

GC 测定汉防己甲素中的 6 种残留有机溶剂

梁选革¹, 王显伟² (1.广西北海食品药品检验所, 广西 北海 536000; 2.桂林医学院药学院, 桂林 541004)

摘要: **目的** 建立毛细管气相色谱法测定汉防己甲素中甲醇、乙醇、丙酮、三氯甲烷、苯、环己烷 6 种有机溶剂的残留量的方法。**方法** 采用 Rtx-1 毛细管色谱柱(30 m×0.25 mm, 0.25 μm), 以氮气为载气, FID 检测器, 以 N, N-二甲基甲酰胺(DMF)为溶剂, 程序升温, 起始温度为 30 ℃, 保持 7.5 min, 再以 5 ℃·min⁻¹升至 35 ℃, 保持 11.5 min, 最后以 40 ℃·min⁻¹升至 200 ℃, 保持 10 min。**结果** 6 种有机溶剂在各自的浓度范围内具有良好的线性, *r* 为 0.998 7~0.999 9, 平均回收率为 99.6%~105.9%, 最低检测限分别为 0.30, 0.22, 0.16, 0.88, 0.03 和 0.10 μg·mL⁻¹。**结论** 本方法简便灵敏, 结果准确可靠, 重复性好, 适用于汉防己甲素中有机溶剂残留量的检测。

关键词: 气相色谱; 汉防己甲素; 残留有机溶剂; 测定

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2010)08-0746-04

Determination of 6 Kinds of Residual Organic Solvents in Tetrandrine by GC

LIANG Xuange¹, WANG Xianwei² (1.Guangxi Beihai Institute for Food and Drug Control, Beihai 536000, China; 2.Pharmacy College of Guilin Medical College, Guilin 541004, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a capillary gas chromatography method for determination of six residual organic

作者简介: 梁选革, 男, 副主任药师 Tel: (0779)6803528 E-mail: liangxuange-110@163.com

solvents including methanol, ethanol, acetone, trichloromethane, benzene and cyclohexane in tetrandrine. **METHODS** The determination was performed on a Rtx-1 capillary column(30 m×0.25 mm, 0.25 μm) with nitrogen gas as carrier and FID as detector. DMF was used as solvents. The initial column temperature was 30 °C, maintaining for 7.5 min, then raising the temperature to 35 °C at the rate of 5 °C·min⁻¹ and maintaining for 11.5 min, then raising the temperature to 200 °C at the rate of 40 °C·min⁻¹ and maintaining for 10 min. **RESULTS** The six residual solvents showed good linearity ($r=0.998\sim0.999\ 9$) in the experimental concentration ranges. The average recovery rates of the preparation were in the range of 99.6%–105.9%. The detection limits were 0.30, 0.22, 0.16, 0.88, 0.03, 0.10 μg·mL⁻¹. **CONCLUSION** The method is simple, sensitive, accurate, and suitable for the determination of the residual organic solvents in tetrandrine.

KEY WORDS: GC; tetrandrine; residual organic solvent; determination

汉防己甲素(tetrandrine, TET)又称粉防己碱,它是从防己科千金藤属植物汉防己(*Stephania tetrandra* S. Moore.)干燥块根中提取的一种双苄基异喹啉生物碱。它具有消炎,镇痛,降压,抗纤维化等广泛的药理作用^[1-2],具有广阔的临床应用前景。汉防己甲素在提取过程中使用多种有机溶剂,国家药品标准^[3]只规定了苯的残留量的检查,但在检验过程中还发现有其他溶剂残留。为了更好地控制药品的质量,本试验根据ICH^[4]对有机溶剂残留量测定的指导原则及中国药典2005年版二部附录中残留溶剂测定法^[5]的要求,采用直接进样毛细管气相色谱法测定汉防己甲素中甲醇、乙醇、丙酮、三氯甲烷、苯、环己烷6种有机溶剂残留量,结果简便、灵敏、准确。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

日本岛津 GC-2010 气相色谱仪;氢火焰检测器;载气为高纯氮气;岛津 AOC-20i 自动进样器;GCsolution 工作站;Rtx-1 非极性石英毛细管色谱柱(100%甲基聚硅氧烷,30 m×0.25 mm,0.25 μm)。

1.2 试剂

甲醇为色谱纯;丙酮为优级纯;三氯甲烷、无水乙醇、环己烷、苯及 N,N-二甲基甲酰胺(DMF)均为分析纯;TET 原料药(批号:060301,060302,060303)为药厂提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Rtx-1 毛细管色谱柱(30 m×0.25 mm,0.25 μm);载气为 N₂(99.999%);柱流量为 0.3 mL·min⁻¹;柱温起始温度为 30 °C,保持 7.5 min,再以 5 °C·min⁻¹ 升至 35 °C,保持 11.5 min,最后以 40 °C·min⁻¹ 升至 200 °C,保持 10 min;进样口温度为 200 °C;FID 检测器温度为 250 °C;分流比 25:

1;进样量:2.0 μL。

2.2 溶液配制

2.2.1 对照品溶液 精密称取三氯甲烷 305.05 mg 和苯 10.35 mg 置 50 mL 量瓶中,加 DMF 稀释至刻度,为对照贮备液①;精密称取甲醇 302.9 mg、无水乙醇 494.7 mg、丙酮 501.9 mg、环己烷 405.5 mg 置 100 mL 量瓶中,加入贮备液① 1.0 mL,用 DMF 稀释至刻度,为对照贮备液②。精密量取对照贮备液② 1.0 mL,置 25 mL 量瓶中,加 DMF 稀释至刻度,摇匀,作为对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密称取汉防己甲素 0.17 g 置 5 mL 量瓶中,加入 N,N-二甲基甲酰胺适量,振摇 15 min 溶解,稀释至刻度。

2.2.3 空白溶液 DMF 溶液。

2.3 系统性适应性试验

取“2.2”项下的对照品溶液、供试品溶液及空白溶液,按“2.1”项下色谱条件进样,记录色谱图,见图 1。甲醇、乙醇、丙酮、三氯甲烷、苯、环己烷的保留时间分别是 5.994, 6.464, 6.740, 9.848, 12.292, 12.895 min,理论板数分别为 45 117, 53 119, 75 302, 91 070, 108 514, 125 782,相邻峰的分离度分别为 4.0, 2.8, 27.2, 17.6, 3.79。溶剂 DMF 保留时间为 22.5 min,对测定无干扰。

2.4 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下对照贮备液②1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 50.0 mL,分别置于 50 mL 量瓶中,加 DMF 稀释至刻度,摇匀,配制成系列对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件,分别取上述对照品溶液 2.0 μL 进样,记录色谱图,以对照品溶液浓度 $C(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$ 为横坐标,以峰面积 Y 为纵坐标,绘制标准曲线,进行线性回归。结果见表 1。实验结果表明,在各自的浓度范围内,6 种溶剂均呈良好的线性关系。

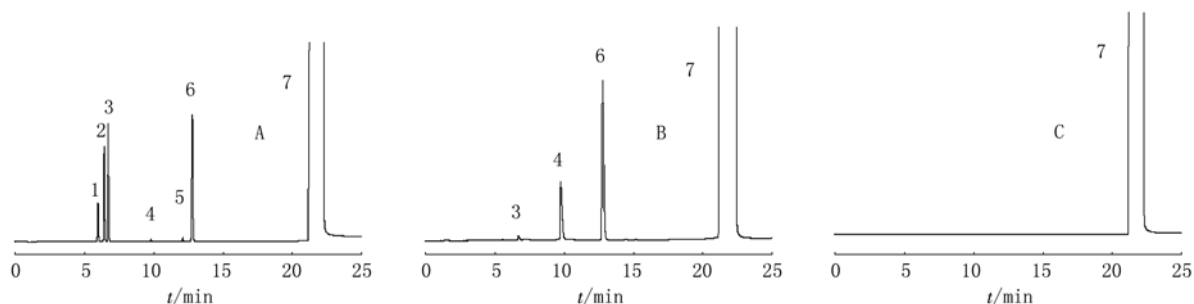


图1 气相色谱图

A-对照品; B-供试品; C-空白; 1-甲醇; 2-乙醇; 3-丙酮; 4-三氯甲烷; 5-苯; 6-环己烷; 7-N,N-二甲基甲酰胺

Fig 1 GC chromatograms

A-reference substances; B-sample; C-blank; 1-methanol; 2-ethanol; 3-acetone; 4-trichloromethane; 5-benzene; 6-cyclohexane; 7-DMF

表1 线性范围及回归方程(n=2)

Tab 1 Linear range and regression equation of calibration curve(n=2)

组分	回归方程	r	浓度范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
甲醇	$Y=607.9C-11\ 962.8$	0.999 9	60.58~3 029
乙醇	$Y=879.5C-34\ 383.5$	0.999 8	98.94~4 947
丙酮	$Y=1\ 003.0C-4\ 932.1$	0.999 9	100.38~5 019
三氯甲烷	$Y=125.3C+53.0$	0.999 8	1.220 2~61.01
苯	$Y=1\ 952.8C+111.7$	0.998 7	0.041 4~2.07
环己烷	$Y=1\ 766.1C-10\ 405.8$	0.999 9	81.10~4 055

2.5 最低检测限测定

取“2.2.1”项下对照贮备液②逐步稀释后,按上述“2.1”项下色谱条件进样分析,以信噪比 $S/N=3$ 计算得甲醇、乙醇、丙酮、三氯甲烷、苯、环己烷的最低检出限分别为 0.30, 0.22, 0.16, 0.88, 0.03, $0.10\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.6 仪器精密度试验

精密取对照品溶液 $2.0\ \mu\text{L}$,按“2.1”项下色谱条件,连续进样 6 次,结果甲醇、乙醇、丙酮、三氯甲烷、苯、环己烷峰面积的 RSD 分别为 3.3%, 4.4%, 3.0%, 4.9%, 5.0%, 2.4%, 试验结果表明仪器精密度良好。

2.7 回收率试验

采用加样回收率,精密称取已测定残留溶剂含量的汉防己甲素约 0.09 g(批号: 060303),共 9 份,分别置 $5\ \text{mL}$ 量瓶中,分别加入相当于 50%, 100%, 150% 3 种低、中、高浓度水平的对照溶液溶解样品,每个浓度 3 份,按上述“2.1”项下色谱条件进样分析,同时测定对照品溶液,计算回收率,见表 2。结果甲醇、乙醇、丙酮、三氯甲烷、苯、环己烷高中低浓度的平均回收率分别为: 101.2%, 99.6%, 100.5%, 105.9%, 102.6%, 100.5%。RSD 分别为: 3.4%, 2.3%, 1.8%, 3.6%, 3.8%, 2.3%($n=3$)。

表2 6 种溶剂回收率测定结果(n=3)

Tab 2 Recoveries of 6 kinds of solvents(n=3)

溶剂	回收率/%				RSD/%
	高浓度	中浓度	低浓度	平均回收率	
甲醇	98.1	100.5	104.9	101.2	3.4
乙醇	98.9	102.1	97.7	99.6	2.3
丙酮	98.4	101.9	101.1	100.5	1.8
三氯甲烷	101.8	106.7	109.2	105.9	3.6
苯	102.5	98.8	106.4	102.6	3.8
环己烷	102.5	100.9	98.0	100.5	2.3

2.8 样品测定

取“2.2”项下溶液,按“2.1”项下色谱条件进样分析,记录色谱图,按外标法计算,结果见表 3。3 批样品中未检出甲醇、乙醇及苯,丙酮的残留量低于药典限度规定,而三氯甲烷和环己烷则超出药典限度规定。

表3 样品中有机残留量测定结果(n=3)

Tab 3 Assay results of residual solvents in sample(n=3)

溶剂	药典限度规定 ^[5]	批号		
		060301	060302	060303
甲醇/%	0.3	—	—	—
乙醇/%	0.5	—	—	—
丙酮/%	0.5	0.1	0.0	0.0
三氯甲烷/%	0.006	0.269	0.260	0.249
苯/%	0.000 2	—	—	—
环己烷/%	0.388	0.537	0.495	0.505

3 讨论

3.1 溶剂选择

汉防己甲素在水中不溶,在氯仿中易溶,在乙醇或丙酮中略溶,但这些都是要测定的残留溶剂,虽然在 $0.1\ \text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸溶液中易溶,可是苯及环己烷只微溶或几乎不溶于水,也不宜作为溶剂使用,只考虑 DMF 及二甲基亚砜(DMSO),经试验汉防己

甲素在 DMF 的溶解度较 DMSO 大, 由于苯的限度较低, 因此选择了溶解性较好的 DMF 为溶剂, 取样品约 0.17 g, 加 DMF 振摇 15 min, 样品能完全溶解, 且 DMF 沸点高, 出峰时间较晚, 不影响残留溶剂的测定。

3.2 进样方法选择

残留溶剂进样方法有直接进样法及顶空进样法, 由于本品在 DMF 能完全溶解, 所以选择进样方式为直接进样法, 另外可以为没有顶空进样器的企业解决检测问题。

3.3 色谱条件选择

实验中还使用了 HP-5 毛细管色谱柱, 但苯与环己烷的分离度达不到要求, 使用 HP-INNOWax 毛细管色谱柱, 则乙醇与三氯甲烷未能分离, 而选用 Rtx-1 毛细管色谱柱可以把 6 种溶剂完全分离。程序升温中使用较低的起始温度 30 °C 保持 7.5 min, 可使乙醇和丙酮较好分离, 以后 5 °C·min⁻¹ 升至 35 °C, 保持 11.5 min, 加快出峰, 改善峰形, 再以 40 °C·min⁻¹ 升至 200 °C, 保持 10 min, 则可尽快除去溶剂, 避免影响以后样品测定。

3.4 共出峰干扰考察

由于三氯甲烷及环己烷超出限度范围, 因此取

对照品溶液及对批号为 060303 供试品溶液用极性 HP-INNOWax 毛细管色谱柱进样, 结果供试品未出现其他杂峰, 测定结果表明与 Rtx-1 毛细管色谱柱基本一致, 可排除共出峰的干扰。

本方法可用于国家药品标准^[3]中汉防己甲素苯的残留量的检查。但由于不同厂家提取生产工艺不尽相同, 残留溶剂也不尽一样, 因此还需考察不同厂家的样品, 以便建立通用的检测方法。

REFERENCES

- [1] SHEN Y C, CHOU C J, CHIOU W F, et al. Anti-inflammatory effects of the partially purified extract of radix Stephaniae tetrandrae: comparative studies of its active principles tetrandrine and fangchinoline on human polymorphonuclear leukocyte functions [J]. Mol Pharmacol, 2001, 60(5): 1083-1090.
- [2] HU M, DUTT J, ZHAO T, et al. Cytokine mRNA in BALB/C mouse corneas infected with herpes simplex virus [J]. Eye, 1999, 13(Pt 3a): 309-313
- [3] State Drug Standard, WS-10001-(HD-1101)-2002(国家药品标准)[S]. 2002.
- [4] ZHOU H J. Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use Quality Section(药品注册的国际技术要求-质量部分) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2000: 79.
- [5] Ch.P(2005)Vol II(中国药典 2005 版.二部): Appendix VIII P.

收稿日期: 2009-08-28