

顶空气相色谱检测甘草苷中大孔吸附树脂残留物

赵海婷^{1,2}, 杨志欣², 吕邵娃², 李超生³, 董政起^{1*}

(1. 中国医学科学院药用植物研究所, 北京 100193; 2. 黑龙江中医药大学, 哈尔滨 150040;
3. 吉林省中医药科学院, 长春 130021)

[摘要] 目的:建立顶空气相色谱测定甘草苷中大孔吸附树脂有机残留物的含量。方法:采用 HP-INNOWAX 石英毛细管柱(0.32 mm×30 m,0.25 μm);以 *N,N*-二甲基甲酰胺为溶剂,对正己烷、丙酮、苯、甲苯、二甲苯、苯乙烯等残留物进行检测。结果:被测物质均能得到很好的分离,RSD 均 < 3.0%,峰面积与浓度线性关系良好,回收率为 93.2%~100.7%。结论:该方法稳定、准确,适用于应用 D-101 型大孔吸附树脂纯化后原料药中有机溶剂残留物的检测。

[关键词] 大孔吸附树脂;有机残留溶剂;顶空气相色谱法;甘草苷

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2015)06-0041-03

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2015060041

Gas Chromatography Detection of Organic Residues of Macroreticular Resin in Liquiritin

ZHAO Hai-ting^{1,2}, YANG Zhi-xin², LYU Shao-wa², LI Chao-sheng³, DONG Zheng-qi^{1*} (1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100193, China; 2. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China; 3. Academy of Traditional Chinese Medicine and Chinese Materia Medica of Jilin Province, Changchun 130021, China)

[Abstract] **Objective:** To build up a headspace method for detecting organic residues of D-101 macroreticular resin in liquiritin. **Method:** Using HP-INNOWAX capillary column (0.32 mm×30 m, 0.25 μm). The purpose was to detect hexane, acetone, benzene, toluene, xylene, styrene and other residues, using *N,N*-dimethyl formamide as solvent. **Result:** Analytes can be well separated, the RSD were less than 3.0%, peak area and concentration had a good linear relationship, the recovery was 93.2%-100.7%. **Conclusion:** This method is stable, accurate and suitable for use D-101 macroporous resin after the detection of residues of organic solvents.

[Key words] macroreticular resin; organic residues; gas chromatography; liquiritin

大孔吸附树脂是一种合成高分子分离材料,八十年代开始把大孔吸附树脂应用于分离提纯及结构分析^[1],在中药的分离纯化中起着重要作用。D-101 型大孔吸附树脂为苯乙烯骨架型树脂,其残留物和裂解产物苯、甲苯、二甲苯、苯乙烯、烷烃类等对人体都有不同程度的伤害^[2-4],因此其安全问题存在很多争论,为了保证药品的安全,国家食品药品监督管理局对大孔吸附树脂中有机残留物进行限量检测,对其残留量加以控制。

本文所测物质为经 D-101 型大孔吸附树脂分离纯化的甘草苷,系我们在研一类中药候选药物的原

料药。甘草苷存在于豆科植物甘草的干燥根及根茎中,属二氢黄酮类,具有护肝、补脾益气、润肺止咳和调和诸药等功效^[5]。对于利用 D-101 型大孔吸附树脂分离纯化甘草苷后有机残留物的研究,至今未见较详细报导,本研究建立了甘草苷经大孔吸附树脂纯化后有机残留物的详细测定方法。

顶空气相色谱法是一种重要的分离、分析方法,该技术已广泛用于石油、化工、医药卫生等许多领域。顶空气相色谱法采用气体进样,分析速度快,用于低沸点有机物的测定,具有操作简便、选择性强、共存物干扰少等优点,随着顶空进样技术的发展,采

[收稿日期] 20140409(002)

[基金项目] 国家“重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09103201-016)

[第一作者] 赵海婷,硕士,从事药剂学研究,Tel:010-57833253,E-mail:zhaohaiting2008319@163.com

[通讯作者] *董政起,博士,助理研究员,从事中药新剂型新技术及新药研发研究,Tel:010-57833253,E-mail:zqdong@implad.ac.cn

用该技术检测药物中残留溶剂的气相色谱方法备受关注^[6-7]。因此,本文采用顶空气相色谱进样法,对原料药甘草苷中 D-101 型大孔吸附树脂可能带来的有机残留物进行分析检测,为将甘草苷顺利开发成中药一类新药提供保障,也为使用 D-101 型大孔吸附树脂纯化的中药质量控制提供参考。

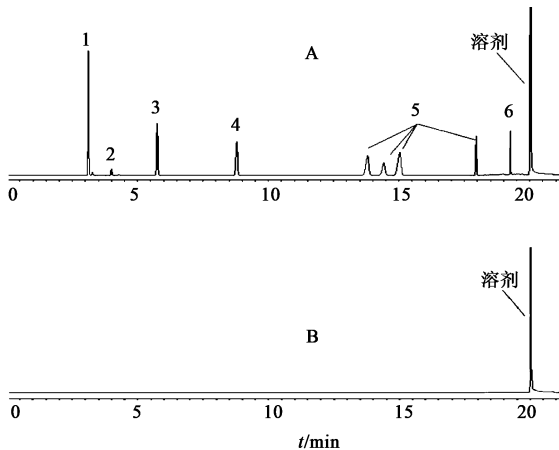
1 材料

1.1 仪器 6890 型气相色谱仪(含氢火焰离子化检测器,7694E 型顶空加热器,20 mL 顶空进样瓶,美国 Agilent 公司);HP-INNOWAX 石英毛细管柱(0.32 mm × 30 m, 0.25 μm),DB-1701 型石英毛细管柱(0.32 mm × 30 m, 0.25 μm),DB-5 石英毛细管柱(0.25 mm × 30 m, 0.25 μm)(美国 Agilent 公司)。

1.2 试药 甘草苷(中国医学科学院药用植物研究所自制纯度 ≥ 98%);N,N-二甲基甲酰胺(农残级别);水为超纯水;正己烷、丙酮、苯、甲苯、二甲苯、苯乙烯(色谱纯)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 HP-INNOWAX 石英毛细管柱(0.25 mm × 30 m, 0.25 μm);进样口温度 250 °C,检测器温度 260 °C,升温程序(初始温度 45 °C,保持 17 min,然后以 50 °C · min⁻¹ 升至 220 °C,保持 5 min),载气为高纯氮气(99.999 2%),流速 0.5 mL · min⁻¹。顶空条件:气化室温度 90 °C,平衡 30 min,进样体积 5 mL,分流比 1:1。理论板数按苯峰计算不低于 5 000。见图 1。



1. 正己烷;2. 丙酮;3. 苯;4. 甲苯;5. 二甲苯;6. 苯乙烯;溶剂. 40% N,N-二甲基甲酰胺

图1 对照品(A)及溶剂(B)的 GC
Fig.1 GC chromatogram of solvent

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称取正己烷、丙酮、苯、甲苯、二甲苯、苯乙烯适量,加 40% N,N-二甲基甲酰胺溶解,并定容至 100 mL 的量瓶中,分别

制得二甲苯质量浓度为 10 g · L⁻¹,其余 5 种物质质量浓度为 2 g · L⁻¹的储备液,密封备用。

2.3 供试品溶液的制备 称取甘草苷 0.5 g,精密称定。置 20 mL 顶空瓶中,精密加入 40% N,N-二甲基甲酰胺溶液 5.0 mL,加盖密封,超声处理(功率 250 W,频率 50 kHz)5 min,作为供试品溶液。

2.4 线性关系的考察 精密量取上述对照品贮备液 0.5,1.0,2.0,3.0,5.0 mL,分别置 100 mL 量瓶中,加 40% N,N-二甲基甲酰胺溶液稀释至刻度,混匀,即得。精密量取上述不同质量浓度的对照品溶液各 5.0 mL,分别置于 20 mL 顶空瓶中,加盖密封,于 90 °C 平衡 30 min。抽取顶空瓶上层气体 5.0 mL 进样,记录峰面积。以待测物浓度(X)为横坐标,平均峰面积(Y)为纵坐标,绘制标准曲线,6 种待测组分的回归方程,线性范围和相关系数见表 1。

表1 6种成分的线性回归方程

Table 1 Linear range of six components

成分	回归方程	线性范围/mg · L ⁻¹	r
正己烷	$Y = 16.064X - 34.756$	11.62 ~ 101.11	0.995 7
丙酮	$Y = 1.549X + 1.836$	10.11 ~ 101.77	0.994 8
苯	$Y = 12.844X + 21.913$	10.63 ~ 99.79	0.999 5
甲苯	$Y = 14.352X - 7.097$	10.59 ~ 101.55	0.994 3
二甲苯	$Y = 48.766X + 167.03$	8.01 ~ 100.12	0.990 9
苯乙烯	$Y = 6.6307X - 4.211$	9.19 ~ 99.31	0.999 3

2.5 精密度试验 取混合对照品溶液在上述色谱条件下重复进样 6 次,记录峰面积。结果正己烷、丙酮、苯、甲苯、二甲苯、苯乙烯峰面积的 RSD 分别为 2.1%, 2.2%, 1.6%, 1.0%, 2.5%, 2.9%。表明仪器精密度良好。

2.6 检测限和定量限 取混合对照品储备液适量,加 40% N,N-二甲基甲酰胺稀释成不同浓度的溶液,在上述色谱条件下进样测定,分别以基线噪声的 3 倍和 10 倍时的浓度为正己烷、丙酮、苯、甲苯、二甲苯和苯乙烯的检测限(LOD)分别为 0.14, 3.92, 0.47, 0.26, 0.93, 0.82 mg · L⁻¹;定量限(LOQ)分别为 0.43, 11.76, 1.41, 0.78, 2.78, 2.45 mg · L⁻¹, RSD 均 < 3%。

2.7 稳定性试验 取同一批对照品溶液,室温放置,于 0, 1, 5, 12, 24 h 分别进样,记录峰面积。结果正己烷、丙酮、苯、甲苯、二甲苯、苯乙烯的 RSD(n = 6)分别为 1.9%, 3.0%, 2.2%, 2.7%, 2.1%, 1.5%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性较好。

2.8 重复性试验 取甘草苷约 0.5 g 共 6 份,按

2.3 项下方法制备储备液,在 2.1 项的色谱条件下测定。结果正己烷、丙酮、苯、甲苯、二甲苯和苯乙烯均未在供试品中检测到。配制同一浓度对照品溶液 6 份,分别进样,各峰面积 RSD 均 <2%,表明方法的重复性较好。

2.9 回收率试验 精密称取甘草苷 0.25 g,置顶空进样瓶中,加入对照品溶液 5.0 mL 后,加入水至 5.0 mL,振摇混匀,按上述方法进行测定,6 种物质的平均回收率结果见表 3。

表 3 溶剂中 6 种残留加样回收率试验 (n=6)
Table 3 Recovery of 6 residue of solvent (n=6)

成分	加入量/mg	测得量/mg	平均回收率/%	RSD/%
正己烷	10	10.04	100.4	2.7
丙酮	10	10.07	100.7	3.0
苯	10	9.55	95.5	2.6
甲苯	10	9.32	93.2	2.8
二甲苯	50	49.05	98.1	2.3
苯乙烯	10	9.38	93.8	1.5

2.10 样品测定结果 按所选定条件测定了 10 批样品(批号 20121036, 20121037, 20121038, 20121039, 20121040, 20121041, 20121042, 20121043, 20121044, 20121045)中溶剂的残留量,测定结果表明,样品中均未检出正己烷、丙酮、苯、甲苯、二甲苯、苯乙烯,且无其他溶剂峰检出,样品均符合标准规定。

3 讨论

本研究对二甲基亚砜, *N,N*-二甲基甲酰胺, 40% *N,N*-二甲基甲酰胺 3 种溶剂进行了考察,二甲基亚砜, *N,N*-二甲基甲酰胺做溶剂时,峰型很差,并且有的溶剂并不能检出。参考有关文献[8-9],采用混合溶剂,在溶剂中加入水,会改善峰型和灵敏度,经过考察,40% *N,N*-二甲基甲酰胺能与测定峰完全分离,且无干扰,最后我们选择了 40% *N,N*-二甲基甲酰胺作为溶剂。

采用正文实验条件进行实验,比较 3 根极性不同的毛细管柱:① HP-INNOWAX 石英毛细管柱(0.32 mm × 30 m, 0.25 μm),② DB-1701 石英毛细管柱(0.32 mm × 30 m, 0.25 μm),③ DB-5 石英毛细管柱(0.25 mm × 30 m, 0.25 μm)。结果,对上述 6 种检测物质,HP-INNOWAX 石英毛细管柱在 20 min 内可以良好分离,而 DB-1701 石英毛细管柱色谱峰中杂峰较多,DB-5 石英毛细管柱未能使二甲苯

的 4 个色谱峰良好分离。因此,选用 HP-INNOWAX 石英毛细管柱作为本实验所选用色谱柱。

采用直接进样方式,分别使用 HP-INNOWAX, DB-1701, DB-5 石英毛细管柱进行实验,按照正文所述的实验条件,三者均未能将二甲苯很好的分离,且苯乙烯与溶剂峰相重叠,达不到分离的效果,因此采用顶空进样方式,6 种物质均能得到很好的分离,且峰型较好。

近年来,大孔吸附树脂在中药研发和生产中应用越来越广泛,但是树脂本身可能带来有害的残留溶剂。《中国药典》2010 年版二部对药品中常见残留溶剂的限度有严格的规定,本研究采用顶空气相色谱法对其系列残留物进行检测,从检测结果可见,甘草苷原料药及其样品中检测不到正文所述的残留溶剂,可能在实验过程中树脂中的残留物并未进入药物中,本研究为将其顺利开发成新药提供了基础。

[参考文献]

- [1] 刘玥. 大孔吸附树脂在中药提取纯化中的应用进展[J]. 世界中医药, 2013, 8(2): 232-234.
- [2] 岳春华, 李岳, 李顺祥, 等. 顶空气相色谱法测定骨碎补总黄酮中大孔吸附树脂残留物[J]. 中南药学, 2011, 9(2): 95-97.
- [3] 张旭, 王锦玉, 仝燕, 等. 大孔树脂技术在中药提取纯化中的应用及展望[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(6): 286-290.
- [4] 张亿, 朱蓉. 顶空毛细管气相色谱法测定西洛他唑中有机溶剂的残留量[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(7): 1026-1027.
- [5] 苏国林, 刘刚, 刘育辰, 等. 甘草苷的提取纯化方法和药理作用的研究进展[J]. 中国现代中药, 2011, 13(10): 48-51.
- [6] 毛威. 空气相色谱法测定盐酸安非他酮中的有机溶剂残留[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(2): 292-293.
- [7] 刘俭, 吴萍, 莫辉, 等. 顶空气相色谱法测定阿诺宁脂肪乳注射剂中间体中有机溶剂残留量[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(2): 294-296.
- [8] 常增荣, 傅欣彤, 刘颖. 顶空气相色谱法测定当药提取物中大孔树脂残留物[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(16): 153-155.
- [9] 梁春谊, 喻佳, 汪远超, 等. 顶空气相色谱法测定鸡骨草总黄酮碳苷提取物中大孔吸附树脂残留物[J]. 亚太传统医药, 2013, 9(9): 37-39.