

## 气相色谱法测定葡萄内酯中的溶剂残留<sup>\*</sup>

★ 黎艳刚 张普照 陈海芳 王发英 魏玲 涂明珠 杨武亮\*\* (江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室 南昌 330004)

**摘要:**目的:建立葡萄内酯中3种有机溶剂残留测定方法。方法:采用毛细管气相色谱法,FID检测器,应用DM-WAX毛细管柱(30 m×0.25 mm×0.25 μm),载气为氮气,柱温采取程序升温,初始温度40℃,保持4 min,然后以40℃/min升至200℃,保持1 min,测定葡萄内酯中丙酮、甲醇和吡啶的残留量。结果:被测组分均能得到有效分离,在所考察的浓度范围内线性关系良好, $r=0.9995\sim0.9999$ ,平均回收率为96.25%~99.58%。结论:本方法灵敏、准确、可靠,可用于葡萄内酯中有机溶剂的检测。

**关键词:**气相色谱法;葡萄内酯;残留溶剂

**中图分类号:**R 927.2 **文献标识码:**A

果见表1。

表1 黄连及其酒制品的含量测定( $n=3$ ,%)

| 样品   | 盐酸小檗碱 | 盐酸药根碱 | 盐酸巴马亭 | 总碱    |
|------|-------|-------|-------|-------|
| 生黄连  | 6.75  | 0.53  | 1.72  | 9.00  |
| 酒炒黄连 | 7.74  | 0.55  | 1.90  | 10.19 |
| 酒蒸黄连 | 8.03  | 0.76  | 1.99  | 10.78 |
| 酒煮黄连 | 6.43  | 0.49  | 1.57  | 8.44  |

由表1可见,黄连生品中3种生物碱含量较酒炒,酒蒸低,但比酒煮的高,表明不同酒制方式对其含量有所影响。

### 3 讨论

(1)提取工艺的考察。在提取工艺的考察试验中,选择了盐酸-甲醇超声提取法、盐酸-甲醇回流法、盐酸-甲醇回流超声法、盐酸-水回流提取法,测定结果表明盐酸-甲醇回流超声法提取法的提取效果最好,且过程简便、提取时间短,重现性好,故在实验中选择盐酸-甲醇回流超声法提取。

(2)检测波长的选择。采用全波长扫描发现盐酸小檗碱、盐酸巴马亭和盐酸药根碱这3种生物碱在345 nm附近都有最大吸收,因此选择345 nm为检测波长。

(3)流动相的选择。实验比较了流动相乙腈:0.1%磷酸=28:72、乙腈:0.1%磷酸(含0.1%三乙胺)=25:75以及乙腈:0.05 mol/L磷酸二氢钾(用磷酸调pH3.0)=28:72,结果显示第一种流动相所

得待检色谱峰有严重拖尾现象,影响色谱峰的分离;第二种流动相所得色谱峰峰形对称性不好,且药根碱不能与其他成分完全分开;第三种流动相所得色谱峰峰形对称性及分离度均符合要求,其保留时间也符合分析要求,故选择乙腈:0.05 mol/L磷酸二氢钾(用磷酸调pH至3.0)=28:72,为本实验流动相。

(4)柱温的影响。30℃时测定的结果较好,温度过低,流动相易析出絮状物,对仪器有损。

(5)研究结果表明,黄连经不同酒制方式炮制后3种生物碱含量有不同程度的变化,其中酒炒和酒蒸后含量均比生品的高,而酒煮后比生品低,酒制黄连能使成分溶出更有利,但酒煮在高温条件下,可能有部分生物碱溶解在酒里随蒸气而损失掉,要根据临床实际需要来选择不同的炮制方式,更好地为临床服务。

(6)通过本试验,建立了黄连药材及其酒制品简便快速准确的含量测定方法,方法的建立将为今后黄连炮制机理的研究以及黄连饮片质量标准化奠定基础。

### 参考文献

- [1]郑虎占. 中药饮片应用标准化研究[M]. 北京:学苑出版社, 2004,1:110.
- [2]国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[S]. 北京:化学工业出版社,2005:21.

(收稿日期:2008-12-03)

\* 基金项目:国家自然科学基金项目(30660230)

\*\* 通讯作者:杨武亮,男,Tel:0791-7118657,E-mail:yangwuliang@163.com

## Determination of residual solvents in auraptene by gas chromatography

LI Yan-gang, ZHANG Pu-zhao, CHEN Hai-fang, WANG Fa-ying, WEI Ling, TU Ming-zhu, YANG Wu-liang

The Key Laboratory of Modern Preparation of TCM, Ministry of Education, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004

**Abstract:** Objective: To establish a method for determination of three residual solvents in auraptene. Methods: The determination was performed on DM-WAX (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm) capillary. Samples were separated with capillary column programmed increased temperature and analyzed with FID detector at 250 °C. The initial temperature was kept at 40 °C for 4 min, then the temperature was raised to 200 °C at the rate of 40 °C/min and kept for 1 min. Result: There was a good linearity ( $r = 0.9995 \sim 0.9999$ ) and three residual solvents were completely separated. The average recovery rate was in the range of 96.25 ~ 99.58%. Conclusion: The method is accurate and sensitive and can be used for determination of three residual solvents in auraptene.

**Key words:** Gas chromatography; Auraptene; Residual organic solvent

葡萄内酯是从柑桔属植物中分离得到的香豆素类化合物,据文献报道葡萄内酯具有显著的抗肿瘤、神经保护、抗炎和清除自由基等活性<sup>[1~6]</sup>。药理实验研究发现葡萄内酯具有促进胃肠动力作用,其作用机理为抑制乙酰胆碱酯酶,很可能成为新药候选化合物,但其在植物中的含量较低,影响对葡萄内酯的开发利用。结合手性合成的新研究成果,本室提出了全新的合成路线,以香叶醇和伞形酮为初始原料,通过氯代、成醚反应合成葡萄内酯。

由于在合成过程中使用了丙酮、甲醇、吡啶溶剂,上述溶剂可对人体产生危害,因此产品中溶剂的残留量应控制在人用药品注册技术规范国际协调大会(ICH)规定范围内。本实验参照《中国药典》2005年版二部<sup>[7]</sup>附录残留溶剂测定法的指导原则,采用毛细管气相色谱法,同时测定上述3种有机溶剂,方法简便、可靠。

### 1 仪器与试剂

岛津 GC-2010 气相色谱仪及工作站, FID 检测器, 色谱柱为 DM-WAX 毛细管柱 (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm)。SGN-300 高纯氮发生器(北京东方精华苑科技有限公司), SGP-2213 低噪音空气泵(北京东方精华苑科技有限公司)。燃气为高纯氢气 (99.999%)。样品葡萄内酯为本实验室合成, 共四批。丙酮、甲醇、吡啶、乙醇、氯仿均为分析纯。

### 2 方法与结果

#### 2.1 色谱条件

色谱柱为: DM-WAX 毛细管柱 (30 m × 0.25 mm × 0.25 μm); 检测器温度 250 °C; 进样口温度 200 °C; 柱温 40 °C, 保持 4 min; 再以 40 °C/min 的升温速率上升到 200 °C, 保持 1 min; 流速为 1 ml/min; 载

气为高纯氮气; 分流比为 60:1。色谱图见图 1。

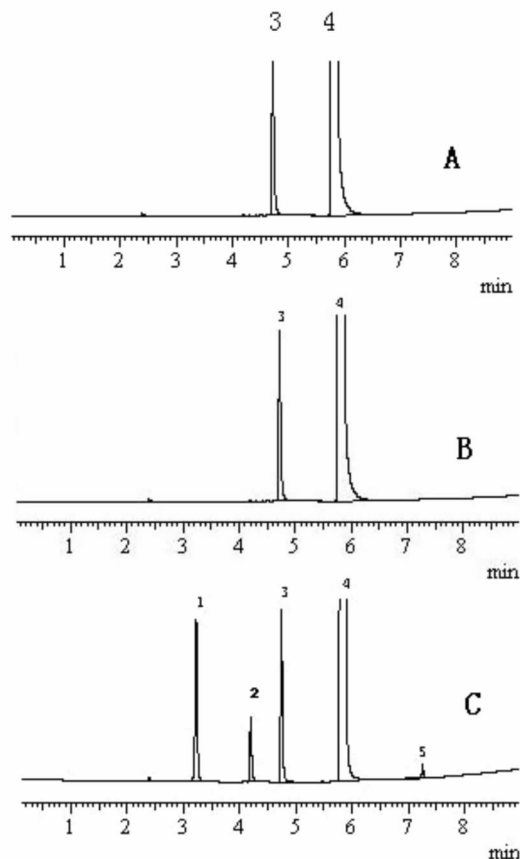


图 1 空白(A)、样品(B)及对照品(C)溶液色谱图

1: 丙酮 2: 甲醇 3: 乙醇(内标) 4: 氯仿(溶剂) 5: 吡啶

#### 2.2 溶液的制备

2.2.1 内标溶液的制备 精密称取乙醇适量, 用氯仿稀释成 1.5 mg/ml 溶液, 作为内标溶液。

2.2.2 对照品储备液的制备 分别精密称取丙酮、甲醇、吡啶各适量, 用内标溶液制成每 1 ml 中含丙酮 5 mg、甲醇 3 mg、吡啶 0.2 mg 的混合对照品储备

液。

### 2.3 精密度试验

取对照品储备液,重复进样5次,按“2.1”项下色谱条件测定峰面积,计算对照品溶液中丙酮、甲醇、吡啶与内标物峰面积之比,*RSD* 分别为2.03%、1.49%、2.15%。

### 2.4 线性关系考察

精密量取对照品储备溶液0.5、2.0、3.0、4.0、5.0和6.0 ml,分别置10 ml容量瓶中,加氯仿稀释至刻度。按“2.1”项下色谱条件测定峰面积,以对照品溶液峰与内标溶液面积之比为纵坐标(*Y*),对照品溶液浓度为横坐标(*X*),进行线性回归,结果见表1。

表1 回归方程和线性范围试验结果(*n*=6)

| 残留溶剂 | 回归方程                   | <i>r</i> | 线性范围/<br>mg·ml <sup>-1</sup> |
|------|------------------------|----------|------------------------------|
| 丙酮   | $Y = 0.6138X + 0.0264$ | 0.9999   | 0.25 ~ 3.0                   |
| 甲醇   | $Y = 0.3691X + 0.0131$ | 0.9998   | 0.15 ~ 1.8                   |
| 吡啶   | $Y = 1.1485X - 0.0053$ | 0.9995   | 0.01 ~ 0.12                  |

### 2.5 最低检测限

精密量取对照品储备液,逐步稀释,按“2.1”项下色谱条件,按*S/N* = 3 计算,丙酮、甲醇、吡啶的检测限分别为0.833、1.50、1.00 μg/ml。

### 2.6 回收率试验

精密量取对照品储备液4.0、5.0和6.0 ml分别置50 ml容量瓶中,加氯仿稀释至刻度,制得相当于检查限度80%、100%、120%对照品溶液3份。取供试品(已知溶剂含量)0.2 g,精密称定,共9份,分别精密加入上述3种浓度的对照品溶液2 ml(各3份,*n*=9),振摇溶解,按“2.1”项下色谱条件进行测定,计算回收率,结果见表2。

表2 不同检查限度回收率结果表(*n*=9,%)

| 组分 | 80%   |            | 100%  |            | 120%  |            |
|----|-------|------------|-------|------------|-------|------------|
|    | 回收率   | <i>RSD</i> | 回收率   | <i>RSD</i> | 回收率   | <i>RSD</i> |
| 丙酮 | 99.35 | 2.7        | 99.52 | 1.5        | 99.58 | 2.5        |
| 甲醇 | 96.25 | 1.9        | 96.92 | 1.4        | 96.84 | 2.5        |
| 吡啶 | 96.43 | 1.5        | 97.52 | 2.0        | 98.21 | 1.7        |

### 2.7 重复性试验

精密称取同一批样品约0.2 g,精密加入内标溶液2 ml使溶解,作为供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进行测定,连续三日重复测得样品中有机溶剂残留量,结果除甲醇外,其他两种溶剂均未检出残留量。甲醇的三日日间残留量结果分别为0.0017%、0.0016%、0.0016%,平均值0.0016%,*RSD* 为4.4%。

### 2.8 样品测定

取样品约0.2 g,精密称定,精密加入内标溶液

2 ml使溶解,作为供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进行测定,四批样品中丙酮、吡啶均未检出,结果见表3。

表3 样品测定结果(*n*=5,%)

| 溶剂残留 | 样品批号   |        |        |        | ICH 限度 |
|------|--------|--------|--------|--------|--------|
|      | 1      | 2      | 3      | 4      |        |
| 丙酮   | -      | -      | -      | -      | 0.5    |
| 甲醇   | 0.0011 | 0.0022 | 0.0015 | 0.0019 | 0.3    |
| 吡啶   | -      | -      | -      | -      | 0.02   |

注:-未检出。

## 3 讨论

### 3.1 样品中残留溶剂的确定

由于葡萄内酯在整个合成工艺过程中,只用到了丙酮、甲醇、丙酮以及石油醚四种有机溶剂,而石油醚在人用药品注册技术规范国际协调大会(ICH)规定为第四类溶剂(尚无足够毒理学资料),故本方法将工艺中协调大会(ICH)规定的应控制的溶剂均作为检测对象。

### 3.2 溶剂的选择

葡萄内酯易溶于甲醇、氯仿、乙酸乙酯等有机溶剂,微溶于水。以水为溶剂易粘附在毛细管柱内壁形成拖尾。经试验以氯仿为溶剂与其他有机溶剂无干扰,可取得较好分离效果。

### 3.3 内标的选择

同时考察了异丙醇、正丙醇、正丁醇和乙醇,乙醇能与诸待测溶剂较好分离,相同浓度下对照品溶液与供试品溶液中内标的峰面积基本一致,故选乙醇为内标。

### 参考文献

- [1] 杨秀伟,徐波,冉福香,等. 40种香豆素类化合物对人胃癌细胞株BGC和人肝癌细胞株BEL-7402细胞生长抑制活性的筛选[J]. 中国现代中药. 2006,8(11):7-10.
- [2] Takuji Tanaka, Kunihiro Kawabata, Mikio Kakumoto, et al. Immunomodulatory action of citrus auraptene on macrophage functions and cytokine production of lymphocytes in female BALB/c mice[J]. Carcinogenesis, 1997, 18(11):2155-2161.
- [3] Hideki Mori, Kenji Niwa, Qiao Zheng, et al. Cell proliferation in cancer prevention; effects of preventive agents on estrogen-related endometrial carcinogenesis model and on an in vitro model in human colorectal cells[J]. Mutation Research, 2001, 480-481:201-207.
- [4] Kyuichi Kawabata, Akira Murakami, Hajime Ohigashi. Citrus auraptene targets translation of MMP-7 (matrilysin) via ERK1/2-dependent and mTOR-independent mechanism[J]. FEBS Letters, 2006, 580:5288-5294.
- [5] Francesco Epifano, Gemma Molinaro, Salvatore Genovese, et al. Neuroprotective effect of prenyloxycoumarins from edible vegetables[J]. Neuroscience Letters, 2008, 443:57-60.
- [6] Kayo Kuroyanagi, Min-Sook Kang, Tsuyoshi Goto, et al. Citrus auraptene acts as an agonist for PPARs and enhances adiponectin production and MCP-1 reduction in 3T3-L1 adipocytes[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2008, 366:219-225.
- [7] 国家药典委员会编. 中华人民共和国药典2005年版(二部)[S]. 北京:化学工业出版社, 2005:附录VIII P.

(收稿日期:2009-06-04)