顶空毛细管气相色谱法测定水飞蓟提取物中正己烷和醋酸乙酯残留量

张 宏[1]，张祝君[2]

（1. 四川师范大学生命科学学院，四川 成都 610068；2. 四川美大康药业集团技术研发中心，四川 成都 611731）

水飞蓟素为菊科植物水飞蓟 *Silybum marianum* Gaertn. 的果实经提取而得的混合物，具有抗自由基、抗脂质过氧化、抗肿瘤和降血脂作用、保护肝细胞膜、促进被损伤肝细胞合成 DNA 及结构蛋白、免疫调节和抗肝纤维化等药理活性，在临床上常将其作为抗肝损伤药物[1~3]。水飞蓟素在提取过程中使用了正己烷和醋酸乙酯溶剂，根据我国新药审批对天然产物中有机溶剂残留量的要求，必须测定生产工艺中接触到的某些溶剂的残留量。残留量的测定方法主要有气相色谱法、顶空气相色谱法、毛细管顶空气相色谱法、固相萃取-气质联用法、毛细管电泳法、反相高效液相色谱法、液相色谱-质谱、质谱等方法[4~10]。本实验采用顶空气相色谱法正己烷和醋酸乙酯残留量进行测定，结果表明该法重现性好，灵敏度高，操作简单、实用，结果准确可靠。

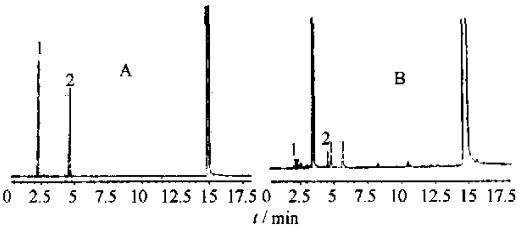
1 仪器与试剂

Agilent 6890 GC，HP2694E 顶空进样器，HP-Chemstation。水飞蓟提取物由四川美大康药业集团提供。正己烷、醋酸乙酯、二甲基甲酰胺（DMF）均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件和顶空进样器分析条件：色谱柱：英毛细管柱，FFAT（2-硝基对苯二甲酸封端的聚乙二醇 20 M 柱）（15 m×0.53 mm，1.0 μm）；载气：N_2，F=1.9 mL/min，S=15 cm/s；进样品温度：250 ℃，顶空不分流进样；柱温：采用程序升温：40 ℃（保持 5 min）以 10 ℃/min 升温至 150 ℃（保持 4 min）；监测器温度：250 ℃（FID），氢气：35 mL/min，空气：350 mL/min，N_2：32 mL/min；柱压：4.8 kPa；顶空条件：瓶压：50 kPa；瓶温：130 ℃，平衡 30 min，进样环管温度 140 ℃，传输管温度 140 ℃；灵敏度：1 AUFS。在此色谱条件下得到的色谱图见图 1。

2.2 标准曲线的制备：分别精密量取正己烷和醋酸乙酯适量，加 DMF 制成含正己烷 0.58 mg/mL 和醋酸乙酯 0.92 mg/mL 的溶液，摇匀，作为对照品储备液。将正己烷对照品储备液精确稀释 5 倍。分别准确移取正己烷稀释液和醋酸乙酯储备液各 0.1、0.5、1.0、2.0、4.0、8.0、10 mL 于 10 mL 量瓶中，用 DMF 稀释至刻度，摇匀。顶空进样量为 1 μL。在上述色谱条件进行测定，每个质量浓度各测 3 次，以峰面积为纵坐标，质量浓度为横坐标，进行线性回归，绘制标准曲线。正己烷：Y=0.537 8 X−0.033 98，r=0.999 8，线性范围：1.16～116 μg/mL；醋酸乙酯：Y=0.198 2 X−0.011 25，r=0.999 6，线性范围：9.2～920 μg/mL。精密量取上述质量浓度最小的混合对照品溶液适量，加 70% DMF 溶液稀释 10、50、100、200 倍后，顶空进样 1 μL，直到峰高约为基线噪声的 3 倍，得最低检出量，正己烷：0.023 2 μg/mL，醋酸乙酯：0.092 0 μg/mL。



1-正己烷 2-醋酸乙酯

1-*n*-hexane 2-ethyl acetate

图 1 对照品（A）和水飞蓟提取物（B）的 GC 色谱图

Fig. 1 GC Chromatogram of reference substance (A) and *S. marianum* extract (B)

2.3 精密度试验：在上述色谱条件下，正己烷和醋酸乙酯的质量浓度分别为 1.16、36.8 μg/mL 时，连续进样 5 次，结果正己烷和醋酸乙酸峰面积的 RSD 分别为 1.04% 和 0.23%。

2.4 稳定性试验：以水飞蓟素提取物样品（批号 040101）制备供试品溶液，室温下放置，在 0、1、2、4、6、8、10、12、24 h 分别进样 1 μL，进行测定。以峰面积计的 RSD 分别为 1.45%（正己烷）、0.28%（醋酸乙酯），表明在 8 h 以内溶液稳定。

2.5 重现性试验：分别准确称取水飞蓟素提取物样

收稿日期：2005-10-10

作者简介：张 宏（1965—），女，重庆市人，副教授，博士，主要从事植物化学与药物分析的科研教学工作，发表相关文章近 20 篇。
Tel：（028）81267211 Fax：（028）84766126 E-mail：zhanghong65@263.net

品(批号 040101) 1.5 g,各 6 份,制备供试品溶液,各进样 1 μL,测定样品中正己烷和醋酸乙酯的质量分数,计算其 RSD 分别为 2.8%、0.82%。

2.6 加样回收率试验:分别准确称取一定量的样品(批号 040101,正己烷和醋酸乙酯的质量分数分别为 3.29×10^{-6},1.795×10^{-5}于 10 mL 量瓶中,分别加入对照品储备液 0.1、0.5、1.0 mL,用 DMF 溶解并定容。摇匀。顶空进样量为 1 μL,在上述色谱条件下进行分析,结果正己烷的平均回收率为 99.82%,RSD 为 0.421%,醋酸乙酯的平均回收率为 99.84%,RSD 为 0.418% ($n=9$)。

2.7 样品中正己烷和醋酸乙酯残留量的测定:按照所述色谱条件测定了水飞蓟素提取物中正己烷和醋酸乙酯残留量,结果见表 1。实验结果得出水飞蓟提取物的正己烷和醋酸乙酯残留量限定在 4×10^{-6}和 2×10^{-5}以内。

表 1 水飞蓟提取物中正己烷和醋酸乙酯 ($n=3$)

Table 1 *n*-Hexane and ethyl acetate residues in *S. marianum* extracts ($n=3$)

批号	质量分数		标准
	正己烷	醋酸乙酯	
040101	3.29×10^{-6}	1.795×10^{-5}	符合规定
040102	3.26×10^{-6}	1.786×10^{-5}	符合规定
040103	2.69×10^{-6}	1.723×10^{-5}	符合规定

3 讨论

3.1 色谱柱的确定:由于在同一样品中同时检测正己烷和醋酸乙酯,而正己烷和醋酸乙酯的极性差别较大,在实验中考察了不同极性的毛细管柱。实验表明极性较大的毛细管柱的分离效果最好,因此选用了 FFAP(2-硝基对苯二甲酸封端的聚乙二醇 20M 柱)(15 m×0.53 mm×1.0 μm)。

3.2 柱温的选择:在实验中,选择了初始温度为 40 ℃,保持 5 min 后,以 10 ℃/min 程序升温至 150 ℃的柱温条件。在此条件下,有利于正己烷和醋酸乙酯的良好分离,既不影响分离度又加快了分析速度;同时,在 150 ℃的柱温下再保持 4 min 是将较长保留的溶剂 DMF 冲洗出来,不干扰下一次进样分析。

3.3 顶空条件的选择:顶空进样是将顶空瓶升温,使挥发性组分的蒸汽压增高,被测组分在一定的蒸汽压下能被检测。同时,使瓶内的蒸汽压高于载气压力,挥发性组分可通过高压驱动迅速进入进样阀,被检测。另外,高的瓶压还能抑制高沸点的大量溶剂进入色谱柱,使得样品前处理简便易行,避免样品杂质对色谱系统的干扰和色谱柱的严重污染。在实验中确定的顶空条件是瓶压高于载气压力 20~50 kPa。进样阀和样品传输管的温度只要略高于瓶温即可。因为温度高些,来自顶空瓶的样品气不会冷凝。实验中采用高于瓶温 10 ℃。

3.4 溶剂的选择:由于被测样品有一定的极性,同时考虑到其他溶剂对被测组分有较强的干扰,根据分析组分和色谱柱的选择,选择了溶解性能好且干扰小的二甲基甲酰胺(DMF)作为溶剂。这样既能很好地溶解样品又能使溶剂峰在所有被分析组分之后出峰,避免了大量溶剂的干扰。

目前许多中成药是以中药材的提取物为原料而制得的。为了更好地利用中药材的有效成分,在生产工艺中,生产厂家根据有效成分的性质选择一定的有机溶剂进行提取。为了保证药品的安全性,中药材提取物中有机溶剂残留量的测定就成为研究者关注的问题,也是药品质量的检测的重点关注的问题,对这些溶剂的测定在《中国药典》2005 版附录作原则性规定。本实验采用顶空进样-毛细管气相色谱法对水飞蓟提取物中正己烷和醋酸乙酯溶剂残留量进行了测定,两组分质量分数均小于 2×10^{-5},完全符合有机溶剂残留量的测定的要求,保证用药的安全。

References:

[1] Yang J, Liu Y M, Liu Y Z. Advances in the pharmaceutical research on silymarin [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2004, 16 (2): 185-187.

[2] Tian J. Advances in pharmaceutical mechanism of curing liver damage using silymarin and its compound [J]. *Strait Pharm J* (海峡药学), 2004, 16 (5): 7-9.

[3] Sun T M, Li X. Advances in pharmacological research of silymarin [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31 (3): 229-232.

[4] Wang Q, Sun H, Zhu M, *et al*. Determination of the contents of residual solvents in zileuton by headspace gas chromatography [J]. *Pharm Care Res* (药学服务与研究), 2004, 4 (3): 247-249.

[5] Kong L L, Yi H X, Cui Q J. Determination of residual *n* butanol in Xin ning extract by gas chromatography [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2004, 35 (10): 1132-1133.

[6] Fu Z M, Bao J G, Jin M C, *et al*. Determination of clenbuterol residues in biological materials by GC/MS/MS [J]. *Chin J Healt Lab Tech* (中国卫生检验杂志), 2004, 14 (1): 26-27.

[7] Yuang G P, Chen S Z, Jin N B. Determination of the residual methanol in Huoxiang Zhengqi Shui by capillary gas chromatography with headspace sampling [J]. *Strait Pharm J* (海峡药学), 2004, 16 (3): 56-57.

[8] Huang B M, Zheng Y P, Yang B Y, *et al*. Determination of trichlorfon in vegetables by capillary electrophoresis [J]. *Chin J Anal Lab* (分析试验室), 2004, 23 (3): 1-3.

[9] Hu J Y, Zhang W J, Li J Z. Determination of residues of *o*-allylphenol and *p*/*o*-butanoylphenol in tomato by reversed phase high performance liqiud chromatography [J]. *Chin J Anal Chem* (分析化学), 2004, 32 (10): 1368-1370.

[10] Qi Y, Li S J, Zhan C R, *et al*. Simultaneous determination of sulfonylurea herbicides residues in soybeans by high performance liqiud chromatography mass spectrometry [J]. *Chin J Anal Chem* (分析化学), 2003, 32 (11): 1421-1425.