

## 淫羊藿总黄酮中乙酸乙酯、正丁醇溶剂残留量的测定<sup>\*</sup>

周 蕾, 雷永涛, 郝小燕<sup>\*\*</sup>, 李 谦, 梁 妍

(贵阳医学院 药学院, 贵州 贵阳 550004)

**[摘 要]** 目的: 建立气相色谱法测定淫羊藿总黄酮中有机溶剂乙酸乙酯和正丁醇残留量的方法。方法: 采用毛细管气相色谱法, 以 SE-54 毛细管柱为色谱柱, 程序升温, 氮气为载气, 进样口温度为 230 ℃, FID 检测器温度为 240 ℃。结果: 乙酸乙酯和正丁醇残留量分别在 1.606 ~ 16.06 mg/L ( $r=0.999\ 1$ )、1.622 ~ 16.22 mg/L ( $r=0.999\ 3$ ) 的浓度范围内呈良好的线性关系, 三批样品中乙酸乙酯和正丁醇残留量均符合中国药典有机溶剂残留量规定。结论: 毛细管气相色谱法可作为淫羊藿总黄酮提取物中有机溶剂残留量的测定方法。

**[关键词]** 黄酮; 淫羊藿; 乙酸乙酯; 正丁醇; 药物残留物; 色谱法, 气相

**[中图分类号]** R927.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2012)02-0123-04

### Determination of Ethyl Acetate and N-butanol Residual Volume in Epimedium Total Flavonoids

ZHOU Lei, LEI Yongtao, HAO Xiaoyan, LI Qian, LIANG Yan

(School of Pharmacology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a method for determination of the residual solvents including ethyl acetate and N-butanol in epimedium total flavonoids by gas chromatography (GC). **Methods:** Gas Chromatography was carried out on temperature programmed SE-54 capillary column using nitrogen as carrier gas. The injection port temperature was 230 ℃. The temperature of FID detector was 240 ℃. **Results:** The calibration curves for Ethyl acetate and n-butanol were linear in the range of 1.606 ~ 16.06 mg/L ( $r=0.999\ 1$ ) and 1.622 ~ 16.22 mg/L ( $r=0.999\ 3$ ) respectively. The residual volume of ethyl acetate and N-butanol in three batches of samples accorded with Chinese Pharmacopoeia requirement of organic solvent residue. **Conclusions:** The method can be used for determination of organic solvent residual volume in epimedium flavonoids.

**[Key words]** flavones; epimedium; ethyl acetate; N-butanol; drug residues; chromatography, gas

淫羊藿为小檗科植物淫羊藿 *Epimedium brevicornu* Maxim、箭叶淫羊藿 *Epimedium . sagittatum* (Sieb. et Zucc.) Maxim、柔毛淫羊藿 *Epimedium pubescens* Maxim. 或朝鲜淫羊藿 *Epimedium koreanum* Nakai 的干燥叶<sup>[1]</sup>, 其主要有效成分为总黄酮, 淫羊藿苷, 多糖等。淫羊藿总黄酮在提取纯化的工艺中使用了乙酸乙酯和正丁醇两种有机溶剂, 为保证

用药的安全性, 有必要对乙酸乙酯、正丁醇有机溶剂残留量进行研究和控制<sup>[2~5]</sup>。本研究在参考相关文献<sup>[6~8]</sup>的基础上采用毛细管气相色谱法, 以甲醇为溶剂, 异戊醇为内标, 对淫羊藿总黄酮中的乙酸乙酯和正丁醇残留量进行测定, 结果表明, 该方法操作简便、灵敏度高、准确度高, 可作为淫羊藿总黄酮提取物中有机溶剂残留量的测定方法。

<sup>\*</sup> [基金项目] 贵州省科技厅中药现代化科技产业研究开发专项项目[黔科合中药字(2010)5021 号], 贵阳市科学技术计划项目[(2008)筑科农合字第 24-2 号], 贵阳市科学技术计划项目[(2010)筑科农合字第 1-中-06 号]。

<sup>\*\*</sup> 通讯作者 E-mail: haoxiaoyan@vip163.com

## 1 仪器与试剂

### 1.1 仪器

GC-14B 气相色谱仪(日本岛津),氢火焰离子检测器、WML 色谱工作站(南宁威玛龙色谱科技公司),超声波清洗机(250 W,29~34 kHz,北京医疗设备二厂)及微量进样器(上海安亭微量进样器厂)。

### 1.2 试剂

正丁醇、乙酸乙酯、异戊醇均为色谱纯,甲醇为分析纯;淫羊藿总黄酮(批号 20100912,20100916,20100921)由贵阳医学院药学院分析化学教研室提供。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

SE-54 毛细管柱(30 m×0.53 mm,1 μm);进样口温度 230 ℃,FID 检测器温度 240 ℃。高纯氮气作为载气,柱前压为 25 kPa,分流比 10:1;氢气 50 ml/min,空气流速 450 ml/min;采用程序升温,起始温度 35 ℃(室温 35℃以下进行)维持 3 min,以 2 ℃/min 速率升温至 50 ℃,维持 2 min。进样量

1.0 μl。理论塔板数按乙酸乙酯计不低于 3 000,按正丁醇计不低于 6 000。

### 2.2 溶液的配制

**2.2.1 标准溶液配制** 吸取乙酸乙酯、正丁醇适量,加甲醇制成每 1 ml 中含乙酸乙酯 0.080 3 mg,正丁醇 0.081 1 mg 的储备液。分别吸取储备液 0.2、0.6、1.0、1.2、2.0 ml,置于 10 ml 量瓶中,再吸取内标溶液 0.1 ml 至各量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,即得系列标准溶液。

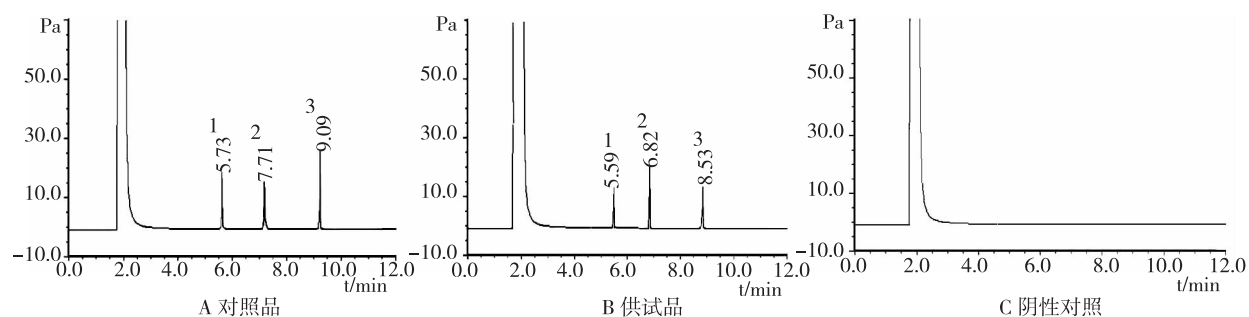
**2.2.2 内标溶液的配制** 称取异戊醇 0.018 2 g,置 50 ml 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀即得。

**2.2.3 供试品溶液的配制** 精密称取三批淫羊藿总黄酮约 30 mg,置 10 ml 量瓶中,精密吸取内标溶液 0.1 ml,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

**2.2.4 阴性对照溶液的制备** 称取未经乙酸乙酯、正丁醇纯化的淫羊藿总黄酮 30 mg,置 10 ml 量瓶中,加甲醇溶解至刻度,摇匀使溶解,即得。

### 2.3 专属性试验

精密吸取对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各 1 μl,并按照“2.1”色谱条件下进样分析,结果见图 1。表明阴性对照溶液在 4~12 min 处干扰很低,不影响目标物的定量,且内标物与各待测物峰分离理想。



注:1. 乙酸乙酯 2. 正丁醇 3. 异戊醇

图 1 淫羊藿总黄酮气相色谱图

Fig. 1 Gas chromatogram of epimedium total flavonoids

### 2.4 线性关系考察

分别精密吸取各标准溶液 1 μl,进样分析,记录峰面积。以待测成分的浓度为横坐标(X),待测成分与内标物峰面积比为纵坐标(Y),绘制标准曲线,进行回归分析,得回归方程。乙酸乙酯: $Y = 0.0023X + 0.0739$  ( $r = 0.9991$ , 1.606~16.06 mg/L); 正丁醇: $Y = 0.0032X + 0.0271$  ( $r = 0.9993$ , 1.622~16.22 mg/L)。结果表明,各待测物线性关系良

好。

### 2.5 最低检出限

将标准溶液逐步稀释,测得溶液中乙酸乙酯和正丁醇的最低检出限分别为 0.5 mg/L 和 0.3 mg/L,分别为供试品溶液的 0.015 % 和 0.011 % (S/N=3)。

### 2.6 最低定量限

将标准溶液逐步稀释,测得溶液中乙酸乙酯和

正丁醇的最低定量限分别为 1.7 mg/L 和 1.0 mg/L,分别为供试品溶液的 0.05 % 和 0.037 % (S/N = 10)。

2.7 精密度试验

取标准溶液(乙酸乙酯 4.818 mg/L、正丁醇 4.866 mg/L、异戊醇 3.640 mg/L)连续进样 6 次,计算待测成分与内标的峰面积比,结果乙酸乙酯、正丁醇的 RSD 分别为 4.6 %、3.2%。

2.8 供试品稳定性试验

精密称定淫羊藿总黄酮 30 mg,置 10 ml 量瓶中,精密吸取内标溶液 0.1 ml,加甲醇溶解至刻度,分别于 0、1、2、5、8 h 进样分析,结果各组分含量的 RSD 分别为乙酸乙酯 3.6 %,正丁醇 3.9 %。表明供试品溶液在 8 h 内稳定。

2.9 重复性试验

取淫羊藿总黄酮样品按照供试品溶液方法制备,一式 6 份进样测定,带入标准曲线,计算正丁醇、乙酸乙酯含量,结果 6 份中乙酸乙酯和正丁醇的平均含量分别为 0.061 % 和 0.066 %,RSD 分别为 3.7 % 和 4.9 %,表明该方法重复性好。

2.10 加样回收率试验

精密称定淫羊藿总黄酮 30 mg,分别加入对照品溶液(乙酸乙酯 4.818 mg/L、正丁醇 4.866 mg/L)1 ml、2 ml、3 ml,按拟定方法测量含量,计算回收率,结果见表 1、表 2。

2.11 样品测定

取三个批号的淫羊藿总黄酮样品各 30 mg,精密称定置 10 ml 量瓶中,加入内标溶液 0.1 ml,加甲醇定容,摇匀,精密吸取 1 μl 进样分析,结果见表 3。

表 1 乙酸乙酯回收率实验结果  
Tab.1 Test results of ethyl acetate recovery

序号	称样量 (g)	含量 (μg)	加入量 (μg)	测得量 (μg)	回收率 (%)
1	0.030 8	15.71	4.818	20.66	102.70
2	0.030 2	15.40	4.818	20.46	105.00
3	0.030 8	15.71	4.818	20.73	104.20
4	0.030 2	15.40	9.636	25.19	101.60
5	0.030 1	15.35	9.636	24.71	97.14
6	0.030 7	15.66	9.636	25.12	98.17
7	0.030 6	15.61	14.450	29.78	98.06
8	0.029 6	15.10	14.450	30.30	105.20
9	0.030 4	15.50	14.450	30.34	102.70

注:平均回收率 101.6% ,RSD 3.1%。

表 2 正丁醇回收率实验结果  
Tab.2 Test results of N-butanol recovery

序号	称样量 (g)	含量 (μg)	加入量 (μg)	测得量 (μg)	回收率 (%)
1	0.029 6	19.54	4.866	24.43	100.50
2	0.029 8	19.67	4.866	24.41	97.50
3	0.030 2	19.93	4.866	24.41	92.06
4	0.030 1	19.86	9.732	29.32	97.21
5	0.030 2	19.93	9.732	29.55	98.85
6	0.030 4	20.06	9.732	29.59	97.92
7	0.029 7	19.60	14.600	34.00	98.63
8	0.029 6	19.54	14.600	34.42	101.90
9	0.029 8	19.66	14.600	34.50	101.60

注:平均回收率 98.49% ,RSD 3.0%。

表 3 样品中溶剂残留量测定结果  
Tab.3 Test results of residual volume  
of solvents in samples

样品 批号	n	乙酸乙酯		正丁醇	
		平均含 量(%)	RSD (%)	平均含 量(%)	RSD (%)
20100912	6	0.059	3.9	0.075	4.4
20100916	6	0.056	3.4	0.069	4.8
20100921	6	0.061	3.7	0.066	4.9

3 讨论

由于淫羊藿总黄酮易溶于甲醇,且甲醇沸点与乙酸乙酯相比较小,在气相色谱中分离良好,所以选择甲醇为样品溶剂。气相色谱法含量测定有内标法和外标法,内标法较为常用,在实验中可减少进样量、色谱条件及操作对结果的影响,准确度、精确度较高,较外标法更适合微量组分的含量测定。所以实验决定采用内标法测定目标溶剂残留量。在内标物选择时,本研究选取 N,N-二甲基乙酰胺、异丙醇和异戊醇分别与目标溶剂同时进样,结果发现,异丙醇与目标溶剂峰之间有干扰,N,N-二甲基乙酰胺则有拖尾现象且出峰时间较晚,而异戊醇出峰时间及分离度较好,因此,选用异戊醇为内标溶液,甲醇为溶解介质效果好。

实验中考察了不同柱温对样品溶液中乙酸乙酯、正丁醇和异戊醇出峰时间的影响,综合检验灵敏度、测定误差及供试品分析时间等因素,本研究选择程序升温法,起始温度 35 ℃ 维持 3 min(室温 35 ℃ 以下),以 2 ℃/min 速率升温至 50 ℃,维持 2 min,结果良好。溶剂残留测定结果表明三批样品中乙酸乙酯、正丁醇残留均小于中国药典 2010

版二部附录Ⅷ P 附表 1 中有机溶剂残留的限度,符合药典规定。

## 4 参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中国药典一部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 306.
- [2] 杨云, 张晶, 陈玉婷. 天然药物化学成分提取分离手册[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 731.
- [3] 战佩英, 李桂娟. 淫羊藿总黄酮常压提取分离工艺研究[J]. 通化师范学院学报. 2008(10): 29-31.
- [4] 国家药典委员会. 中国药典二部[S]. 北京: 化学工业出版社, 2010: 附录 61.
- [5] 刘岚. 浅析影响溶剂残留量检验结果的重要因素[J]. 粮食与食品工业, 2011, (1): 59-61.
- [6] 李丽敏, 钱大公, 王柯, 等. 毛细管气相色谱法测定原人参二醇中有机溶剂残留物[J]. 中成药, 2010(5): 821-823.
- [7] 容彦华, 阎随朝, 李清娟. 毛细管气相色谱法测定盐酸度洛西汀中 5 种有机溶剂残留[J]. 中国药师, 2011, (1): 13-15.
- [8] 孙爱萍, 谷菲菲, 宋更申, 等. 顶空毛细管气相色谱法测定替卡西林钠原料药中的有机溶剂残留量[J]. 中国药房, 2011, (9): 848-849.
- (2011-12-26 收稿, 2012-02-20 修回)
- 编辑: 潘 娅
- 
- (上接第 122 页)
- [2] Nguyen D, Alavi MV, Kim KY, et al. A new vicious cycle involving glutamate excitotoxicity, oxidative stress and mitochondrial dynamics [J]. Cell Death Dis, 2011 (2): e240.
- [3] 魏岗之, 尧粗. 缺血性脑血管病神经元保护治疗研究现状[J]. 中华内科杂志, 1999(10): 708.
- [4] Hisano K, Watanabe M, Morimoto Y. Protective effects of the free radical scavenger edaravone against glutamate neurotoxicity in nearly pure neuronal culture [J]. J Anesth, 2009(3): 363-369.
- [5] 刘辉, 王迪芬, 付江泉. 依达拉奉预处理离体乳鼠脑皮质细胞对脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 贵阳医学院学报, 2008(12): 657-662.
- [6] 刘辉, 王迪芬, 付江泉. 异丙酚和依达拉奉对脑缺血/再灌注损伤保护作用的研究比较[J]. 中国危重病急救医学, 2008(11): 691-692.
- [7] 付江泉, 王迪芬, 刘辉. 神经生长因子和依达拉奉对缺血/再灌注损伤脑保护作用的比较研究[J]. 中国危重病急救医学, 2010(4): 226-229.
- [8] Yumi Nakano-Okuda, Koh Hasegawa, Kiyoshi Hirai, et al. Effects of edaravone on N-methyl-D-aspartate (NMDA)-mediated cytochrome c release and apoptosis in neonatal rat cerebrocortical slices [J]. Int J Devl Neuroscience, 2006(24): 349-356.
- [9] Wang ZJ, Li GM, Tang WL, et al. Neuroprotective effects of stearic acid against toxicity of oxygen/glucose deprivation or glutamate on rat cortical or hippocampal slices[J]. Acta Pharmacol Sin, 2006(2): 145-150.
- [10] Benedek A, Móricz K, Jurányi Z, et al. Use of TTC staining for the evaluation of tissue injury in the early phases of reperfusion after focal cerebral ischemia in rats [J]. Brain Res, 2006(1): 159-165.
- [11] Egea J, Rosa AO, Sobrado M, et al. Neuroprotection afforded by nicotine against oxygen and glucose deprivation in hippocampal slices is lost in alpha7 nicotinic receptor knockout mice [J]. Neuroscience, 2007(3): 866-872.
- [12] Scopel D, Fochesatto C, Cimarosti H, et al. Exercise intensity influences cell injury in rat hippocampal slices exposed to oxygen and glucose deprivation [J]. Brain Res Bull, 2006(1-3): 155-159.
- [13] Chen H, Wang S, Ding JH, et al. Edaravone protects against MPP+ - induced cytotoxicity in rat primary cultured astrocytes via [J]. J Neurochem, 2008 (6): 2345-2352.
- [14] Lee BJ, Egi Y, Van Leyen K, et al. Edaravone, a free radical scavenger, protects components of the neurovascular unit against oxidative stress in vitro [J]. Brain Res, 2010 (1307): 22-27.
- [15] Sivakumar V, Ling EA, Lu J, et al. Role of glutamate and its receptors and insulin-like growth factors in hypoxia induce dperiventricular white matter injury [J]. Glia, 2010 (5): 507-523.
- [16] Higashi Y. Edaravone for the treatment of acute cerebral infarction: role of endothelium-derived nitric oxide and oxidative stress [J]. Expert Opin Pharmacother, 2009 (2): 323-331.
- [17] Jiao L, Zhang J, Li Z, et al. Edaravone alleviates delayed neuronal death and long-dated cognitive dysfunction of hippocampus after transient focal ischemia in Wistar rats [J]. Neuroscience, 2011(182): 177-183.
- (2012-01-05 收稿, 2012-03-20 修回)
- 编辑: 潘 娅