

气相色谱法测定氧化白藜芦醇中的 4 种残留溶剂*

徐志琴, 沈杰, 陈子礼, 邹永, 徐新军**

(中山大学药学院, 广州 510006)

摘要 目的:建立氧化白藜芦醇中叔丁醇、乙醇、乙酸乙酯、乙二醇 4 种有机溶剂残留量的测定方法。**方法:**以 DB-624 弹性石英毛细管柱为色谱柱(30 m×0.32 mm, 1.8 μm), 采用氢火焰离子化检测器, 载气为氮气, 进样口温度为 250 ℃, 检测器温度为 300 ℃, 柱温采用程序升温(70 ℃保持 3 min, 以 30 ℃·min⁻¹ 的速率升温至 100 ℃, 保持 8 min, 然后以 30 ℃·min⁻¹ 的速率升温至 210 ℃), 流速为 3 mL·min⁻¹。以 *N,N*-二甲基甲酰胺为溶剂, 进样体积为 1 μL。**结果:**4 种有机溶剂均能得到很好的分离。叔丁醇、乙醇、乙酸乙酯、乙二醇检测质量浓度线性范围分别为 395.28~1 482.3 μg·mL⁻¹ ($r=0.999\ 9$)、398.16~1 493.1 μg·mL⁻¹ ($r=0.999\ 9$)、395.84~1 484.4 μg·mL⁻¹ ($r=0.999\ 9$)、53.12~199.2 μg·mL⁻¹ ($r=0.999\ 6$); 定量限分别为 9.88、19.91、19.79、53.12 μg·mL⁻¹, 检测限分别为 3.95、9.95、9.90、19.92 μg·mL⁻¹; 精密度、重复性和稳定性的 RSD 均小于 5.0%; 乙醇、叔丁醇、乙酸乙酯和乙二醇平均回收率($n=9$) 分别为 100.81%、96.72%、99.14%、99.51%, RSD 分别为 2.93%、3.98%、2.75%、3.34%, 且精密度较好。测定样品三批, 样品中叔丁醇的残留量分别为 0.03%、0.12% 和 0.02%, 乙醇、乙酸乙酯和乙二醇均未被检测到。**结论:**本文经方法学验证可用于氧化白藜芦醇中 4 种残留溶剂的分离与测定。

关键词:氧化白藜芦醇; 残留溶剂; 气相色谱法

中图分类号: R 921.2

文献标识码: A

文章编号: 1009-3656(2019)-5-0000-0

doi: 10.19778/j.chp.2019.05.00?

Determination of 4 residual solvents in Oxyresveratrol by gas chromatography*

XU Zhiqin, SHEN Jie, CHEN Zili, ZOU Yong, XU Xinjun**

(School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510006, China)

Abstract Objective: To establish a method for simultaneous determination of 4 residual organic solvents of tert-butanol, ethanol, ethyl acetate and ethylene glycol in Oxyresveratrol. **Methods:** The test was performed in DB-624 (30 m×0.32 mm, 1.8 μm) capillary chromatography column. The FID detector was used, the carrier gas was nitrogen, the injection temperature was 250 ℃ and the detector temperature was 300 ℃. Column temperature is programmed to 70 ℃ for 3 min, 30 ℃·min⁻¹ to 100 ℃, 100 ℃ for 8 minutes, then 30 ℃·min⁻¹ increase to 210 ℃. The flow rate was 3 mL·min⁻¹. The injection volume was 1 μL with *N,N*-dimethylformamide as the solvent. **Results:** Four residual solvents were separated well. The linear ranges of the concentration of tert-butanol, ethanol, ethyl acetate and ethylene glycol fell into 395.28-1 482.3 μg·mL⁻¹ ($r=0.999\ 9$), 398.16-1 493.1 μg·mL⁻¹

* 基金项目: 广州市科技计划项目(201505041557046)及中山市引进创新科研团队项目(2015-224)

第一作者简介: 徐志琴, 研究生; 研究方向: 药物分析。Tel: 13060675890; E-mail: xuzhq3427@163.com

** 通讯作者简介: 徐新军, 副教授; 研究方向: 药物分析。Tel: 020-39943041; E-mail: xxj2702@sina.com

($r=0.999\ 9$), $395.84-1\ 484.4\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r=0.999\ 9$), and $53.12-199.2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($r=0.999\ 6$) respectively. The limits of quantitation were 9.88 , 19.91 , 19.79 and $53.12\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ respectively, and the limits of detection were 3.95 , 9.95 , 9.90 and $19.92\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ respectively. The RSDs of precision, repeatability and stability were all less than 5.0% . The average recoveries of ethanol, tert-butanol, ethyl acetate and ethylene glycol ($n=9$) were 100.81% , 96.72% , 99.14% and 99.51% with RSDs as 2.93% , 3.98% , 2.75% and 3.34% respectively. The residues of tert-butanol in three batches of sample were 0.03% , 0.12% and 0.02% respectively. Ethanol, ethyl acetate and ethylene glycol were not detected. **Conclusion:** The established method was proved to be suitable for the separation and determination of four residual solvents in Oxyresveratrol after validation.

Key words: oxyresveratrol; residual solvent; gas chromatography

氧化白藜芦醇又名氧化芪三酚,化学名称为4-[(E)-2-(3,5-二羟基苯基)乙烯基]苯-1,3-二醇。氧化白藜芦醇是一种天然活性物质,具有多种生物活性,如可抑制酪氨酸酶的活性和黑色素的生成^[1],还具有抗炎^[2],清除自由基^[3],抗病毒^[4],抗肿瘤^[5]等作用。由于氧化白藜芦醇市场需求大,来源窄,多用化学合成制备。本品在合成过程中,使用了乙醇、叔丁醇、乙酸乙酯和乙二醇4种有机溶剂,由于有机溶剂对人体的毒性作用,有必要在其质量控制时对残留溶剂的含量进行有效的检测,保证质量。为此,本文根据《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)2015年版四部^[6]残留溶剂测定法和人用药品注册技术要求国际协调会(ICH)指导原则的相关要求^[7],建立了毛细管气相色谱法测定氧化白藜芦醇的4种残留溶剂的方法,该法简便、灵敏、准确,可用于氧化白藜芦醇残留溶剂的质量控制。

1 材料

1.1 仪器

AG285型电子天平(梅特勒托利多集团,瑞士);Agilent 7890A型气相色谱仪,包含氢火焰离子化检测器、Agilent 7890A型自动进样器(美国安捷伦公司);GH-300型高纯氢发生器(北京中兴汇利科技发展有限公司);OTS-550型无油空气压缩机(台州市奥突斯工贸有限公司);SB25-12DTDN型超声波清洗机(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

1.2 药品和试剂

氧化白藜芦醇样品(中山大学药学院自制,批号:OXY180324、M244-170705A、M244-170705B);叔丁醇、乙二醇、乙酸乙酯与无水乙醇均为分析纯, N,N -二甲基甲酰胺为色谱纯。

2 方法和结果

2.1 色谱条件

色谱柱:DB-624弹性石英毛细管色谱柱(固定液为6%氰丙基苯基-94%二甲基聚硅氧烷; $30\text{ m}\times 0.32\text{ mm}$, $1.8\ \mu\text{m}$);进样口温度为 $250\text{ }^{\circ}\text{C}$,分流进样,分流比为 $30:1$;氢火焰离子化检测器(FID),检测器温度为 $300\text{ }^{\circ}\text{C}$;载气为氮气,载气流速为 $3.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;氢气流速为 $30\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;空气流速为 $300\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;柱温:程序升温模式, $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保持 3 min ,然后以 $30\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速率升温至 $100\text{ }^{\circ}\text{C}$,保持 8 min ,然后以 $30\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 的速率升温至 $210\text{ }^{\circ}\text{C}$;进样量为 $1\ \mu\text{L}$ 。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 精密称取叔丁醇 494.1 mg 、乙酸乙酯 494.8 mg 、无水乙醇 497.7 mg 和乙二醇 66.4 mg ,置同一 100 mL 量瓶中,用 N,N -二甲基甲酰胺稀释至刻度,摇匀,作为对照品储备液。精密量取对照品储备液 5 mL ,置 50 mL 量瓶中,用 N,N -二甲基甲酰胺稀释至刻度,摇匀,作为对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取氧化白藜芦醇约 0.5 g ,精密称定,置 5 mL 量瓶中,加适量 N,N -二甲基甲酰胺超声溶解,用 N,N -二甲基甲酰胺稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。

2.3 专属性试验

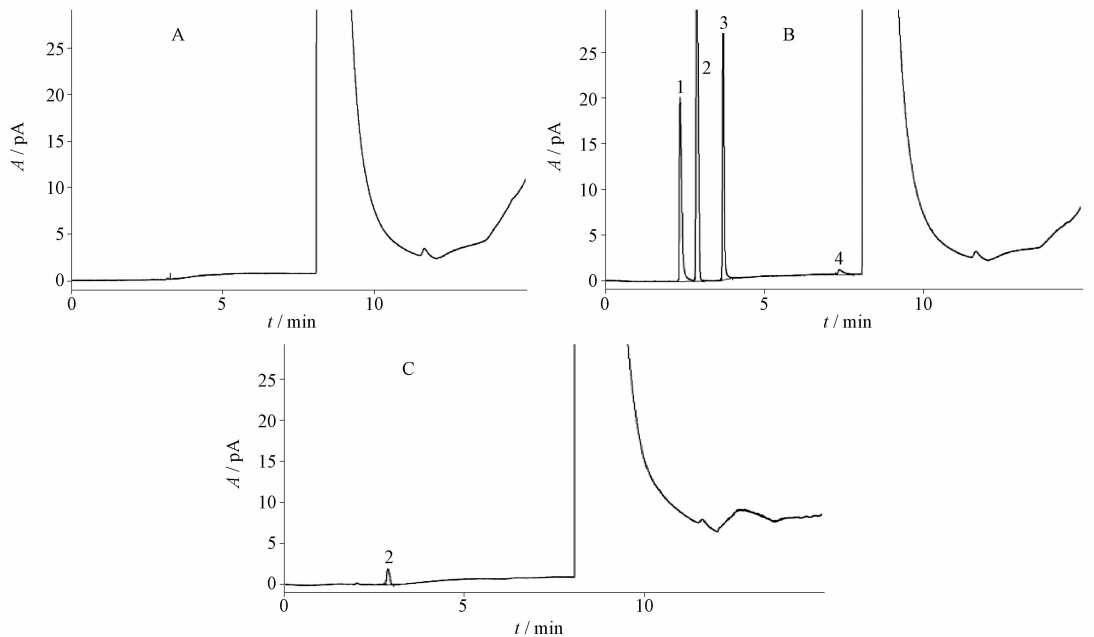
分别取空白溶液(N,N -二甲基甲酰胺)、对照品溶液和供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样分析,记录气相色谱图(图1),由气相色谱图可知各成分之间的分离均符合要求,表明专属性良好。

2.4 线性关系考察

精密量取“2.2.1”项下对照品储备液 4 、 5 、 6 、 7.5 、 10 、 15 mL ,分别置于 50 mL 量瓶中,加 N,N -二甲基甲酰胺定容,摇匀,作为系列混合对照品溶液。

取上述混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样分析,记录色谱图,测定峰面积,以峰面积为

纵坐标(Y),以浓度($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)为横坐标(X)绘制标准曲线,计算回归方程,结果见表1。



1. 乙醇(ethanol) 2. 叔丁醇(tert-butanol) 3. 乙酸乙酯(ethyl acetate) 4. 乙二醇(ethylene glycol)

图1 空白溶液(A)、对照品溶液(B)和供试品(批号:M244-170705A)溶液(C)的气相色谱图

Fig. 1 GC chromatograms of blank solution (A), reference solution (B) and test solution (C)

表1 4种残留溶剂的线性关系方程及相关系数($n=6$)

Tab. 1 Linear regression equation and correlation coefficient of 4 residual solvents

溶剂 (solvents)	线性范围 (linear range)/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	回归方程 (regression equations)	r	LOQ/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	LOD/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
乙醇(ethanol)	398.16 ~ 1 493.1	$Y = 0.333 0X - 2.701 8$	0.999 9	19.91	9.95
叔丁醇(tert-butanol)	395.28 ~ 1 482.3	$Y = 0.526 1X - 3.439 5$	0.999 9	9.88	3.95
乙酸乙酯(ethyl acetate)	395.84 ~ 1 484.4	$Y = 0.288 5X - 5.293 4$	0.999 9	19.79	9.90
乙二醇(ethylene glycol)	53.12 ~ 199.2	$Y = 0.161 1X - 1.284 4$	0.999 6	53.12	19.92

2.5 检测限与定量限考察

取对照品溶液加 N,N -二甲基甲酰胺逐级稀释至一定浓度,按“2.1”项下色谱条件进样分析,记录色谱图,以信噪比约为 10:1 时相应浓度为定量限(LOQ)浓度,以信噪比约为 3:1 时相应浓度为检测限(LOD)浓度,测定结果见表1,四种残留溶剂定量限都低于其对应的限量。

2.6 精密度试验

取按“2.2.1”项下制备的对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件连续进样6次分析,记录色谱图,以测定的峰面积计算,乙醇、叔丁醇、乙酸乙酯和乙二醇RSD分别为1.12%、0.72%、1.13%和3.15%,表明仪器精密度好。

2.7 重复性试验

取氧化白藜芦醇样品(批号:M244-170705B)约0.5 g,共6份,精密称定,分别置5 mL量瓶中,精密加入对照品储备液0.5 mL,加适量 N,N -二甲基甲酰胺超声溶解,用 N,N -二甲基甲酰胺稀释定容至刻度,摇匀,作为重复性试验溶液。按“2.1”项下色谱条件进样分析,其乙醇、叔丁醇、乙酸乙酯和乙二醇的平均回收率分别为102.16%、97.68%、99.94%和100.74%,RSD分别为3.05%、3.82%、2.41%和3.78%,表明本方法重复性良好。

2.8 稳定性试验

精密称定氧化白藜芦醇样品(批号:M244-

170705B) 0.490 3 g, 置 5 mL 量瓶中, 精密加入对照品储备液 0.5 mL, 加适量 *N,N*-二甲基甲酰胺超声溶解, 用 *N,N*-二甲基甲酰胺稀释定容至刻度, 摇匀, 作为稳定性试验溶液, 于室温下分别放置 0、1、2、3、5、8、12 h, 按“2.1”项下色谱条件进样分析, 记录峰面积。结果, 乙醇、乙酸乙酯、乙二醇和叔丁醇峰面积的 RSD 分别为 3.10%、1.68%、3.50% 和 2.67%, 表明供试品溶液在室温下放置 12 h 内稳定性良好。

2.9 准确度试验

取氧化白藜芦醇样品(批号:M244-170705B)约 0.5 g, 共 9 份, 精密称定, 分别置 5 mL 量瓶中, 每 3 份分别精密加入对照品储备液 0.4 mL、0.5 mL、0.6 mL, 加适量 *N,N*-二甲基甲酰胺超声溶解, 用 *N,N*-二甲基甲酰胺稀释定容至刻度, 摇匀, 作为加样回收溶液。按“2.1”项下色谱条件进样分析, 记录色谱图, 以测定的峰面积计算叔丁醇、乙酸乙酯、无水乙醇和乙二醇回收率, 测定结果见表 2, 本法准确度良好。

表 2 加样回收率试验结果($n=9$)

Tab. 2 The results of recovery test

溶剂 (solvents)	取样量 (sample amount)/ g	原有量 (original)/ mg	加入量 (added)/ mg	测得量 (detected)/ mg	回收率 (recovery)/ %	平均回收率 (mean recovery)/ %	RSD/ %
乙醇(ethanol)	0.502 0	0	1.987 4	2.020 7	101.68	100.81	2.93
	0.500 1	0	1.987 4	2.033 8	102.34		
	0.503 3	0	1.987 4	2.078 9	104.61		
	0.490 3	0	2.484 2	2.531 8	101.92		
	0.490 1	0	2.484 2	2.402 2	96.70		
	0.493 7	0	2.484 2	2.549 0	102.61		
	0.490 1	0	2.981 0	2.977 3	99.87		
	0.495 1	0	2.981 0	2.846 0	95.47		
	0.501 6	0	2.981 0	3.042 9	102.08		
叔丁醇(tert-butanol)	0.502 0	0.100 4	2.001 6	1.987 8	94.29	96.72	3.98
	0.500 1	0.098 5	2.001 6	2.018 7	95.93		
	0.503 3	0.098 5	2.001 6	2.017 6	95.88		
	0.490 3	0.098 1	2.502 0	2.723 0	104.91		
	0.490 1	0.098 0	2.502 0	2.505 1	96.21		
	0.493 7	0.098 7	2.502 0	2.571 6	98.84		
	0.490 1	0.098 0	3.002 4	2.967 5	95.57		
	0.495 1	0.099 0	3.002 4	2.822 0	90.69		
	0.501 6	0.100 3	3.002 4	3.047 6	98.17		
乙酸乙酯(ethyl acetate)	0.502 0	0	2.004 9	2.008 6	100.18	99.14	2.75
	0.500 1	0	2.004 9	1.996 0	99.55		
	0.503 3	0	2.004 9	2.006 7	100.09		
	0.490 3	0	2.506 2	2.507 1	100.04		
	0.490 1	0	2.506 2	2.395 2	95.57		
	0.493 7	0	2.506 2	2.530 5	100.97		
	0.490 1	0	3.007 4	3.047 5	101.33		
	0.495 1	0	3.007 4	2.810 9	93.47		
	0.501 6	0	3.007 4	3.038 7	101.04		
乙二醇(ethylene glycol)	0.502 0	0	0.271 6	0.257 1	94.67	99.51	3.34
	0.500 1	0	0.271 6	0.267 1	98.35		
	0.503 3	0	0.271 6	0.274 6	101.10		
	0.490 3	0	0.339 5	0.327 0	96.32		
	0.490 1	0	0.339 5	0.347 0	102.21		
	0.493 7	0	0.339 5	0.344 5	101.47		
	0.490 1	0	0.407 4	0.421 9	103.55		
	0.495 1	0	0.407 4	0.389 4	95.59		
	0.501 6	0	0.407 4	0.416 9	102.33		

2.10 样品残留量测定

取氧化白藜芦醇样品三批(批号分别为:M244-170705A、OXY180324、M244-170705B),按“2.2.2”项下方法平行制备供试品溶液2份,再按“2.1”项下色谱条件进样分析,记录色谱图,结果,测得样品中叔丁醇的残留量分别为0.03%、0.12%和0.02%,乙醇、乙酸乙酯和乙二醇均未被检测到,符合《中国药典》2015年版对残留溶剂限度要求^[6]。

3 讨论

本品氧化白藜芦醇在合成过程中未引入 N,N -二甲基甲酰胺,且氧化白藜芦醇及所需测定的四种残留溶剂在 N,N -二甲基甲酰胺中有较好的溶解度,故在实验过程中采用 N,N -二甲基甲酰胺作为溶剂。实验曾考虑顶空进样测定四种溶剂残留量,但由于乙二醇顶空进样灵敏度太低,达不到定量测定的要求,最终采用直接进样的方式测定残留溶剂,与顶空进样相比,直接进样测定操作更简单,节省时间。

实验开始时,考虑到所测定溶剂极性的差异,通过查阅文献^[8,9],最后决定使用中等极性的DB-624色谱柱进行实验并进行色谱条件的筛选。由于乙醇、叔丁醇、乙酸乙酯与乙二醇的沸点差异较大,实验中使用程序升温使乙二醇和 N,N -二甲基甲酰胺尽快出峰,各溶剂的色谱峰得到较好分离。最初设置初温为40℃时,乙二醇与 N,N -二甲基甲酰胺色谱峰未能较好分离。当提高温度到70℃时,沸点较低且相近的乙醇、叔丁醇和乙酸乙酯以及乙二醇与 N,N -二甲基甲酰胺色谱峰均能得到较好分离。另外,实验中对分流比(10:1,20:1,30:1)进行考察,在分流比为30:1时,各待测定溶剂的信号响应较大,峰形较好,且乙二醇与 N,N -二甲基甲酰胺能较好地分离,故选择30:1的分流比。

根据《中国药典》2015年版^[6]要求及人用药物注册技术要求国际协调会议(ICH)要求^[7],乙醇和乙酸乙酯属于第3类在药品中应当限制残留量的溶剂,限度要求为0.5%;乙二醇属于第2类在药品中应当限制残留量的溶剂,限度要求为0.062%;叔丁醇未作限度要求。样品中测得叔丁醇的残留量分别为0.03%、0.12%和0.02%,乙醇、乙酸乙酯和乙二醇均未被检测到,按其检测限计,即其含量分别低

于0.01%、0.004%和0.02%,因此氧化白藜芦醇样品残留溶剂检查符合《中国药典》2015年版中对残留溶剂限度的要求。

方法学验证结果表明,此方法简便,灵敏,检测结果准确可靠,可用于氧化白藜芦醇中残留溶剂乙醇、乙二醇、叔丁醇和乙酸乙酯的检测。

参考文献

- [1] HU ST, ZHENG ZP, ZHANG XC, *et al.* Oxyresveratrol and trans-dihydromorin from the twigs of *Cudrania tricuspidata* as hypopigmenting agents against melanogenesis[J]. *J Funct Foods*, 2015, (13):375
- [2] CHUNG KO, KIM BY, LEE MH, *et al.* In-vitro and in-vivo anti-inflammatory effect of oxyresveratrol from *Morus alba* L. [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2003, 55(12):1695
- [3] 师成斌, 张晓云, 田艳花, 等. 黑麦芽类黑精体外抗氧化活性的研究[J]. *食品工程*, 2007(1):56
SHI CB, ZHANG XY, TIAN YH, *et al.* Anti-oxidative Effect of melanoidins from black malt *in vitro*[J]. *J Food Eng*, 2007(1):56
- [4] LIPIUN V, SASIVIMOLPHAN P, YOSHIDA Y, *et al.* Topical cream-based oxyresveratrol in the treatment of cutaneous HSV-1 infection in mice[J]. *Antiviral Res*, 2011, 91(2):154
- [5] 黄羽, 熊尧, 周黎明. 氧化白藜芦醇体内外抑制肝癌细胞增殖的研究[J]. *中药药理与临床*, 2015, 31(3):34
HUANG Y, XIONG Y, ZHOU LM. Study on anti-hepatocarcinoma activity and of mechanism of oxyresveratrol *in vitro* and *in vivo* [J]. *Pharm Clin Chin Mater Med*, 2015, 31(3):34
- [6] 中华人民共和国药典2015年版. 四部[S]. 2015:105
ChP 2015. Vol IV [S]. 2015:105
- [7] ICH 指导委员会. 药品注册的国际技术要求:质量部分[M]. 周海钧译. 北京:人民卫生出版社, 2011:1
ICH Steering Committee. International Technical Requirements for Drug Registration: Quality Part [M]. Zhou Haijun, Translation. Beijing: People's Health Publishing House, 2011:1
- [8] 夏学军, 金笃嘉, 周翠萍, 等. 布格呋喃中有机溶剂残留量的毛细管GC法测定[J]. *中国医药工业杂志*, 2008, 39(8):617
XIA XJ, JIN DS, ZHOU CP, *et al.* Determination of residual organic solvents in buagafuran by capillary GC[J]. *Chin J Pharm*, 2008, 39(8):617
- [9] 徐意华, 聂金花, 孙学涛, 等. 气相色谱法测定阿哌沙班中8种残留溶剂[J]. *化学试剂*, 2015, 37(12):1094
XU YH, NIE JH, SUN XT, *et al.* Detection of residual organic solvent in apixaban by gas chromatography[J]. *Chem Reagents*, 2015, 37(12):1094

(收稿日期:2019-03-25)