http://www.journals.zju.edu.cn/med

顶空毛细管气相法测定三七提取物中有机溶剂残留量

王翰华[1],倪珍珍[1,2],姚彤炜[1]
(1.浙江大学药学院 药物分析与药物代谢研究室,浙江 杭州 310058;
2.浙江大学医学院 附属第二医院,浙江 杭州 310009)

[摘 要] 目的:建立三七提取物中7种有机溶剂残留量的测定方法。方法:采用顶空毛细管气相色谱法,以标准溶液加入法测定三七提取物中有机溶剂残留量。结果:在考察的浓度范围内7种有机溶剂呈现良好的线性关系(乙醇r=0.9994、正己烷r=0.9982、苯r=0.9999、甲苯r=0.9991、二甲苯r=0.9994、苯乙烯r=0.9997、二乙烯苯r=0.9932),回收率81.74%~111.2%,理论板数均大于15 000,相邻峰的分离度均大于2,日内、日间精密度RSD均小于10%。结论:该方法简单、准确、灵敏度高、重现性好,排除了基质的干扰,适用于三七提取物中有机溶剂残留量的测定。

[关键词] 色谱法,气相;药物残留物;三七提取物;顶空进样法;毛细管气相色谱法;标准溶液加入法;有机溶剂残留量
[中图分类号] R 917 [文献标识码] A [文章编号] 1008-9292(2007)06-0598-06

Determination of residual organic solvents in *Panax notoginseng* extracts by capillary gas chromatography with headspace sampling

WANG Han-hua[1], NI Zhen-zhen[1,2], YAO Tong-wei[1] (1. *Department of Pharmaceutical Analysis and Drug Metabolism, College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou* 310058, *China*; 2. *The Second Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou* 310009, *China*)

[**Abstract**] **Objective**: To develope a headspace gas chromatography method for the determination of residual organic solvents *in Panax notoginseng* extracts. **Methods**: The samples were injected into HP-INNOWAX capillary column by headspace sampler and analyzed with FID detector using standard addition method. **Results**: There was a good linearity in the experimental concentration (r=0.9932-0.9999). The rate of recovery was in the rang of 81.74%-111.2%. The numbers of theoretical plates were more than 15 000 and the resolutions between the adjacent peaks were more than 2. The RSD of precision and accuracy were both less than 10%. **Conclusions**: The method is simple, accurate and sensitive with good reproducibility, which can be used for the determination of the residual organic solvents in *Panax notoginseng* extracts.

收稿日期:2006-12-18 修回日期:2007-03-15
基金项目:浙江省中医药管理局重点资助项目(2003KF001);浙江省科技厅计划重点资助项目(2004C33106).
作者简介:王翰华(1982—),男,药物分析学硕士研究生.
通讯作者:姚彤炜(1953—),女,教授,硕导,主要从事体内药物分析和中药与化学药品质量标准及稳定性研究;E-mail:yaotw@zju.edu.cn

[Key words] Chromatography, gas; Drug residues; Panax notoginseng extracts; Headspace injection; Capillary gas chromatography; Standard addition method; Residual organic solvents

[J Zhejiang Univ (Medical Sci), 2007,36(6):598-603.]

三七为五加科植物三七[*Panax notoginseng* (Burk.)]的干燥根，含有三七皂苷、三七素、黄酮、挥发油、氨基酸等成分[1]。三七是我国的传统名贵中药，主产于云南、广西等地。三七原药材已经可以由GAP控制质量，但是对药用的主体——三七提取物，05版药典未收录有关的质量标准，因此制定相关的质量标准显得尤为重要。目前大孔吸附树脂纯化技术已用于中药提取物的精制。此技术的应用可在保证有效成份的前提下，减少出膏量，有利于满足中药制剂现代化的要求。但是可能在使用中引入合成大孔树脂时使用的有机溶剂。本次实验在三七提取过程中使用了乙醇，在富集纯化过程中使用了大孔吸附树脂，在生产过程中可能引入乙醇、正己烷、苯、甲苯、二甲苯、苯乙烯、二乙烯苯等多种有机溶剂，因此，有必要对三七提取物中有机溶剂的残留量进行检测，控制产品的质量，确保中药产品的安全性。本研究采用外标法和标准溶液加入法，分别对三七提取物中有机溶剂进行了检测，通过方法学比较最后选用标准溶液加入法，排除了基质的干扰，分析结果令人满意。

1　材料和方法

1.1　主要仪器　Agilent 6890N气相色谱仪，配置氢火焰离子化检测器(FID)；Agilent 7694E顶空进样仪；HP ChemStations软件。

1.2　试剂　无水乙醇、正己烷、苯、甲苯、二甲苯、苯乙烯、二乙烯苯、N,N-二甲基甲酰胺(DMF)均为分析纯，水为超纯水。三七提取物由浙江大学药学院药理学与毒理学教研室提供(批号050701，050702，050703)。

2　方法与结果

2.1　顶空条件　顶空加热温度：80℃；加热时间：30 min；进样环温度：105℃；输送管温度：120℃；震摇强度为强烈，震摇3 min；进样体积为顶空瓶上部气体1 ml，自动顶空进样。

2.2　色谱条件　Agilent HP-INNOWAX(30 m×0.32 mm，0.25 μm)毛细管色谱柱；载气为高纯氮气(纯度≥99.999%)，柱流速1.3 ml·min^{-1}；气化室温度200℃；检测器温度240℃；氢气流速45.0 ml·min^{-1}，空气流速450 ml·min^{-1}，尾吹气(氮气)流速25.0 ml·min^{-1}；柱温为程序升温：起始温度60℃，保持9 min，以20℃·min^{-1}升温至200℃，保持3 min；分流进样，分流比5∶1。

2.3　溶液制备

2.3.1　对照品溶液制备：分别取无水乙醇、正己烷、苯、甲苯、二甲苯、苯乙烯、二乙烯苯适量，精密称定，置25 ml容量瓶中，加入DMF溶解，并稀释至刻度，作为对照品储备液。精密量取上述对照品储备液1 ml、2 ml、5 ml、10 ml置50 ml容量瓶中，加水至刻度，摇匀，得对照品溶液2、3、4、5，再从对照品溶液3中精密量取5 ml置50 ml容量瓶中，加水至刻度，摇匀，得对照品溶液1。

2.3.2　供试品溶液制备：取三七提取物约30 g，精密称定，加水超声溶解，转移至100 ml容量瓶中，加水稀释至刻度，摇匀即得。

2.3.3　标准溶液加入液制备：精密量取供试品溶液2.8 ml，置10 ml顶空瓶中，分别精密加入0.2 ml“2.3.1”项下不同浓度的对照品溶液，加盖密封，同法加入0.2 ml水，作为空白。

2.3.4　外标法对照品溶液制备：精密量取水2.8 ml，置10 ml顶空瓶中，分别精密加入0.2 ml“2.3.1”项下不同浓度的对照品溶液，加盖密封。

2.4　系统适用性试验　取加入对照品溶液5的标准溶液加入液，按上述色谱条件进行检测，色谱图见图1A，在所得的色谱图中，各组分峰的理论塔板数均大于15 000，各个相邻峰的分

离度均大于2。

2.5 标准曲线制备 取"2.3.3"项下标准溶液加入液和"2.3.4"项下外标法对照品溶液，按上述色谱条件进行检测。以加入的对照品溶液浓度X为横坐标，组分峰面积Y为纵坐标绘制标准曲线，进行线性回归，结果见表1、2。

表1 标准溶液加入法的回归方程和线性范围

Table 1 Regression equation and linear range of standard addition method

有机溶剂	回归方程	r	线性范围/($\mu g \cdot ml^{-1}$)
乙醇	Y=0.1565X+16.66	0.9994	42.66～2133
正己烷	Y=1.8650X+2.749	0.9982	2.471～123.6
苯	Y=1.7660X−0.04920	0.9999	0.2027～10.13
甲苯	Y=1.1330X−1.860	0.9991	7.681～384.1
二甲苯	Y=0.7322X−5.126	0.9994	18.47～923.5
苯乙烯	Y=0.6888X−0.1369	0.9997	0.4544～22.72
二乙烯苯	Y=0.2968X+0.06910	0.9932	0.8139～40.69

表2 外标法的回归方程和线性范围

Table 2 Regression equation and linear range of external standard method

有机溶剂	回归方程	r	线性范围/($\mu g \cdot ml^{-1}$)
乙醇	Y=0.1507X−5.480	0.9992	42.66～2133
正己烷	Y=2.2090X−12.12	0.9975	2.471～123.6
苯	Y=2.4590X−0.4585	0.9999	0.2027～10.13
甲苯	Y=1.6400X−20.48	0.9991	7.681～384.1
二甲苯	Y=0.9169X−24.12	0.9994	18.47～923.5
苯乙烯	Y=0.9299X−0.5687	0.9997	0.4544～22.72
二乙烯苯	Y=0.4190X−0.0359	0.9910	0.8139～40.69

2.7 精密度试验 取加入对照品溶液2、3、4的标准溶液加入液(提取物批号：050701)，平行3份，按上述色谱条件进行检测，记录色谱图，按标准溶液加入法算得的浓度计算RSD，结果见表3；同法平行操作3天，按标准溶液加入法算得的浓度计算日间精密度，结果见表4。

表3 日内精密度

Table 3 Intra-day variability (n=3,%)

有机溶剂	低浓度 RSD	中浓度 RSD	高浓度 RSD
乙醇	4.9	3.3	1.1
正己烷	6.6	6.9	4.7
苯	3.9	4.9	3.8
甲苯	0.6	2.7	5.0
二甲苯	4.3	1.5	6.1
苯乙烯	4.1	0.2	5.4
二乙烯苯	4.6	1.6	4.0

表4 日间精密度

Table 4 Inter-day variability (n=3,%)

有机溶剂	低浓度 RSD	中浓度 RSD	高浓度 RSD
乙醇	6.1	8.2	2.2
正己烷	6.3	7.9	6.3
苯	9.8	5.4	4.8
甲苯	7.1	4.1	4.6
二甲苯	5.8	5.6	7.4
苯乙烯	9.7	5.3	8.1
二乙烯苯	9.8	8.2	9.4

2.8 最低检测限试验 取"2.3.1"项下对照品溶液，采取逐步稀释法，按上述色谱条件进行检测，测得乙醇、正己烷、苯、甲苯、二甲苯、苯乙烯、二乙烯苯的最低检测浓度(S/N=3)分别为3.600、0.02440、0.02760、0.06333、0.2100、

0.1960、0.3000 μg·ml^{-1}，相当于在样品中能检测到的最低量 12.00、0.08133、0.09200、0.2110、0.7000、0.6530、1.000 μg·g^{-1}。

2.9 回收率试验　取加入对照品溶液 2、3、4 的标准溶液加入液（提取物批号：050701），平行 3 份，按上述色谱条件进行检测，记录色谱图，以标准溶液加入法计算的总量，减去本底量，比上加入量，算得回收率，结果见表5；同时以外标法计算的总量，减去本底量，比上加入量，算得回收率，结果见表6。

表5 加样回收试验结果

Table 5 Results of recovery rate　(n=3)

有机溶剂	加入量 /mg	检测量 /mg	平均回收率 /%	RSD /%
乙醇	0.5131	0.7060	82.13	4.9
	1.026	1.123	81.74	3.3
	2.565	2.519	87.11	1.1
正乙烷	0.03707	0.03973	95.24	3.3
	0.07414	0.07330	92.90	1.8
	0.1854	0.1749	91.96	2.8
苯	0.003040	0.003055	100.50	3.8
	0.006080	0.005981	98.38	1.5
	0.01520	0.01531	100.70	1.5
甲苯	0.1152	0.1016	88.21	2.8
	0.2304	0.2387	103.60	2.9
	0.5761	0.6046	105.00	4.5
二甲苯	0.2771	0.2399	86.59	4.3
	0.5541	0.5692	102.70	1.7
	1.385	1.465	105.70	4.7
苯乙烯	0.006816	0.006101	89.52	4.0
	0.01363	0.01358	99.58	3.3
	0.03408	0.03487	102.30	1.0
二乙烯苯	0.01221	0.01151	94.29	3.7
	0.02442	0.02453	100.50	3.4
	0.06104	0.06790	111.20	4.4

表6 外标法回收试验结果

Table 6 Results of recovery rate of external standard method　(n=3)

有机溶剂	加入量 /mg	检测量 /mg	平均回收率 /%	RSD /%
乙醇	0.6399	1.206	116.90	4.6
	1.280	1.704	97.33	2.2
	3.199	3.806	104.60	4.3
正乙烷	0.03707	0.05372	133.00	3.3
	0.07414	0.08206	104.70	1.8
	0.1854	0.1678	88.13	2.8
苯	0.003040	0.002693	88.58	3.8
	0.006080	0.004793	78.84	1.5
	0.01520	0.01149	75.58	1.5
甲苯	0.1152	0.1043	90.53	2.8
	0.2304	0.1990	86.36	2.9
	0.5761	0.4519	78.45	4.5
二甲苯	0.2771	0.2537	91.57	4.3
	0.5541	0.5166	93.24	1.7
	1.385	1.232	88.92	4.7
苯乙烯	0.006816	0.005913	86.75	4.0
	0.01363	0.01145	83.98	3.3
	0.03408	0.02722	79.88	1.0
二乙烯苯	0.01221	0.008906	72.96	3.7
	0.02442	0.01813	74.25	3.4
	0.06104	0.04885	80.03	4.4

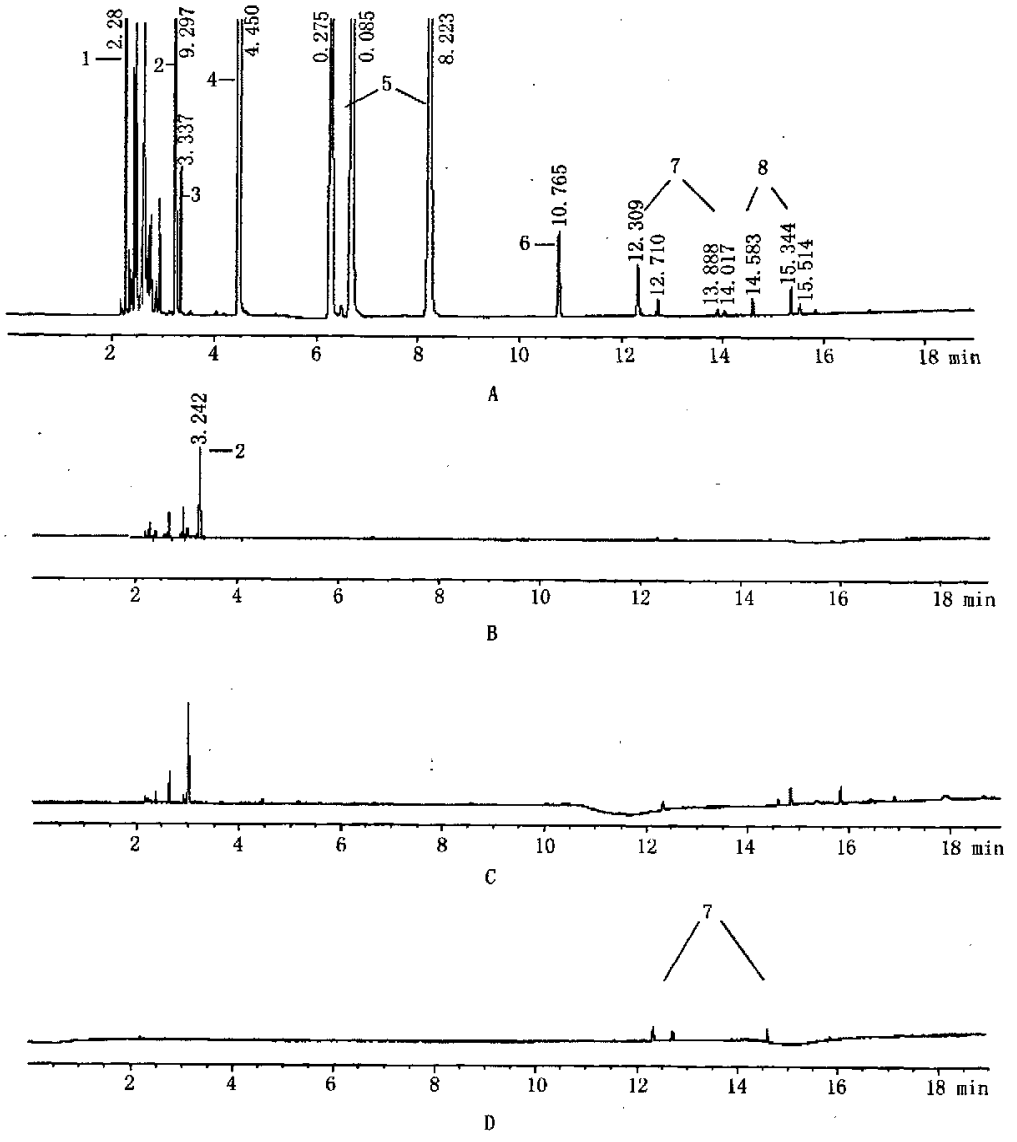
2.10 样品测定结果　取“2.3.3”项下标准溶液加入液，按上述色谱条件进行检测，以标准溶液加入法计算，取平均值作为测定结果。结果见表7，色谱图见图1B。

表7 样品残留溶剂测定结果

Table 7 Determination results of residual solvents in samples　(n=6，%)

有机溶剂	批号 050701		批号 050702		批号 050703	
	含量	RSD	含量	RSD	含量	RSD
乙醇	0.031470	3.6	0.003675	2.0	0.004012	2.0
正乙烷	0.002118	4.7	—	—	—	—
苯	—	—	—	—	—	—
甲苯	—	—	—	—	—	—
二甲苯	—	—	—	—	—	—
苯乙烯	—	—	—	—	—	—
二乙烯苯	—	—	—	—	—	—

“—”表示未检出



1. 正己烷;2. 乙醇;3. 苯;4. 甲苯;5. 二甲苯;6. 苯乙烯;7. DMF;8. 二乙烯苯

图 1 标准溶液加入液(A)、供试品溶液 050702(B)和三七药材(C)及 DMF(D)的色谱图

Fig. 1 Chromatograms of standard solution added liquid (A), sample solution 050702 (B), *Panax notoginseng* (C) and DMF (D)

3 讨 论

3.1 ChP2005 新增加了标准溶液加入法测定供试品中某个杂质或主成分含量的方法。特别说明当采用顶空进样技术时,由于供试品和对照品处于不完全相同的基质中,故可采用标准溶液加入法以消除基质效应的影响;当标准溶液加入法与其他定量方法结果不一致时,应以标准加入法结果为准[2]。本实验用标准溶液加入法和外标法分别对三七提取物中有机溶剂残

留量进行了方法学比较，发现采用外标法测定时，由于受基质效应影响较大，数据波动较大（表1～6），所以最后采用标准溶液加入法对三七提取物中有机溶剂残留量进行了测定。

3.2 本研究首先采用了HP-5毛细管柱进行分析，但在这根色谱柱上苯乙烯和二甲苯不能得到有效分离，分析原因可能是两者的沸点较接近。后改用强极性的Agilent HP-INNOWAX毛细管柱，在该柱系统上，各有机溶剂得到了良好分离。

3.3 三七提取物中某些成分在本实验条件下会出峰（图1B和C），为了不干扰测定，本实验比较了不同的顶空加热温度，发现在80℃的顶空加热温度下，提取物中的成分对有机溶剂的出峰没有干扰。

3.4 对FID检测器，水为最理想的溶剂。由于苯系列物在水中溶解度不好，因此选择DMF做贮备液的溶剂，而后用水稀释至所需的浓度。在此条件下，DMF的浓度极低，不干扰其他峰的测定（图1D）。

3.5 根据ChP2005中的相关规定，苯属于第一类残留溶剂，为应避免使用的溶剂，限度为0.0002%，正己烷、甲苯、二甲苯属于第二类残留溶剂，为应限制使用的溶剂，限度分别为0.029%、0.089%、0.217%，乙醇属于第三类残留溶剂，为低毒性溶剂，限度为0.5%[2]。ChP2005、USP29-NF24、ICH指导原则都没有规定苯乙烯和二乙烯苯的限度，根据国家食品药品监督管理局（SFDA）有关使用大孔吸附树脂纯化中药产品和保健食品中有机残留物的规定，把苯乙烯和二乙烯苯的限度定为20 ppm，即0.002%。实验中的最低检测浓度均低于上述限度，可以认为本方法灵敏度高。

本研究采用顶空毛细管气相色谱法测定三七提取物中7种有机溶剂残留量，色谱条件分离良好，用标准溶液加入法计算排除了基质的干扰。本方法简单、准确、灵敏度高、重现性好，可作为三七提取物中有机溶剂残留量的测定方法。

References:

[1] LI Jia-shi（李家实）. **Chinese Pharmacy Determination（中药鉴定学）**[M]. Shanghai: Shanghai Literature of Science and Technology Press, 1998: 132. (in Chinese)

[2] National Pharmacopoeia Committee（国家药典委员会）. **Pharmacopoeia of People's Republic of China（中华人民共和国药典）**[M]. Beijing: Chemical Industry Press. 2005. Vol Ⅰ; Appendix Ⅱ: 20-21, ⅧP: 54-57. (in Chinese)

[责任编辑　黄晓花]

我校孙优贤院士和蔡秀军教授喜获2007年何梁何利奖

何梁何利基金2007年度颁奖大会于10月31日在京举行，浙江大学孙优贤院士和蔡秀军教授喜获此殊荣。孙优贤院士获得科学与技术进步奖，蔡秀军教授获得科学与技术创新奖。全国共有65位杰出科技工作者获奖，其中产业界两位作出重要贡献者林元培院士、马永生博士荣获科学与技术成就奖，42名科学家荣获科学与技术进步奖，21名科学家荣获科学与技术创新奖。

何梁何利基金是香港爱国经济实业家何善衡、梁銶琚、何添、利国伟先生共同捐资4亿港币，于1994年3月30日在香港注册成立的社会公益性慈善基金。基金以崇尚科学、振兴中华为宗旨，分设“科学与技术成就奖”、“科学与技术进步奖”，自2006年起增设“科学与技术创新奖”，每年评奖一次。

今年是何梁何利基金成立第13年，我校先后有8位优秀科技工作者获得该基金奖项。