品含量测定

取 050604，050611，060502 3 批鱼腥草注射液，按 2.7 项方法制备，并按上述顶空固相微萃取条件和气相色谱条件测定甲基正壬酮的含量，试验结果依次为 2.77 ， 2.82 ， $2.92\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.15 两种方法测定同批次供试品甲基正壬酮含量

取同一批次(批号060502) 供试品分别采用顶空固相微萃取法和 水蒸气蒸馏法处理后，按 2.3 项下气相色谱条件各测定 5 次，计算其中甲基正壬酮含量，结果见表 2。

表 2 两种方法测定同批次鱼腥草注射液甲基正壬酮含量
/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

序号	顶空固相微萃取法	水蒸气蒸馏法
1	2.92	2.85
2	2.90	2.79
3	2.86	2.66
4	2.79	2.87
5	2.82	2.69
$\bar{x}$	2.86	2.77
RSD/%	1.89	3.39

注： $n = 2$

s 检验和 t 检验表明，顶空固相微萃取法和 水蒸气蒸馏法测定甲基正壬酮含量所得两组结果无显著性差异；由表 2 可见，顶空固相微萃取法所得 RSD 结果较小，表明该方法不仅操作简捷，而且准确度高。

3 讨论

本研究采用顶空固相微萃取法提取鱼腥草注射

液中的甲基正壬酮。实验过程中对萃取头的种类、预平衡时间、萃取时间、萃取温度等影响实验结果的顶空固相微萃取条件进行了优化，最终确定甲基正壬酮最佳提取条件为：供试品经超级恒温水浴加热至 55°C ，预平衡 40min ，使用聚二甲基硅氧烷(PDMS, $100\mu\text{m}$) 固相微萃取头顶空萃取 30min (55°C)。

本研究将顶空固相微萃取前处理方法同传统的水蒸气蒸馏提取方法进行比较，结果显示顶空固相微萃取测定值较高、相对标准偏差小；通过气相色谱图可以看出，顶空固相微萃取提出物杂质干扰少、溶剂峰很小，且操作过程简便快捷，有明显的优势。

可以认为顶空固相微萃取能够取代耗时、繁琐、准确度低的水蒸气蒸馏法用于中药成方制剂中挥发性成分的提取、分析。**TCM**

参考文献

[1] 《中药辞海》编审工作委员会. 中药辞海(第二卷)[M]. 北京:中国医药科技出版社,1996:980.

[2] 李爽,于庆海,金佩河. 鱼腥草的有效成分、药理作用及临床应用的进展[J]. 沈阳药科大学学报,1997,14(2): 144-147.

[3] 冯芝,陈英. 鱼腥草注射液佐治新生儿肺炎疗效观察[J]. 中成药,2001,23(8):607.

[4] 陈绍宏,张晓云,卢云. 鱼腥草注射液治疗急性感染性疾病 500 例临床总结[J]. 中国中医急症,1998,7(4):172.

[5] 姜方正. 鱼腥草联合 F- 的确旦治疗滤泡性结膜炎[J]. 中国药师,2001,4(3):219.

[6] 王锡昌,陈俊卿. 固相微萃取技术及其应用[J]. 上海水产大学学报,2004,13(4):348-352.

[7] 魏宁漪,段天璇,马长华. 固相微萃取技术及其在天然产物分析中的应用[J]. 中国中药杂志,2004,29(3): 197-199.

[8] Belardli RG Paw lizyn,J. The application of chemically modified fused silica fibers in the extraction of organics from water matrix samples and their rapid transfer to capillary columns [J]. Water Pollution, J Can,1989,24:179-191.

[9] 黎维勇,吴波,宋波. 固相微萃-气相色谱法测定大蒜素注射液的含量[J]. 中国药科大学学报,2005,36(1): 90-91.

[10] 魏宁漪,马长华,段天璇. 固相微萃取-气相色谱法测定醒脑静注射剂中的麝香酮[J]. 色谱,2005,23(5): 565-566.

(收稿日期 2007-10-22)

(下转第 41 页)

与葡萄糖酸钙配伍使用。据实验观察^[13]，1mL 盐酸氯丙嗪注射液(25mg) 加入 1mL 清开灵注射液中，立即出现棕红色沉淀，静置 1h 后沉淀不溶解，加热无变化，取上液加入 5% 葡萄糖注射液 1mL 或加入 0.9% 氯化钠注射液 1mL 均无明显变化，说明两药存在配伍禁忌。申艳梅^[14]将清开灵注射液与川芎嗪注射液各 1 支抽入同一注射器中，立即出现大量棕色块状物，将上述混和药液注入 5% 葡萄糖注射液 250mL 与 0.9% 氯化钠注射液 250mL 中，棕色块状物不溶解，静置 24h 仍不溶解，表明清开灵注射液与盐酸川芎嗪注射液不能配伍使用。实验显示^[15]，肌苷溶于 0.9% 的氯化钠注射液 250，500mL 中后放置 0h~8h 后无混浊、无沉淀。换液过程中，与清开灵注射液混合后立即变色。

3 结语

清开灵注射液是纯中药复方制剂，成分比较复杂，在常用输液中配伍应用其他药物时，应当慎重，尽量避免同时使用或连续使用。如病情需要，应合理安排输液顺序，建议在清开灵与其他药物输液之间加输其他液体，延长两种药物滴入的间隔时间；或必要的情况下，在清开灵注射液和其他药物之间用不加任何药物的生理盐水或葡萄糖溶液冲洗输液管道，防止因 2 种药物在体外相遇后发生沉淀或颜色变化，影响各自的疗效，同时也可避免因此而可能对机体造成的不良影响。**TCM**

参考文献

[1] 康春花. 头孢噻肟与清开灵有配伍禁忌[J]. 护理学杂志, 2005, 20(7): 70.

[2] 段筱妍, 黄会英, 徐俊艳. 丹参、清开灵、头孢哌酮钠静点用药禁忌[J]. 现代中医药, 2004, (5): 74.

[3] 王文. 君可平与清开灵配伍禁忌[J]. 现代中西医结合杂志, 2007, 16(15): 2076.

[4] 李旭华, 胡高楼, 陈根芝. 清开灵和乳酸环丙沙星注射液的体外配伍实验研究[J]. 中国药物与临床, 2007, 7(6): 423-424.

[5] 齐菲, 侯连兵. 清开灵注射液与常用注射液配伍的稳定性[J]. 医药导报, 2006, 25(6): 583-584.

[6] 闫桂玲, 王兰英. 清开灵注射液与小诺新霉素注射液存在配伍禁忌[J]. 齐鲁护理杂志, 2003, 9(5): 328.

[7] 李晓红, 张伟. 清开灵与硫酸阿米卡星存在配伍禁忌[J]. 南方护理学报, 2003, 10(2): 62.

[8] 张丽华. 清开灵注射液与庆大霉素注射液存在配伍禁忌[J]. 齐齐哈尔医学院学报, 2004, 25(2): 223.

[9] 孙莉. 清开灵注射液与盐酸精氨酸注射液存在配伍禁忌[J]. 医疗装备, 2007(1): 56.

[10] 陈占梅, 赵菊, 张颖, 等. 酚妥拉明与常见中药制剂在输液管内发生配伍反应的临床观察[J]. 西南国防医药, 2006, 16(3): 311.

[11] 丁春花. 清开灵注射液与维生素 B₆ 存在配伍禁忌[J]. 护理研究, 2004, 18(8): 1409.

[12] 代大顺. 清开灵与临床常用药物的配伍禁忌[J]. 中医药信息, 2006, 23(2): 29-30.

[13] 赵秀丽, 李敏. 盐酸氯丙嗪注射液与清开灵注射液存在配伍禁忌[J]. 解放军护理杂志, 2003, 20(2): 56.

[14] 申艳梅. 清开灵与盐酸川芎嗪注射液配伍禁忌浅析[J]. 实用中医药杂志, 2004, 20(8): 461.

[15] 樊晶晶. 换药过程中清开灵注射液存在的配伍禁忌[J]. 实用医技杂志, 2007, 14(17): 2410.

(收稿日期 2007-11-08)

(上接第 28 页)

Determination of Methyl-n-nonylketone in Herba houttuyniae Injection by HS-SPME-GC

Li Ying¹, Zheng Shenxi², Li Zong³

(1. Department of Pharmacology, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou Fujian 350003, China;
2. Fuzhou Center for Disease Control and Prevention, Fuzhou Fujian 350003, China;
3. Fujian Adverse Drug Reaction Monitoring Center, Fuzhou Fujian 350001, China)

[Abstract] **Objective:** Methyl-n-nonylketone in Herba houttuyniae injection were extracted by HS-SPME and SD. The constituents were analyzed by GC spectrometry and compared. **Methods:** Herba houttuyniae injection samples were collected by a HS-SPME fiber and desported for 4 minutes at a high temperature in GC injector. Methyl-n-nonylketone were confirmed by capillary gas chromatography. The determination was performed on a DB-1 column(30m × 0.25mm, 0.25μm). Carrier gas was high purity nitrogen. The fopw rate was 1.0mL·min⁻¹. Temperature of column was 130℃. No spilt injection mode was used. Temperature of injector and FID detector were both 200℃. **Results:** A good linearity was obtained within the range of 1.07~25.91μg (r=0.9996). The average recovery of methyl-n-nonylketone was 99.77% (RSD=2.24%). Results of HS-SPME-GC method has no significant different with those of SD-GC. **Conclusion:** This method has been proved to be simple, rapid, accurate, high sensitivity and reproducible for the quality control of herba houttuyniae injection.

[Key words] Head Space Solid-Phase Microextraction; Gas chromatography; Herba houttuyniae injection; Methyl-n-nonylketone