

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.10.09

气相色谱法鉴别柴辛注射液中的柴胡

于晓辉¹,王雷¹,王琦²,赵富华¹,杨星¹,马秋冉¹,顾进华^{1*}

(1. 中国兽医药品监察所,北京 100081;2. 牧原食品股份有限公司,河南南阳 473000)

[收稿日期] 2022-05-05 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2022) 10-0048-06 [中图分类号] S859.79

[摘要] 以己醛为标记物,采用气相色谱法对柴辛注射液中的柴胡进行了定性鉴别。通过筛选标记物和色谱柱、比较提取方法和进样方式、考察方法的专属性和耐用性等,对新建的鉴别方法进行了验证。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;柴胡;己醛;气相色谱法

Identification of Bupleurum in Chaixin Injection by Gas Chromatography

YU Xiao-hui¹, WANG Lei¹, WANG Qi², ZHAO Fu-hua¹, YANG Xing¹, MA Qiu-ran¹, GU Jin-hua^{1*}

(1. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China; 2. Muyuan Food Stuff Co. Ltd. Nanyang 473000, China)

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

Abstract: The qualitative identification of Bupleurum in “Chaixin Injection” was carried out by gas chromatography with hexanal as marker. The new identification method was verified by screening markers and chromatographic columns, comparing extraction methods and injection methods, and investigating the specificity 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, Bupleurum, hexanal, 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【鉴别】(2)项是采用气相色谱法对其中的柴胡进行鉴别,具体的方法为“取本品,作为供试品溶液。另取正己酸对照品,加丙酮制成每1 mL含35 μg的溶液,作为对照品溶液。照含量测定项下色谱条件,吸取对照品溶液及供试品溶

液各1 μL,注入气相色谱仪,测定。供试品色谱中,应呈现与对照品保留时间相同的色谱峰。”。

在应用上述方法对柴辛注射液进行检验时,发现其存在如下问题:现行质量标准要求采用强极性的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,对供试品原液直接进样测定。但是,该供试品原液是水溶液,将其直接注入FFAP色谱柱进行测定时,会对色谱柱的固定相造成不可

作者简介:于晓辉,副研究员,从事化药检验检测工作。

通讯作者:顾进华。E-mail: gujinhua@sohu.com

逆的损伤,实验结果表明,进供试品原液 5 次后,色谱柱的检测限就由 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 升高至 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$,即色谱柱的灵敏度快速下降,导致无法准确鉴别供试品中是否含有柴胡,容易出现“假阴性”的实验结果。

为了解决上述问题,本研究新建了一种“柴辛注射液”中柴胡的鉴别方法,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 μm , Agilent 公司; HP - INNOWAX, 30 m \times 0.53 mm, 1.00 μm 色谱柱, Agilent 公司; DB - 624, 75 m \times 0.530 mm, 3.00 μm 色谱柱, Agilent 公司; HP - 5, 30 m \times 0.32 mm, 0.25 μm 色谱柱, Agilent 公司; 7694E 顶空进样器, Agilent 公司; LDZ5 - 2 离心机, 京立公司。

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:正己醛(批号:US7 NB - BK), >98.0%, 东京化成工业株式会社。

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

取本品 5 mL,置于分液漏斗中,加入正己烷 5 mL,强力振摇 5 min,移至玻璃离心管中,以 5000 转/分钟的速率离心 15 min,取上层溶液作为供试品溶液。另取正己醛对照品适量,加正己烷制成每 1 mL 含 6 μg 的溶液,作为对照品溶液。照含量测定项下的色谱条件,吸取对照品溶液和供试品溶液各 3 μL ,注入气相色谱仪,测定。

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 μm),柱温为程序升温,初始温度为 70 $^{\circ}\text{C}$,保持 1 min,以每分钟 5 $^{\circ}\text{C}$ 的速率升温至 170 $^{\circ}\text{C}$,保持 10 min,再以每分钟 5 $^{\circ}\text{C}$ 的速率升温至 240 $^{\circ}\text{C}$,保持 10 min;用氢火焰离子化检测器检测,检测器温度 250 $^{\circ}\text{C}$;进样口

温度 210 $^{\circ}\text{C}$;以氮气为载气,流速为每分钟 5 mL,分流比 10:1。

2 结果与分析

2.1 柴胡标记物的选择 现行质量标准中是以己酸作为柴胡标记物对其进行鉴别的,而在研究过程中发现,以己酸作为标记物存在如下两个问题:

问题① 响应因子较低:采用 DB - 624 色谱柱时,35 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的己酸丙酮溶液的峰面积仅约为 10;采用 DB - FFAP 色谱柱时,上述溶液的峰面积约为 60。以己酸作为标记物,方法的灵敏度较差,容易出现“假阴性”的结果。

问题② 提取困难:当采用 DB - FFAP 色谱柱进行测定时,无法直接进水溶液,即必须用非极性溶剂将己酸从强极性的供试品溶液中提取出来。本研究曾尝试用乙醚、乙酸乙酯、正己烷等非极性溶剂对己酸进行提取,但均未能成功,这可能是由于己酸极性较强、活性较大、难以从强极性的水溶液中被提取出来。

为了解决上述问题,本研究参考了《中国兽药典》二部柴胡注射液中的标记物^[2-3],采用己醛作为柴胡的标记物对其进行了测定。

2.2 色谱柱的选择 分别采用 DB - FFAP、DB - 624 和 HP - 5 色谱柱,按照 1.3 中的色谱条件进行操作,对浓度为 6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的己醛正己烷对照品溶液进行测定,比较不同色谱柱条件下,己醛峰面积的差异,结果见表 1。

表 1 不同色谱柱时己醛的峰面积

Tab 1 Peak area of hexanal utilizing different chromatographic columns

色谱柱类型	DB - FFAP	DB - 624	HP - 5
己醛峰面积	88	86	87

根据上述结果得知,三种色谱柱条件下,己醛峰面积值基本一致,表明己醛的响应值几乎不受色谱柱极性的影响。另外,本研究还应用该色谱条件同时测定了甲基丁香酚,所以,为了方便操作,最终

选择甲基丁香酚测定时采用的 DB-FFAP 色谱柱对己醛进行鉴别检查。

2.3 提取方法

2.3.1 提取溶剂的选择 根据制剂的特点及文献查阅的结果,以 1 号样品为研究对象,分别以正己

烷和乙酸乙酯为提取溶剂,比较二者的提取效果。结果,以乙酸乙酯为提取溶剂时,供试品溶液中己醛色谱峰峰形较差,溶剂峰干扰严重;而以正己烷做溶剂时,己醛峰峰形对称,周围的干扰峰较少。二者的色谱图见图 1。

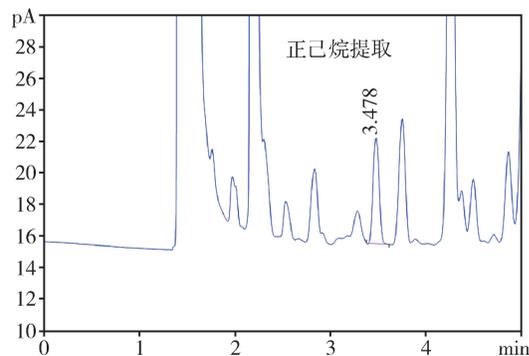
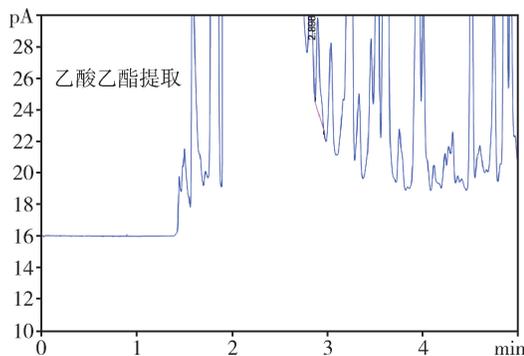


图 1 不同提取溶剂的比较

Fig 1 Comparison of different extraction solvents

2.3.2 正己烷用量的考察 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 3 次,置于 9 个分液漏斗中,向每个分液漏斗中分别加入正己烷 5 mL、10 mL、15 mL,按照 1.3 中的方法进行测定,比较供试品溶液中己醛的峰面积,结果见表 2。

表 2 不同量提取溶剂时己醛的峰面积

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

样品编号	正己烷 5 mL	正己烷 10 mL	正己烷 15 mL
1	28.0	13.7	9.1
2	20.1	10.2	7.0
3	9.6	4.7	3.0

根据上述结果得知,随着提取溶剂正己烷用量的增加,供试品溶液中己醛峰面积呈现相应比例的变化,表明 5 mL、10 mL 和 15 mL 正己烷的提取效果基本一致。为了便于观察实验结果,本研究最终以己醛响应值较大时正己烷的用量(5 mL)为提取溶剂的用量。

2.3.3 提取时间的考察 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 3 次,置于 9 个分液漏斗中,加入正己烷 5 mL,分别强力振摇 2、5 和 10 min,按照 1.3 中的方法进行测定,比较供试品溶液中己醛的峰面积,结果见表 3。

表 3 不同提取时间时己醛的峰面积

Tab 3 Peak area of hexanal changing with extraction time

样品编号	振摇 2 min	振摇 5 min	振摇 10 min
1	26.5	27.1	27.0
2	20.2	20.5	20.5
3	10.0	10.1	10.0

根据上述结果得知,强力振摇 2 分钟、5 分钟和 10 分钟后,供试品溶液中的己醛峰面积基本一致。为了兼顾提取效果和时间效率,本研究最终选择 5 分钟为提取时间。

2.3.4 乳化问题及离心注意事项 研究过程中发现,向 5 mL 供试品中加入 5 mL 正己烷,强力振摇 5 分钟后,溶液较易出现乳化现象。为了解决乳化问题,我们采用了将乳化液静置过夜、低温加热、加少量氯化钠、离心四种方法。结果显示,前三种方法对乳化问题的解决效果均较差,而离心方式能够快

速有效的解决乳化问题。

另外,本研究还比较了塑料材质离心管和玻璃材质离心管的离心效果,结果显示,将乳化液置于塑料离心管中离心 15 min 后,上清液中会出现干扰物,造成己醛峰面积增加 2~3 倍。这可能是由于正己烷是一种非极性溶剂,容易将塑料材质中的某些成分浸出,从而对己醛测定产生干扰。

根据上述研究结果,新建方法中采用“玻璃离心管”对乳化液进行离心操作。

2.4 进样方式

2.4.1 提取溶液直接进样与供试品原液顶空进样测定结果比较 为了更准确的测定供试品溶液中的己醛,本研究对 1.2 中的 8 批供试品分别采用提取溶液直接进样法与供试品原液顶空进样法两种方式进行己醛含量测定,比较不同进样方式下己醛测定结果之间的差异。其中,顶空进样条件是按照《中国兽药典》二部柴胡注射液【特征图谱】项下的条件进行的(顶空瓶平衡温度 85 ℃,平衡时间 15 min,进样阀温度 100 ℃,传输线温度 115 ℃,顶空瓶充压时间 0.2 min,定量环填充时间 0.2 min,定量环平衡时间 0.5 min,进样时间 1.0 min)。两种进样方式下,己醛含量测定结果见表 4。

表 4 不同进样方式时柴辛注射液中的己醛含量

Tab 4 Content of hexanal in chaixin injection with different injection mode

	1	2	3	4	5	6	7	8
直接进样(μg/mL)	1.9	0.7	1.4	2.2	2.2	2.3	6.6	1.7
顶空进样(μg/mL)	1.7	0.8	1.3	1.2	1.2	1.2	0.4	1.2

从上表结果得知,8 批样品中 7 批样品直接进样的测定结果高于供试品原液顶空进样的结果,尤其 7 号样品,两种进样方式测得结果之间的差异高达 16 倍。之所以会出现这样的差异,可能是由于己醛的沸点较高(130~131 ℃),在上述顶空平衡条件下,难以使己醛从供试品中充分挥发出来,以至于顶空进样方式测定结果偏低;另外,不同企业生产的制剂中添加的丙二醇等辅料的量也存在较

大差异,这也会造成顶空进样时挥发出来的己醛量不充分,从而导致己醛测得结果偏低。

根据上述研究结果,新建方法中采用提取溶液直接进样法对供试品溶液中的己醛进行鉴别。

2.4.2 进样量的考察 由于己醛的响应因子较低,峰面积较小,为了便于观察实验结果,准确判断己醛色谱峰,本研究根据 1.3 中方法的溶剂类型、进样口温度、色谱柱规格等,计算出供试品溶液的最大进样量为 3 μL;如果超过该进样量,有可能造成进样溶液气化后溢出衬管、污染进样口的问题。所以,在应用该方法时,要按照质量标准的要求去操作,尤其注意色谱柱型号和规格的选择,否则容易造成进样不准确。

另外,本研究又通过多次反复进样,考察 3 μL 的进样量是否会对色谱系统造成残留污染。结果显示,在 3 μL 的进样量下,重复进供试品溶液约 30 次,未观察到色谱系统中出现残留物峰。

2.5 己醛对照品溶液浓度的确定 为了确定新建方法中己醛对照品溶液的浓度,本研究以《中国兽药典》二部柴胡注射液【特征图谱】项下的对照品溶液浓度为参考,比较了“柴胡注射液”和“柴辛注射液”二者处方和制法之间的差异,并对差异进行了转换计算,最终确定新建方法中己醛对照品溶液的浓度为“6 μg/mL”。

2.6 专属性考察 按照柴辛注射液的制法,制备不含有柴胡的阴性样品,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,阴性样品在己醛对照品色谱峰位置处无吸收峰,表明制剂中的其他成分对己醛的测定无干扰,方法专属性良好。

2.7 耐用性考察 本研究对 1.3 中的色谱条件进行了耐用性考察,结果表明,当初始柱温在 70 ℃ ± 20 ℃、进样口温度在 210 ℃ ± 20 ℃、检测器温度在 250 ℃ ± 20 ℃ 范围内变化时,己醛峰的峰面积和对称性、己醛峰与相邻杂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,供试品溶液中己醛峰与相邻杂峰的分度度,结果见表 5。

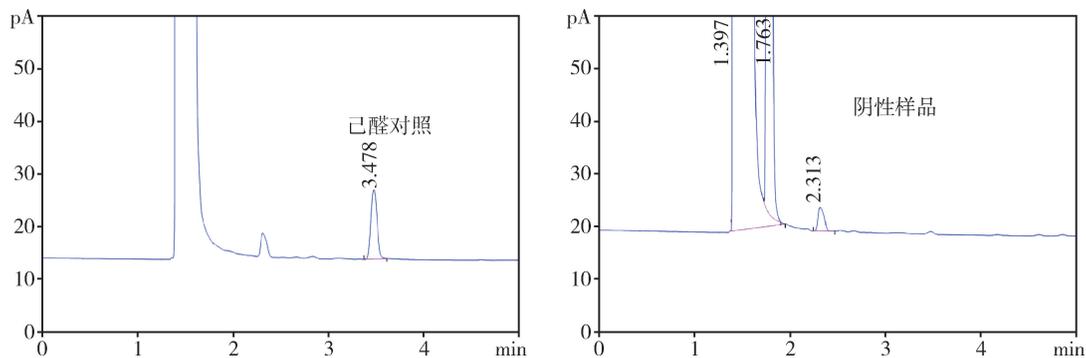


图 2 己醛对照图谱和阴性样品图谱

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

表 5 升温速率的比较

Tab 5 Comparison of heating rates

升温速率	5 °C/min	10 °C/min	25 °C/min
与相邻峰的分离度	6.3、2.5	1.7、2.5	1.3、2.4

峰的分离度越差。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。

2.8 样品测定 按照 1.3 中的方法对 1.2 中的 8 批样品进行己醛鉴别检查,结果 8 批样品中均呈现与己醛对照品保留时间相同的色谱峰,代表性色谱图见图 3。

上述结果表明,升温速率越快,己醛峰与相邻

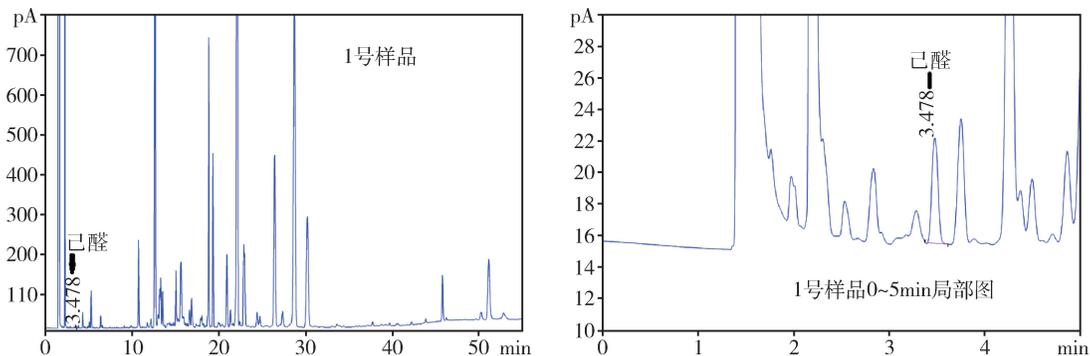


图 3 1号样品的气相色谱图

Fig 3 Gas chromatogram of sample 1

3 讨论与结论

研究新建了柴辛注射液中柴胡的鉴别方法^[4-5]。通过采用己醛作为柴胡的标记物,解决了原质量标准中以己酸作为标记物而导致的响应因子低、提取困难等问题;通过筛选提取溶剂、优化溶剂使用量和提取时间,解决了原质量标准中直接进样水溶液供试品以至于色谱柱被损伤、灵敏度快速下降等问题;通过比较不同进样方式并优化进样量,保证了己醛峰面积较大,便于结果观察和结果判断。

另外,本研究还对新建方法的专属性和耐用性进行了考察,保证方法准确可靠、适用性良好。应用新建方法对 6 个厂家生产的 8 批柴辛注射液进行测定,结果表明,该方法操作简便、专属性强、耐用性好,适用于该类制剂的质量控制^[6],为柴辛注射液质量标准的完善和提升提供了实验依据。

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] 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].
- [3] 国家药典委员会, 中华人民共和国药典一部, 2015 [S].
National Pharmacopoeia Committee, Pharmacopoeia of the People's Republic of China, 2015 [S].
- [4] 庞雪, 廖念, 周逸群, 等. 柴胡 5 种不同炮制品中挥发性成分的气相色谱-质谱联用分析 [J]. 时珍国医国药, 2017, 28 (1): 108-110.
Pang X, Liao N, Zhou Y Q, *et al.* Research on Volatile Components from Five Kinds of Processed Radix Bupleuri by GC-MS [J]. Lishizhen Medicine and Materia Medica Research, 2017, 28(1): 108-110.
- [5] 袁其堂, 仲英, 麦曦, 等. 柴胡注射液中挥发性化学成分 GC-MS 分析 [J]. 中成药, 2014, 36(6): 1326-1328.
Yuan Q T, Zhong Y, M x, *et al.* Analysis of volatile chemical components in Chaihu Injection by GC-MS [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2014, 36(6): 1326-1328.
- [6] 邵秋红, 刘娟. 中兽药质量标准研究进展 [J]. 中国兽药杂志, 2012, 46(11): 54-57.
Shao Q H, Liu J. Progress on Quality Standards of Chinese Materia Medica for Animals [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2012, 46(11): 54-57.

(编辑:陈希)