

气相色谱法测定六味地黄苷糖原料药中的7种残留溶剂^Δ

仲海洁^{1,2*}, 胡军华^{1,2}, 王晓娇^{1,2}, 乔善义³, 吴 云^{1,2}, 王振中^{1,2}, 萧 伟^{1,2#}(1.江苏康缘药业股份有限公司, 江苏连云港 222001; 2.中药制药过程新技术国家重点实验室, 江苏连云港 222001; 3.军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)06-0797-04
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.06.25

摘 要 目的:建立测定六味地黄苷糖原料药中7种残留溶剂(乙醇、正己烷、苯、甲苯、二甲苯、苯乙烯、二乙烯苯)的方法。方法:色谱条件:色谱柱为DB-624弹性石英毛细管柱,载气为高纯氮气,流速为5.0 ml/min,检测器为氢火焰离子化检测器,检测器温度为250 ℃(程序升温);顶空条件:平衡温度为80 ℃,样品环温度为90 ℃,传输线温度为100 ℃,样品瓶加热平衡时间为30 min,定量环填充时间为0.5 min,定量环平衡时间为0.05 min,进样时间为1.0 min,载气压力为95 kpa,样品瓶压力为60 kpa。结果:乙醇、正己烷、苯、甲苯、二甲苯、苯乙烯、二乙烯苯检测质量浓度线性范围分别为25~500($r=0.998\ 7$)、0.025~10($r=0.998\ 8$)、0.025~10($r=0.999\ 9$)、0.1~40($r=1.000\ 0$)、0.25~100($r=0.999\ 9$)、0.5~500($r=1.000\ 0$)、0.5~500 μg/ml($r=1.000\ 0$);精密度、稳定性、重复性试验的RSD<4%;加样回收率分别为99.60%~102.70%(RSD=1.08%, $n=9$)、90.70%~100.30%(RSD=4.51%, $n=9$)、100.10%~109.80%(RSD=3.82%, $n=9$)、99.50%~110.00%(RSD=4.40%, $n=9$)、100.00%~109.10%(RSD=3.50%, $n=9$)、93.40%~102.30%(RSD=3.73%, $n=9$)、99.70%~101.70%(RSD=0.79%, $n=9$);检测限分别为1.000、0.025、0.025、0.025、0.100、0.025、0.250 μg/ml。结论:该方法操作简便、稳定、重复性好,可用于六味地黄苷糖原料药中残留溶剂乙醇、正己烷、苯、甲苯、二甲苯、苯乙烯、二乙烯苯的测定。
关键词 六味地黄苷糖;顶空气相色谱法;残留溶剂

Determination of Seven Residual Solvents in Liuwei Dihuang Glycoside by Gas Chromatography Method
ZHONG Haijie^{1,2}, HU Junhua^{1,2}, WANG Xiaojiao^{1,2}, QIAO Shanyi³, WU Yun^{1,2}, WANG Zhenzhong^{1,2}, XIAO Wei^{1,2}(1. Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Jiangsu Lianyungang 222001, China; 2.State Key Laboratory of Chinese Pharmaceutical Process New Technology, Jiangsu Lianyungang 222001, China; 3.Institute of Pharmacology and Toxicology of Military Medical Sciences, Beijing 100850, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determination of 7 residual solvents (ethanol, *n*-hexane, benzene, toluene, xylene, styrene, divinylbenzene) in Liuwei dihuang glycoside. METHODS: The column was DB-624 capillary column, carrier gas was nitrogen, flow rate was 5.0 ml/min; detector was a hydrogen flame ionization detector with temperature of 250 ℃ (programmed temperature); equilibrium temperature was 80 ℃, sample loop temperature was 90 ℃, and transfer line temperature was 100 ℃; the equilibrium time of vial heating was 30 min, sample loop filling time was 0.05 min, injection time was 1.0 min; the carrier gas pressure was 95 kpa, and the vial pressure was 60 kpa. RESULTS: The linear range was 25-500 μg/ml for ethanol($r=0.998\ 7$), 0.025-10 μg/ml for *n*-hexane ($r=0.998\ 8$), 0.025-10 μg/ml for benzene ($r=0.999\ 9$), 0.1-40 μg/ml for toluene($r=1.000\ 0$), 0.25-100 μg/ml for xylene($r=0.999\ 9$), 0.5-500 μg/ml for styrene($r=1.000\ 0$) and 0.5-500 μg/ml for divinylbenzene ($r=1.000\ 0$); RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 4%; recoveries were 99.60%-102.70% (RSD=1.08%, $n=9$), 90.70%-100.30% (RSD=4.51%, $n=9$), 100.10%-109.80% (RSD=3.82%, $n=9$), 99.50%-110.00% (RSD=4.40%, $n=9$), 100.00%-109.10% (RSD=3.50%, $n=9$), 93.40%-102.30% (RSD=3.73%, $n=9$) and 99.70%-101.70% (RSD=0.79%, $n=9$), respectively; the low limits of detection were 1.000, 0.025, 0.025, 0.025, 0.100, 0.025, 0.250 μg/ml respectively. CONCLUSIONS: The method is simple, stable and reproducible, and can be used for the determination of residual solvents (ethanol, *n*-hexane, benzene, toluene, xylene, styrene, divinylbenzene) in Liuwei dihuang glycoside.
KEYWORDS Liuwei dihuang glycoside; Headspace gas chromatography; Residual solvent

杂志, 2014, 2(5): 85.
[23] 张梅香.左氧氟沙星合前列舒通胶囊治疗慢性前列腺炎37例临床观察[J].中国民族民间医药, 2015, 24(13): 47.
Δ 基金项目:“重大新药创制”科技部重大专项(No.2013ZX09402 203)
* 博士。研究方向:新药质量标准。E-mail:18260389826@163.com
通信作者:研究员级高级工程师, 博士。研究方向:中药新药研发。电话:0518-81152337。E-mail:kanionlunwen@163.com

[24] 陈国宏, 宋竖旗, 李海松, 等.中医辨证治疗慢性前列腺炎的多中心随机对照临床研究[J].中医杂志, 2010, 51(5): 419.
[25] 祁进伟.前列舒通胶囊联合抗生素治疗慢性细菌性前列腺炎的疗效研究[J].临床医药文献杂志, 2015, 2(8): 1 536.
(收稿日期:2015-09-13 修回日期:2015-10-12)
(编辑:刘明伟)

六味地黄苷糖原料药由多糖、糖苷、寡糖3个有效成分组成,该药是基于对六味地黄汤的大量基础研究开发而成的,其中糖苷对免疫和内分泌调节起重要作用。笔者在完成制备工艺研究和优化后,按制备工艺条件制备糖苷,该工艺涉及乙醇提取,并通过大孔树脂柱色谱分离^[1]。由于苯乙烯骨架型大孔树脂中大都含有未聚合的单体、交联剂、致孔剂^[2],如正己烷、苯、甲苯、二甲苯、苯乙烯和二乙烯苯等有机物,这些有机溶剂的残留不仅没有药效作用,而且潜在毒性还会对服药者的健康造成危害^[3]。因此,人类用药注册技术要求国际协调会议(ICH)对残留溶剂的种类和限度做了明确规定^[4]。为了保障用药安全,对药物中残留溶剂进行有效控制十分重要。本试验采用气相色谱法,并参考有机溶剂残留测定的相关文献[5-9],建立对乙醇、正己烷、苯、甲苯、二甲苯、苯乙烯和二乙烯苯的检测方法,为六味地黄苷糖原料的质量控制提供依据。

1 材料

1.1 仪器

5890 型气相色谱仪,包括氢火焰离子化检测器(美国 Agilent 公司);AE240 型电子天平(瑞士 Mettler-Toledo 公司);Milli-Q 型超纯水仪(美国 Millipore 公司)。

1.2 药品与试剂

六味地黄苷糖原料药(江苏康缘药业股份有限公司,批号:20141115、20141220、20140125);乙醇(上海星可高纯溶剂有限公司,批号:031140803,纯度:99.8%);正己烷(批号:LOT14090291,纯度:99.5%);苯(批号:13052910777,纯度:99.5%);甲苯(批号:14071611553,纯度:99.5%);二甲苯(批号:10123111470,纯度:99.5%);苯乙烯(批号:09102360633,纯度:99.5%);二甲基亚砜(批号:12080211263,纯度:99.0%)均购自南京化学试剂有限公司;二乙烯苯(美国 Alfa Aesar 公司,批号:1321-74-0,纯度:99.8%);水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 试验条件

2.1.1 色谱条件 色谱柱:DB-624弹性石英毛细管柱(固定相为6%氰丙基苯、94%二甲基硅氧烷,30 m×0.32 mm×1.8 μm);载气:高纯氮气;流速:5.0 ml/min;检测器:氢火焰离子化检测器;检测器温度:250 ℃,程序升温(初始温度 50 ℃,保持 2 min,以 10 ℃/min 的速率升温至 90 ℃,再以 20 ℃/min 的速率升温至 230 ℃);进样口温度:200 ℃。

2.1.2 顶空条件 平衡温度:80 ℃;样品环温度:90 ℃;传输线温度:100 ℃;样品瓶加热平衡时间:30 min;定量环填充时间:0.5 min;定量环平衡时间:0.05 min;进样时间:1.0 min;载气压力:95 kpa;样品瓶压力:60 kpa。

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 分别精密移取 7.9 ml 乙醇、38.0 μl 正己烷、2.8 μl 苯、28.8 μl 甲苯、28.8 μl 二甲苯、27.5 μl 苯乙烯和

27.5 μl 二乙烯苯,分别置于不同 25 ml 量瓶中,用二甲基亚砜溶解并定容,摇匀,制成对照品贮备液。分别精密量取 0.1 ml 上述对照品贮备液,置于 50 ml 量瓶中,加水定容,制成乙醇、正己烷、苯、甲苯、二甲苯、苯乙烯、二乙烯苯质量浓度分别为 500、2.0、0.2、2.0、2.0、2.0、2.0 μg/ml 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密称取样品 500 mg,加 5 ml 水(含 0.2% 二甲基亚砜)溶解,即得。

2.2.3 空白对照溶液 精密量取二甲基亚砜溶液 0.2 ml,置于 100 ml 量瓶中,加水定容,制成空白对照溶液。

2.3 系统适用性试验和专属性试验

分别取“2.2.1”“2.2.2”“2.2.3”项下对照品溶液、供试品溶液、空白对照溶液各适量,按“2.1”项下试验条件进样,记录色谱图,详见图 1。由图 1 可知,待测成分峰均不少于 3 000,分离度均>1.5。

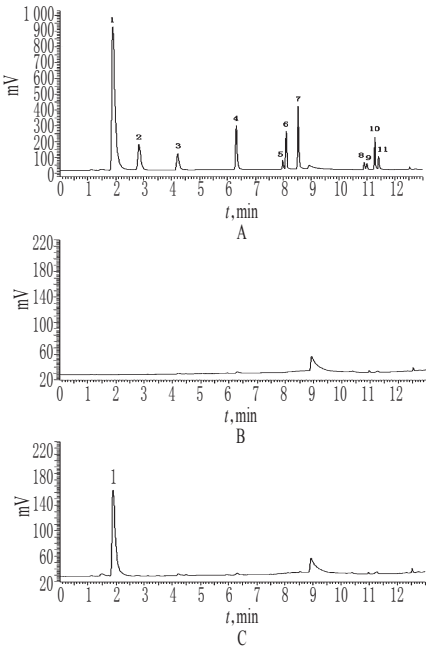


图1 气相色谱图

A.混合对照品;B.空白对照;C.供试品;1.乙醇(1.90 min);2.正己烷(2.84 min);3.苯(4.21 min);4.甲苯(6.32 min);5~6.二甲苯(8.00、8.12 min);7.苯乙烯(8.55 min);8~11.二乙烯苯(10.91、11.00、11.29、11.43 min)

Fig 1 Meteorological chromatogram

A.mixed reference substance; B.blank control; C.test sample; 1.ethanol (1.90 min); 2.n-exane (2.84 min); 3.benzene (4.21 min); 4.toluene (6.32 min); 5-6.xylene(8.00 min, 8.12 min); 7.styrene(8.55 min); 8-11.divinylbenzene(10.91 min, 11.00 min, 11.29 min, 11.43 min)

2.4 检测限与定量限考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液,等倍逐步稀释,按“2.1”项下试验条件连续进样测定 6 次,记录峰面积。当信噪比为 3:1 时,得检测限(LOD);当信噪比为 10:1 时,得定量限(LOQ),结果见表 1。

2.5 线性关系考察

分别精密量取“2.2.1”项下对照品贮备液适量,加水分别稀释 10 000、4 000、2000、500、10 倍制成系列单一对照品溶

液。精密量取上述系列单一对照品溶液各 1 ml,按“2.1”项下试验条件进样测定,记录峰面积,得回归方程与线性范围,详见表 2。

表 1 检测限和定量限测定结果(n=3)

Tab 1 Results of limits of detection and quantification(n=3)		
待测成分	LOD, μg/ml	LOQ, μg/ml
乙醇	1.000	0.24
正己烷	0.025	0.012
苯	0.025	0.011
甲苯	0.025	0.014
二甲苯	0.100	0.025
苯乙烯	0.025	0.013
二乙苯	0.250	0.050

表 2 回归方程与线性范围(n=6)

Tab 2 Results of detection limit(n=6)			
待测成分	回归方程	线性关系, μg/ml	r
乙醇	y=242.8x+1302	25~500	0.998 7
正己烷	y=6.3004x-741.42	0.025~10	0.998 8
苯	y=5.7229x-18.178	0.025~10	0.999 9
甲苯	y=4.6288x-48.169	0.1~40	1.000 0
二甲苯	y=1.9315x-26.449	0.25~100	0.999 9
苯乙烯	y=1960.4x+1563	0.5~500	1.000 0
二乙苯	y=681.57x+836.76	0.5~500	1.000 0

2.6 精密度试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下试验条件连续进样测定 6 次,记录峰面积,结果见表 3。

表 3 精密度试验结果(n=3)

Tab 3 Results of precision tests(n=3)		
待测成分	质量浓度, μg/ml	RSD, %
乙醇	200	2.32
	50	1.59
	25	1.52
正己烷	10	1.52
	1	3.78
	0.05	3.44
苯	10	1.72
	1	3.25
	0.05	3.31
甲苯	40	1.64
	4	3.84
	0.2	2.63
二甲苯	100	1.78
	10	3.89
	0.5	2.32
苯乙烯	500	1.45
	50	3.61
	5	4.16
二乙苯	500	2.14
	50	3.79
	5	4.67

2.7 稳定性试验

取“2.2.3”项下供试品溶液(批号:20141115)适量,分别于放置 0、1、3、6、9、12 h 时进样测定,记录峰面积。结果,正己烷、苯、甲苯、二甲苯、苯乙烯、二乙苯均未检出,乙醇的含量均值为 0.023%,RSD=3.90%(n=6),表明供试品溶液在 12 h

内基本稳定。

2.8 重复性试验

精密称取同一批样品(批号:20141115)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,共 6 份,再按“2.1”项下试验条件进样测定,记录峰面积。结果,正己烷、苯、甲苯、二甲苯、苯乙烯、二乙苯未检出,乙醇的含量均值为 0.02%,RSD=3.2%,表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

取已知含量样品(批号:20141115)适量,共 6 份,分别加入高、中、低质量的对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下试验条件进样测定,计算样品中残留溶剂含量,并计算加样回收率,结果见表 4。

表 4 加样回收率试验结果(n=9)

Tab 4 Results of recovery tests(n=9)								
待测成分	取样量,g	样品含量,μg	加入量,μg	测得量,μg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%	
乙醇	0.253 3	5.066 0	625.000 0	641.941 0	101.90%	100.62	1.08	
	0.252 0	5.040 0	625.000 0	636.915 0	101.10%			
	0.254 3	5.086 0	625.000 0	646.961 0	102.70%			
	0.255 0	5.100 0	1250.000 0	1 261.350 0	100.50%			
	0.250 0	5.000 0	1250.000 0	1 258.750 0	100.30%			
	0.254 5	5.090 0	1250.000 0	1 256.340 0	100.10%			
	0.253 7	5.074 0	1875.000 0	1 872.574 0	99.60%			
	0.253 2	5.064 0	1875.000 0	1 873.501 5	99.65%			
	0.254 6	5.092 0	1875.000 0	1 874.467 0	99.70%			
	0.253 3	0.000 0	2.500 0	2.507 5	100.30%	94.69	4.51	
	0.252 0	0.000 0	2.500 0	2.507 5	100.30%			
	0.254 3	0.000 0	2.500 0	2.507 5	100.30%			
正己烷	0.255 0	0.000 0	5.000 0	4.542 0	90.84%			
	0.250 0	0.000 0	5.000 0	4.535 0	90.70%			
	0.254 5	0.000 0	5.000 0	4.599 0	91.98%			
	0.253 7	0.000 0	7.500 0	6.945 0	92.60%			
	0.253 2	0.000 0	7.500 0	6.930 0	92.40%			
	0.254 6	0.000 0	7.500 0	6.960 0	92.80%			
	0.253 3	0.000 0	0.2500	0.270 0	108.00%	104.97	3.82	
	0.252 0	0.000 0	0.25 00	0.266 3	106.50%			
	0.254 3	0.000 0	0.250 0	0.273 8	109.50%			
	0.255 0	0.000 0	0.500 0	0.500 5	100.10%			
	0.250 0	0.000 0	0.500 0	0.501 5	100.30%			
	0.254 5	0.000 0	0.500 0	0.501 0	100.20%			
	0.253 7	0.000 0	0.7500	0.800 3	106.70%			
	0.253 2	0.000 0	0.750 0	0.777 0	103.60%			
	0.254 6	0.000 0	0.750 0	0.823 5	109.80%			
苯	0.253 3	0.000 0	2.500 0	2.500 0	100.00%	103.00	4.40	
	0.252 0	0.000 0	2.500 0	2.512 5	100.50%			
	0.254 3	0.000 0	2.500 0	2.487 5	99.50%			
	0.255 0	0.000 0	5.000 0	5.000 0	100.00%			
	0.250 0	0.000 0	5.000 0	5.015 0	100.30%			
	0.254 5	0.000 0	5.000 0	4.985 0	99.70%			
	0.253 7	0.000 0	7.500 0	8.175 0	109.00%			
	0.253 2	0.000 0	7.500 0	8.100 0	108.00%			
	0.254 6	0.000 0	7.500 0	8.250 0	110.00%			
	0.253 3	0.000 0	2.500 0	2.522 5	100.90%	102.80	3.50	
	0.252 0	0.000 0	2.500 0	2.512 5	100.50%			
	0.254 3	0.000 0	2.500 0	2.532 5	101.30%			
甲苯	0.255 0	0.000 0	5.000 0	5.005 0	100.10%			
	0.250 0	0.000 0	5.000 0	5.010 0	100.20%			
	0.254 5	0.000 0	5.000 0	5.000 0	100.00%			

续表 4
Continued tab 4

待测成分	取样量,g	样品含量,μg	加入量,μg	测得量,μg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
苯乙烯	0.253 7	0.000 0	7.500 0	8.077 5	107.70%	98.47	3.73
	0.253 2	0.000 0	7.500 0	7.905 0	105.40%		
	0.254 6	0.000 0	7.500 0	8.182 5	109.10%		
	0.253 3	0.000 0	2.500 0	2.500 0	100.00%		
	0.252 0	0.000 0	2.500 0	2.512 5	100.50%		
	0.254 3	0.000 0	2.500 0	2.487 5	99.50%		
	0.255 0	0.000 0	5.000 0	5.085 0	101.70%		
	0.250 0	0.0000	5.000 0	5.055 0	101.10%		
	0.254 5	0.0000	5.000 0	5.115 0	102.30%		
	0.253 7	0.0000	7.500 0	7.005 0	93.40%		
二乙烯苯	0.253 2	0.0000	7.500 0	7.027 5	93.70%	101.03	0.79
	0.254 6	0.0000	7.500 0	7.050 0	94.00%		
	0.253 3	0.000 0	2.500 0	2.500 0	100.00%		
	0.252 0	0.000 0	2.500 0	2.507 5	100.30%		
	0.254 3	0.000 0	2.500 0	2.492 5	99.70%		
	0.255 0	0.000 0	5.000 0	5.075 0	101.50%		
	0.250 0	0.000 0	5.000 0	5.065 0	101.30%		
	0.254 5	0.000 0	5.000 0	5.085 0	101.70%		
	0.253 7	0.000 0	7.500 0	7.620 0	101.60%		
	0.253 2	0.000 0	7.500 0	7.612 5	101.50%		
	0.254 6	0.000 0	7.500 0	7.627 5	101.70%		

2.10 样品中残留溶剂的测定

取3批样品各适量,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下试验条件进样测定,计算样品中残留溶剂含量,结果见表5(质量要求:乙醇不得超过5‰,正己烷不得超过0.02‰,苯不得超过0.002‰,甲苯不得超过0.02‰,二甲苯不得超过0.02‰,苯乙烯不得超过0.02‰,二乙烯苯不得超过0.02‰)。

表5 样品中残留溶剂的测定结果(n=3,‰)

Tab 5 Determination results of residual organic solvents sample(n=3,‰)

样品批号	乙醇	正己烷	苯	甲苯	二甲苯	苯乙烯	二乙烯苯
20141115	0.02	<0.000 25	<0.000 25	<0.000 25	<0.001	<0.000 25	<0.002 5
20141220	0.03	<0.000 25	<0.000 25	<0.000 25	<0.001	<0.000 25	<0.002 5
20140125	0.02	<0.000 25	<0.000 25	<0.000 25	<0.001	<0.000 25	<0.002 5

3 讨论

3.1 色谱柱的选择

本试验分别选用DB-INNOWAX、DB-17、DB-624弹性石英毛细管柱进行测定,结果DB-INNOWAX、DB-17弹性石英柱均不能将对照品溶液很好分离;DB-624弹性石英柱可将对照品溶液中各成分完全分离,运行时间为15 min,因此笔者选用DB-624弹性石英柱测定六味地黄苷糖原料药中有机溶剂残留量。

3.2 顶空平衡温度与时间的确定

因溶剂为含二甲基亚砩0.2%的超纯水溶液,故样品平衡温度不能过高,笔者考察了75、80、85℃平衡30 min对各待测成分测定的影响,发现温度升高将促进灵敏度提高,但考虑到各溶剂灵敏度增加程度,仪器性能的参数,最终选择80℃作为平衡温度。笔者分别考察了80℃平衡20、30、40 min后进样,结果30 min时各主成分的峰面积达最大值,故选择30 min作为平衡时间。

综上所述,本方法操作简便、稳定、重复性好,可用于六味地黄苷糖原料药中残留溶剂乙醇、正己烷、苯、甲苯、二甲苯、苯乙烯、二乙烯苯的测定。

参考文献

[1] 王晓燕,孙磊,乔善义.六味地黄苷糖中糖苷部位的化学成分研究[J].中国中药杂志,2012,37(17):2 576.

[2] 高文分,袁文娟,张启明,等.顶空气相色谱法测定三七总皂苷中有机溶剂残留量及大孔吸附树脂有机残留物[J].药物分析杂志,2007,27(3):460.

[3] 方秋雪,刁兴利,万谦宏,等.顶空气相色谱法测定瑞替加滨原料药中残留溶剂[J].分析测试学报,2013,32(3):308.

[4] International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. In Q3C(R4) impurities: guidelines for residual solvents[S].2009.

[5] 滕怀凤,佟晓波,孙晓娟.气相色谱法测定厄贝沙坦中9种残留溶剂[J].中国药师,2015,18(2):317.

[6] 王昊欣,王霄,张丽芳,等.气相色谱法检测沙咪珠利中的残留溶剂[J].中国兽药杂志,2014,48(3):38.

[7] 秦宇芬,睢凤英,傅应华,等.顶空毛细管-气相色谱法测定腺嘌呤原料药中5种有机溶剂残留量[J].中国药房,2014,25(9):840.

[8] 潘栋辉,杨敏,徐宇平,等.顶空气相色谱法测定依匹必利原料药中有机溶剂残留量[J].中国药房,2009,20(25):1 976.

[9] 陆烨,夏宇沁,昌军,等.毛细管气相色谱法测定13种有机溶剂残留[J].复旦学报:医学版,2013,40(2):222.

(收稿日期:2015-11-19 修回日期:2015-12-21)

(编辑:张 静)