

顶空气相色谱法同时测定灯盏花乙素中 5 种有机溶剂残留量

王 相^{1,2}, 张 伟², 董知旭², 杨兆祥^{2△}

(1. 昆明医科大学, 云南昆明 650500; 2. 昆明制药集团股份有限公司, 云南昆明 650100)

摘要: **目的** 建立灯盏花乙素中 5 种有机溶剂残留量的分离测定方法。**方法** 采用顶空进样毛细管气相色谱法, 色谱柱为 DB-1301 毛细管柱(30m×0.32mm×1.0μm), 以 N₂ 为载气, FID 检测器, 程序升温, N,N-二甲基乙酰胺(DMA)为溶解介质。**结果** 5 种有机溶剂完全分离, 在所考察的浓度范围内具有良好的线性, r 为 0.9939~0.9999, 甲醇、乙醇、丙酮、二氯甲烷、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)的最低检测限分别为 0.875, 1.338, 1.132, 1.528, 10.56μg/mL, 精密度 RSD 均小于 2%, 平均回收率为 99.15%~103.32%。**结论** 本实验建立的方法简便灵敏, 结果准确可靠, 可用于灯盏花乙素中有机溶剂残留量的检测。

关键词: 灯盏花乙素; 有机溶剂残留量; 顶空气相色谱法

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-2723(2014)01-0015-04

灯盏花乙素是从灯盏细辛中提取的黄酮类有效成分, 结构式鉴定为 4,5,6-三羟基黄酮-7-葡萄糖醛酸甙, 又名野黄芩苷(以下用 SCU 表示)(见图 1)。目前已经有人工合成灯盏花乙素的研究^[1]。人工合成灯盏花乙素过程中使用了甲醇、乙醇、丙酮、二氯甲烷、DMF 等有机溶剂, 此 5 种溶剂均为限制使用的溶剂, 必须对其残留量进行考察^[2]。因此制定本方法以控制灯盏花乙素中甲醇、乙醇、丙酮、二氯甲烷、DMF 的残留量。

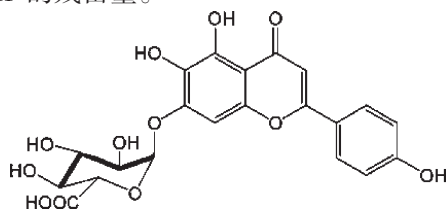


图 1 灯盏花乙素结构式

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Clarus-600 气相色谱仪(美国 Perkin Elmer), FID 检测器, DB-1301(30m×0.32mm×1.0μm)毛细管色谱柱, Turbomatrix 40 顶空进样器(美国 Perkin Elmer), BP221-S 型电子天平(Sartorius)

1.2 试剂

灯盏花乙素(SCU)由昆明制药集团股份有限

公司提供, 批号分别为 20121026, 20121029, 20121030。DMA、甲醇、乙醇、丙酮、二氯甲烷、DMF 均为色谱纯。

2 色谱条件^[3-4]

2.1 溶解介质的选择

由于 SCU 在碱性水溶液中的溶解性极差, 且残留溶剂 DMF 的沸点为 152.3℃, 考虑若采用碱性水溶液或水为溶解介质, 不仅不能满足 SCU 的溶解性要求, 而且会影响顶空温度的选择, 故决定使用有机溶剂为溶解介质。

气相色谱法常用的有机溶解介质有 DMA、DMF 等, 由于残留溶剂有 DMF, 故选择 DMA 为溶解介质。

2.2 顶空时间、温度的选择

2.2.1 混合对照品溶液

精密称取甲醇、乙醇、丙酮、二氯甲烷、DMF 适量, 用 DMA 稀释成 1mL 含甲醇 0.3mg、乙醇 0.5mg、丙酮 0.5mg、二氯甲烷 0.06mg、DMF 0.088mg 的混合溶液, 即得。

2.2.2 顶空时间的选择

分别设置顶空时间为 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50min, 进样混合对照溶液, 结果见表 1, 由表可知 30min 时, 甲醇、乙醇、二氯甲烷、DMF 均达到气液

收稿日期: 2013-11-08

作者简介: 王相(1987-), 男, 山西稷山人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 原料药质量标准的研究。

△通信作者: 杨兆祥, E-mail: yangzxky@163.com

表 1 顶空时间选择结果数据表

顶空时间 (min)	峰面积					
	20	25	30	35	40	45
甲醇	108088	106585	108450	107065	105913	107905
乙醇	204661	198770	210837	203966	203242	207299
丙酮	774674	769710	767449	770692	761205	775476
二氯甲烷	17912	14788	17885	17739	17651	17854
DMF	2955	2806	3194	3046	3131	3010

平衡,且丙酮的峰面积达到检测要求,故选择顶空时间为 30min。

2.2.3 顶空温度的选择

分别设置顶空温度为 70,75,80,85,90,95℃,

进样 2.2.1 项下的混合对照溶液,结果见表 2。可见随着温度的升高残留溶剂的峰面积均增大,综合考虑高温下样品的稳定性及检测的要求,最终确定顶空温度为 90℃。

表 2 顶空温度选择结果数据表

顶空温度 (℃)	峰面积					
	70	75	80	85	90	95
甲醇	50740	62248	75826	90807	109447	131044
乙醇	91727	114364	141733	168246	205118	248711
丙酮	432802	509291	595851	675066	778480	890691
二氯甲烷	9362	11254	13349	15317	17873	20785
DMF	1194	1935	2295	2956	3283	4312

2.3 色谱条件的确定

载气为 N₂,采用线速率模式,流速 1.0mL/min;分流比 1:1;柱温采用程序升温,初始柱温:60℃,保持 6min,以 70℃/min 的速度升温到 160℃,保持 10min;进样口温度:200℃;氢火焰检测器温度:220℃;顶空温度 90℃,进样针温度 100℃,传输线温度 100℃;顶空保温时间 30min。

3 实验内容

3.1 专属性考察

3.1.1 空白溶液

量取 DMA50mL 于 10mL 顶空瓶,加盖密封,即得。

3.1.2 对照溶液

量取 DMA5.0mL 于 10mL 顶空瓶,平行 6 份,记号为 1-6 号。其中 1 号瓶中加 1 滴甲醇,2 号瓶中加 1 滴乙醇,3 号瓶中加 1 滴丙酮,4 号瓶中加 1 滴二氯甲烷,5 号瓶中加 1 滴 DMF,6 号瓶中甲醇、乙醇、丙酮、二氯甲烷、DMF 各加一滴,加盖密封,振摇混匀,即得。其中 1-5 号为单一对照,6 号为混合对照。

3.1.3 供试品溶液

精密称取 1.0g 的 SCU 于 10mL 容量瓶中,加 DMA 溶解并定容,即得。

3.1.4 专属性考察

在 2.2.4 色谱条件下,分别进样空白溶液、对照溶液、供试品溶液,记录色谱图(见图 2-A,2-B,2-C)。结果在甲醇、乙醇、丙酮、二氯甲烷、DMF 出峰的保留时间处,在空白和供试品溶液中均无干扰峰出现,且 5 种残留溶剂彼此之间及与 DMA 之间互不干扰,分离度均大于 1.5,表明专属性良好。

3.2 精密度考察

3.2.1 混合对照品溶液

精密称取甲醇、乙醇、丙酮、二氯甲烷、DMF 适量,用 DMA 稀释成 1mL 含甲醇 0.3mg、乙醇 0.5mg、丙酮 0.5mg、二氯甲烷 0.06mg、DMF0.088mg 的混合溶液,即得。

3.2.2 精密度考察

精密量取 3.2.1 项下的混合对照品溶液 5.0mL 于 10mL 顶空瓶中,平行 6 份,密封瓶口,顶空进样,测得甲醇、乙醇、丙酮、二氯甲烷、DMF 峰面积的 RSD 分别为 0.89%,0.51%,0.80%,0.70%,1.81%,表明仪器精密度良好。

3.3 重复性考察

按照 3.2.1 项下方法平行配置混合对照品溶液

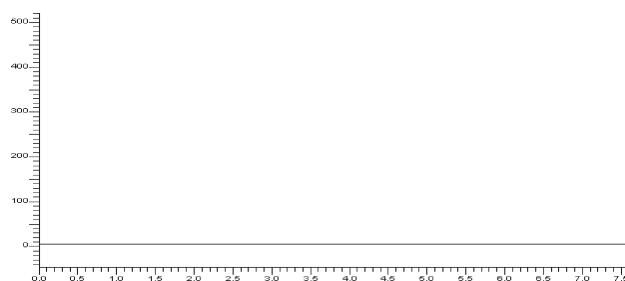


图 2-A

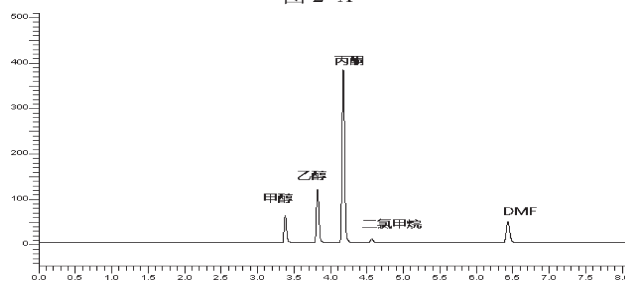


图 2-B

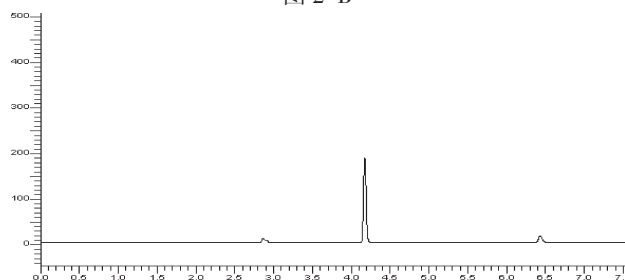


图 2-C

图 2 空白溶液(A)、对照品溶液(B)、供试品溶液(C)
气相色谱图

6 份,每份精密量取 5.0mL,分别置于 6 个 10mL 顶空瓶中,密封瓶口,顶空进样,结果甲醇、乙醇、丙酮、二氯甲烷、DMF 峰面积的 RSD 分别为 0.73%、0.77%、0.50%、0.87%、2.27%。结果表明方法的重复性良好。

3.4 最低检测限和最低定量限

3.4.1 单一对照品溶液

精密称取甲醇、乙醇、丙酮、二氯甲烷、DMF 适量,分别置于 5 个顶空瓶中,用 DMA 稀释成 1mL 含甲醇 0.3mg、乙醇 0.5mg、丙酮 0.5mg、二氯甲烷 0.06mg、DMF 0.088mg 的对照品溶液,即得。

3.4.2 最低检测限和最低定量限的测定

取 3.4.1 项下的单一对照品溶液,逐步稀释,精密量取 5.0mL 于 10mL 顶空瓶中,立即密封,顶空进样,记录色谱图,计算主峰信噪比,测得甲醇、乙醇、丙酮、二氯甲烷、DMF 的最低检测限和最低定量限见下表(表 3)。

表 3 5 种残留溶剂最低定量限和最低检测限的测定结果

(单位: $\mu\text{g/mL}$)

	甲醇	乙醇	丙酮	二氯甲烷	DMF
最低检测限	0.875	1.338	1.132	1.528	10.56
最低定量限	2.648	5.352	5.078	4.604	42.24

3.5 线性范围考察

3.5.1 对照品储备液的制备

精密量取甲醇 60mg、乙醇 100mg、丙酮 100mg、二氯甲烷 12mg、DMF 17.6mg 于 100mL 容量瓶中, DMA 稀释、定容作为对照品储备液。

3.5.2 标准曲线的绘制

精密量取对照品储备液适量,用 DMA 稀释成一系列对照品溶液,使甲醇的浓度在 0.003~0.450mg/mL,乙醇浓度在 0.005~0.750mg/mL,丙酮浓度在 0.005~0.750mg/mL,二氯甲烷浓度在 0.0006~0.0900mg/mL,DMF 浓度在 0.0086~0.1320mg/mL。每个对照品溶液精密量取 5mL 置于 10mL 顶空瓶中,在“2.3”项色谱条件下进样,记录色谱图,以浓度为横坐标,对照峰面积为纵坐标进行线性回归,回归方程和线性范围见表 4。

表 4 回归方程及线性范围

残留溶剂	回归方程	相关系数	线性范围 (mg/mL)
甲醇	$y=416743x+1837.6$	0.9997	0.0031~0.4687
乙醇	$y=388618x+463.56$	0.9999	0.0052~0.7741
丙酮	$y=1539753.38x-1950.96$	1.0000	0.0050~0.7495
二氯甲烷	$y=315383x+396.37$	0.9998	0.0061~0.0908
DMF	$y=26524x+714.62$	0.9939	0.0087~0.1302

3.6 回收率考察

3.6.1 80%、100%、120%对照品溶液的配制

精密量取 3.5.1 项下的对照品储备液 10mL、50mL、15mL,分别置于 25mL、100mL、25mL 的容量瓶中,DMA 稀释定容,即得。

3.6.2 回收率测定

精密量称取灯盏花乙素(批号:20121030) 250mg 于顶空瓶中,平行 12 分,记为 1-12 号,其中 1-3 号精密加入空白 DMA 5mL,4-6 号精密加入 80%对照品溶液 5mL,7-9 号精密加入 100%对照品溶液 5mL,10-12 号精密加入 120%对照品溶液 5mL,加盖密封,进样,测定回收率。结果甲醇的平均回收率为 100.89%,RSD 为 1.16%;乙醇的平均回收

率为 102.68%, RSD 为 1.33%; 丙酮的平均回收率为 103.22%, RSD 为 1.75%; 二氯甲烷的平均回收率为 100.75%, RSD 为 0.84%, DMF 的平均回收率为 99.15%, RSD 为 3.40%。

3.7 稳定性考察

精密量取灯盏花乙素适量, 用 DMA 溶解稀释成浓度为 100mg/mL 的供试品溶液, 取 3.6.1 项下的 100% 对照品溶液作为对照品溶液, 分别在 0, 2, 4, 8, 12, 16h 时进样, 记录色谱图, 结果对照品溶液中甲醇、乙醇、丙酮、二氯甲烷、DMF 的 RSD 分别为 1.34%、2.23%、0.74%、1.31%、4.72%; 样品溶液中甲醇、乙醇、丙酮的 RSD 分别为 2.91%、1.87%、0.95% (样品中无二氯甲烷和 DMF)。说明样品及对照的稳定性良好。

3.8 样品测定

精密量取 3 批 SCU 样品, 各约 1.0g, 加 DMA 溶解并定容至 10mL 容量瓶中, 精密量取 5mL 于顶空进样小瓶中, 按 2.3 项下的色谱条件进行测定, 同时测定混合对照, 按外标法计算, 结果见表 5。《中国药典》(2010 版) 规定药品中残留溶剂甲醇、乙醇、丙酮、二氯甲烷、DMF 的限度分别为 0.3%、0.5%、

0.5%、0.06%、0.088%, 由表可知 3 批 SCU 中 5 中溶剂的残留量均在限度范围内, 符合标准。

4 讨论

进样方式的选择: 顶空进样可以避免将样品中的难溶性物质引入色谱柱中, 减小对柱子的污染, 可以延长柱子的寿命, 且甲醇、乙醇、丙酮、二氯甲烷均为低沸点溶剂, N, N-二甲基甲酰胺虽沸点较高, 但使用顶空进样也可满足检测要求, 故选择进样方式为顶空进样。

本方法简便、灵敏, 精密度、重复性、回收率等均符合《中国药典》2010 年版的要求。故本方法适用于灯盏花乙素中 5 种有机溶剂的检测。

由样品测定的结果可以看出, 3 批 SCU 中 5 中残留溶剂均在限度范围内, 但丙酮的含量均较多, 分别为 0.482%、0.493%、0.400%, 已快达到药典规定的限度, 故在合成的过程中应加以控制。

参考文献:

- [1] 崔建梅, 吴松. 灯盏花素的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2003, 15(3): 255-258.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 (二部)[M]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 附录 63.
- [3] 田智慧, 王连尧, 李守申, 等. 毛细管气相色谱法测定氨曲南中 4 种有机溶剂残留量 [J]. 中国药学杂志, 2008, 41(16): 1272-1273.
- [4] 洪丽娅, 沈红燕, 王建. 毛细管气相色谱法测定盐酸头孢他美酯中残留溶剂 [J]. 医药导报, 2010, 29(10): 1349-1351.

(编辑: 迟越)

表 5 样品测定结果

	含量%				
	甲醇	乙醇	丙酮	二氯甲烷	DMF
scu-20121026	0.001	0.008	0.482	0.000	0.000
scu-20121029	0.001	0.010	0.493	0.000	0.000
scu-20121030	0.016	0.070	0.400	0.000	0.000

Simultaneous Determination of 5 Residual Solvents in Scutellarin by Head-space Gas Chromatography

WANG Xiang^{1,2}, ZHANG Wei¹, DONG Zhi-xu¹, YANG Zhao-xiang²

(1. Kunming Medical University, Kunming 650500, China;

2. Kunming Pharmaceutical CORP., Kunming 650100, China)

ABSTRACT: **Objective** To establish a method for the determination of five residual solvents in scutellarin. **Methods** Head-space gas chromatography was established, the chromatographic column was DB-1301 (30m×0.32mm×1.0μm), the carrier gas was N₂, the detector was FID, temperature was controlled by program and the solvent was N, N-Dimethylacetamide(DMA). **Results** Five residual solvents were completely separated. A good linearity (r=0.9939~0.9999) was obtained. The detection limits of methanol, ethanol, acetone, dichloromethane and DMF were 0.875, 1.338, 1.132, 1.528, 10.56μg·mL⁻¹ respectively; the RSDs of precision were less than 2%; the average recovery rates of the preparation were in the range of 99.15%~103.32%. **Conclusion** The method is simple, sensitive, accurate and can be used for the quality control of scutellarin.

KEY WORDS: Scutellarin; residual solvents; head-space gas chromatography