

顶空进样气相色谱法筛选并测定脉络宁注射液中有有机溶剂残留量

郭青¹, 伍乃英¹, 吴晓燕² (1. 江苏省食品药品检验所, 南京 210008 2. 南京中医药大学, 南京 210029)

摘要: 目的 筛选脉络宁注射液中残留有机溶剂, 并建立方法测定其残留量, 为质量评价提供依据。方法 采用顶空进样气相色谱法, 以键合聚乙二醇 (HP-INNOWAX) 毛细管柱和 5% 二苯基-95% 二甲基硅氧烷共聚物 (HP-5) 毛细管柱相互验证进行筛选, 以 HP-5 进行测定, 载气 N_2 , 流速 $4.0\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 恒流方式; 柱升温程序: 起始柱温 50°C ; 保持 5 min 以 $10^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ 升温至 150°C ; 进样口温度 150°C ; 检测器 (FID) 温度 250°C ; 尾吹 (N_2) $30\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。顶空进样瓶平衡温度 85°C , 平衡时间 20 min , 传输管温度 110°C , 进样环温度 105°C 。结果 79 批脉络宁注射液中筛查出 4 种溶剂, 乙酸乙酯在 14 批样品中未检出, 其余 65 批中为 $0.000\ 0\%$ ~ $0.000\ 7\%$, 乙醇为 $0.004\% \sim 0.049\%$, 甲醇为 $0.004\% \sim 0.018\%$, 丙酮为 $0.000\ 3\% \sim 0.002\ 7\%$ 。4 种溶剂在 $0.000\ 79 \sim 4.5\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好, r 均为 $1.000\ 0$ ($n = 7$); 检测限为 $0.032 \sim 0.079\text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, 定量限为 $0.090 \sim 0.198\text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$; 日内精密密度小于 3.0% ($n = 6$), 日间精密密度小于 9.1% ($n = 3$); 平均回收率为 $92.0\% \sim 110.9\%$ (RSD 为 $2.2\% \sim 5.7\%$, $n = 6$)。结论 所建立的方法准确、快速、灵敏, 测定结果较全面地反映了脉络宁注射液中有有机溶剂残留量状况, 为其质量评价提供了依据。

关键词: 有机溶剂残留量; 脉络宁注射液; 顶空进样气相色谱

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2011)04-0300-04

Screening and Analyses on the Residues of Organic Solvents in Mailuoning Injection by GC with Headspace Sampler

GUO Qing¹, WU Naiying¹, WU Xiaoyan² (1. Jiangsu Institute for Food and Drug Control, Nanjing 210008, China; 2. Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a method for analyzing on organic solvent residues in Mailuoning Injection, based on screening multi residues of solvents in order to give the quality evaluation of the injection. **METHODS** GC instrument coupled with headspace sampler was used. The separation were carried out on HP-5 column, based on screening results of dual columns of HP-INNOWAX and HP-5. A nitrogen flow rate was set at $4.0\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ in a constant flow mode, using an oven temperature program from 50°C (5 min) to 150°C at a rate of $10^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$. Injection inlet was 150°C and FID was 250°C and the make up was $30\text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. 1 mL was injected by headspace sampler in the split mode with the split ratio of 1:1. The headspace vials were balanced at 85°C for 20 min , the transfer line and sampling loop were set at 110°C and 105°C , respectively. **RESULTS** Ethyl acetate was undetected in 14 batches of samples and $0.000\ 01\% \sim 0.000\ 7\%$ in 65 batches, ethanol, methanol and acetone fell in the range of $0.004\% \sim 0.049\%$, $0.004\% \sim 0.018\%$ and $0.000\ 3\% \sim 0.002\ 7\%$, respectively. A good linear behavior was indicated by r value of $1.000\ 0$ ($n = 7$) in the concentration range from $0.000\ 79$ to $4.5\text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. The LODs and LOQs were $0.032 \sim 0.079$ and $0.090 \sim 0.198\text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, and interday and intraday precisions were below 3.0% ($n = 6$) and 9.1% ($n = 3$), respectively. The average recoveries were in the range from 92.0% to 110.9% , with RSDs of $2.2\% \sim 5.7\%$ ($n = 6$). **CONCLUSION** The developed method is accurate, rapid and sensitive. The results could provide a survey of the residues of organic solvents in Mailuoning Injection and a reference to the quality evaluation of the injection.

KEY WORDS residues of organic solvents; Mailuoning injection; GC/headspace sampler

中药注射液的质量与其临床用药安全密切相关, 脉络宁注射液由牛膝、玄参、石斛、金银花四味药组成, 用于血栓闭塞性脉管炎、静脉血栓形成、动脉硬化性闭塞症、脑血栓形成及后遗症等病^[1], 疗效优良, 临床使用量较大但也有一定的不良反应^[2], 因此需要对其质量安全性进行进一步评价。有机溶

剂对人体具有刺激、麻醉和中毒等危害, 依据《中国药典》二部^[3]规定, 生产和制备过程中涉及有机溶剂使用的原料药和制剂均应严格限制有机溶剂的残留量以保证用药安全。而药材提取物由于不可避免地使用有机溶剂, 也应严格控制有机溶剂残留量, 中药注射液的药材提取物中间体就更应严格控制。但

作者简介: 郭青, 女, 博士, 主任药师 研究方向: 中药质量标准 and 安全性研究 Tel (025) 86632807 E-mail guoqing850@yahoo.cn

• 300 • Chin Pharm J, 2011 February, Vol. 46 No. 4

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net 中国药学杂志 2011 年 2 月第 46 卷第 4 期

就目前的实际情况,《中国药典》2010年版一部仅对一种注射用单体原料规定了有机溶剂残留检查,3种注射用单体原料和提取物规定了树脂残留检查,对其他的中药提取物尚无有机溶剂残留限量规定^[4];另一方面,一些中药注射液生产厂家对药材提取物中间体中有机溶剂残留的内部控制也未能做到或做得不够,因而有必要对中药注射液成品中有机溶剂残留量进行考察。脉络宁注射液在四味药材的提取工艺中涉及乙酸乙酯和乙醇的使用,本实验采用顶空进样气相色谱法筛选了脉络宁注射液中的残留有机溶剂,并建立方法测定了摘自23个省份的79批样品中筛选出来的4种有机溶剂残留量^[58]。方法准确、快速、灵敏,测定结果较全面地反映了脉络宁注射液中有有机溶剂残留量的状况,为其质量评价提供了依据。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

HP-6890N 气相色谱仪及 ChemStation32 工作站, HP7694 E 顶空进样器(美国惠普);键合聚乙二醇毛细管柱(HP-INNOWAX, 30.0 m × 0.53 mm × 1.0 μm)(美国惠普), 5% 二苯基-95% 二甲基硅氧共聚物毛细管柱(HP-5柱, 30.0 m × 0.53 mm × 1.5 μm)(美国惠普)。

1.2 试剂

脉络宁注射液样品为独家生产,由各相应省食品药品监督管理局或食品药品检验所从23个省份抽取,共计79批;乙酸乙酯、丙酮、甲醇、乙醇均为分析纯;水为超纯水, *N,N*-二甲基甲酰胺为色谱纯(Sigma Aldrich 美国)。

2 实验方法与结果

2.1 色谱条件

分别采用以下弱极性和极性色谱柱二种分析系统进行筛选。

①弱极性色谱柱(HP-5)系统: HP-5 毛细管柱(30.0 m × 0.53 mm × 1.5 μm);柱温: 50℃, 保持 5 min, 再以 10℃·min⁻¹的速率升温至 150℃, 保持 5 min; 进样口温度 150℃; 检测器(FID)温度 250℃。分流进样, 分流比为 1:1; 载气: N₂, 流速 4.0 mL·min⁻¹, 恒流方式。

②极性色谱柱(HP-INNOWAX)系统: HP-INNOWAX 毛细管柱(25.0 m × 0.32 mm × 0.5 μm); 柱温: 50℃, 保持 6 min, 再以 8℃·min⁻¹的速率升温

至 120℃, 保持 10 min; 进样口温度 150℃; 检测器(FID)温度 240℃。分流进样, 分流比为 1:1; 载气: N₂, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 恒流方式。

最终确定以弱极性色谱柱系统进行残留量测定, 顶空进样, 顶空瓶平衡温度为 85℃, 平衡时间为 20 min, 传输管温度为 110℃, 进样环温度为 105℃。

2.2 溶液的配制

2.2.1 对照品溶液的制备 筛选用对照品溶液: 精密量取正己烷、二氯甲烷、氯仿、苯、正庚烷、甲苯、二甲苯、苯乙烯各 10 μL, 置 100 mL 量瓶中, 加 *N,N*-二甲基甲酰胺溶液稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液(1)。另精密量取甲醇、乙醇、丙酮、丁酮、异丙醇、正丙醇、乙酸乙酯、正丁醇各 10 μL, 置 100 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液(2)。

测定用对照品溶液: 量取甲醇、乙醇、丙酮、乙酸乙酯各 10 μL, 置 100 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀。

2.2.2 供试品溶液的制备 取样品 5 支混匀, 取混匀后溶液作为供试品溶液。

2.3 方法学验证

2.3.1 检测限和定量限实验 分别精密量取甲醇、乙醇、丙酮、乙酸乙酯各适量, 用水溶解并制成适当浓度的对照品溶液, 并用水逐级稀释, 取信噪比约为 3:1 和 10:1 时浓度的溶液, 按“2.1”项下弱极性色谱柱系统方法测定。结果检测限为: 甲醇 0.031 6 ng·mL⁻¹、乙醇 0.031 6 ng·mL⁻¹、丙酮 0.079 ng·mL⁻¹、乙酸乙酯 0.036 ng·mL⁻¹; 定量限为: 甲醇 0.158 ng·mL⁻¹、乙醇 0.198 ng·mL⁻¹、丙酮 0.158 ng·mL⁻¹、乙酸乙酯 0.09 ng·mL⁻¹。

2.3.2 线性关系考察 精密量取对照品混合溶液适量, 用水溶解并稀释制成梯度浓度的混合溶液, 按“2.1”项下弱极性色谱柱系统方法测定峰面积, 以浓度为横坐标, 峰面积的平均值为纵坐标, 绘制标准曲线, 计算回归方程及相关系数。结果见表 1, 4 种溶剂在 0.000 79~4.5 mg·mL⁻¹内线性关系良好, *r* 均为 1.000 0(*n* = 7)。

2.3.3 精密度实验 取对照品溶液, 按“2.1”项下弱极性色谱柱系统方法连续测定 5 次, 计算校正因子的 RSD。结果甲醇、乙醇、丙酮、乙酸乙酯校正因子的 RSD(*n* = 5)分别为 0.71%、0.96%、1.80%、2.67%。再精密量取同一批样品(批号 20090309) 5 mL, 精密加入低、中、高浓度分别为 0.01、0.1、1 μL·mL⁻¹的对照品混合溶液 5 mL, 摇匀, 每个浓度

表 1 有机溶剂线性关系考察结果

Tab 1 Linear test results of organic solvents

Organic solvents	n	Regression equation	r	Linear range /mg· mL ⁻¹
Methanol	7	y = 2 407. 5x - 8 095	1. 000 0	0. 000 79~ 3. 95
Ethanol	7	y = 4 808. 9x - 6 747	1. 000 0	0. 000 79~ 3. 95
Acetone	7	y = 12 873. 4x + 34 926	1. 000 0	0. 000 79~ 3. 95
Ethyl acetate	7	y = 26 632. 9x - 150. 399	1. 000 0	0. 000 90~ 4. 50

各配制 6 份, 按“2. 1”项下弱极性色谱柱系统方法测定, 每份每天测定一次, 外标一点法计算含量, 求得日内 RSD, 连续测定 3 d 求得日间 RSD。结果 4 种溶剂的日内精密度均小于 3. 0% (n= 6)、日间精密度均小于 9. 1% (n= 3)。

2. 3. 4 加样回收实验 精密量取甲醇、乙醇、丙酮、乙酸乙酯适量, 加水溶解并稀释制成浓度分别为甲醇 39. 5 μg· mL⁻¹、乙醇 395 μg· mL⁻¹、丙酮 3. 95 μg· mL⁻¹、乙酸乙酯 4. 5 μg· mL⁻¹的对照品混合溶液。取已测知各溶剂残留量的样品 (批号 20090335) (甲醇 0. 003 39%、乙醇 0. 030 02%、丙酮 0. 000 323 9%、乙酸乙酯 0. 000 308 1%) 6 份, 每份精密量取 0. 5 mL, 置顶空瓶中, 精密加入上述对照品混合溶液 0. 5 mL, 密封, 摇匀, 按 2. 1 项下弱极性色谱柱系统方法测定。4 种溶剂的平均回收率为 91. 97% ~ 110. 92%, RSD 为 2. 2% ~ 5. 7% (n= 6)。

2. 4 结果

精密吸取供试品溶液、对照品溶液 (1) 和 (2) 各 5 mL (筛选) 和 1 mL (测定) 至顶空瓶中, 气体进样 1 mL, 分别按“2. 1”项下极性和弱极性二种色谱柱系统方法记录色谱图进行筛选, 再按弱极性色谱柱系统方法进行测定, 按外标一点法计算, 结果如下。

2. 4. 1 筛选结果 对两个系统下得到的色谱图 (图 1) 中供试品与对照品的保留时间进行比对, 确定二种系统中共同检出的溶剂为乙醇、甲醇、乙酸乙酯、丙酮, 再结合生产工艺提供的信息, 最终确定供试品中需要控制的残留溶剂为乙醇、甲醇、乙酸乙酯、丙酮。

2. 4. 2 测定结果 79 批样品中 4 种有机溶剂残留量结果 (表 2): 甲醇为 0. 003% ~ 0. 014%, 乙醇为 0. 003% ~ 0. 039%, 丙酮为 0. 000 2% ~ 0. 002 1%, 乙酸乙酯在 14 批样品中未检出, 在 65 批样品中为 0. 000 02% ~ 0. 000 49%; 平均值 (n= 79) 分别为 0. 006% (RSD = 36. 75%), 0. 009% (RSD = 73. 21%), 0. 000 5% (RSD = 69. 86%), 0. 000 08% (RSD = 104. 48%)。

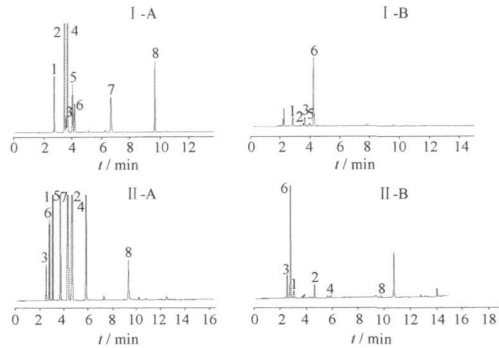


图 1 有机溶剂 GC 色谱图
I - HP-NNOWAX 柱; II - HP-5 柱; A - 对照品; B - 脉络宁注射液样品; 1 - 丙酮; 2 - 乙酸乙酯; 3 - 甲醇; 4 - 丁酮; 5 - 异丙醇; 6 - 乙醇; 7 - 正丙醇; 8 - 正丁醇

Fig 1 GC Chromatogram of organic solvents
I - column of HP-NNOWAX; II - column of HP-5 A - standards B - main injection 1 - acetone 2 - ethyl acetate 3 - methanol 4 - butanone 5 - isopropyl alcohol 6 - ethanol 7 - n-propanol 8 - n-butanol

表 2 79 批样品中 4 种有机溶剂残留量

Tab. 2 Residues of four organic solvents in 79 batches of the samples

Batches of the samples	Methanol %	Ethanol %	Acetone %	Ethyl acetate %
20090327	0. 006	0. 019	0. 000 5	0. 000 30
20090328	0. 006	0. 017	0. 000 4	0. 000 17
20090122	0. 007	0. 009	0. 000 6	0. 000 06
20090253	0. 004	0. 008	0. 000 6	0. 000 15
20081040	0. 005	0. 005	0. 000 4	0. 000 09
20081233	0. 005	0. 007	0. 000 7	0. 000 06
20081234	0. 006	0. 007	0. 000 4	0. 000 04
20090245	0. 005	0. 011	0. 000 6	0. 000 19
20090219	0. 007	0. 007	0. 000 7	0. 000 10
20081125	0. 005	0. 017	0. 000 4	0. 000 06
20081023	0. 006	0. 005	0. 000 6	0. 000 03
20080925	0. 005	0. 006	0. 000 5	0. 000 06
20090238	0. 006	0. 011	0. 000 6	0. 000 20
20090116	0. 006	0. 012	0. 000 5	0. 000 24
20081045	0. 005	0. 006	0. 000 5	0. 000 02
20081044	0. 006	0. 007	0. 000 6	-
20081016	0. 007	0. 008	0. 000 6	-
20081123	0. 006	0. 010	0. 000 5	-
20090245	0. 006	0. 011	0. 000 5	0. 000 16
20090242	0. 006	0. 011	0. 000 5	0. 000 27
20081026	0. 006	0. 005	0. 000 6	0. 000 02
200806043	0. 006	0. 005	0. 000 6	0. 000 04
20081215	0. 006	0. 007	0. 000 6	0. 000 05
20081101	0. 006	0. 022	0. 000 6	0. 000 04
20081010	0. 018	0. 008	0. 002 7	-
20081024	0. 005	0. 006	0. 000 5	0. 000 04
20090213	0. 005	0. 016	0. 000 4	0. 000 12
20081001	0. 004	0. 004	0. 000 5	-
20080813	0. 007	0. 005	0. 000 6	-
20081202	0. 006	0. 016	0. 000 5	0. 000 10
20090321	0. 005	0. 006	0. 000 3	0. 000 04
20081228	0. 008	0. 009	0. 000 8	0. 000 16
20090317	0. 005	0. 015	0. 000 6	0. 000 09
20081144	0. 005	0. 006	0. 000 5	0. 000 06

Batches of the samples	Methanol %	Ethanol %	Acetone %	Ethyl acetate %
20081147	0.005	0.007	0.0005	0.00008
20081229	0.006	0.009	0.0005	0.00007
20081129	0.006	0.025	0.0006	0.00007
20090324	0.005	0.010	0.0004	0.00024
20081147	0.006	0.008	0.0005	0.00009
20081218	0.005	0.007	0.0004	0.00010
20081235	0.006	0.010	0.0005	0.00009
20080913	0.005	0.005	0.0005	—
20080909	0.005	0.007	0.0005	0.00003
20081024	0.007	0.006	0.0006	—
20090326	0.006	0.032	0.0005	0.00049
20090335	0.004	0.038	0.0004	0.00039
20090348	0.005	0.017	0.0004	0.00008
20081017	0.004	0.005	0.0004	—
20090221	0.007	0.009	0.0006	0.00024
20081242	0.005	0.011	0.0004	0.00018
20081005	0.006	0.009	0.0006	—
20081239	0.008	0.008	0.0011	0.00060
20080926	0.005	0.005	0.0005	—
20090329	0.014	0.023	0.0030	0.00024
20090331	0.007	0.023	0.0006	0.00027
20090301	0.004	0.007	0.0004	0.00018
20081137	0.005	0.006	0.0004	—
200712253	0.006	0.006	0.0005	—
20090320	0.005	0.010	0.0004	0.00014
20081147	0.013	0.007	0.0017	0.00005
20090202	0.005	0.016	0.0006	0.00015
20090206	0.006	0.010	0.0005	0.00007
20081234	0.006	0.007	0.0005	0.00004
20081232	0.006	0.008	0.0006	0.00005
200811116	0.006	0.008	0.0009	0.00003
20090317	0.005	0.016	0.0004	0.00007
20090307	0.005	0.008	0.0005	0.00008
20090218	0.006	0.009	0.0005	0.00020
20090309	0.006	0.009	0.0005	0.00006
20090219	0.015	0.008	0.0021	0.00007
20080820	0.006	0.006	0.0006	—
20080935	0.007	0.006	0.0006	0.00001
20081223	0.009	0.008	0.0011	0.00070
20090342	0.007	0.049	0.0005	0.00037
20090314	0.007	0.010	0.0007	0.00015
20090336	0.007	0.039	0.0005	0.00034
20081125	0.005	0.008	0.0004	0.00002
20081245	0.009	0.010	0.0012	0.00006
20081214	0.005	0.011	0.0004	0.00050
Average	0.00627	0.01114	0.00064	0.00012
RSD	37.15%	73.21%	69.89%	117.2%

注：— 未检出

No. — undetected

3 讨论

3.1 顶空进样可排除脉络宁注射液一些成分对待测组分的干扰,而极性和弱极性二个系统的相互验证进一步确保了筛选结果的可靠性。所建立的HP-5柱测定方法对79批样品的测定结果可较全面地反映其有机溶剂的残留状况。参照《中国药典》

二部规定^[3],4种溶剂残留量均未超标,但甲醇和乙醇残留最高分别达0.014%和0.04%,值得关注。

3.2 脉络宁注射液在药材提取工艺中只涉及乙醇和乙酸乙酯的使用,但另外还检出丙酮和毒性更高的甲醇,检出率100%。由此表明,对中药注射剂中有机溶剂残留进行评价,仅局限在工艺使用的溶剂还不够,还应全面筛选以寻找出其他因素导致的残留溶剂,评估这些溶剂的风险,排查带来这些风险的原因。据文献,含有甲氧基化合物的样品在100℃以上的顶空温度下易降解产生甲醇^[6]。脉络宁注射液中不排除含有此类化合物,但85℃的顶空温度使化合物降解的可能性很小^[6]。另一种原因可能与大生产所用溶剂的纯度有关,甲醇和丙酮可能是乙醇和乙酸乙酯中的杂质,在提取过程中带入并残留。

3.3 注射剂尤其是静脉滴注用注射剂,应该有比口服药更严格的有机溶剂残留量要求,而国家在这方面尚无规定,除化合物单体外,中药提取物均未强制检查有机溶剂残留^[4]。此外,一些中药注射剂生产厂家在药材提取物中间体的内控标准中并未制定该项检查。因此,为确保用药安全,建议国家在基础研究成熟的基础上,制定中药注射剂中有机溶剂残留限量规定,同时呼吁中药注射剂生产厂家完善药材提取物中间体内控标准,增加有机溶剂残留量检查。

REFERENCES

- [1] Drug Specification Promulgated by the Ministry of Public Health Chinese Patent medicines Vol 18(卫生部药品标准·中药成方制剂第18册)[S]. 1998 244-246.
- [2] CHEN A Q, JIA P S, LI L. Analysis of adverse reactions to Mairioning injection in 70 cases[J]. *Adv Drug React J* (药物不良反应杂志), 2003, 5(3): 162-165.
- [3] Ch.P (2010) Vol III (中国药典 2010年版·二部)[S]. 2010 Appendix 61-65.
- [4] Ch.P (2010) Vol I (中国药典 2010年版·一部)[S]. 2010 365-397.
- [5] ZHANG W J. To review the measurement of residual solvents in drugs[J]. *Mod Instr* (现代仪器), 2004, 10(3): 10-14.
- [6] QIN L, HU C Q, LIU W Y. Research on the interference in determination of residual solvents in pharmaceuticals by headspace gas chromatography[J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2005, 25(7): 823-826.
- [7] SU Y, ZHANG L. Identification and determination of residual solvents in amoxicillin sodium and potassium clavulanate[J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2007, 42(12): 955-956.
- [8] WANG SM, QIAN D G, WANG K, et al. Determination of the residues from microporous resin in traditional Chinese medicine extract by GC[J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2009, 44(1): 55-58.

(收稿日期: 2010-06-08)