

顶空毛细管气相色谱法测定银杏叶片中大孔树脂残留物^{*}

梁文琳^{1,2}, 谢达温¹, 丁 岗¹, 孙永成¹, 李艳静¹, 寇俊萍², 段金廛³, 萧 伟^{1**}

(1. 江苏康缘药业股份有限公司 连云港 222001; 2. 中国药科大学中药复方研究室 南京 210009;
3. 南京中医药大学江苏省方剂研究重点实验室 南京 210046)

摘 要:目的:建立银杏叶片中9种大孔树脂有机溶剂残留物的检测方法。方法:采用顶空气相色谱法测定大孔树脂残留物正己烷、苯、甲苯、邻二甲苯、间二甲苯、对二甲苯、苯乙烯、二乙基苯和二乙烯苯的含量。结果:9种大孔树脂残留物得到较好的分离,呈良好线性关系(r 为0.999 2–0.999 8),精密度良好,平均回收率为80%–110%。结论:该方法准确快捷,灵敏度高,适用于银杏叶片中树脂残留物的检查。

关键词:银杏叶片 大孔树脂 有机溶剂 残留物 顶空气相色谱法

doi: 10.11842/wst.2014.08.015

中图分类号:R284.1

文献标识码:A

银杏叶片是治疗心脑血管疾病、抗衰老和抗痴呆的有效药物,生产厂家众多,销量大。银杏叶片由银杏叶提取物加辅料制成^[1],在银杏叶提取物的制备过程中使用了大孔吸附树脂,大孔吸附树脂为聚乙烯骨架,其残留物和裂解产物等都对人体有不同程度的伤害^[2,3]。近年来已有多篇文献报道了多种提取物及中成药中树脂残留的检测研究,何连军等^[4]使用顶空气相色谱法测定了银杏叶提取物中有机溶剂残留量。依据国家药监局《关于“大孔吸附树脂分离纯化中药提取液的技术要求”的补充说明》规定,应在成品中建立树脂残留物或裂解物的检测方法,2010年版《中国药典》已引入多种中成药树脂残留质控指标。

相对于银杏叶提取物,银杏叶片成品中添加了多种辅料,样品前处理方法和检测条件需进一步摸索。为保证银杏叶片用药安全,本文采用顶空气相色谱法,以正己烷、苯、甲苯、邻二甲苯、间二甲苯、对二甲苯、苯乙烯、二乙基苯和二乙烯苯为标准品,

建立了不同生产厂家银杏叶片中大孔树脂有机溶剂残留物的含量测定方法。

1 仪器与试剂

Agilent 6890 气相色谱仪(安捷伦科技有限公司),氢火焰检测器(hydrogen flame detector, FID)(安捷伦科技有限公司),Agilent 7694E 顶空进样器(安捷伦科技有限公司);Mettler toledo XS205 电子分析天平(梅特勒-托利多仪器上海有限公司);KH2200B 型超声清洗器(昆山市超声仪器设备有限公司)。

正己烷(山东禹王实业有限公司,批号:2012032801,纯度 $\geq 97\%$),苯(上海中试化工总公司,批号:20091025,纯度 $\geq 99.5\%$),甲苯(上海中试化工总公司,批号:20110537,纯度 $\geq 99.5\%$),间二甲苯(国药集团化学试剂有限公司,批号:20100414,纯度 $\geq 95.0\%$),对二甲苯(国药集团化学试剂有限公司,批号:T20080616,纯度 $\geq 98.5\%$),邻二甲苯(国药集团化学试剂有限公司,批号:T20100715,纯度 $\geq 98.0\%$),苯乙烯(上海凌峰化学试剂有限公司,批号:20120302,纯度 $\geq 99.0\%$),

收稿日期:2013-12-19

修回日期:2014-08-18

* 科学技术部国家科技支撑计划项目(2011BAI04B03):华东区中药材规范化种植及大宗中药材综合开发技术研究,负责人:段金廛。

** 通讯作者:萧伟,本刊编委,研究员级高级工程师,博士,主要研究方向:中药新药的研究与开发。

1,4-二乙基苯(阿拉丁试剂有限公司,批号:23589,纯度 $\geq 99\%$),二乙烯苯(SIGMA,批号:MKBC1238,纯度 $\geq 80\%$),N,N-二甲基甲酰胺(Dimethyl Formamide,DMF)(南京化学试剂有限公司,批号:12101611762),无水碳酸钠(Na_2CO_3)(上海凌峰化学试剂有限公司,批号:2013121),超纯水(自制)。

实验用银杏叶片均由市场购入,其中5批由康缘药业提供,包括:江苏晨牌药业股份有限公司(批号:111107)、深圳海王药业(批号:20120404)、广西益佰药业(批号:121201)、广东环球药业(批号:111202)、江苏扬子江药业(批号:11121021)、涿州东乐制药厂(批号:120901)、江苏润邦药业(批号:120902)、桂林兴达制药厂(批号:110901)、烟台荣昌制药(批号:120602)、德国威玛舒培药厂(批号:1710711)、江苏康缘药业(批号:110908、120507、120508、120509、120510)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

DB-wax 毛细管柱(30 m $\times$ 0.25 mm,0.25 μm);柱温为程序升温,起始温度为50 $^{\circ}\text{C}$,保持12 min,再以10 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速率升温至180 $^{\circ}\text{C}$;进样口温度200 $^{\circ}\text{C}$;检测器温度250 $^{\circ}\text{C}$;氢气:空气:氮气流量为40:400:40($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$)。载气为氮气,流速为1.5 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,分流比1:1。顶空分析条件:顶空平衡温度80 $^{\circ}\text{C}$,顶空平衡时间40 min。进样环温度110 $^{\circ}\text{C}$,传输线温度120 $^{\circ}\text{C}$,进样时间1 min,瓶增压时间0.5 min,定量环充样时间0.15 min。

2.2 标准品溶液的制备

精密称取苯、正己烷、甲苯、邻二甲苯、间二甲苯、对二甲苯、苯乙烯、1,4-二乙基苯和二乙烯苯适量置量瓶中,加DMF溶解并定容,制成每1 mL中分别含苯0.4 mg,含正己烷、甲苯、邻二甲苯、间二甲苯、对二甲苯、苯乙烯、1,4-二乙基苯和二乙烯苯各2 mg的溶液,作为标准品储备液。精密量取上述标准品储备液0.5 mL,置50 mL量瓶中,加DMF溶液稀释至刻度,再精密量取该稀释溶液2 mL,置50 mL量

瓶中,加0.5% Na_2CO_3 溶液稀释至刻度,摇匀,作为混合标准品溶液。精密吸取该混合标准品溶液5 mL置顶空瓶中,加盖密封。

2.3 供试品溶液的制备

取本品1片,除去包衣,研细,精密称定,置20 mL顶空瓶内,精密加入0.5% Na_2CO_3 溶液5 mL,密封,超声使其溶解,作为供试品溶液。

2.4 线性范围及标准曲线

精密量取上述标准品储备液2.5 mL,置50 mL量瓶中,加DMF溶液稀释至刻度。精密吸取上述稀释后的溶液各0.2、0.5、1、1.5、2、2.5 mL,置25 mL量瓶中,加0.5% Na_2CO_3 溶液稀释至刻度,摇匀,再分别精密吸取上述一系列混合对照品溶液各5 mL,置顶空瓶中,加盖密封,按“2.1”项下色谱条件进行检测,进样1.5 mL,以各溶液浓度为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线,进行线性回归。结果见表1。

2.5 精密度考察

精密量取标准品储备液0.5 mL,置50 mL量瓶中,加DMF溶液稀释至刻度,精密量取上述溶液5 mL,置50 mL量瓶中,加0.5% Na_2CO_3 溶液稀释至刻度,摇匀,精密吸取混合标准溶液5 mL置顶空瓶中,加盖密封,按“2.1”项下色谱条件进行检测,进样1.5 mL,重复进样6次,记录各峰的峰面积,计算RSD值。测得标准品溶液峰面积的RSD值分别为正己烷8.33%、苯4.17%、甲苯3.93%、邻二甲苯4.23%、间二甲苯3.97%、对二甲苯3.75%、苯乙烯3.22%、1,4-二乙基苯4.63%、二乙烯苯3.46%,均小于10%。

表1 各树脂残留物的回归方程及线性范围

溶剂	回归方程	相关系数 r	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
正己烷	$y=0.799\ 7x-0.166\ 7$	0.999 8	0.87–10.87
苯	$y=1.760\ 2x+0.568\ 8$	0.999 2	0.28–3.48
甲苯	$y=4.924\ 1x-1.184\ 2$	0.999 6	0.80–10.03
间二甲苯	$y=5.455\ 2x-1.418\ 2$	0.999 4	0.82–10.30
对二甲苯	$y=4.849\ 7x-1.000\ 6$	0.999 6	0.90–11.12
邻二甲苯	$y=6.441\ 0x-0.558\ 0$	0.999 6	1.18–14.70
苯乙烯	$y=4.270\ 4x-0.266\ 1$	0.999 8	0.81–10.07
1,4-二乙基苯	$y=5.176\ 2x-1.119\ 6$	0.999 3	0.85–10.62
二乙烯苯	$y=4.814\ 7x-1.134\ 7$	0.999 5	0.83–10.34

2.6 最低检测限考察

将 9 种溶剂的标准品溶液逐步稀释后 ,按“ 2.1 ”项下色谱条件进行检测 ,进样 1.5 mL ,直到信噪比为 3:1 为止 ,得到各对照品的检测限。结果最低检测限分别为 :正己烷 0.3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、苯 0.15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、甲苯 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、邻二甲苯 0.2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、间二甲苯 0.2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、对二甲苯 0.2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、苯乙烯 0.15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、1,4-二乙基苯 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、二乙烯苯 0.3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.7 回收率试验

取样品 1 片 ,除去包衣 ,研细 ,精密称定 ,置 20 mL 顶空瓶中 ,精密加入 3 个不同浓度 (8、4 和 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的混合标准品溶液各 5 mL ,平行 3 份 ,按“ 2.1 ”项下色谱条件进行检测 ,进样 1.5 mL ,以外标法计算回收率和相对标准偏差 ,结果见表 2。

2.8 专属性试验

同“ 2.2、2.3 ”项下制备供试品溶液和标准品溶液 ,并制备溶剂空白溶液 ,依次进样 ,结果显示溶剂对对照品和供试品溶液出峰无影响。

2.9 样品测定

按“ 2.3 ”项下供试品制备方法和“ 2.1 ”项下色谱条件 ,分别对市售 10 批不同厂家生产的银杏叶片样品和康缘药业生产的 5 批银杏叶片样品进行测定 ,色谱图见图 1。结果表明 ,15 批供试品中均未检出正己烷、苯、甲苯、二甲苯、苯乙烯、二甲基苯和二乙烯苯。

3 讨论

3.1 溶剂的选择

因银杏叶提取物在水中溶解度小 ,使用 DMF 和二甲基亚砜(DMSO)作为溶剂时 ,有一部分形成糊状悬浊液 ;考虑到片剂中使用淀粉为辅料 ,该成分与水相溶时加热会形成糊状 ,不能形成均一稳定的溶液 ,基质可能会对检测造成影响 ,因此 ,比较了丙酮、二氯甲烷、异丙醇和氢氧化钠水溶液对银杏叶片样品的溶解性。结果表明 ,样品在丙酮、二氯甲烷、异丙醇溶液中溶解度不佳 ,在 NaOH 和 Na_2CO_3 溶液中能够完全溶解 ,但以 10%NaOH 作为溶剂时溶剂峰会干扰标准品峰 ,而以 Na_2CO_3 溶液作为溶剂时不会干扰样品和标准品出峰。对不同浓度的 Na_2CO_3 溶液进行考察 ,最终确定 0.5% Na_2CO_3 溶液作为溶剂。

3.2 色谱柱的选择

实验考察了 DB-wax、HP-1701 和 HP-5MS 3 种不同极性的毛细管色谱柱对样品的分离度 ,结果显示只有 DB-wax 毛细管柱能够将间二甲苯与对二甲苯分离 ,最终确定色谱柱为 DB-wax 毛细管柱。

3.3 检测条件的确定

3.3.1 不同升温程序的选择

考察的物质中正己烷的沸点最低 ,为 69℃ ,选择柱温时应不低于此温度。考察了 40℃、50℃和 60℃作为起始温度 ,起始温度为 50℃时各峰均能稳

表 2 回收率实验考察结果

溶剂	回收率/%									平均值/%	RSD/%
	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
正己烷	90.0	99.2	98.2	99.3	95.7	93.0	76.9	90.5	105.5	94.3	8.09
苯	95.4	106.9	98.1	97.9	111.7	108.0	87.4	91.6	102.4	100.0	6.10
甲苯	95.6	103.7	97.5	94.5	107.1	105.7	84.6	90.4	98.0	97.4	6.15
间二甲苯	94.0	104.0	95.0	93.4	107.6	106.2	86.5	90.0	95.7	96.9	6.13
对二甲苯	95.5	101.6	95.3	93.0	106.8	105.4	84.3	89.3	97.1	96.5	6.12
邻二甲苯	99.2	108.4	100.7	90.8	102.8	101.5	90.5	93.5	98.6	98.4	5.26
苯乙烯	93.1	97.6	92.6	85.9	97.6	96.1	95.5	97.3	103.9	95.5	4.74
1,4-二乙基苯	89.0	96.9	90.1	93.4	107.4	107.4	87.0	93.8	99.5	96.1	6.41
二乙烯苯	90.1	93.4	89.0	91.6	102.4	102.4	88.8	89.6	95.1	93.6	4.21

定出峰,分离度均大于 1.5,最终选择 50℃作为起始温度。考察 8、10 和 20℃·min⁻¹ 3 种不同升温速率,当升温速率为 10℃·min⁻¹ 时,峰间距合理,分布均匀,最终选择升温速率为 10℃·min⁻¹。

3.3.2 载气流速的选择

载气流速在 1–2 mL·min⁻¹ 时峰形较好,未有拖尾峰。载气流速主要对出峰时间有影响,为得到最优色谱图,考察了 1、1.5 和 2 mL·min⁻¹ 3 种不同载气流速,最终选择载气流速为 1.5 mL·min⁻¹。

对于氢火焰离子化检测器,需要 N₂-H₂-Air 焰,点燃后应为富氧焰,即空气应过量,以保证氢气完全燃烧,3 种气体的最佳比例为 N₂:H₂=1:(0.85–1),Air:H₂=(6–8):1 或 Air 量更大。在此条件下,检测器灵敏度高、稳定性好,作出的定量校正因子可靠。实验选择的气流比例为氢气:空气:氮气流量=40:400:40 mL·min⁻¹。

3.3.3 进样口温度及检测器温度的选择

进样口温度要大于检测物质的沸点,保证完全汽化。待检测的物质中,沸点最高的物质为二乙烯苯,为 190℃,故选择进样口温度为 200℃。为了不使进入检测器的气体遇冷液化,检测器温度一般高于进样口温度,参考有关文献,选择检测器温度为 250℃。

3.3.4 不同顶空平衡条件的选择

结合标准品和样品的热稳定性,考察了 70℃、80℃、90℃不同顶空平衡温度对组分峰面积的影响,当加热温度为 80℃时样品中所有峰面积基本达到平衡状态,最终选择的顶空平衡温度为 80℃。在 80℃条件下分别考

察了 15、30、40、60 min 不同顶空平衡时间,平衡时间过短物质不能达到平衡状态,过长会影响顶空瓶的气密性,在 40 min 时峰面积已经接近最大,最终选择该时间作为顶空平衡时间。

3.4 检测结果

实验过程中发现对照品中苯(峰 2)的保留时间与样品中较高的峰(峰 10)的保留时间接近,在已优化的色谱条件下二者可实现基线分离(见图 2)。经与对照品对照,确定峰 10 为乙醇,这与在提取过程中使用乙醇是相符的。

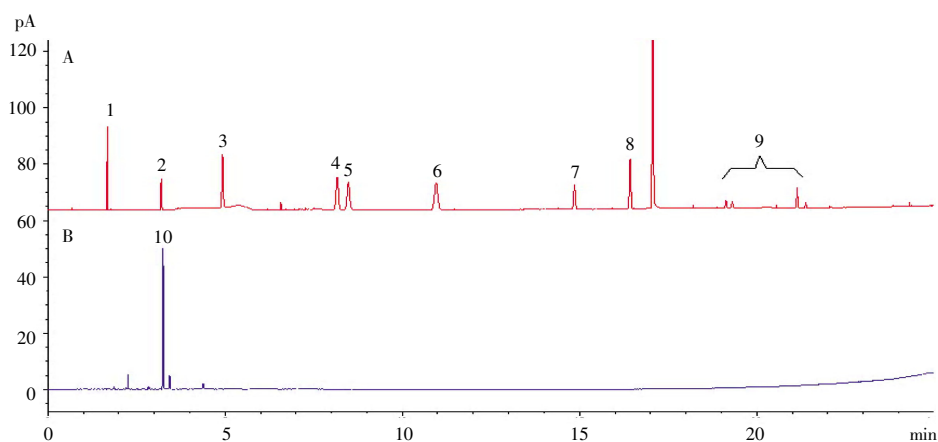


图 1 银杏叶片 GC 图

注:A.混合标准品,B.银杏叶片;1.正己烷,2.苯,3.甲苯,4.间二甲苯,5.对二甲苯,6.邻二甲苯,7.苯乙烯,8.1,4-二乙基苯,9.二乙烯苯,10.乙醇。

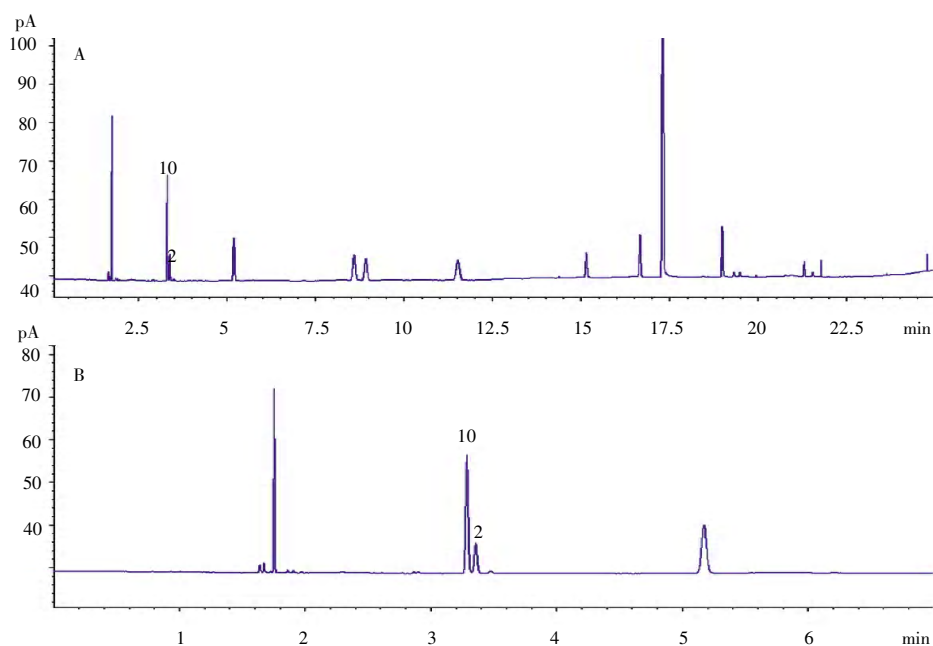


图 2 加入混合标准品的银杏叶片 GC 图

注:A.全图,B.10号峰和2号峰局部放大图;10.乙醇,2.苯。

4 结论

本实验收集的市售银杏叶片中均未检出上述9种树脂残留成分。参照国家药监局《关于“大孔吸附树脂分离纯化中药提取液的技术要求”的补充说明》标准,初步将银杏叶片的树脂残留成分限量定为:苯 ≤ 2 ppm,正己烷、甲苯、邻二甲苯、间二甲苯、对二甲苯、苯乙烯、二乙基苯、二乙烯苯 ≤ 20 ppm。

本研究建立了顶空气相色谱检测银杏叶片大孔树脂残留物的方法,该方法方便快捷,灵敏度高,

适用于银杏叶片树脂残留的检查。

参考文献

- 1 国家药典委员会.中华人民共和国药典.北京:中国医药科技出版社,2010:1170.
- 2 景明,师霞,石建功.独一味滴丸中大孔树脂吸附残留物限量检查研究.中国中药杂志,2006,31(10):1736.
- 3 常增荣,张小倩.中药提取物中大孔吸附树脂残留物限量检查研究.中国中药杂志,2004,29(6):585.
- 4 何连军,邵胜荣,雷凯琴,等.顶空气相色谱法测定银杏叶提取物中有机溶剂残留量.药物分析学,2005,25(9):1099.

Determination of Macroporous Resin Residues in Ginkgo Leaf Tablets by Headspace Capillary Gas Chromatography

Liang Wenlin^{1,2}, XieDawen¹, Ding Gang¹, Sun Yongcheng¹, Li Yanjing¹, Kou Junping², DuanJin'ao³, Xiao Wei¹

(1. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co. Ltd., Lianyungang 222001, China;

2. Department of Complex Prescription of TCM, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;

3. Jiangsu Key Laboratory for TCM Formulae Research, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

Abstract: This study was aimed to establish the determination method of nineorganic solvent residues of macroporous resin. Headspace capillary gas chromatography (GC) was used in the content determination of hexane, benzene, methyl-benzene, *o*-xylene, *m*-xylene, *p*-xylene, styrene, diethyl-benzene and divinyl-benzene of macroporousresin residues in Ginkgo leaf tablets. The results showed that ninemacroporous resin residues in Ginkgo leaf tablets were completely separated. The calibration curves were in good linearity ($r=0.9992-0.9998$). The average recoveries were 80%–110%. It was concluded that themethod was accurate, quick, and sensitive, which can be used to determine the macroporous resin residues in Ginkgo leaf tablets.

Keywords: Ginkgo leaftablets, macroporous resin, organic solvent, residue, headspace capillary gas chromatography

(责任编辑:曹翠玲 张志华,责任译审:王 晶)