

气相色谱法测定人参皂苷 R_{g1} 中的有机溶剂残留量

张建民¹, 张宇佳², 相莉², 陈少华², 郑稳生^{2*}, 王锦玉³

(1. 首都儿科研究所, 北京 100020; 2. 中国医学科学院北京协和医学院药物研究所药物传输技术及新型制剂北京市重点实验室, 北京 100050; 3. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

[摘要] 目的: 建立气相色谱法测定人参皂苷 R_{g1} 中有机残留量的方法。方法: 采用气相色谱法, FID 检测器, DB-624 (30 m × 0.32 mm, 0.25 μm), 载气为氮气, 柱温为恒温 50 °C, 进样口温度 200 °C, 检测器温度 200 °C, 以水为溶剂配制对照溶液及供试品溶液。结果: 在所考察的浓度范围内具有良好的线性, 乙醇的检测限为 1.0 μg·L⁻¹, 精密密度 RSD < 1.0%。平均回收率为 90% ~ 105%。结论: 经方法学验证, 该检测方法简便灵敏, 结果准确可靠, 适用于人参皂苷 R_{g1} 原料药中有机溶剂残留量的检测。

[关键词] 人参皂苷 R_{g1}; 有机溶剂残留量; 气相色谱

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)24-0118-03

[doi] 10.11653/syfy2013240118

Determination of Residual Solvents in R_{g1} by Gas Chromatograph

ZHANG Jian-min¹, ZHANG Yu-jia², XIANG Li², CHEN Shao-hua²,
ZHENG Wen-sheng^{2*}, WANG Jin-yu³

[收稿日期] 20130916(196)

[基金项目] 国家科技重大专项“重大新药创制”项目(2009ZX09301-005)

[第一作者] 张建民, 副主任药师, 从事医院制剂新药研发, Tel: 13910733577, E-mail: zjm051525@126.com

[通讯作者] * 郑稳生, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 从事药物传输技术及新型制剂, Tel: 13601084817, E-mail: zhengwensheng@imm.ac.cn

[参考文献]

[1] 罗布桑. 蒙药学[M]. 北京: 民族出版社, 1989: 321.
[2] 刘勇民. 维吾尔药志. 下册[M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 1999: 892.
[3] 中国科学院《中国植物志》编辑委员会. 中国植物志. 62卷[M]. 北京: 科学出版社, 1988: 313, 314.
[4] 杨红霞, 魏立新, 杜玉枝, 等. 不同海拔川西獐牙菜中药用成分的 HPLC 分析[J]. 中药材, 2010, 33(6): 867.
[5] 霍丽云, 王燕飞. 高寒藏药材-白花假龙胆药效成分的高效液相色谱测定[J]. 山东教育学院学报, 2005, 20(2): 86.
[6] 王秀梅, 巴根那, 白明纲. 高效液相色谱法测定肋柱花中獐牙菜苦苷的含量[J]. 内蒙古民族大学学报, 2007, 22(3): 320.
[7] 李冬鸣, 曾阳. 藏药川西獐牙菜人工栽培与野生品种有效成分比较研究[J]. 青海科技, 2008(1): 15.
[8] 丁兰, 谭桂山, 李福双, 等. 两种獐牙菜属植物中两种

苦苷的含量分析[J]. 中药材, 2008, 31(4): 533.
[9] 徐康平, 李福双, 谭健兵, 等. 高效液相色谱法测定川东獐牙菜属植物中多种成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(1): 14.
[10] 丁文雅, 张婷婷, 王强. 7种龙胆科蒙药药材中龙胆苦苷的含量测定[J]. 中药材, 2008, 39(1): 52.
[11] 张兴旺, 陶燕铎, 梅丽娟, 等. HPLC 测定 7 种龙胆科植物花中龙胆苦苷与獐牙菜苦苷的含量[J]. 中国野生植物资源, 2010, 29(2): 38.
[12] 胡杰, 陈刚, 田华咏, 等. 民族药獐牙菜生药学研究[J]. 中国民族医药杂志, 2010, 16(8): 44.
[13] 李福双, 徐康平, 谭健兵, 等. 高效液相色谱法测定川东獐牙菜中獐牙菜苦苷和去甲当药苷的含量[J]. 中南药学, 2003, 1(3): 141.
[14] 张元忠, 陈刚, 田华咏, 等. 显脉獐牙菜植物器官獐牙菜苦苷含量分布规律研究[J]. 中国民族医药杂志, 2007, 13(12): 34.

[责任编辑 顾雪竹]

(1. Capital Institute of Pediatrics, Beijing 100020, China;

2. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Beijing City Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Novel Formulations, Beijing 100050 China;

3. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for the determination of residual solvents in R_{g1} by GC.

Method: The detector was FID. The analytical column was DB-624 (0.32 mm × 30 m, 0.25 μm). The injector temperature was 200 °C, and the detector temperature was 200 °C. The column temperature was 50 °C. Nitrogen as the carrier gas and the water as solvent media. **Result:** It had a good linearity in the experimental concentration. The detection limit of ethanol was 1.0 ng · mL⁻¹. The RSD of precision was all less than 1.0%. The average recovery was 90% -105%. **Conclusion:** This method was simple, sensitive, accurate and can be used for the detection of residual solvents in R_{g1}.

[Key words] ginsenoside R_{g1}; residual solvent; gas chromatography

人参是一种名贵的药用植物,应用历史悠久,其主要活性成分为人参皂苷类化合物。其中,人参皂苷 R_{g1} 作为人参三醇类皂苷的主要代表,近年来得到广泛的研究。在临床上有增强性功能和雌激素样作用^[1]、免疫调节和抗炎作用^[2-4]、抗癌抗肿瘤作用^[5]。由于人参皂苷 R_{g1} 在提取过程中需使用乙醇为有机溶剂,产品中的有机残留量对人体有害,故应对有机溶剂残留量进行控制^[6-8],ICH 对药品中限制使用溶剂残留限量规定乙醇为 ≤0.5%。目前国内对其有机残留的研究未见报道,本文根据人用药品注册技术要求国际协调会(ICH)^[6]对有机溶剂残留量测定的指导原则进行研究,通过查询相关资料确立实验方法^[7-8]。

1 材料

Agilent 6890 气相色谱仪, FID 检测器,乙醇为色谱纯,中国医学科学院药物研究所植化室自制的人参皂苷 R_{g1} 原料。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 毛细管色谱柱 DB-624 (0.32 mm × 30 m, 0.25 μm), 检测器温度 200 °C, 进样口温度 200 °C, 载气为氮气, 顶空进样, 采用恒流模式, 分流比 20:1, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 氮气流速 45 mL · min⁻¹, 空气流速 450 mL · min⁻¹, 进样量 1 μL, 柱温为恒温 50 °C。Agilent 气相色谱工作站。理论塔板数不低于 10 000。

2.2 顶空条件 分别取对照品溶液和样品溶液 14 mL 于 20 mL 顶空瓶中, 密封垫轧盖密封, 于另一 GC 恒温箱中, 100 °C 恒温预热 15 min, 然后用气密针抽取 1 μL 顶空瓶气相部分注入色谱仪进行分析。

2.3 溶液的制备

2.3.1 对照品溶液的制备 精密称取色谱级乙醇 100 mg 于 100 mL 量瓶中用纯化水稀释至刻度, 摇匀, 作为储备液, 然后取储备液稀释 100 倍即得对照品溶液。过滤, 顶空进样。

2.3.2 样品溶液的制备 取人参皂苷 R_{g1} 原料置容量瓶中, 用水溶解稀释至刻度, 配制为 100 g · L⁻¹ 的溶液做为样品溶液, 振摇过滤, 顶空进样分析。

2.4 方法学考察

2.4.1 专属性考察 分别取对照品溶液和样品溶液, 按上述色谱条件和顶空处理, 样品进样检测, 结果见图 1 ~ 3。从图中可以看出, 乙醇的出峰位置在 2.34 min, 可以判定本方法对乙醇的测定适用。

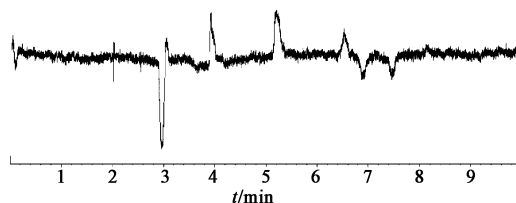


图1 空白溶剂液相色谱

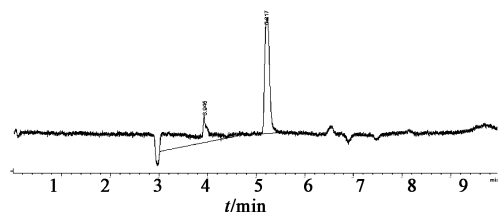


图2 乙醇对照液色谱图

2.4.2 线性关系及检测限、定量限 分别精密移取乙醇适量, 用水稀释制成每 1 mL 含乙醇的溶液, 浓度分别为 50, 10, 5.0, 1.0, 0.5, 0.05, 0.01 mg · L⁻¹, 分别过滤, 制备乙醇对照品溶液。顶空进样 1 μL, 测定峰面积, 依法进样 3 次, 依外标法对面积和浓度

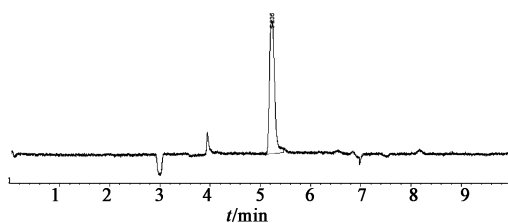


图 3 Rg1 样品溶液色谱图

之间进行线性回归,得到线性方程为 $Y = 2.171X + 0.8281$ ($r = 0.9999$) $0.01 \sim 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。结果表明,本品在 $0.01 \sim 50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 线性关系良好。

当信噪比 $S/N = 3$ 时,乙醇的最低检测限为 $1.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,当信噪比 $S/N = 10$ 时,乙醇的定量限为 $4.0 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.4.3 精密性实验、稳定性试验 取乙醇 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 对照品溶液同一试样,连续顶空进样 6 次,以峰面积计算精密性,计算乙醇峰面积的 RSD,分析结果;取乙醇对照品溶液,于 0,2,4,8,12 h 进样检测,计算稳定性。日内测定结果稳定,RSD 0.58%。日间测定,样品中乙醇的残留量基本不变,RSD 为 1.21%。稳定性实验结果,12 h 内乙醇的峰面积 RSD 0.79%。

2.4.4 加样回收率试验 取 3 份上述已知有机残留量的样品 5 mL 分别置 3 个 25 mL 量瓶中,分别加入 $600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙醇对照品溶液 3,2.5,2 mL,水溶解并定容至刻度,即得到回收率试验样品溶液,摇匀,过滤,顶空进样。以外标法计算乙醇的平均回收率,结果见表 1。

表 1 气相色谱法加样回收率试验

| 溶剂 | 试样 $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ | 加入量 $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ | 检出量 $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ | 回收率 /% | RSD /% |
|----|--|---|---|-----------|-----------|
| 乙醇 | 16 | 48.01 | 63.88 | 99.80 | |
| | | | 64.01 | 100.00 | |
| | | | 64.36 | 100.55 | |
| 乙醇 | 16 | 60.01 | 76.31 | 100.39 | |
| | | | 76.87 | 101.13 | 0.55 |
| | | | 76.09 | 100.11 | |
| 乙醇 | 16 | 72.01 | 87.94 | 99.92 | |
| | | | 87.23 | 99.11 | |
| | | | 88.21 | 100.23 | |

2.4.5 样品测试 称取 3 份不同批号的人参皂苷 Rg₁ 原料置量瓶中,用水溶解稀释至刻度,配制为 $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液,过滤,续滤液置顶空瓶中,加盖密封,按照上述方法进行检测。经检测,乙醇残留量均

符合规定,结果见表 2。

表 2 样品测定 ($n = 3$)

| 批号 | 乙醇 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (%) | 结果 |
|----|--|------|
| A | 21.33(0.053) | 符合要求 |
| B | 21.34(0.053) | 符合要求 |
| C | 21.34(0.053) | 符合要求 |

3 讨论

本方法选择使用 DB-624 毛细管柱(极性)检测,试验结果表明分离效果好,因此,测定方法中选择该色谱柱。

在实验的过程中,随着柱温升高,乙醇与样品的分离度均不符合要求,因此,柱温定为 $50 \text{ }^\circ\text{C}$,进样口温度为 $200 \text{ }^\circ\text{C}$,GC $100 \text{ }^\circ\text{C}$ 恒温预热 15 min,然后用气密针抽取 $1 \mu\text{L}$ 顶空瓶气相部分注入色谱仪进行分析,实验结果表明分离效果好。

[参考文献]

[1] Wang X, Chu S, Qian T, et al. Ginsenoside Rg₁ improves male copulatory behavior via nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway [J]. J Sex Med, 2010, 7(2 Pt 1):743.

[2] Sun J H, Song X M, Hu S H. Ginsenoside Rg₁ and aluminum hydroxide synergistically promote immune responses to ovalbumin in BALB/c mice [J]. Clin Vaccine Immunol, 2008, 15(2):303.

[3] Qu D F, Yu H J, Liu Z, et al. Ginsenoside Rg₁ enhances immune response induced by recombinant Toxoplasma gondii SAG1 antigen [J]. Vet Parasitol, 2011, 179(1/3):28.

[4] Rhule A, Rase B, Smith J R, et al. Toll-like receptor ligand-induced activation of murine DC2.4 cells is attenuated by Panax notoginseng [J]. J Ethnopharmacol, 2008, 116(1):179.

[5] Toh D F, Patel D N, Chan C Y, et al. Anti-proliferative effects of raw and steamed extracts of Panax notoginseng and its ginsenoside constituents on human liver cancer cells [J]. Chin Med, 2011, 6:4.

[6] 人用药物注册技术要求国际协调会. 残留溶剂指导原则 [M]. 北京:人民卫生出版社, 2000:236.

[7] 王尊文, 赵宗阁, 栾成章, 等. 顶空气相色谱法测定洛氟普啉中有机溶剂残留量 [J]. 药物分析杂志, 2010, 30(7):1245.

[8] 王坤, 翟宇, 王英华. 顶空毛细管气相色谱法测定苦参素中丙酮和乙醇残留量 [J]. 药物分析杂志, 2010, 30(7):1258.

[责任编辑 蔡仲德]