

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.21.012

## 注射用益气复脉(冻干)中糖类成分研究\*

王莹<sup>1</sup>,李耀磊<sup>1</sup>,岳洪水<sup>2</sup>,刘丽娜<sup>1</sup>,金红宇<sup>1△</sup>,马双成<sup>1</sup>

(1. 中国食品药品检定研究院,北京 100025; 2. 天津天士力之骄药业有限公司,天津 300402)

**摘要:**目的 建立测定注射用益气复脉(YQFM)中糖类成分的薄层色谱(TLC)法联合高效液相色谱-电喷雾检测器(HPLC-CAD)法。方法 采用TLC法对YQFM中的糖类成分进行鉴别;采用HPLC-CAD法对YQFM中糖类成分的含量进行分析,色谱柱采用Shodex Asahipak NH2P-50柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为水(A)-乙腈(B),梯度洗脱,10~35 min时10% A→40% A。结果 TLC法测定结果显示,YQFM主要由果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖4种糖组成。HPLC-CAD法经系统方法学考察,线性关系良好,果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖的平均加样回收率分别为106.45%,100.00%,98.08%,99.57%,RSD分别为2.24%,4.50%,4.25%,4.41%(n=6);4种糖的平均质量比为3.4:1.0:1.1:0.7,4种糖总量为16.05%~17.68%。结论 该方法可用于YQFM中的糖类成分分析,简便准确,重复性好,专属性强,可为YQFM的质量标准提高提供参考。

**关键词:**注射用益气复脉;糖组成;薄层色谱法;高效液相色谱-电喷雾检测器法

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)21-0041-04

### Study on Saccharides in Yiqi Fumai Lyophilized Injection

WANG Ying<sup>1</sup>, LI Yaolei<sup>1</sup>, YUE Hongshui<sup>2</sup>, LIU Lina<sup>1</sup>, JIN Hongyu<sup>1</sup>, MA Shuangcheng<sup>1</sup>

(1. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing, China 100025; 2. Tianjin Tasly Pride Pharmaceutical Co., Ltd., Tianjin, China 300402)

**Abstract: Objective** To establish a thin layer chromatography(TLC) combined with high performance liquid chromatography-charged aerosol detection(HPLC-CAD) method for the determination of saccharides in Yiqi Fumai Lyophilized Injection(YQFM). **Methods** The saccharides types of YQFM were identified by the TLC method, the contents of saccharides were determined by the HPLC-CAD method. The chromatographic column was Shodex Asahipak NH2P-50 column(250 mm×4.6 mm,5 μm), the mobile phase was water (A) - acetonitrile(B) with gradient elution(10-35 min, 10% A → 40% A). **Results** The results of TLC showed YQFM mainly consists of four kinds of saccharides: fructose, glucose, sucrose and maltose. Good linearity was obtained by using the HPLC-CAD method. The average recoveries of fructose, glucose, sucrose and maltose were 106.45%, 100.00%, 98.08% and 99.57%, and the RSDs were 2.24%, 4.50%, 4.25% and 4.41% (n=6), respectively. The average mass ratio of four saccharides was 3.4:1.0:1.1:0.7, and the total amount of four saccharides was in the range of 16.05%-17.68%. **Conclusion** The method can be used for the analysis of saccharides in YQFM. It is simple, accurate, reproducible and specific, which can provide reference for improving the quality standard of YQFM.

**Key words:** Yiqi Fumai Lyophilized Injection; saccharides type; TLC; HPLC-CAD

注射用益气复脉(冻干,YQFM)处方来源于古方生脉散,由红参、麦冬、五味子组方,以甘露醇和葡甲胺为辅料,具有益气复脉、养阴生津功效<sup>[1]</sup>,临床主要用于治疗冠状动脉粥样硬化性心脏病心绞痛和冠状动脉粥样硬化性心脏病慢性心力衰竭等<sup>[2]</sup>。YQFM于2007年批准上市,现行法定质量标准为国家药品标准 YBZ07062006-2009Z-2015,主要对其皂苷类、木脂素类及糖类成分进行控制。YQFM主要化学成分包括三萜皂苷、甾体皂苷、木脂素、糖等<sup>[3-6]</sup>,其中对皂苷类成分的研究较深入,对单糖及双糖成分的研究则较少。糖类成分作为主要质控指标,现行标准采用苯酚硫酸-紫外分光光度法对总糖进行测定,但缺乏专属性,无法获取糖的种类信息,且操作步骤复杂,重复性不佳。故本研究中拟对YQFM中糖类成分的测定方法进行研究。目前,糖组成测定方法包括薄层色谱(TLC)法、气相色谱(GC)

法、高效液相色谱(HPLC)法等。TLC法具有简单、方便、经济的特点,常作为糖类鉴别方法<sup>[7-9]</sup>。由于糖极性大、难气化,故使用GC分析前需对糖进行硅烷化或酯化等处理;由于糖无紫外吸收,若采用HPLC-UV检测器分析,需先对其进行衍生化,操作较烦琐;蒸发光散射检测器(ELSD)是一种质量型检测器,在对无紫外吸收化合物进行分析时具有基线稳定、结果准确、样品处理简单等优点,常用于糖类物质尤其是单糖和双糖的检测<sup>[10-11]</sup>。电喷雾检测器(CAD)是一种通用型检测器,其检测信号不依赖于被检测物质的化学结构,能检测大部分非挥发性或半挥发性物质,作为通用型检测器目前已有报道将其应用于单糖和寡糖的检测<sup>[12-13]</sup>。本研究中分别采用TLC法和HPLC-CAD法对YQFM中糖的种类和含量进行测定,以期对YQFM的质量控制提供科学依据。现报道如下。

\*基金项目:天津市科技计划项目[18YFCZC00430]。

第一作者:王莹,女,博士研究生,副研究员,研究方向为中药质量控制及安全检测,(电子信箱)wayi\_1986@163.com。

△通信作者:金红宇,男,大学本科,主任药师,研究方向为中药质量控制及安全检测,(电子信箱)jhyw@nifdc.org.cn。

## 1 仪器与试药

### 1.1 仪器

Thermo Ultimate 3000 型液相色谱仪,配置 CAD 检测器(美国赛默飞世尔科技公司);TLC 点样系统,TLC 薄层显像系统,均购自瑞士卡玛公司。

### 1.2 试药

果糖对照品(批号为 100231-201807,质量分数为 99.6%),D-无水葡萄糖对照品(批号为 110833-201707,含量为 99.9%),蔗糖对照品(批号为 111507-201303,含量为 99.8%),麦芽糖对照品(批号为 100287-201303,含量为 94.3%),均购自中国食品药品检定研究院;TLC 硅胶 G 薄层板(Merck 公司);注射用益气复脉(冻干,天津天士力之骄药业有限公司,编号分别为 S1~S5,规格为每瓶 0.65 g)。

## 2 方法与结果

### 2.1 TLC 法鉴别糖组成

溶液制备:分别取葡萄糖、果糖、麦芽糖、蔗糖,制成质量浓度为 1 mg/mL 的单标溶液。分别吸取 1 mL,置 10 mL 容量瓶中,加水定容,摇匀,即得混标溶液。精密称取样品 100 mg,置 10 mL 容量瓶中,加水制成质量浓度为 10 mg/mL 的溶液,摇匀,即得供试品溶液。

薄层展开条件:取对照品溶液及供试品溶液,在薄层板上各点样 2  $\mu$ L,展开剂为正丁醇-异丙醇-水-醋酸(7:5:2:1, V/V/V/V),展开,取出,吹干,苯胺-二苯胺显色剂显色,置加热板(105  $^{\circ}$ C,加热 10 min),在日光下观察。

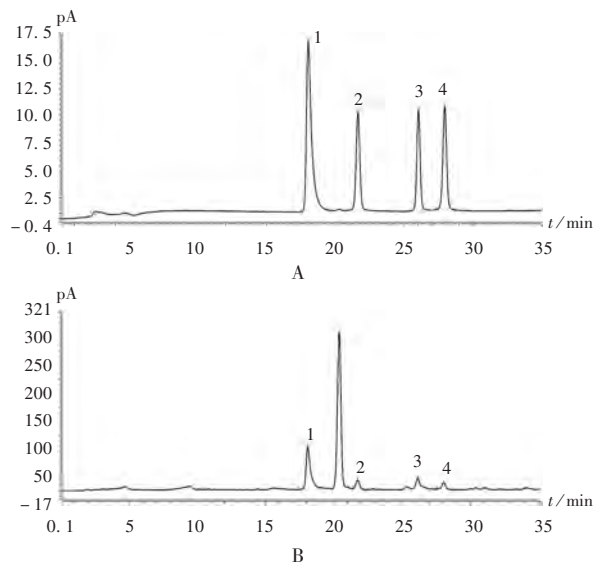
样品测定:采用上述方法对 5 批样品进行 TLC 检测,供试品溶液在与对照品溶液相对应的位置上,应显相同颜色的斑点。由图 1 可见,5 批样品均包括葡萄糖、果糖、麦芽糖、蔗糖,其中果糖、葡萄糖、蔗糖主斑点显色明显,蔗糖斑点显色略弱于其他 3 种单糖,显示可能蔗糖含量较低。

### 2.2 HPLC-CAD 法分析糖组成

#### 2.2.1 色谱条件

色谱柱:Shodex Asahipak NH2P-50 柱(250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu$ m);流动相:水(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~35 min, 10% A $\rightarrow$ 40% A);流速:0.8 mL/min;柱温:

30  $^{\circ}$ C;CAD 雾化温度:45  $^{\circ}$ C;进样量:10  $\mu$ L;PF 值:1.3。在此色谱条件下的色谱图见图 2。



1. 果糖 2. 葡萄糖 3. 麦芽糖 4. 蔗糖

A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液

图 2 高效液相色谱-电喷雾检测器色谱图

#### 2.2.2 溶液制备

分别精密称取果糖、葡萄糖、蔗糖和麦芽糖对照品适量,制成质量浓度为 0.60, 0.20, 0.20, 0.20 mg/mL 的混合对照品溶液。精密称取 120 mg 的样品,置 10 mL 容量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,0.45  $\mu$ m 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。

#### 2.2.3 方法学考察

线性关系考察:分别精密吸取 2.2.2 项下混合对照品溶液 2, 5, 10, 15, 20  $\mu$ L,注入高效液相色谱仪,测定各成分的峰面积,以进样量( $X$ ,  $\mu$ g)为横坐标、峰面积( $Y$ )为纵坐标进行线性回归。结果见表 1。

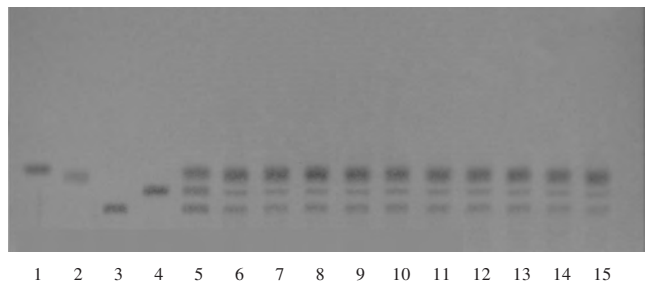
表 1 线性关系考察结果( $n=5$ )

| 成分  | 线性方程               | $r$    | 线性范围( $\mu$ g) | 定量限( $\mu$ g) |
|-----|--------------------|--------|----------------|---------------|
| 果糖  | $Y=0.7568X+1.4933$ | 0.9900 | 1.227~12.27    | 0.20          |
| 葡萄糖 | $Y=0.2312X+0.2748$ | 0.9988 | 0.416~4.16     | 0.20          |
| 蔗糖  | $Y=0.3573X+0.4583$ | 0.9993 | 0.453~4.53     | 0.23          |
| 麦芽糖 | $Y=0.2152X+0.1968$ | 0.9986 | 0.388~3.88     | 0.19          |

精密度试验:精密吸取供试品溶液 10  $\mu$ L,注入高效液相色谱仪,测定各成分的峰面积。结果果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖峰面积的  $RSD$  分别为 3.26%, 1.60%, 1.41%, 1.14% ( $n=6$ ),表明仪器精密度良好。

加样回收试验:取已知含量的样品(编号为 S1) 60 mg,精密称定,共 6 份,分别按样品-对照品 1:1 的比例加入对照品,依法制备供试品溶液,摇匀,按拟订色谱条件测定各成分的峰面积,并计算回收率。结果见表 2。

重复性试验:取样品适量,依法平行制备供试品溶液 6 份,并测定其果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖的含量,计



1. 葡萄糖对照品溶液 2. 果糖对照品溶液 3. 麦芽糖对照品溶液 4. 蔗糖对照品溶液 5. 混标溶液 6-15. 供试品溶液

图 1 薄层色谱图

表2 加样回收试验结果( $n=6$ )

| 成分  | 样品含量(mg) | 加入量(mg) | 测得量(mg) | 回收率    | $\bar{X}$ (%) | RSD(%) |
|-----|----------|---------|---------|--------|---------------|--------|
| 果糖  | 5.41     | 4.29    | 10.08   | 108.86 | 106.45        | 2.24   |
|     | 5.39     | 4.29    | 10.05   | 108.62 |               |        |
|     | 5.36     | 4.29    | 9.83    | 104.20 |               |        |
|     | 5.32     | 4.29    | 9.96    | 108.16 |               |        |
|     | 5.16     | 4.29    | 9.68    | 105.36 |               |        |
|     | 5.18     | 4.29    | 9.62    | 103.50 |               |        |
| 蔗糖  | 1.78     | 1.50    | 3.27    | 99.33  | 100.00        | 4.50   |
|     | 1.77     | 1.50    | 3.40    | 108.67 |               |        |
|     | 1.76     | 1.50    | 3.25    | 99.33  |               |        |
|     | 1.75     | 1.50    | 3.18    | 95.33  |               |        |
|     | 1.69     | 1.50    | 3.17    | 98.67  |               |        |
|     | 1.70     | 1.50    | 3.18    | 98.67  |               |        |
| 葡萄糖 | 1.63     | 1.04    | 2.65    | 98.08  | 98.08         | 4.25   |
|     | 1.62     | 1.04    | 2.65    | 99.04  |               |        |
|     | 1.61     | 1.04    | 2.63    | 97.08  |               |        |
|     | 1.60     | 1.04    | 2.54    | 90.38  |               |        |
|     | 1.55     | 1.04    | 2.62    | 102.88 |               |        |
|     | 1.56     | 1.04    | 2.60    | 100.00 |               |        |
| 麦芽糖 | 1.25     | 1.15    | 2.33    | 93.91  | 99.57         | 4.41   |
|     | 1.24     | 1.15    | 2.39    | 100.00 |               |        |
|     | 1.24     | 1.15    | 2.41    | 101.74 |               |        |
|     | 1.23     | 1.15    | 2.44    | 105.22 |               |        |
|     | 1.19     | 1.15    | 2.36    | 101.74 |               |        |
|     | 1.19     | 1.15    | 2.28    | 94.78  |               |        |

算 RSD 值。结果果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖含量的 RSD 分别为 1.67% , 2.50% , 3.22% , 1.35% ( $n=6$ ) , 表明方法重复性良好。

稳定性试验:取样品(编号为 S1)适量,依法制备供试品溶液,分别于 0, 5, 10, 15, 20, 24 h 时进样,测定各成分的峰面积。结果果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖峰面积的 RSD 分别为 4.84% , 3.97% , 3.96% , 2.37% ( $n=6$ ) , 表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

#### 2.2.4 样品含量测定

取 5 批样品(批号分别为 S1~S5),各 2 份,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样 10  $\mu$ L,记录峰面积,以标准曲线法计算 4 种糖的含量。结果见表 3。5 批样品中 4 种糖的平均质量比为 3.4:1.0:1.1:0.7,糖总量为 16.05%~17.68% ,均符合现行法定标准要求。

表3 5批样品中4种糖含量测定结果( $n=2$ )

| 编号        | 果糖(%) | 葡萄糖(%) | 蔗糖(%) | 麦芽糖(%) | 总糖含量(%) | 按每瓶计(g) |
|-----------|-------|--------|-------|--------|---------|---------|
| S1        | 8.93  | 2.69   | 2.93  | 2.06   | 16.61   | 0.11    |
| S2        | 8.91  | 2.51   | 2.58  | 2.05   | 16.05   | 0.10    |
| S3        | 9.67  | 3.01   | 3.10  | 1.90   | 17.68   | 0.11    |
| S4        | 9.57  | 2.91   | 2.90  | 2.16   | 17.54   | 0.11    |
| S5        | 9.35  | 2.56   | 3.24  | 2.05   | 17.20   | 0.11    |
| $\bar{X}$ | 9.29  | 2.74   | 2.95  | 2.04   | 17.02   | 0.11    |

### 3 讨论

#### 3.1 TLC 条件优化

对 TLC 展开系统及显色剂进行考察,分别采用正丁醇-异丙醇-水-醋酸为展开溶剂,苯胺-二苯胺为显色剂;正丁醇-0.1 mol/L 磷酸氢二钠-丙酮为展开剂, $\alpha$ -萘酚试液为显色剂;正丁醇-醋酸乙酯-异丙醇-乙酸-吡啶-水为展开剂,苯胺-邻苯二甲酸溶液为显色剂。结果表明,正丁醇-异丙醇-水-醋酸的分离效果最佳,故以此为展开条件。

前期研究中采用确定的 TLC 条件,对 9 种单糖(葡萄糖、果糖、麦芽糖、蔗糖、半乳糖、乳糖、甘露糖、木糖、阿拉伯糖)、双糖及样品进行测定及鉴别,发现 YQFM 中主要由 4 种糖类成分组成,即果糖、葡萄糖、蔗糖和麦芽糖。文献[14]显示,YQFM 中红参的主要糖成分为蔗糖和麦芽糖,麦冬中主要糖成分为果糖和葡萄糖,故上述 4 个单糖可作为 YQFM 中反映药味质量的有效指标。

#### 3.2 HPLC-CAD 条件优化

曾考察流动相梯度洗脱和等度洗脱,结果梯度洗脱时分离效果好,最终确定流动相为乙腈-水、梯度洗脱。

#### 3.3 CAD 法与紫外可见分光光度法测定结果比较

采用 HPLC-CAD 法及现行标准中的苯酚硫酸法对 3 批样品中糖含量进行测定,发现 2 种方法存在一定差异,紫外分光光度法测定结果均显著高于 CAD 法的测定结果,这可能与苯酚硫酸法显色原理有关。不同单糖显色程度有差异,以葡萄糖作为对照品计算可能导致结果存在误差<sup>[15]</sup>。由总糖含量测定结果可知,2 种方法的测定结果均符合现行法定标准(总糖含量限度为每瓶不得少于 0.10 g)。

#### 3.4 方法评价

采用 TLC 结合 HPLC-CAD 法对益气复脉中糖类成分组成及其含量进行分析,该方法相较于原标准中的苯酚硫酸-紫外分光光度法,专属性强,简便快速,成本低,可用于生产过程及成品制剂的质量控制。

#### 参考文献:

- [1] 鞠爱春,罗瑞芝,苏小琴,等.注射用益气复脉(冻干)化学成分及质量控制研究进展[J].现代药物与临床,2018,41(3):365-371.
- [2] 褚延斌,苏小琴,李德坤,等.基于一测多评法对注射用益气复脉(冻干)中 9 种成分的质量控制研究[J].中草药,2017,48(17):3537-3544.
- [3] 周焱焱,焦燕婷,王彦帅,等.注射用益气复脉(冻干)化学成分的 UPLC-Q-TOF/MS 分析[J].现代药物与临床,2018,41(3):446-450.
- [4] 何珊珊,岳洪水,宋丽丽,等.注射用益气复脉(冻干)HPLC 指纹图谱研究[J].现代药物与临床,2015,38(4):390-393.
- [5] 褚延斌,苏小琴,周学谦,等.基于液质指纹图谱和化学模式识别的注射用益气复脉(冻干)质量综合评价研究[J].中草药,