

顶空气相色谱法测定大孔树脂提取物中的残留溶剂研究

刘冬^{1,2}, 杨敬芝², 杜守颖^{1*}, 张东明², 赵立敏², 陈雯¹

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 2. 中国医学科学院药物研究所北京 100050)

摘要 目的: 建立了测定大孔树脂淫羊藿提取物、栀子提取物以及 HP 中乙醇、正己烷、苯、甲苯、甲基环己烷、二甲苯、苯乙烯、二乙烯苯残留有机溶剂含量的顶空气相色谱法。**方法:** 采用顶空气相色谱法, FD 检测器, 以 20% ~ 50% 二甲基亚砜为溶媒, 顶空预热温度为 90℃, 预热时间为 10 min 进样口温度为 180℃, 检测器温度为 250℃, 以氮气为载气, 使用 DB-1 交联毛细管柱 (60m × 0.32mm, 1μm), 程序升温, 实现了各组分的基线分离。**结果:** 乙醇、正己烷、苯、甲苯、甲基环己烷、二甲苯、苯乙烯、二乙烯苯在各自对应的浓度范围内, 线性关系良好; 乙醇、正己烷、苯、甲苯、甲基环己烷、二甲苯、苯乙烯、二乙烯苯的最小检测限分别为 2.72, 0.22, 0.03, 0.03, 0.28, 0.33, 0.03, 0.31 μg·mL⁻¹; 加样回收率均在 75% 以上, 精密度较好。**结论:** 经方法学验证, 该方法灵敏、准确、可靠, 可适用于大孔树脂淫羊藿提取物、栀子提取物及 HP 中乙醇、正己烷、苯、甲苯、甲基环己烷、二甲苯、苯乙烯、二乙烯苯等残留有机溶剂的测定。

关键词: 顶空进样法; 毛细管气相色谱法; 淫羊藿提取物; 栀子提取物; HP; 溶剂残留测定

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)11-1877-04

Determination of residual solvents in macroporous resin extracts by Head-space capillary gas chromatography

LU Dong^{1,2}, YANG Jing-zhi², DU Shou-ying^{1*}, ZHANG Dong-ming², ZHAO Li-min², CHEN Wen¹

(1. School of Chinese Pharmacy Beijing University of TCM, Beijing 100102 China)

2. Institute of Materia Medica Chinese Academy of Medical Sciences Beijing 100050 China)

Abstract Objective This paper reports a Head-space GC method for determination of ethanol, hexane, benzene, toluene, methyl cyclohexane, xylene, styrene, divinyl benzene in macroporous resin extractions. **Method** The analytical column was DB-1 (60m × 0.32mm, 1μm). The injector temperature was 180℃ and the detector temperature was 250℃. The column temperature was programmed raised. The carrier gas was nitrogen and the solvent was 20% - 50% dimethyl sulfoxide. **Results** The standard curve were linear for each solvents in the range of each consistency. The average recoveries were all more than 75%. **Conclusion** This method is simple, rapid and precise; it is suitable for measurement of residual solvents in macroporous resin extracts.

Key words head-space injecting capillary gas chromatography; extract of epimedii herba; extract of Gardeniae; HP; multiresidue determination

中药提取物目前被广泛应用于药品以及保健食品中, 其在提取过程中经常使用大孔树脂对样品进行提取、精制, 根据国家食品药品监督管理局有关规定, 均应对提取物中因使用大孔树脂而可能引入的残留溶剂进行检查, 并对其残留量加以控制; 本文对淫羊藿、栀子等 3 个经大孔树脂提取后得到的中药提取物应用顶空气相色谱法进行了残留溶剂的

测定。

淫羊藿主要化学成分为黄酮类化合物, 对预防和治疗骨质疏松有明显的效果, 其水提液经过大孔树脂纯化, 得到淫羊藿提取物; 栀子为中药新药醒脑滴丸的处方组成之一, 主要用于脑中风的预防, 经大孔树脂纯化得到其提取物; HP 为中国医学科学院药物研究所近年来研究的中药提取物, 其主要用于肾

* 通讯作者 Tel: (010) 84738645, E-mail: dushouying@263.net

功能衰竭的治疗,前期临床研究结果表明其疗效肯定,安全、无明显毒副作用。我们参考有关文献^[1-4],建立了同时测定大孔树脂提取物中乙醇、正己烷、苯、甲苯、甲基环己烷、二甲苯、苯乙烯、二乙烯苯残留有机溶剂含量的顶空气相色谱法。参考 ICH 及《中国药典》2005 年版关于残留溶剂的有关规定^[5,6],制定各溶剂的限度为:本品 1 g 中含乙醇不得过 200 μg,含苯不得过 2 μg,含正己烷、甲苯、甲基环己烷、二甲苯、苯乙烯、二乙烯苯不得过 20 μg。根据该中药提取物溶解特征,分别选用 20% 二甲基亚砜、50% 二甲基亚砜为溶媒,采用外标法进行试验,结果表明各组分的分离度、重现性良好,试验方法合理,简单易行,测定结果准确可靠,可作为上述各提取物中乙醇、正己烷、苯、甲苯、甲基环己烷、二甲苯、苯乙烯、二乙烯苯残留溶剂的有效测定方法。

1 仪器与试剂

Agilent 6890N 气相色谱仪、Agilent 7689E 顶空进样装置配有 Agilent 操作控制及积分软件; AND HA-202M 电子分析天平。

乙醇(北京益利精细化学品有限公司,批号为 20070728),正己烷(北京化学试剂公司,批号为 070508),苯(北京化学试剂公司,批号为 40002694),甲基环己烷(上海试剂一厂,批号为 97-03-01),甲苯(北京化学试剂公司,批号为 20060628),二甲苯(北京化学试剂公司,批号为 20060805),苯乙烯(北京化学试剂公司,批号为 070508),二乙烯苯(Fluka 批号为 1300998 23906216),二甲基亚砜(天津市福晨化学试剂厂,批号为 20070615、20071105)均为色谱纯。

样品为淫羊藿提取物(批号为:080110-1、080110-2、080110-3),栀子提取物(批号为:080901、080902、080903),由北京中医药大学提供;HP(批号为:0510201、051202、051203),由中国医学科学院药物研究所提供。

对照溶液的配制:取色谱纯乙醇、正己烷、苯、甲苯、甲基环己烷、二甲苯、苯乙烯、二乙烯苯适量,分别精密称定,至同一量瓶中,加 50% 二甲基亚砜溶解并稀释制成每 1 mL 约含苯 0.8 μg,含正己烷、甲苯、甲基环己烷、二甲苯、苯乙烯、二乙烯苯 8 μg,乙醇 80 μg 的均匀溶液作为对照溶液。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 采用色谱柱为 DB-1 交联毛细管柱(60m × 0.32mm, 1μm),以氮气为载气,氢火焰离

子化检测器,进样口温度为 180℃,检测温度 250℃。柱温采用程序升温:40℃保持 6 min 后以 8℃·min⁻¹升至 150℃,保持 5 min,流速为 2.5 mL·min⁻¹。顶空进样(90℃预热 15 min),进样体积为顶空瓶上部气体 1 mL,分流比为 1:5。

2.2 分离度试验 精密量取对照溶液 1.0 mL 于顶空瓶中,按上述方法进行测定,记录色谱图,见图 1。乙醇、正己烷、苯、甲苯、甲基环己烷、二甲苯、苯乙烯、二乙烯苯的分离度均大于 1.5。取对照溶液连续进样 6 次,所得待测各溶剂峰面积的相对标准偏差均小于 5.0%,符合《中国药典》2005 年版二部的相关规定。

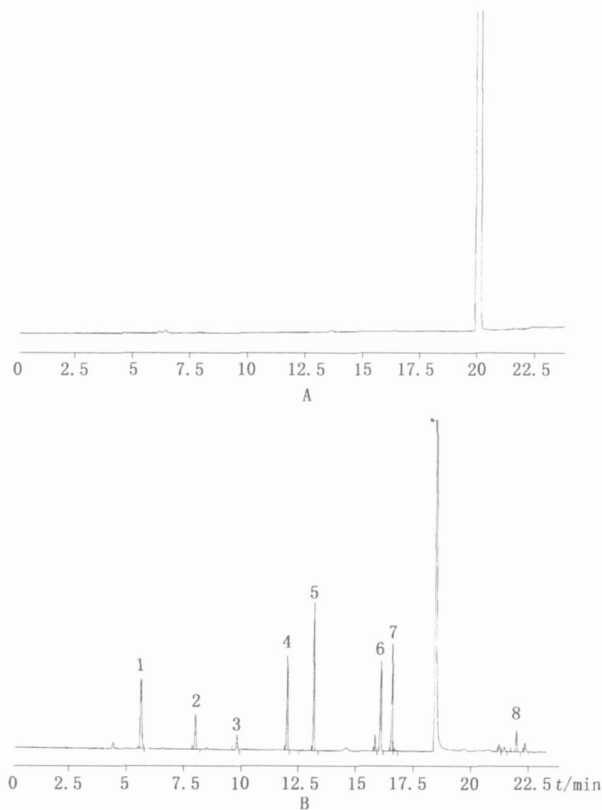


图 1 空白溶液(A)、对照溶液(B)色谱图
Fig 1 GC chromatograms of blank solution(A), reference solution(B)
1. 乙醇(ethanol) 2. 正己烷(hexane) 3. 苯(benzene) 4. 甲苯(toluene) 5. 甲基环己烷(methylcyclohexane) 6. 二甲苯(xylene) 7. 苯乙烯(styrene) 8. 二乙烯苯(divinylbenzene)

2.3 线性范围及标准曲线 精密称取苯 20.0 mg 于 10 mL 量瓶中,以二甲基亚砜液稀释至刻度摇匀,作为苯储备液;精密量取苯储备液 1.0 mL、乙醇 200.0 mg、正己烷、甲苯、甲基环己烷、二甲苯、苯乙烯、二乙烯苯 20.0 mg 置同一 25 mL 量瓶中,以二甲基亚砜液稀至刻度摇匀,作为标准曲线储备溶液。精密量取该溶液 3.0 mL 置 100 mL 量瓶中加 50%

二甲基亚砷溶液稀释至刻度, 摇匀, 作为标准曲线溶液。按比例精密稀释成不同浓度标准溶液 7 瓶, 照“2.1”项下方法进行测定, 记录色谱图, 通过积分确定峰面积, 以浓度为横坐标, 以峰面积为纵坐标, 进行线性回归。结果见表 1。

表 1 线性范围和回归方程

Tab 1 Linear range and regression equation

组分 (component)	回归方程 (regression equation)	r	线性范围 (linear range) / μg·mL ⁻¹
乙醇 (ethanol)	$A = 2.25 \times 10^4 + 6.85C$	0.9995	25.0~225.0
正己烷 (hexane)	$A = -7.38 \times 10^4 + 2.693C$	0.9982	2.5~20.0
苯 (benzene)	$A = 2.96 + 1.09 \times 10^2 C$	0.9997	0.20~2.01
甲苯 (dimethyl benzene)	$A = 4.64 \times 10^4 + 1.03 \times 10^2 C$	0.9987	2.5~20.0
甲基环己烷 (methyl cyclohexane)	$A = -7.59 \times 10^4 + 9.65 \times 10^2 C$	0.9989	2.5~20.0
二甲苯 (dimethyl benzene)	$A = 4.12 \times 10^4 + 9.4 \times 10^2 C$	0.9983	2.5~20.0
苯乙烯 (cinnaene)	$A = 3.34 \times 10^4 + 6.38 \times 10^2 C$	0.9994	2.5~20.0
二乙烯苯 (divinyl benzene)	$A = 4.50 \times 10^4 + 3.26 \times 10^2 C$	0.9978	2.5~20.0

2.4 最小检测限 按照信噪比为 3:1, 本方法溶液中乙醇、正己烷、苯、甲苯、甲基环己烷、二甲苯、苯乙烯、二乙烯苯的最小检测限分别为 2.72, 0.22, 0.03, 0.03, 0.28, 0.33, 0.03, 0.31 μg·mL⁻¹。

2.5 精密度试验 精密量取对照溶液各 1.0 mL, 置 6 个顶空瓶中, 照“2.1”项下方法测定, 根据乙醇、正己烷、苯、甲苯、甲基环己烷、二甲苯、苯乙烯、二乙烯苯的峰面积计算 RSD% 分别为 2.69%, 1.96%, 2.51%, 2.53%, 2.07%, 2.66%, 2.39%, 3.00%, 均小于 5.0%。

2.6 回收率试验 分别精密称取淫羊藿提取物、栀子提取物以及 HP 各一批供试品, 各 120 mg 6 份于 6 个顶空瓶中, 分别加入对照溶液 1 mL 充分混匀, 照“2.1”项下方法进行测定, 通过积分确定其峰面积, 按外标法计算试样中乙醇、正己烷、苯、甲苯、甲基环己烷、二甲苯、苯乙烯、二乙烯苯的平均回收率, 见表 2。

表 2 各提取物的平均回收率 (%)

Tab 2 Average recoveries of macroporous resin extracts

	淫羊藿提取物 (extract of Epimedium heba)		栀子提取物 (extract of Gardenia)		HP
乙醇 (ethanol)	97.4	(1.8)	98.8	(1.6)	96.8 (3.7)
正己烷 (hexane)	80.3	(3.7)	83.4	(1.8)	76.8 (2.6)
苯 (benzene)	87.2	(2.3)	88.9	(1.9)	84.0 (2.5)
甲苯 (dimethylbenzene)	89.3	(2.2)	90.2	(2.0)	84.4 (2.5)
甲基环己烷 (methylcyclohexane)	88.1	(2.7)	92.3	(1.6)	80.9 (3.0)
二甲苯 (dimethylbenzene)	81.3	(2.8)	83.6	(3.0)	77.6 (3.4)
苯乙烯 (cinnaene)	82.2	(2.9)	84.8	(2.1)	78.4 (4.0)
二乙烯苯 (divinylbenzene)	80.3	(4.1)	83.1	(3.6)	73.5 (4.8)

注 (Note): 括号内为 RSD% 值 (Brackets values for the RSD%)

2.7 样品测定 分别精密称取淫羊藿提取物、栀子提取物以及 HP 各 3 批供试品各约 400 mg 分别于顶空瓶中, 加入 20%~50% 二甲基亚砷溶液 1.0 mL 充分混匀, 照“2.1”项下方法进行测定, 9 批供试品中乙醇均低于限度要求, 未检出正己烷、苯、甲苯、甲基环己烷、二甲苯、苯乙烯等有机溶剂残留, 结果符合规定。

3 讨论

3.1 预热温度及时间的选择 本试验根据样品的热稳定性情况分别选择了在 60, 70, 80, 90, 100 °C 条件下预热, 经过比较在温度相对较低的条件下, 样品的回收率较低, 且对照溶液中沸点较高的组分响应信号较低, 而过高的温度对于样品的稳定性以及低沸点的溶剂也会造成一定影响; 而后, 我们对预热时间进行了选择, 分别比较了预热 5, 10, 15, 20, 30 min 时进行测定, 开始, 峰面积随着时间的增加, 增加明显, 10 min 后, 增加变得缓慢, 15 min 时, 各峰面积与预热 30 min 时基本一致或更大, 最终我们选择 90 °C、预热 15 min 作为预热条件。

3.2 程序升温的选择 经过比较本试验要检测的各有有机溶剂的沸点以及极性, 采用较低的温度, 使沸点较低的乙醇等溶剂在该条件下出峰, 然后以较小的升温速率升至较高温度, 并保持一定时间, 以保障后面出峰的溶剂也能得到较好的分离, 且溶媒二甲基亚砷的出峰也不影响沸点较高的苯乙烯、二乙烯苯的分离。

3.3 溶媒的选择 根据上述 3 种提取物的溶解特性, 我们首先选择了水作为溶媒, 在测定过程中发现以水作为溶媒时各溶剂的出峰面积不稳定, 且对于沸点较高的苯乙烯、二苯乙烯较难检测出来; 然后我们选择二甲基亚砜、N, N-二甲基甲酰胺作为溶媒, 因所称取的提取物相对较多, 不能使其完全溶解, 使测定结果存在一定的偏差, 且二甲基甲酰胺的出峰时间与被测组分甲苯出峰时间接近, 存在干扰, 经改变程序升温后分离度仍达不到要求。随后, 我们分别试验了 20%, 50%, 80% 以及 100% 二甲基亚砜作为溶媒, 通过比较最终分别选择了 20% 的二甲基亚砜溶解淫羊藿提取物及栀子提取物, 50% 的二甲基亚砜作为溶媒, 得到了较为满意的效果。

3.4 关于定量方法的选择 对于残留溶剂的测定目前大部分研究中使用的方法为内标法, 本试验在研究过程中曾试用过甲醇、二氧六环等多种溶剂作为内标物质, 但由于多检测的溶剂较多, 在测定过程中内标物质与被检测的溶剂出峰存在一定的干扰, 且分离度不能达到要求, 故选择了外标法作为测定方法。

3.5 被测溶剂的出峰与计算 在所测的 8 种有机溶剂中, 二甲苯具有 3 个异构体, 而二乙烯苯具有 3 个异构体 (GC 含量 80%) 及 3-乙基苯乙烯混合物 (Fluka 试剂手册), 为多种异构体比例固定的混合物, 故在色谱图中分别表现为 3 个峰和 4 个峰, 在计算峰面积的时候均以峰面积的总和作为上述两种溶剂的峰面积进行计算。

3.6 关于回收率 在本方法回收率的测定过程中, 由于所称取的样品较多, 且使用的溶剂为 1.0 mL, 测得的回收率结果偏低, 但均大于 70%。分析其原因, 可能主要为样品对所测定的溶剂存在一定的吸附作用, 在提高预热温度、延长预热时间后有一定改善, 但考虑到样品的稳定性情况及残留溶剂的测定为半定量方法, 故未对测定条件做进一步修改。

3.7 结语 大孔树脂提取为中药提取中经常使用

的提取方式之一, 国内生产大孔树脂的厂家较多, 质量参差不齐, 故需要对采用此方法提取的中药提取物进行苯、二乙烯苯等 7 种溶剂的测定; 因中药在提取、纯化过程中通常使用乙醇作为提取剂, 故本检测方法也对乙醇的残留进行了考察。本实验建立的顶空气相色谱法, 经上述方法学考察, 结果表明该方法准确、可靠, 可用淫羊藿提取物、栀子提取物以及 HP 中残留溶剂的测定; 由于所选择的提取物有一定的代表性, 且根据提取物的不同溶解特性选择了不同的溶媒进行溶解、测定, 对于大孔树脂提取物中残留溶剂的检测具有一定的参考价值。

参考文献

- 1 LILi-m in(李丽敏), QIAN Da-gong(钱大公), WANG Ke(王珂), et al Headspace gas chromatographic determination of macroporous resin residues in leaves saponins of *Panax notoginseng* (顶空气相色谱法测定三七叶中大孔树脂有机溶剂残留物). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2007, 27(5): 738
- 2 YANG Ling(杨玲), WANG Ying-feng(王英峰), GUO Xue-qing(郭雪清), et al Headspace-GC analysis of benzene series residues of D-101 macroporous resin in *Scutellaria baicalensis* G. extracts (顶空气相色谱法检测黄芩提取物中的 D-101 大孔树脂有机溶剂残留物). *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2008, 28(5): 814
- 3 LIXian-yi(李仙义), YUAN Hai-long(袁海龙), LIU Yu-bo(刘玉波), et al Analysis of benzene series residues in *Potentilla anserina* L. extraction by Headspace-GC (蕨麻提取物中大孔树脂残留物的顶空进样法分析研究). *Lishizhen Med Mater Med* (时珍国医国药), 2004, 15(8): 484
- 4 LIXian-yi(李仙义), ZHANG Lei(张雷), YUAN Hai-long(袁海龙), et al Analysis of benzene series residues in *Scutellaria baicalensis* G. extraction by headspace-GC (顶空气相色谱法检测茵陈黄芩提取物中苯系列残留物). *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2003, 28(7): 672
- 5 ChP(中国药典). 2005. Vol III (二部): Appendix(附录) VIII P
- 6 ZHOU Hai-jun(周海钧). Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals Human Use Section (药品注册的国际技术要求). Beijing(北京): People's Medical Publishing House(人民卫生出版社), 2001. 343

(本文于 2009 年 3 月 23 日收到)