

顶空气相色谱法同时测定黄蜀葵花总黄酮提取物中9种有机溶剂的残留量

张清华*, 张治云#, 杨海霞(山东省药学院, 济南 250101)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)14-1946-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.14.15

摘要 目的:建立同时测定黄蜀葵花总黄酮提取物中9种有机溶剂残留量的方法。方法:采用顶空气相色谱法测定黄蜀葵花总黄酮提取物中苯、丙烯腈、甲基丙烯酸甲酯、甲苯、1,2-二氯乙烷、二甲苯、氯苯、苯乙烯、二乙烯苯等9种残留溶剂的含量。色谱柱为Agilent DB-WAX毛细管柱(30 m×0.25 mm, 0.25 μm),程序升温;氢焰离子化检测器温度为250 ℃,进样口温度为250 ℃;载气为氮气,流速为1.2 mL/min,分流比为10:1;顶空进样量为1 mL,顶空平衡温度为90 ℃,平衡时间为45 min。结果:9种待测成分色谱峰之间的分离度均大于1.5,空白溶剂(10% N-甲基吡咯烷酮水溶液)无干扰;其检测质量浓度的线性范围分别为0.16~1.21、0.80~6.03、1.61~12.09、1.62~12.12、0.16~1.21、1.60~12.01、0.81~6.11、1.60~12.03、0.80~6.03 μg/mL($r \geq 0.999 4$);定量限分别为0.162 08、0.201 08、0.080 6、0.080 768、0.161 92、0.400 36、0.040 712、0.026 736、0.013 395 μg/mL,检测限分别为0.040 52、0.040 216、0.026 87、0.026 9、0.040 48、0.080 072、0.013 57、0.008 912、0.004 465 μg/mL;精密度的RSD均小于5%;平均回收率为99.41%~111.27%(RSD<9%, $n=9$)。3批黄蜀葵花总黄酮提取物中试样品中均未检出上述9种残留溶剂。结论:所建立方法简便、准确、可靠,可用于黄蜀葵花总黄酮提取物中9种有机溶剂残留量的同时测定。

关键词 黄蜀葵花总黄酮;顶空气相色谱法;残留溶剂

Simultaneous Determination of 9 Kinds of Organic Solvents Residues in Total Flavonoids Extracts from *Abelmoschus manihot* by Headspace GC

ZHANG Qinghua, ZHANG Zhiyun, YANG Haixia (Shandong Academy of Pharmaceutical Sciences, Jinan 250101, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of 9 kinds of organic solvents residues in total flavonoids extracts from *Abelmoschus manihot*. METHODS: Headspace GC was adopted to determine the contents of 9 kinds of organic solvents residues in total flavonoids extracts from *A. manihot*, such as benzene, acrylonitrile, methyl methacrylate, toluene, 1, 2-dichloroethane, xylene, chlorobenzene, styrene and divinylbenzene. The determination was performed on Agilent DB-WAX capillary column (30 m×0.25 mm, 0.25 μm) through temperature-programmed route. The inlet temperature and FID detector temperature were set at 250 ℃. The carrier gas was nitrogen with the flow rate of 1.2 mL/min. The split ratio was 10:1. The containers of headspace injector were in equilibrium at 90 ℃ for 45 min and the sample size was 1 mL. RESULTS: The separation degree among the peaks of 9 components was greater than 1.5, and the blank solvent (10% N-methyl pyrrolidone aqueous solution) had no interference. The linear ranges of them were 0.16-1.21, 0.80-6.03, 1.61-12.09, 1.62-12.12, 0.16-1.21, 1.60-12.01, 0.81-6.11, 1.60-12.03, 0.80-6.03 μg/mL, respectively ($r \geq 0.999 4$). The limits of quantitation were 0.162 08, 0.201 08, 0.080 6, 0.080 768, 0.161 92, 0.400 36, 0.040 712, 0.026 736, 0.013 395 μg/mL; the limits of detection were 0.040 52, 0.040 216, 0.026 87, 0.026 9, 0.040 48, 0.080 072, 0.013 57, 0.008 912, 0.004 465 μg/mL, respectively. RSDs of precision ($n=5$) and reproducibility ($n=6$) tests were all lower than 5%. Average recoveries were 99.41% -111.27% (RSD<9%, $n=9$). Above 9 residual solvents were not detected in 3 batches of total flavonoids extracts from *A. manihot*. CONCLUSIONS: Established method is simple, accurate and reliable, and can be applied for simultaneous detection of 9 kinds of organic solvents residues in total flavonoids extracts from *A. manihot*.

KEYWORDS Total flavonoids from *Abelmoschus manihot*; Headspace gas chromatography; Residual solvents

黄蜀葵为锦葵科植物黄蜀葵 [*Abelmoschus manihot* (L.)] 的干燥花冠,始载于宋代掌禹锡所著《嘉佑本草》,后历代本草均有记载。《嘉佑本草》记载黄蜀葵:“治诸恶疮、脓水久不瘥者,作末敷之即愈,为疮家要

药”。《本草纲目》记载:“其主治小便淋及催生,消痈肿,浸油涂汤火伤”。现代药理学研究证明,黄蜀葵花总黄酮具明显的抗炎、抑菌、镇痛、抗病毒及促进愈合等药理作用^[1-4],并可通过抑制心肌脂质过氧化、抑制心肌炎症反应,对缺血再灌注损伤的心肌细胞发挥保护作用^[5]。

大孔吸附树脂是一类具有大孔结构的高分子吸附材料,已广泛应用于医药、食品、环保等领域。大孔吸附树脂多以苯乙烯、二乙烯苯、丙烯酸酯、丙烯腈等为原

* 主管中药师,硕士。研究方向:中药新药研究与开发。电话:0531-81213089。E-mail:zqh_914@163.com

通信作者:副主任药师,硕士。研究方向:药物分析和质量控制。电话:0531-81213065。E-mail:simmon20001@163.com

制备,经过其分离纯化的中药提取物及活性成分可能会引入苯、甲苯、氯苯、二甲苯等有机物,因此有必要进行相关残留物检测^[9-10]。黄蜀葵花总黄酮是将黄蜀葵花药材采用乙醇提取浓缩后,经过大孔吸附树脂进行纯化,用不同比例的水/乙醇梯度洗脱,并将乙醇洗脱液浓缩干燥所得。在其制备过程中就采用了大孔吸附树脂进行纯化。因此,本研究参考国家标准文件(GB/T 24396-2009)^[11]和2015年版《中国药典》(四部)附录0861^[12],以苯、丙烯腈、甲基丙烯酸甲酯、甲苯、1,2-二氯乙烷、二甲苯、氯苯、苯乙烯、二乙烯苯为检测指标,采用顶空气相色谱法测定了黄蜀葵花总黄酮提取物中的大孔树脂残留物,以保证该中药材提取物的质量安全,现报道如下。

1 材料

1.1 仪器

6890N型气相色谱仪,包括7694E型顶空进样器、氢火焰离子化(FID)检测器(美国Agilent公司);XS-205型电子天平(瑞士Mettler-Toledo公司);KQ-50E型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

黄蜀葵花总黄酮提取物[本课题组自制,批号分别为20091212(初试样品)和20170115、20170223、20170225(中试样品)];所用药材均产自江苏徐州,每克提取物相当于生药28.6g;苯(分析纯)、1,2-二氯乙烷(色谱纯)、二甲苯(色谱纯)、苯乙烯(色谱纯)、*N*-甲基吡咯烷酮(NMP,色谱纯)均购自天津市科密欧化学试剂有限公司;丙烯腈(化学纯)、氯苯(分析纯)、二乙烯苯(化学纯)、甲苯(色谱纯)均购自国药集团化学试剂有限公司;苯乙醚(内标,色谱纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);甲基丙烯酸甲酯(分析纯,天津市大茂化学试剂厂);其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent DB-WAX毛细管柱(30 m×0.25 mm,0.25 μm);程序升温:起始温度32℃,保持6 min,以10℃/min的速率升温至150℃,再以20℃/min的速率升温至220℃,保持2 min;FID检测器温度:250℃;进样口温度:250℃;载气为氮气,流速:1.2 mL/min;分流比:10:1;顶空进样,顶空瓶体积:10 mL,顶空平衡温度:90℃,平衡时间:45 min;进样量:1 mL。

2.2 溶液制备

2.2.1 内标溶液 精密称取苯乙醚100.27 mg,置于50 mL量瓶中(事先已加入适量NMP),再加NMP稀释至刻度,摇匀;精密量取2.5 mL,置于25 mL量瓶中,加10% NMP水溶液稀释至刻度,摇匀,作为内标贮备液。精密量取该贮备液适量,加10% NMP水溶液稀释制成苯乙醚质量浓度约为4 μg/mL的溶液,即得。

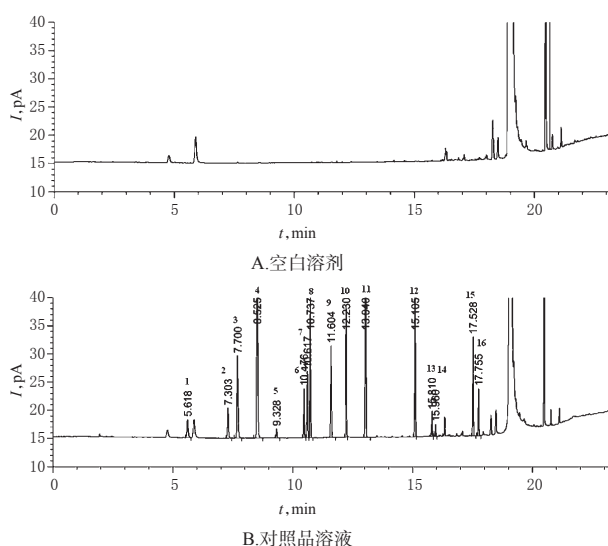
2.2.2 对照品溶液 (1)精密称取苯10.13 mg、1,2-二氯乙烷10.12 mg、丙烯腈50.27 mg、氯苯50.89 mg、二乙烯苯50.23 mg、甲基丙烯酸甲酯100.75 mg、甲苯100.96

mg、二甲苯100.09 mg、苯乙烯100.26 mg,置于同一50 mL量瓶(事先已加入适量NMP),以NMP稀释至刻度,摇匀;精密量取2.5 mL,置于25 mL量瓶中,加10% NMP水溶液稀释至刻度,摇匀,作为对照品贮备液 I。(2)分别精密量取对照品贮备液 I 和“2.2.1”项下内标贮备液适量,加10% NMP水溶液稀释制成含苯、1,2-二氯乙烷分别约为0.4 μg/mL,含丙烯腈、氯苯、二乙烯苯分别约为2 μg/mL,含甲基丙烯酸甲酯、甲苯、二甲苯、苯乙烯、苯乙醚(内标)分别约为4 μg/mL的混合溶液,作为对照品贮备液 II。(3)取黄蜀葵花总黄酮提取物0.4 g,精密称定,置于10 mL顶空瓶中,精密加入对照品贮备液 II 2.0 mL,密封,超声(功率:50 W,频率:40 kHz,下同)处理2 min使溶解,轻轻摇匀,即得。

2.2.3 供试品溶液 取黄蜀葵花总黄酮提取物0.4 g,精密称定,置于10 mL顶空瓶中,精密加入10% NMP水溶液2.0 mL,密封,超声处理2 min使溶解,轻轻摇匀,即得。

2.3 系统适用性试验

取空白溶剂(10% NMP水溶液)和对照品溶液,分别按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果显示,对照品溶液中各待测成分出峰顺序依次为苯、丙烯腈、甲基丙烯酸甲酯、甲苯、1,2-二氯乙烷、二甲苯(呈现四峰)、氯苯、苯乙烯、苯乙醚、二乙烯苯(呈现四峰),且各待测峰之间的分离度均大于1.5;空白溶剂对上述成分检测无干扰。色谱图详见图1。



注:1.苯;2.丙烯腈;3.甲基丙烯酸甲酯;4.甲苯;5.1,2-二氯乙烷;6~9.二甲苯(四峰);10.氯苯;11.苯乙烯;12.苯乙醚;13~16.二乙烯苯(四峰)

Note: 1. benzene; 2. acrylonitrile; 3. methyl methacrylate; 4. toluene; 5. 1, 2-dichloroethane; 6-9. xylene (four peaks); 10. chlorobenzene; 11. styrene; 12. phenylether; 13-16. divinylbenzene (four peaks)

图1 对照品溶液和空白溶剂气相色谱图

Fig 1 GC chromatograms of control solution and blank solvent solution

2.4 线性关系考察

精密量取“2.2.2”项下对照品贮备液 I 0.2、0.3、0.5、

1.0、1.5 mL,分别置于25 mL量瓶中,均精密加入“2.2.1”项下内标贮备液0.5 mL,以10% NMP水溶液稀释至刻度,摇匀,制得线性系列对照品溶液(编号分别为①②③④⑤)。精密称取黄蜀葵花总黄酮提取物0.4 g,置于10 mL顶空瓶中,平行操作5份,分别精密加入上述线性系列对照品溶液2 mL,密封,超声使溶解,按“2.1”项下色谱条件进样测定。另同步制备不加对照品贮备液、只加提取物样品0.4 g的顶空瓶作为基质样品,同法测定(以下同)。以对照品溶液中待测成分质量浓度(x , $\mu\text{g/mL}$)为横坐标、对照品溶液中各被测成分峰面积(需扣除基质样品中对应成分的峰面积,以下同;二甲苯、二乙烯苯均按其4个峰的峰面积之和计算)与内标峰面积的比值(y)为纵坐标进行线性回归,结果见表1。

表1 线性关系试验结果

Tab 1 Results of linear relationship test

待测成分	回归方程	r	线性范围, $\mu\text{g/mL}$
苯	$y=0.2971x-0.0064$	0.9997	0.16~1.21
丙烯腈	$y=0.1252x-0.0111$	0.9997	0.80~6.03
甲基丙烯酸甲酯	$y=0.1680x-0.0335$	0.9998	1.61~12.09
甲苯	$y=0.3767x-0.1376$	0.9996	1.62~12.12
1,2-二氯乙烷	$y=0.1021x-0.0063$	0.9994	0.16~1.21
二甲苯	$y=0.3823x-0.1212$	0.9995	1.60~12.01
氯苯	$y=0.2623x-0.0258$	0.9997	0.81~6.11
苯乙烯	$y=0.3748x-0.0673$	0.9997	1.60~12.03
二乙烯苯	$y=0.1337x+0.1258$	0.9988	0.80~6.03

2.5 定量限和检测限考察

精密量取“2.4”项下③号线性对照品溶液,以10% NMP水溶液进行适当稀释后,按“2.1”项下色谱条件进样测定。按信噪比10:1考察定量限,结果苯、丙烯腈、甲基丙烯酸甲酯、甲苯、1,2-二氯乙烷、二甲苯、氯苯、苯乙烯、二乙烯苯的定量限分别为0.162 08、0.201 08、0.080 6、0.080 768、0.161 92、0.400 36、0.040 712、0.026 736、0.013 395 $\mu\text{g/mL}$;按信噪比3:1考察检测限,结果上述待测成分的检测限分别为0.040 52、0.040 216、0.026 87、0.026 9、0.040 48、0.080 072、0.013 57、0.008 912、0.004 465 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.6 精密度试验

精密量取“2.2.2”项下对照品贮备液 I 0.5 mL,置于25 mL量瓶中,精密加入“2.2.1”项下内标贮备液0.5 mL,以10% NMP水溶液稀释至刻度,摇匀,作为贮备液 III;精密称取黄蜀葵花总黄酮提取物0.4 g,置于10 mL顶空瓶中,平行操作5份,分别精密加入贮备液 III 2.0 mL,密封,超声使溶解,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定,记录峰面积。结果,苯、丙烯腈、甲基丙烯酸甲酯、甲苯、1,2-二氯乙烷、二甲苯、氯苯、苯乙烯、二乙烯苯峰面积与内标峰面积比值的RSD分别为0.80%、2.98%、1.63%、2.60%、2.69%、4.92%、2.56%、2.88%、4.42% ($n=5$),表明仪器连续进样精密度良好。

2.7 重复性试验

精密称取黄蜀葵花总黄酮提取物(批号:20091212)0.4 g,置于10 mL顶空瓶中,共6份,分别精密加入

“2.2.1”项下内标溶液2.0 mL,密封,超声使溶解,摇匀,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,按内标法计算各待测成分含量。结果,样品中甲基丙烯酸甲酯、二甲苯、苯乙烯、二乙烯苯平均含量分别为0.000 032%、0.000 015%、0.000 009%、0.000 053% (RSD分别为3.95%、2.84%、3.42%、2.51%, $n=6$),而苯、丙烯腈、甲苯、1,2-二氯乙烷、氯苯则均未检出。

2.8 回收率试验

精密量取“2.2.2”项下对照品贮备液 I 0.4、0.5、0.6 mL,置于25 mL量瓶中,分别精密加入“2.2.1”项下内标贮备液0.5 mL,以10% NMP水溶液稀释至刻度,摇匀,作为80%、100%、120%回收对照品溶液。取9支10 mL顶空瓶(编号为1~9),分别加入已测得各组分含量的黄蜀葵花总黄酮提取物(批号:20091212)0.4 g;1~3号顶空瓶均分别加入80%回收对照品溶液2 mL,4~6号顶空瓶均分别加入100%回收对照品溶液2 mL,7~9号顶空瓶均分别加入120%回收对照品溶液2 mL,超声使溶解,摇匀,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,按内标法计算苯、丙烯腈、甲基丙烯酸甲酯、甲苯、1,2-二氯乙烷、二甲苯、氯苯、苯乙烯、二乙烯苯的含量,并计算回收率。结果,上述待测成分的平均回收率分别为101.76%、99.41%、99.71%、104.12%、111.27%、105.70%、102.95%、102.61%、101.72% (RSD分别为2.88%、3.27%、1.21%、3.57%、8.16%、5.37%、2.97%、3.09%、4.50%, $n=9$),表明本方法准确度良好。

2.9 黄蜀葵花总黄酮提取物样品中残留溶剂含量测定

取3批黄蜀葵花总黄酮提取物中试样品(批号:20170115、20170223、20170225)适量,按“2.2.3”项下方法处理后,再按“2.7”项下方法测定9种残留溶剂含量。结果,3批样品中均未检出上述残留溶剂。

3 讨论

黄蜀葵花总黄酮提取物在水中的溶解性较差,本研究采用10% NMP水溶液为溶剂,可较好地溶解样品。笔者曾在预试验中尝试采用二甲基亚砜、 N,N -二甲基甲酰胺、 N,N -二甲基乙酰胺、水、NMP、10% NMP水溶液溶解提取物。结果发现,水不能完全溶解提取物,而二甲基亚砜、 N,N -二甲基甲酰胺、 N,N -二甲基乙酰胺均会对被测组分产生干扰;NMP虽能较好地溶解提取物,但会导致苯和1,2-二氯乙烷的响应值偏低,不能满足检测需求;采用10% NMP水溶液作为溶剂时,不仅能较好地溶解提取物,对各被测组分也无干扰,而且苯和1,2-二氯乙烷的响应值明显提高。

本课题组采用顶空气相色谱法同时测定黄蜀葵花总黄酮提取物中的苯、丙烯腈、甲基丙烯酸甲酯、甲苯、1,2-二氯乙烷、二甲苯、氯苯、苯乙烯、二乙烯苯等9种有机溶剂的含量。经前期优化色谱条件后,采用程序升温法能实现各待测成分的良好分离。其中,二甲苯、二乙烯苯均为其邻、间、对二甲苯/二乙烯苯等异构体的混合物^[12],导致色谱图上均呈现四峰现象,故均以4个峰的峰

山慈菇中总黄酮的提取工艺优化^Δ

王萌萌^{1*}, 谢典¹, 周育芳², 李晓静³, 徐步斌¹, 周斌^{1#} (1. 江西科技师范大学药学院, 南昌 330013; 2. 贵溪市罗河镇人民政府农综站, 江西贵溪 335400; 3. 海军勤务学院, 天津 300450)

中图分类号 R284.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)14-1949-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.14.16

摘要 目的: 建立山慈菇中总黄酮的含量测定方法, 并优化其提取工艺。方法: 采用紫外-可见分光光度法测定山慈菇中总黄酮的含量。以山慈菇中总黄酮含量为考察指标, 以乙醇体积分数、料液比、提取时间、提取次数为考察因素, 在单因素试验的基础上, 采用L₉(3⁴)正交设计优化山慈菇中总黄酮的提取工艺。结果: 芦丁检测质量浓度线性范围为8~48 μg/mL ($r=0.9997$); 定量限为0.54 μg/mL, 检测限为0.18 μg/mL; 精密性、稳定性、重复性试验的RSD均小于2%; 加样回收率为99.61%~102.38% (RSD=1.15%, $n=6$)。最优提取工艺为70%乙醇、料液比1:20(g/mL)、提取时间45 min、提取次数2次。在此条件下, 山慈菇中总黄酮的平均含量为2.74 mg/g。结论: 所建含量测定方法简单、准确; 所得提取工艺稳定、可行。

关键词 山慈菇; 总黄酮; 芦丁; 正交设计; 提取工艺; 紫外-可见分光光度法; 含量测定

Optimization of the Extraction Technology of Total Flavonoids from *Typhonium divaricatum*

WANG Mengmeng¹, XIE Dian¹, ZHOU Yufang², LI Xiaojing³, XU Bubin¹, ZHOU Bin¹ (1. School of Pharmacy, Jiangxi Science and Technology Normal University, Nanchang 330013, China; 2. Comprehensive Agriculture Station, Luohe Town People's Government in Guixi City, Jiangxi Guixi 335400, China; 3. Naval Logistics Academy, Tianjin 300450, China)

面积之和计算对应成分总峰面积。

在本研究过程中发现, 采用顶空进样法时, 供试样品的基质效应对回收率试验结果影响较大, 如果不在对照品溶液中加入黄蜀葵花总黄酮提取物, 则所得各待测组分回收率明显偏低。为了消除基质效应的影响, 本课题组采用标准加入法^[12]进行回收率试验, 在对照品溶液中加入与样品溶液相同量的黄蜀葵花总黄酮提取物, 使对照品和供试样品处于相同的基质环境下, 结果显示, 各待测组分回收率均良好, 符合相关规定。

综上所述, 本方法简便、准确、稳定、可靠, 可用于黄蜀葵花总黄酮提取物中9种有机溶剂残留量的测定。

参考文献

[1] 范丽, 董六一, 江勤, 等. 黄蜀葵花总黄酮抗炎解热作用[J]. 安徽医科大学学报, 2003, 38(1): 25-26.
[2] 徐向进, 张家庆, 黄庆玲. 槲皮素对糖尿病大鼠肾脏非酶糖化及氧化的抑制作用[J]. 中华内分泌代谢杂志, 1998, 14(1): 34-37.
[3] 范丽, 袁丽萍, 陈志武. 黄蜀葵花总黄酮对小鼠急性心肌缺血缺氧损伤的保护作用[J]. 中国药房, 2005, 16(3): 176-177.

[4] 范丽, 袁丽萍, 陈志武. 黄蜀葵花总黄酮药理性预适应对家兔心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国药理学杂志, 2005, 40(11): 836-838.
[5] 黎望. 黄蜀葵花黄酮的提取及抗氧化性研究[D]. 无锡: 江南大学, 2017.
[6] 马茹君, 王莉, 杨华蓉, 等. GC法测定三七三醇皂苷中8种大孔吸附树脂的残留物[J]. 华西药学杂志, 2016, 31(2): 202-205.
[7] 马国萍, 陈丹, 黄群, 等. 玳玳果降脂提取物中大孔吸附树脂有机残留物的顶空气相色谱分析研究[J]. 福建医科大学学报, 2017, 51(6): 375-380.
[8] 许勇, 郑征伟, 钱大公, 等. 顶空气相色谱测定灯盏花素提取物中大孔树脂有机溶剂残留物[J]. 中成药, 2011, 33(8): 1351-1355.
[9] 蔡振华, 金松子, 蒋庆峰. 顶空气相色谱法测定黄芪提取物中大孔树脂有机溶剂残留[J]. 现代仪器与医疗, 2016, 22(1): 81-84.
[10] 付建武, 施之琪, 张茵茵, 等. 顶空气相色谱法同时测定人参总皂苷中10种树脂残留成分[J]. 药物分析杂志, 2017, 37(9): 1680-1686.
[11] 国家标准化管理委员会. GB/T24396-2009 食品工业用吸附树脂产品测定方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
[12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 四部[S]. 2015年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 63-64, 105-109.

(收稿日期: 2018-12-19 修回日期: 2019-06-11)

(编辑: 段思怡)

Δ 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 81560635, 81760701)

* 硕士研究生。研究方向: 药物分析。E-mail: wg_mgm@163.com

通信作者: 副教授, 硕士生导师, 博士。研究方向: 中药新药研究。E-mail: tju_zhoubin@163.com