

# 高效液相-蒸发光散射检测法测定清开灵注射液中木糖等4种糖的含量

张红霞<sup>1</sup>, 张加余<sup>2</sup>, 张倩<sup>1</sup>, 乔廷江<sup>1</sup>, 卢建秋<sup>2\*</sup> (1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 2. 北京中医药大学科研实验中心, 北京 100029)

**摘要:**目的 采用高效液相-蒸发光散射检测法(HPLC-ELSD)测定不同厂家清开灵注射液中木糖、果糖、葡萄糖和蔗糖的含量,并根据4种糖的含量水平对8个厂家的产品进行聚类分析。方法 采用Prevail Carbohydrate ES糖分析色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),乙腈(B)-水(A)为流动相,线性梯度洗脱,流速为1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温为30℃;ELSD检测器:漂移管温度为90.7℃,雾化气(空气)流速为2.4 L·min<sup>-1</sup>,测定清开灵注射液中4种糖的含量,并利用SPSS 16.0进行聚类分析。结果 4种糖在色谱柱上分离效果良好,并具有良好的线性范围;木糖、果糖、葡萄糖、蔗糖的平均加样回收率分别为98.52%(RSD=1.70%)、99.15%(RSD=2.55%)、99.82%(RSD=2.04%)、99.26%(RSD=1.67%);聚类分析将不同厂家清开灵样品分成3类。结论 该方法简便、稳定、重复性好,可用于清开灵注射液中糖类成分测定,并为其质量控制提供理论依据。

**关键词:** 高效液相-蒸发光散射检测法;清开灵注射液;聚类分析;木糖;果糖;葡萄糖;蔗糖

**doi:** 10.11669/cpj.2013.14.012 **中图分类号:** R917 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-2494(2013)14-1183-04

## Determination of Four Saccharides in Qingkailing Injection by HPLC-ELSD

ZHANG Hong-xia<sup>1</sup>, ZHANG Jia-yu<sup>2</sup>, ZHANG Qian<sup>1</sup>, QIAO Yan-jiang<sup>1</sup>, LU Jian-qiu<sup>2\*</sup> (1. School of Chinese Pharmacy, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China; 2. Center of Scientific Experiment, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish an HPLC-ELSD method to determine the contents of four saccharides in Qingkailing injection and carry out cluster analysis of the products from different manufactures. **METHODS** Chromatographic separation was performed on a Prevail Carbohydrate ES column with mobile phase of acetonitrile (B) -water (A) at a flow rate of 1.0 mL·min<sup>-1</sup> with gradient elution; the column temperature was 30℃; the ELSD drift tube temperature was 90.7℃ and the gas flow was 2.4 L·min<sup>-1</sup>. Cluster analysis was performed by SPSS16.0. **RESULTS** Good resolution and linearities were obtained. The average recoveries of xylose, fructose, glucose and sucrose were 98.52% (RSD=1.70%), 99.15% (RSD=2.55%), 99.82% (RSD=2.04%) and 99.26% (RSD=1.67%), respectively. The test samples were clustered into three classes. **CONCLUSION** The established method is simple, reliable and accurate. It can be used to determine the saccharide components in Qingkailing injection, and provide theoretical basis for its quality control.

**KEY WORDS:** HPLC-ELSD; Qingkailing injection; cluster analysis; xylose; fructose; glucose; sucrose

清开灵注射液是在古方“安宫牛黄丸”的基础上改制而成,由胆酸、珍珠母(粉)、猪去氧胆酸、栀子、水牛角(粉)、板蓝根、黄芩苷和金银花等八味药材或提取物配制而成,具有清热解毒、泻火除烦、化痰通络等作用<sup>[1-3]</sup>。目前,该制剂物质基础研究主要集中在有机酸类、氨基酸类、环烯醚萜类、胆酸类等成分<sup>[4-6]</sup>,而对其中单糖及双糖成分的研究较少。王宏洁等<sup>[7]</sup>采用苯酚-硫酸法,仅测定了其中的总多糖的含量,而未能对其含有的单糖成分进行分离检测。在以往的药物研究和常规检验中,通常采用示差折光检测法<sup>[8-9]</sup>对糖类成分进行定性和定量

分析,但该方法专属性较差,不能梯度洗脱,受液相条件等影响较大;采用HPLC-UV定性定量时,则由于单糖及双糖仅有末端吸收,检测非常困难,通常需采用柱前或柱后衍生化,操作繁琐费时,误差也较大<sup>[10]</sup>。而蒸发光散射检测器(ELSD)作为一种通用型质量检测器,它不依赖样品的官能团或光学特性,能检测挥发性低于流动相的任何化合物,并且可以梯度洗脱,对温度变化不敏感,基线稳定,克服了传统紫外检测和示差折光检测方法的不足<sup>[11-18]</sup>。本实验采用高效液相色谱-蒸发光散射法测定清开灵注射液中4种糖的含量,并据此对8个不同厂家的

基金项目: 国家重大新药创制专项资助项目(2010ZX09502-002)

作者简介: 张红霞,女,硕士 研究方向: 中药注射剂质量控制 \* 通讯作者: 卢建秋,男,研究员 研究方向: 中药质量控制 Tel/Fax: (010) 64286203 E-mail: lujq@vip.sina.com

注射液进行了系统聚类分析, 以期为该制剂的质量评价提供理论依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Agilent 1100 高效液相色谱系统, Alltech ELSD 2000 蒸发光散射检测器, AllChrom Plus Data System 数据工作站(美国奥泰科技公司); 合成空气(北京市氧利来化工气体有限公司); BP211D、BS110S 电子分析天平( Sartorius, Switzerland 公司); Milli-Q Synthesis 超纯水纯化系统等。

### 1.2 试剂

果糖对照品(批号: 100231-200904)、D-无水葡萄糖对照品(批号: 110833-200904)、D-木糖对照品(批号: 111508-200404)、蔗糖对照品(批号: 111507-200302)等均购自中国食品药品检定研究院。市售 8 个厂家清开灵注射液(编号分别为 F1、F2、F3、F4、F5、F6、F7 和 F8)。乙腈为色谱级。

## 2 方法与结果

### 2.1 液相色谱条件

Prevail Carbohydrate ES (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相为乙腈(B)-水(A) 线性梯度洗脱: 0 min 80% B; 5 min 80% B; 11 min 75% B; 20 min 75% B; 25 min 68% B; 30 min 65% B 流速为 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, 柱温为 30 °C; ELSD 条件: 漂移管温度为 90.7 °C 雾化气(空气) 流速为 2.4 L · min<sup>-1</sup>, 进样量 10 μL。结果见图 1。由于成分 4 浓度大, 而采用稀释后独立检测(图 1C)。

### 2.2 溶液制备

**2.2.1 混合对照品溶液的制备** 分别精密称取木糖、果糖、葡萄糖、蔗糖对照品适量, 置于 5 mL 量瓶中, 加水溶解, 定容至刻度, 摇匀, 制成质量浓度分别为 0.44、0.61、0.14 和 0.37 mg · mL<sup>-1</sup> 的混合对照品溶液。

**2.2.2 供试品溶液的制备** 精密量取 1 mL 的清开灵注射液 2 份, 分别置于 5、25 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 过 0.45 μm 的微孔滤膜, 取续滤液, 即得。

### 2.3 线性范围

分别精密吸取上述混合对照品溶液 1、2、5、10、15、20 μL 注入高效液相色谱仪, 测定各成分的峰面积, 以进样量(μg) 的常用对数值(lgW) 为横坐标(ρ), 以峰面积的常用对数值(lgA) 为纵坐标(Y) 进

行线性回归。结果表明, 4 种糖的线性关系良好。结果见表 1。

### 2.4 精密度实验

精密吸取混合对照品溶液 10 μL 注入高效液相色谱仪, 测定各成分的峰面积。结果木糖、果糖、葡

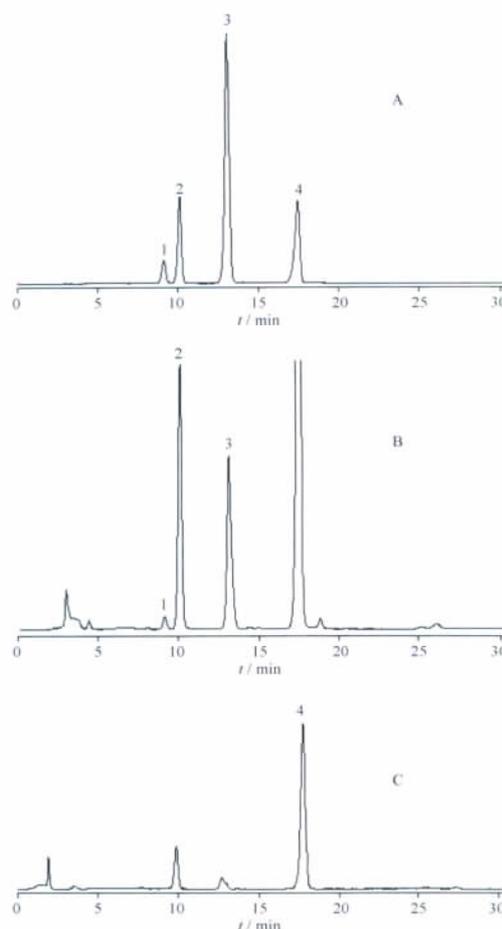


图 1 清开灵注射液中混合对照品(A)、稀释 5 倍样品(B)、稀释 25 倍样品(C)的 HPLC-ELSD 图

1 - 木糖; 2 - 果糖; 3 - 葡萄糖; 4 - 蔗糖

Fig. 1 HPLC-ELSD Chromatograms of Qingkailing injection mixed standards (A), 5 times diluted sample (B), 25 times diluted sample (C)

1 - xylose; 2 - fructose; 3 - glucose; 4 - sucrose

表 1 清开灵注射液中木糖、果糖、葡萄糖和蔗糖的线性回归分析

Tab. 1 The linear regression analysis of xylose, fructose, glucose and sucrose in Qingkailing injection

Standars	Regression equations	r	Range/μg	LOD/ng	LOQ/ng
Xylose	$Y = 1.532 0\rho + 4.480 9$	0.997 4	0.44 - 8.72	6.88	22.95
Fructose	$Y = 1.544 8\rho + 6.140 4$	0.999 5	0.61 - 12.16	2.98	9.97
Glucose	$Y = 1.548 5\rho + 5.559 5$	0.999 6	0.14 - 2.78	4.71	15.63
Sucrose	$Y = 1.569 0\rho + 6.065 5$	0.999 7	0.37 - 7.44	1.99	6.65

葡萄糖、蔗糖峰面积的 RSD ( $n = 6$ ) 分别为 1.10%、0.17%、0.40%、0.37% 表明仪器精密度良好。

### 2.5 稳定性实验

取同一供试品溶液 (F1), 分别于 0, 2, 4, 8, 12, 24 h 进样, 测定各成分的峰面积。结果木糖、果糖、葡萄糖、蔗糖峰面积的 RSD 分别为 3.73%、0.68%、0.37%、2.63% 表明该供试品溶液在 24 h 内稳定。

### 2.6 重复性实验

取同一清开灵注射液样品 (F1), 按照“2.2.2”项下方法, 两个稀释倍数样品各平行配制 6 份, 按照“2.1”项下色谱条件测定各成分峰面积。结果木糖、果糖、葡萄糖、蔗糖峰面积的 RSD 分别为 1.35%、0.18%、0.68%、0.20% 表明本方法重复性好, 所得实验结果准确可靠。

### 2.7 回收率实验

精密量取样品溶液 1 mL, 共取 6 份, 分别精密加入高、中、低 3 个质量浓度的混合对照品溶液 1 mL。每个浓度各取 2 份, 按照“2.2.2”项下方法制备, 摇匀, 按“2.1”色谱条件测定各成分的峰面积, 并计算各成分的回收率, 结果见表 2。结果表明 4 种糖的平均回收率均符合要求, RSD 值均小于 3%。

表 2 清开灵注射液中木糖、果糖、葡萄糖和蔗糖的加样回收率情况

Tab. 2 Recoveries situation of xylose, fructose, glucose and sucrose in Qingkailing injection

Components	$m$ (added)	$m$ (sample)	$m$ (founded)	Recovery	Average	RSD
	/mg	content/mg	/mg	%	recovery/%	%
Xylose	2.98	2.87	2.88	97.18	98.52	1.70
			2.92	99.94		
	4.33		3.53	96.92		
			3.56	98.40		
	5.43		4.11	101.12		
			4.08	97.57		
Fructose	2.45	2.953	2.74	103.26	99.15	2.55
			2.70	100.41		
	3.05		2.97	98.01		
			2.97	97.82		
	3.68		3.24	95.94		
			3.30	99.46		
Glucose	1.24	1.40	1.33	102.4	99.82	2.04
			1.30	96.80		
	1.42		1.40	98.57		
			1.41	100.09		
	1.83		1.61	99.46		
			1.63	101.62		
Sucrose	7.75	9.75	8.73	99.59	99.26	1.67
			8.75	100.10		
	9.25		9.35	96.77		
			9.57	101.62		
	10.88		10.28	99.31		
			10.22	98.18		

### 2.8 样品测定

分别精密吸取供试品溶液 10  $\mu$ L, 注入液相色谱仪测定, 按照“2.1”项下色谱条件测定各成分峰面积, 代入标准曲线方程计算, 测定结果, 见表 3。

8 个厂家清开灵注射液中均含有上述 4 种糖, 且含量有较大差异: 相比于其他 7 个厂家, F3 厂家清开灵注射液中 4 种糖的含量普遍偏低; F7 和 F3 两个厂家的清开灵注射液中蔗糖的含量都比较低, 而 F1 厂家的注射液中蔗糖的含量最高, 含量是最低含量的 44 倍。8 个厂家样品总糖含量相差也比较大, 最低含量与最高含量相差 6 倍多。

### 2.9 8 个厂家样品的系统聚类分析

将表 3 中 8 个厂家 4 种糖的含量输入 SPSS 16.0 软件, 采用组间均连法, 以欧氏距离为指标进行聚类分析, 结果见图 2。系统聚类把 8 个厂家的清开灵注射液按 4 种糖的含量聚成 3 大类, F2、F5、F6、F8 厂家样品 4 种糖含量非常接近, 与厂家 F3、F4、F7 比较接近; F1 厂家样品与其他厂家样品在较远距离聚合。

## 3 讨论

### 3.1 本实验中研究的 4 种糖不含强紫外和荧光吸

表 3 8 个厂家清开灵注射液中木糖、果糖、葡萄糖和蔗糖的含量

Tab. 3 The contents of xylose, fructose, glucose and sucrose in Qingkailing injections from eight factories manufacturers

No.	Content of sugars in the samples/mg $\cdot$ mL <sup>-1</sup>				
	Xylose	Fructose	Glucose	Sucrose	Total
F1	2.83	2.46	1.42	11.63	18.34
F2	1.45	2.30	1.38	7.23	12.36
F3	0.75	0.86	0.62	0.45	2.68
F4	0.70	1.32	1.12	2.36	5.50
F5	1.36	2.86	1.25	5.96	11.43
F6	0.96	3.13	2.10	6.93	13.12
F7	1.50	1.00	0.69	0.26	3.45
F8	2.70	2.81	1.32	6.15	12.98

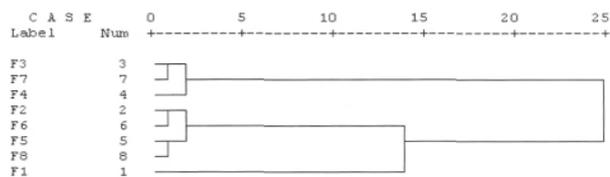


图 2 不同厂家清开灵注射液中糖类成分含量的聚类分析树状图

Fig. 2 The cluster analysis dendrogram of Qingkailing injections from different manufactures according to saccharides contents

收的官能团,采用常规的紫外检测/二极管阵列检测器进行检测具有一定的难度。前期研究工作表明,为了使木糖和果糖在色谱柱上达到基线分离,需采用梯度洗脱,而通用型示差折光检测器无法满足本实验要求。因此,本实验选择蒸发光散射检测器对清开灵注射液中4种糖进行含量测定。

**3.2** 本实验考察了梯度洗脱和等度洗脱两种洗脱方式,等度洗脱时样品峰不能得到良好的分离。经反复实验,最终确定流动相为乙腈-水,梯度洗脱。同时,还对漂移管温度、流速分别进行了考察和优化,最终确定上述色谱条件。

**3.3** 清开灵注射液中糖的含量比较高,故采用稀释法进行样品测定。将注射液稀释5倍,测定4种糖的含量,木糖、果糖和葡萄糖能达到含量测定的要求,而蔗糖的色谱图峰超载,为了满足其含量测定的需要,本实验采用稀释25倍的样品溶液对其进行含量测定。

**3.4** 对比可以发现8厂家的清开灵注射液中4糖在含量上存在一定的差异,可能与所用原料和生产工艺有关,具体原因还有待于进一步研究。

## REFERENCES

- [1] Ch. P (2010) Vol I (中国药典2010年版·一部) [S]. 2010: 1110.
- [2] ZHENG Z H, DONG Z H, SHE J. *Appl Mod Res Chin Med* (中药现代研究与应用) [M]. Vol 4. Beijing: China Academic Press, 1998: 3166.
- [3] YAN S K. Studies on the Chemical Fingerprinting of Qingkailing Injection [D]. Zhejiang: Univ. of Zhejiang, 2005: 1-96.
- [4] JIANG Y Q. Determination of cholic acid and hyodeoxycholic acid in Qingkailing Injection by HPLC-ELSD [J]. *Drug Stand China* (中国药品标准), 2006, 7(4): 31-33.
- [5] ZHANG H Y, WANG Y L, HU P, et al. Fingerprints of Qingkailing Injection by HPLC/UV/MS/MS [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2006, 28(4): 469-473.
- [6] XIAO X, FU C, CHEN L. Study of relative molecular mass of polymers in Qingkailing Injection by high performance gel permeation chromatography [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2011, 46(24): 1946-1947.
- [7] WANG H J, LI P Y, LIU T, et al. Determination of the content of polysaccharides in Qingkailing injection by the method of phenol vitril [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2009, 15(11): 3-5.
- [8] ZHOU H, YANG X L, ZHANG X X. HPLC Simultaneous analysis of monosaccharide in pumpkin [J]. *Food Sci* (食品科学), 2002, 23(4): 95-96.
- [9] LIANG W Y, FENG W J. Determination of fructose and glucose in invert sugar for injection by HPLC-RID [J]. *Chin J Biochem Pharm* (中国生化药物杂志), 2007, 28(2): 116-117.
- [10] REN H N, CHEN X H, BI K S. Analysis of monosaccharide composition in Radix Glehniace by precolumn derivatization HPLC [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2009, 26(3): 206-209.
- [11] BEN-BASSAT A A, GRUSHKA E. HPLC of mono- and oligosaccharide [J]. *Chromatogr*, 1991, 14(6): 1051.
- [12] YI W Z, LI X E, QIN M J, et al. Simultaneous determination of three oligosaccharides by HPLC-ELSD in the Fresh Root of Rehmannia glutinosa [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2011, 46(13): 1038-1040.
- [13] ROBARDS K, WHITELAW M. Chromatography of monosaccharides and disaccharides [J]. *Chromatogr*, 1986, 373: 81.
- [14] LUO X L. Studies on Quality Analysis of Chinese Medicine Using HPLC-ELSD [D]. Zhejiang: Zhejiang University, 2007.
- [15] LAN J, HU C Q, SONG D Q. Content and impurities comparison of hydroxycamptothecin injection and hydroxycamptothecin for injection [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2003, 38(9): 702-704.
- [16] LI X D, ZHANG Y J. Quality control method of sucrose in vaccine product [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2010, 45(3): 218-220.
- [17] CAO J, XU Y, ZHANG Y H, et al. Fingerprint chromatogram by high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection of Qingkailing injection and its relationship with quality control [J]. *Chin J Anal Chem* (分析化学), 2004, 4(4): 469-473.
- [18] YAN S K, XIN W F, WANG Y M, et al. Application of HPLC/ELSD fingerprint and constellation graphical clustering method applied to evaluate the quality of Qingkailing injection [J]. *Acta Pharm Sin* (药理学学报), 2005, 40(9): 842-845.

(收稿日期: 2012-12-11)

## 临床药学高端论坛之二十六——CIT的治疗进展与合理用药在沈阳举办

由中国药学会医院药专业委员会主办,《中国药理学杂志》社、中国药学会医院药专业委员会肿瘤药药理学组、《实用药物与临床》杂志、辽宁省药学会承办,沈阳三生制药有限责任公司协办的第26届临床药学高端论坛于2013年5月18日在沈阳举办。来自全国各地的一百二十位临床药师赶赴参会。

中国药学会医院药专业委员会副主任委员肇丽梅教授主持了开幕式。中国药学会副理事长吴春福教授,中国药学会陈兵副秘书长,中国药学会医院药专业委员会主任委员朱珠教授分别致辞。

大会报告部分由中山大学附属第一医院药剂科主任陈孝教授和复旦大学附属中山医院药剂科主任吕迁洲教授主持。会议特邀全军肿瘤专业委员会主任委员、长征医院肿瘤科主任王杰军教授就《CIT中国专家共识》作了专题报告,《中国新药与临床杂志》副主编、上海华山医院静安分院临床药学与临床药理科终身名誉主任黄仲义教授就《化疗所致血小板减少症(CIT)治疗现状与合理用药》作了专题报告。

会上,还进行了精彩创新的肿瘤专科临床药师实践能力现场演示与互动环节,由中国人民解放军307医院药剂科主任刘泽源教授、沈阳军区总医院药剂科主任史国兵教授共同主持。

doi: 10.11669/cpj.2013.14.013

[本刊讯]