

· 检验检测 ·

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2018.11.007

注射用黄芪多糖单糖鉴别及游离单糖检查方法研究

王 赵¹, 赵剑锋², 王 莹¹, 张建宝³, 金红宇¹, 马双成^{1△}

(1. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050; 2. 国家药典委员会, 北京 100061;
3. 天津赛诺制药有限公司, 天津 301700)

摘要:目的 研究注射用黄芪多糖质量标准,通过改进原标准中纸色谱鉴别项和游离单糖检查项,建立新的薄层及液相色谱鉴别和检查方法。方法 以葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖为指标性成分,按照原标准方法及改进方法分别对注射用黄芪多糖进行色谱鉴别和检查。并建立高效液相色谱方法,验证黄芪多糖的单糖组成。结果 改进的薄层色谱法及液相色谱法鉴别和检查方法避免了高毒离子(Ba^{2+})的使用,提高了实验的安全性,将色谱鉴别项和游离单糖检查项合并,提高了工作效率,减少了试剂使用量;且水解后样品中单糖混合液能更好地分离,克服了原有方法的不足。结论 该方法操作简便、准确、可靠,可用于注射用黄芪多糖的质量控制。

关键词:注射用黄芪多糖;薄层鉴别;高效液相色谱法;游离单糖检查;标准改进

中图分类号:R284.1;R286

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2018)11-0021-04

Study on Method of Identification of Monosaccharide and Inspection of Free Monosaccharide of Astragalus Polysaccharide for Injection

Wang Zhao¹, Zhao Jianfeng², Wang Ying¹, Zhang Jianbao³, Jin Hongyu¹, Ma Shuangcheng¹

(1. National Institute for Food and Drug Control, Beijing, China 100050; 2. Chinese Pharmacopoeia Commission, Beijing, China 100061;
3. Tianjin Cinorch Pharmaceutical Co., Ltd., Tianjin, China 301700)

Abstract: Objective To study the standard of Astragalus Polysaccharide for Injection, and to establish a new TLC and HPLC identification and inspection method by improving the items of chromatographic identification and inspection of free monosaccharides in the original standard. **Methods** With glucose, galactose and arabinose as the index components, the chromatographic identification and inspection of Astragalus Polysaccharide for Injection were carried out according to the original standard method and the improved method, respectively. **Results** The improved TLC and HPLC identification and inspection method avoided the use of highly toxic ions (Ba^{2+}) and improved the safety of experiments, the method combined the chromatographic identification items and the free monosaccharide inspection items into one experiment, which improved the work efficiency and reduced the usage of reagents. After hydrolysis, the monosaccharide mixture in the sample could be separated better, which could overcome the deficiency of the original method. **Conclusion** The newly established TLC and HPLC identification and inspection method is simple, accurate and reliable, which can be used for the quality control of Astragalus Polysaccharides for Injection.

Key words: Astragalus Polysaccharides for Injection; TLC; HPLC; inspection of free monosaccharide; standard improvement

注射用黄芪多糖为肿瘤辅助用药,功能益气补虚,用于倦怠乏力,少气懒言,自汗、气短、食欲不振,属气虚证因化学治疗后白细胞减少,生活质量降低,免疫功能低下的肿瘤患者^[1]。注射用黄芪多糖是利用现代分离技术提取分离黄芪中的多糖有效部位,并纯化精制而成。注射用黄芪多糖由天津赛诺制药有限公司生产,于2001年取得新药证书,现行标准为WS-330(Z-030)-2001(试行),其中前处理过程需使用高毒试剂(碳酸钡与硫酸溶液反应产生 Ba^{2+}),此外,纸色谱目前已较少使用,且3种单糖分离效果不明显。基于以上不足,本研究中对质量标准“单糖鉴别”“游离单糖检查”项^[2]进行了深入探讨,改进样品前处理方法,采用硅胶G板优化分离条件,建立了注射用黄芪多糖水解产物的鉴别方法及注射用黄芪多糖中游离单糖的检查方法。现报道如下。

1 仪器与试剂

Linomat-IV型薄层自动点样仪(瑞士CAMAG公

司);Visualizer型薄层色谱照相系统型,包括VinCAYTS薄层色谱软件(瑞士CAMAG公司);KQ-30012D型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司);AE-240型分析天平(万分之一,Mettler公司);P-1型双槽展开缸(200 mm×100 mm);3030-861型硅胶G板(20 cm×20 cm,德国默克公司),3030-861型微晶纤维素板(20 cm×20 cm, whatmanTM),纸薄层板(型号不详)。葡萄糖对照品(Glu,批号为110833-201205,含量为99.5%),半乳糖对照品(Gal,批号为100226-201105,含量为99.9%),半乳糖醛酸对照品(批号为111646-200301,纯度大于98%),均购自中国食品药品检定研究院;阿拉伯糖对照品(Ara,批号为C10297500,含量为99.0%),鼠李糖对照品(Rha,C16813500,含量为98.3%),均购自Dr. Ehrenstorfer GmbH;注射用黄芪多糖(批号为150702,151201,151101,M150701,M151001,天津赛诺制药有限公司);所用试剂均为分析纯。

第一作者:王赵,女,硕士研究生,研究方向为药物分析,(电话)010-67095994(电子信箱)wang_zhao_happy@yeah.net。

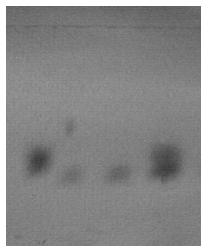
△通信作者:马双成,男,博士研究生,研究方向为药理学类,(电话)010-67095272(电子信箱)masc@nifdc.org.cn。

2 方法与结果

2.1 单糖鉴别

2.1.1 现行方法^[3]

鉴别:取本品 0.2 g,加 1 mol/L 硫酸溶液 25 mL,置水浴中水解 7 h,取出,放冷,取 5 mL,加碳酸钡(固体)中和至中性,滤过,滤液作为供试品溶液。另取葡萄糖和阿拉伯糖对照品,分别加水制成每 1 mL 含 5 mg 的溶液,作为对照品溶液。照纸色谱法试验,吸取上述供试品溶液 10 μ L、对照品溶液各 4 μ L,分别点于同一新华中速层析滤纸上,以醋酸乙酯-甲酸-水(6:2:2)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以苯胺-邻苯二甲酸溶液(取苯胺 0.93 g 和邻苯二甲酸 1.66 g,溶于水饱和正丁醇 100 mL 中),在 105 $^{\circ}$ C 烘约 5 min。供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相应位置上显相同颜色的斑点。纸色谱图见图 1。



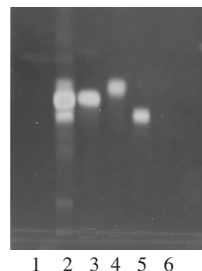
1. 阿拉伯糖 2. 葡萄糖 3. 半乳糖 4. 水解样品
图 1 纸色谱图

检查:取本品,加水制成每 1 mL 含 20 mg 的溶液,作为供试品溶液。另取葡萄糖和阿拉伯糖对照品,分别加水制成每 1 mL 含 5 mg 的溶液,作为对照品溶液。照 2000 年版《中国药典(一部)》附录 VIB 薄层色谱法试验,吸取上述供试品溶液 10 μ L,对照品溶液各 2 μ L,分别点于同一硅胶 G 薄层板上,以正丁醇-0.1 mol/L 磷酸二氢钠溶液-丙酮(4:1:5)为展开剂,展开,取出,晾干,喷以 α -萘酚试液,在 90~100 $^{\circ}$ C 烘约 5 min。供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相应位置上,未显相同颜色的斑点。

2.1.2 改进方法

鉴别:取黄芪多糖 20 mg,加水 5 mL 使溶解。取 1 mL,加 6 mol/L 三氟乙酸(TFA)1 mL,密封,于 110 $^{\circ}$ C 反应 6 h;氮气吹干,加甲醇约 1 mL,吹干,再重复操作 1 次,以除尽剩余的 TFA,残渣加水 0.5 mL 溶解,作为供试品溶液。另取葡萄糖、阿拉伯糖、半乳糖适量,加水制成每 1 mL 分别含 1 mg 的溶液,作为对照品溶液。照薄层色谱法(2015 年版《中国药典<四部>》通则 0502)试验,吸取上述供试品溶液 5 μ L、对照品溶液 1~5 μ L,分别点于同一 Merck 硅胶 G60 薄层板上,以正丁醇-乙酸乙酯-异丙醇-乙酸-吡啶-水(7:20:12:7:6:5)为

展开剂,二次展开,展距 9 cm,取出,晾干,喷以苯胺-邻苯二甲酸溶液(取苯胺 0.93 g 和邻苯二甲酸 1.66 g,溶于水饱和正丁醇 100 mL 中),在 105 $^{\circ}$ C 烘约 5 min,置紫外光灯(365 nm)下检视。供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相应位置上,显相同颜色的荧光斑点。色谱图见图 2。

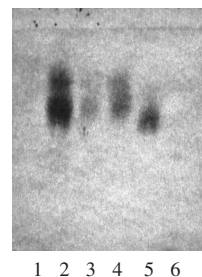


1. 空白溶液 2. 水解样品溶液 3. 葡萄糖 4. 阿拉伯糖
5. 半乳糖 6. 未水解样品溶液
图 2 薄层色谱图

检查:取本品 20 mg,加水 1 mL 使溶解,作为供试品溶液。照鉴别方法试验。供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相应位置上未显相同颜色的荧光斑点。

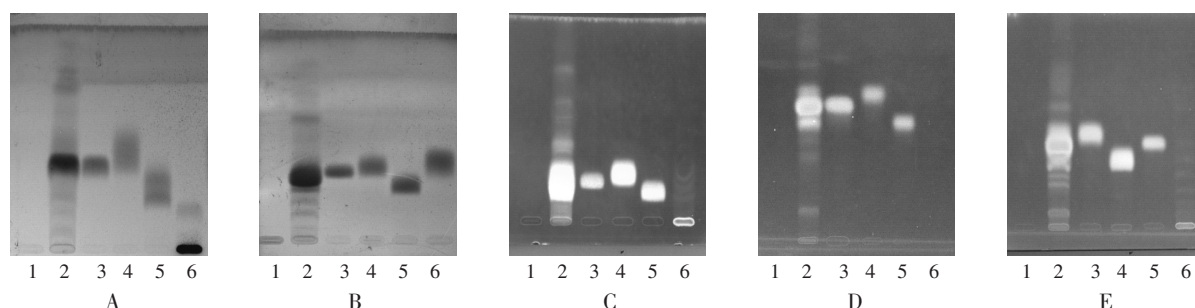
2.1.3 方法学考察

薄层板考察:首先考察纤维素板的分离效果^[5],结果单糖斑点较大,产生拖尾现象,各单糖分离效果不明显,详见图 3。比较硅胶 H 板与硅胶 G 板的差异,发现硅胶 H 板因不含黏合剂,在展开过程中经常出现吸附薄层脱落的现象,且分离效果不好,硅胶 G 板效果较好,且硅胶略带酸性,适于分离酸性及中性物质,目前应用广泛,便于实验室准备耗材。最终选择硅胶 G 板。



1. 空白溶液 2. 水解样品溶液 3. 葡萄糖 4. 阿拉伯糖
5. 半乳糖 6. 未水解样品溶液
图 3 微晶纤维素薄层色谱图

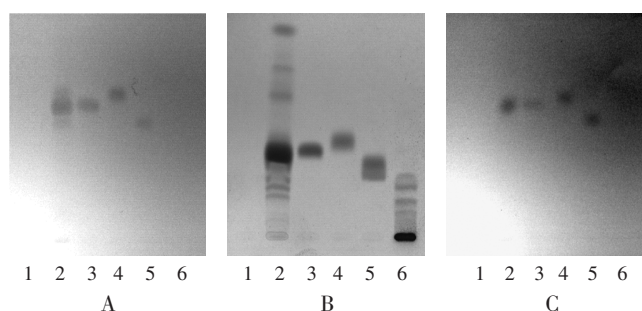
展开系统考察:参考文献[6-9],考察了不同展开剂系统(I~IV)的分离效果,系统 I 正丁醇-0.1 mol/L 磷酸二氢钠溶液-丙酮(4:1:5)、系统 II 正丁醇-丙酮-水(5:1:1)、系统 III 正丁醇-乙酸乙酯-水(7:2:1)、系统 IV 正丁醇-醋酸乙酯-异丙醇-乙酸-吡啶-水(7:20:12:7:6:5);同时,采用展开剂系统 IV 二次展开。结果展开剂系统 I 展开,单糖斑点较大,有拖尾现象;展开剂系统 II, III, IV 展开,单糖斑点较好,但水解黄芪多糖样品分离不完全。最终选择了使用展开剂系统 IV(正丁醇-醋酸乙酯-异



1. 空白溶液 2. 水解样品溶液 3. 葡萄糖 4. 阿拉伯糖 5. 半乳糖 6. 未水解样品溶液
A. 展开系统 I B. 展开系统 II C. 展开系统 III D. 展开系统 IV E. 系统 IV 二次展开苯胺-邻苯二甲酸(366 nm 荧光)
图 4 展开系统薄层色谱图

丙醇-乙酸-吡啶-水=7:20:12:7:6:5)二次展开作为修订标准的展开系统。薄层色谱图见图 4。

显色剂考察^[8-10]:考察苯胺-邻苯二甲酸显色剂在日光、366 nm 荧光、茴香醛及 α -萘酚显色剂的显色效果,以展开剂系统 IV 作为展开剂及展开方法,点样量分别为 10, 10, 10, 5, 2, 10 μ L。结果见图 4 E 和图 5。最终确定使用苯胺-邻苯二甲酸显色剂(366 nm 荧光下)检视。



1. 空白溶液 2. 水解样品溶液 3. 葡萄糖 4. 阿拉伯糖 5. 半乳糖 6. 未水解样品溶液
A. 系统 IV 二次展开苯胺-邻苯二甲酸(366 nm 日光)
B. 系统 IV 二次展开硫酸-茴香醛(日光)
C. 系统 IV 二次展开 α -萘酚-硫酸(日光)
图 5 展示系统二次展开显色剂薄层色谱图

展开温度和湿度考察:考察薄层板展开过程中温度和相对湿度对结果的影响,结果表明,温度为 10, 20, 30 $^{\circ}$ C 时,各指标成分斑点的 R_f 值影响不大,对分离效果几乎无影响;相对湿度为 30%, 50%, 75% 时,各指标成分斑点的 R_f 值影响不大,对分离效果也几乎无影响。

点样量考察:经试验对比发现,减少点样量有利于提高分离效果,建议点样量固定为“供试品溶液 5 μ L, 对照品溶液 1~5 μ L”。

2.2 游离单糖检查

2.2.1 色谱条件^[4-11]与系统适用性试验

色谱柱:Spolar C_{18} 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m);流动相:乙腈-0.1 mol/L 乙酸铵(体积比为 21:79,加冰醋酸调节 pH 为 5.5);流速:1.0 mL/min;柱温:35 $^{\circ}$ C;

检测波长:250 nm;进样量:10 μ L。水解后黄芪多糖样品中出现 5 个单糖的色谱峰,以葡萄糖、半乳糖和阿拉伯糖色谱峰为主,未水解黄芪多糖样品中未出现单糖色谱峰。色谱图见图 6。

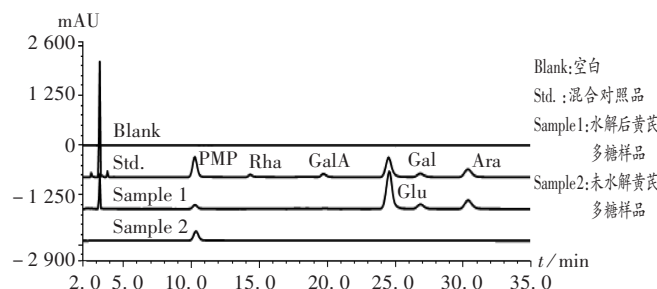


图 6 高效液相色谱图

2.2.2 溶液制备

分别精密称取鼠李糖、半乳糖醛酸、葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖适量,配制成适宜浓度的混合对照品溶液。定量吸取上述溶液 500 μ L,加 0.3 mol/L 氢氧化钠溶液 67 μ L,再加入 0.5 mol/L PMP 甲醇溶液 150 μ L,搅拌均匀,于 70 $^{\circ}$ C 反应 90 min。冷却至室温,加 0.3 mol/L 盐酸溶液 67 μ L 中和。加 1 mL 氯仿萃取,分去下层有机层,重复萃取 3 次,取上层溶液,作为对照品溶液。

取黄芪多糖样品约 20 mg,精密称定,加水制成每 1 mL 约含 4.0 mg 的溶液,定量吸取 250 μ L,置安瓿中,加入等体积的 6 mol/L 三氟乙酸,密闭,于 110 $^{\circ}$ C 反应 6 h。氮气吹干,加适量甲醇,再吹干,重复 3 次,以除尽残余三氟乙酸。加水 500 μ L,使残渣溶解。照对照品溶液制备“加 0.3 mol/L 氢氧化钠溶液 67 μ L”起同法处理,取上层溶液,作为供试品溶液 1。另取黄芪多糖,加水制成每 1 mL 含 1 mg 的溶液,定量吸取 500 μ L,照对照品溶液制备“加 0.3 mol/L 氢氧化钠溶液 67 μ L”起同法处理,取上层溶液,作为供试品溶液 2。

2.2.3 方法学考察

日间精密度试验:取样品(批号为 151101),按不同日期依法制备供试品溶液,依法测定。结果见表 1。可

表1 日间精密度试验结果(%, n=6)

单糖	2016-07-06	2016-07-11	2016-07-12	2016-07-13	2016-07-18	RSD
葡萄糖	83.18	78.81	86.37	75.36	83.31	5.31
半乳糖	3.85	4.26	3.91	6.13	3.85	22.31
阿拉伯糖	11.71	14.34	9.03	19.03	12.23	28.13

见,日间精密度 RSD 偏大,重复性差,建议仅用作定性鉴别。

稳定性试验:取样品(批号为 151101),精密称取 20 mg,于 0,1,2,6,12,24,36 h 时依法测定,结果见表 2。其中,半乳糖 RSD 偏大,但符合鉴别方法要求,表明葡萄糖和阿拉伯糖在 36 h 内基本稳定。

加样回收试验:取样品(批号为 151101)适量,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件测定。结果见表 3。

表2 稳定性试验结果(n=7)

测定时间	葡萄糖峰面积	半乳糖峰面积	阿拉伯糖峰面积
0 h	1 029.331	52.463	122.115
1 h	1 028.348	50.775	123.188
2 h	1 029.653	50.282	123.129
6 h	1 029.917	44.218	122.906
12 h	1 034.184	51.946	123.203
24 h	1 036.619	57.074	125.381
36 h	1 039.344	57.247	124.891
RSD(%)	0.41	8.55	0.94

表3 加样回收试验结果(n=6)

单糖	糖组成(%)	样品含量(μmol)	加入量(μmol)	测得量(μmol)	回收率(%)	RSD(%)
葡萄糖	86.8	1.632	1.630	3.287	101.53	2.21
半乳糖	3.4	0.064	0.045	0.102	84.44	3.40
阿拉伯糖	9.2	0.172	0.088	0.245	82.95	3.30

3 讨论

通过对质量标准“单糖鉴别”“游离单糖检查”项进行研究,改进了样品前处理方法,避免出现高毒离子(Ba²⁺),此外,通过采用实验室常用的硅胶 G 板分离黄芪多糖水解产物,优化了分离条件,使单糖分离效果明显。将原标准中检查项下“游离单糖”的检查与此薄层鉴别方法合并,同时进行单糖鉴别和游离单糖的检查,大大提高了工作效率,减少了试剂的使用。

对混合单糖进行分离比较困难,尤其是葡萄糖和阿拉伯糖在硅胶板上的分离。本研究中对多种薄层色谱条件进行了考察,对于其他单糖的薄层鉴别具有参考价值。

本研究中采用高效液相色谱法对注射用黄芪多糖的单糖组成进行了初步研究,先将注射用黄芪多糖用三氟乙酸水解,然后进行 PMP 衍生化处理,紫外吸收后进行高效液相色谱数据采集,色谱峰峰形较好,5 种单糖分离完全。故可用于注射用黄芪多糖中单糖组成的鉴别及游离单糖的检查。

高效液相色谱法方法学考察结果显示,葡萄糖、半乳糖、阿拉伯糖回收率及稳定性结果基本符合定量测定要求,但日间精密度 RSD 值偏大,重复性差,建议仅用作定性鉴别使用。

薄层色谱方法是中药鉴别常用方法之一,其简单、方便、经济等优势在中药质量控制中有着不可替代的地位,由于纸色谱目前已逐渐被其他方法取代,本研究将硅胶 G 板薄层鉴别替代纸色谱鉴别用于黄芪多糖注射液质量标准中单糖的研究,并建立了黄芪多糖的高效液

相色谱鉴别和检查方法,安全、准确,可用于注射用黄芪多糖的质量控制。

参考文献:

- [1] 张莹,王蕾,杜梦楠.注射用黄芪多糖治疗肿瘤的临床研究进展[J].药物评价研究,2016,39(6):1092-1094.
- [2] 范慧红.2010年版中国药典中多糖类药物标准的修订[J].中国药理学杂志,2010,45(17):1294-1297.
- [3] WS-330(Z-030)-2001,国家药品监督管理局标准(试行)注射用黄芪多糖[S].
- [4] 许杜鹃,夏泉,刘钢,等.高效液相法测定黄芪中性多糖的单糖组成[J].中国实验方剂学杂志,2008,14(9):4-6.
- [5] 刘柳,李莉,张庆林,等.微晶纤维素薄层色谱法分析苜蓿多糖中的单糖组成[J].中国实验方剂学杂志,2008,14(6):17-18.
- [6] 刘秀花,王莉,张淑红,等.玉米芯降解液糖类成分薄层色谱法分析技术优化[J].商丘师范学院学报,2014,30(9):56.
- [7] 颜军,郭晓强,李晓光,等.TLC快速分析多糖的单糖组成[J].食品科学,2006,27(12):603-606.
- [8] 钱夕惠.薄层色谱法分析灵芝多糖中的单糖组成[J].中国现代药物应用,2013,7(18):13-14.
- [9] 李继民,王彦吉,邹宁,等.薄层色谱法测定纸张水解液中单糖的研究[J].纤维素科学与技术,2008,16(2):43-47.
- [10] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(一部)[M].北京:中国医药科技出版社,2015:188.
- [11] 陈虎虎,孙静,杨金颖,等.柱前衍生化-高效液相色谱法测定蒙古黄芪多糖中单糖的组成[J].现代药物与临床,2012,27(5):468-470.

(收稿日期:2017-12-09;修回日期:2018-01-04)