

## 注射用丹参(冻干)中糖和糖醇类成分的定性定量分析

蒋受军<sup>1</sup>, 朱斌<sup>1</sup>, 王钢力<sup>2</sup>, 王英新<sup>3</sup>, 林瑞超<sup>2\*</sup>

(1. 广西食品药品检验所, 南宁 530021; 2. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050; 3. 哈药集团中药二厂, 哈尔滨 150078)

**摘要** 目的: 研究建立注射用丹参(冻干)中糖和糖醇成分定性、定量分析的方法。方法: 以 1-甲基咪唑作溶剂和催化剂, 盐酸羟胺和乙酸酐为脎化和乙酰化试剂, 将注射用丹参(冻干)样品中的糖类成分乙酰化后, 再利用 GC-MS 联用技术进行定性和定量分析。结果: 对注射用丹参(冻干)中所含 8 个糖和糖醇成分进行了结构确证, 并对其中 6 个成分的含量进行了测定, 6 个成分的线性关系良好( $r \geq 0.9995$ ), 平均回收率在 95.77% ~ 104.4% 之间。结论: 本法操作简便、灵敏、准确, 可用于注射用丹参(冻干)中糖和糖醇成分的质量控制。

**关键词:** 气相色谱; 质谱; 糖; 糖醇; 定性; 定量; 分析; 注射剂; 丹参

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)07-1313-04

## Analysis of sugars and sugar alcohols in freeze-dried Dan-Shen injection

JIANG Shou-jun<sup>1</sup>, ZHU Bin<sup>1</sup>, LIU Li-na<sup>2</sup>, WANG Gang-Li<sup>2</sup>,  
WANG Ying-Xin<sup>3</sup>, LIN Rui-Chao<sup>2\*</sup>

(1. Guangxi Institute for Food and Drug Control, Nanning 530021, China;

2. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China;

3. Harbin Pharm Group Co. LTD Second Chinese Medicine Factory, Harbin 150078, China)

**Abstract Objective:** To establish a method for the determination of sugars and sugar alcohols in freeze-dried Dan-Shen injection. **Methods:** 1-Methylimidazole was used as solvent and catalyst, hydroxylamine hydrochloride and acetic anhydride were used as reagent for oximization and acetylation. The products of the derivation reaction were separated effectively by gas chromatography with a capillary column, and structurally identified and characterized by GC-MS. **Results:** The structures of 8 sugars and sugar alcohols were identified and characterized by GC-MS in freeze-dried Dan-Shen injection, the content of six of them were determined. The calibration curve showed a good linear ( $r \geq 0.9995$ ). The average recoveries were within 95.77% - 104.4%. **Conclusion:** The method is simple, accurate, reliable and applicable for the determination of sugars and sugar alcohols in freeze-dried Dan-Shen injection.

**Key words:** GC; MS; sugars; sugar alcohols; qualitative; quantitative analysis; injection; Radix Salviae Miltiorrhizae

糖和糖醇类成分广泛存在于自然界各种生物中,也是植物细胞中非常重要的一类小分子化合物,它们参与植物体内的三羧酸、糖酵解等基础代谢过程,具有提供能量、清除多余自由基和调节植物细胞渗透压从而提高植物抗逆性等生理功能<sup>[1]</sup>。目前,用于分析测定糖和糖醇常用的方法主要有气相色谱(GC)、高效液相色谱(HPLC)和高效毛细管电泳(HPCE)等<sup>[2~6]</sup>。气相色谱法测定糖和糖醇类成分具有速度快、分离效果好以及灵敏度高优点,与质

谱检测器(MS)联用,可以实现糖和糖醇类成分的结构确定和定量分析,其应用较为广泛。

由于糖类成分没有挥发性,对热也不稳定,在气相色谱分析之前,需将糖和糖醇制备成易挥发且热稳定的衍生物。现常用的衍生化方法有三甲基硅烷化(TMS)、甲基化和乙酰化,其中乙酰化衍生法由于生成的衍生物相对分子质量适中能有效分离、衍生化反应时间适中、对无水条件要求不高而更可行<sup>[5,7,8]</sup>。

\* 通讯作者 Tel: (010) 67095307; E-mail: linrch@nicbp.org.cn

注射用丹参(冻干)是哈药集团中药二厂独家生产的中药保护品种,系由单味药材—丹参经适宜加工制成的冻干粉针。具活血通脉之功效。主要用于胸痹血瘀证症见胸部刺痛、绞痛,痛有定处,或有心悸,冠心病、心绞痛见上述症候者,临床疗效显著。初步的成分预试结果表明,注射用丹参(冻干)样品含有糖类成分。经进一步 HPLC 分析,表明注射用丹参(冻干)样品中仅含三糖以下的寡糖。由于其工艺为水提醇沉,成品水溶性较好,且在冻干时没有添加任何助溶剂和骨架剂,可能与所含糖类成分与注射用丹参(冻干)中酚酸类等成分产生缔合作用起到增加样品溶解性有关。因此,对注射用丹参(冻干)中所含糖类成分进行定性和定量分析,了解所含糖类成分具体的种类和含量,对控制注射用丹参(冻干)质量、保证产品的均一性具有重要的意义。

本文以 1-甲基咪唑作溶剂和催化剂,盐酸羟胺和乙酸酐为胍化和乙酰化试剂,将注射用丹参(冻干)样品中的糖类成分乙酰化后,再利用 GC-MS 联用技术进行分析,首次建立了对注射用丹参(冻干)样品中糖类成分的定性、定量分析方法,对注射用丹参(冻干)中所含 8 个糖和糖醇成分进行了结构确证,并对其中 6 个成分的含量进行了测定。方法操作简便、灵敏、准确,可用于注射用丹参(冻干)中糖和糖醇成分的质量控制。

## 1 仪器和试剂

**1.1 仪器** Agilent 6890N-5975C 气相色谱-质谱联用仪,配 7683B 自动进样器;AE 240 型电子分析天平(瑞士 METTLER 公司);LABCONCO 减压离心蒸发浓缩仪;Milli-Q 超纯水处理系统。

**1.2 试剂和药品** L-阿拉伯糖对照品(供鉴别用,批号 1506-200202)、D-无水葡萄糖对照品(供含量测定用,批号 0833-9501)、D-果糖对照品(供含量测定用,批号 1504-200001)、蔗糖对照品(供含量测定用,批号 1507-200001)购自中国药品生物制品检定所;赤藓醇(含量 99%)、肌醇(含量 99%)、甘露醇(含量 99%)、D-半乳糖(含量 99%)购自 ACROS ORGANICS 公司;注射用丹参(冻干)样品由哈药集团中药二厂提供;1-甲基咪唑(优级纯, Sigma 公司);盐酸羟胺、乙酸酐和无水硫酸钠均为分析纯,水为高纯水。

## 2 仪器条件

**2.1 气相色谱条件** 色谱柱: Agilent HP-5 MS 玻璃毛细管色谱柱(30 m × 0.25 mm,膜厚 0.25 μm);柱温: 130 °C 保持 5 min,以 4 °C · min<sup>-1</sup> 的速

度升温至 250 °C,保持 5 min,再以 10 °C · min<sup>-1</sup> 的速度升温至 280 °C,保持 11 min;辅助器温度: 280 °C;进样口温度: 300 °C;进样量: 1 μL(不分流进样,分流口吹扫流量: 20 mL · min<sup>-1</sup>, 0.3 min 开始);氮气流速: 1.5 mL · min<sup>-1</sup>(模式: 恒流)。

**2.2 质谱条件** 离子源温度: 230 °C;MS 四极杆温度: 150 °C;EM 电压: 1 kV。

## 3 溶液的配制

**3.1 对照品溶液** 精密称取上述糖及糖醇对照品各 5.0 mg,精密加入盐酸羟胺 1-甲基咪唑溶液(100 mg · mL<sup>-1</sup>) 1 mL,超声使溶解,置 80 °C 水浴中加热 5 min,取出,冷却,精密加入乙酸酐 1 mL,摇匀,置 30 °C 水浴中加热 5 min,取出,冷却,精密加入氯仿 5 mL,摇匀,加水洗涤 3 次,每次 5 mL,分取氯仿液,加适量无水硫酸钠除尽水分,氯仿液作为对照品溶液。

**3.2 供试品溶液** 精密称取 20.0 mg 注射用丹参(冻干)样品,置具塞玻璃离心管中,加盐酸羟胺 1-甲基咪唑溶液(100 mg · mL<sup>-1</sup>) 1 mL,超声使溶解,置 80 °C 水浴中加热 5 min,取出,加乙酸酐 1 mL,室温放置 5 min,精密加入氯仿 5 mL,加水洗涤 3 次,每次 5 mL,分取氯仿液,加适量无水硫酸钠除尽水分,氯仿液作为供试品溶液。

## 4 定性分析

**4.1 糖成分的初步推测** 分别精密吸取上述对照品溶液、供试品溶液各 1 μL,注入气相色谱-质谱仪,记录总离子流图,通过样品乙酰化衍生物的色谱峰和各糖及糖醇对照品乙酰化衍生物的色谱峰的保留时间初步推断可能存在的糖及糖醇的种类。结果注射用丹参(冻干)样品乙酰化衍生物的总离子流图中有与赤藓醇、阿拉伯糖、D-无水葡萄糖、D-半乳糖、肌醇、甘露醇、D-果糖、蔗糖对照品乙酰化衍生物的保留时间相一致的峰,初步推测注射用丹参(冻干)样品中可能存在以上糖和糖醇类成分。结果见图 1。

**4.2 糖成分的结构确证** 经对 8 个糖及糖醇对照品乙酰化衍生物的色谱峰分别提取质谱图,并与注射用丹参(冻干)样品乙酰化衍生物总离子流图中与对照品乙酰化衍生物保留时间对应的色谱峰提取的质谱图进行比较。结果表明,从注射用丹参(冻干)样品乙酰化衍生物总离子流图中相关峰提取的质谱图与 8 个糖及糖醇对照品乙酰化衍生物色谱峰提取的质谱图基本一致,进一步确证注射用丹参(冻干)样品中含有赤藓醇、阿拉伯糖、葡萄糖、半乳糖、肌醇、甘露醇、果糖、蔗糖 8 个糖及糖醇成分。注射用丹参(冻干)样品和对照品乙酰化衍生物的质

谱图见图 2( 仅以赤藓糖为例说明)。

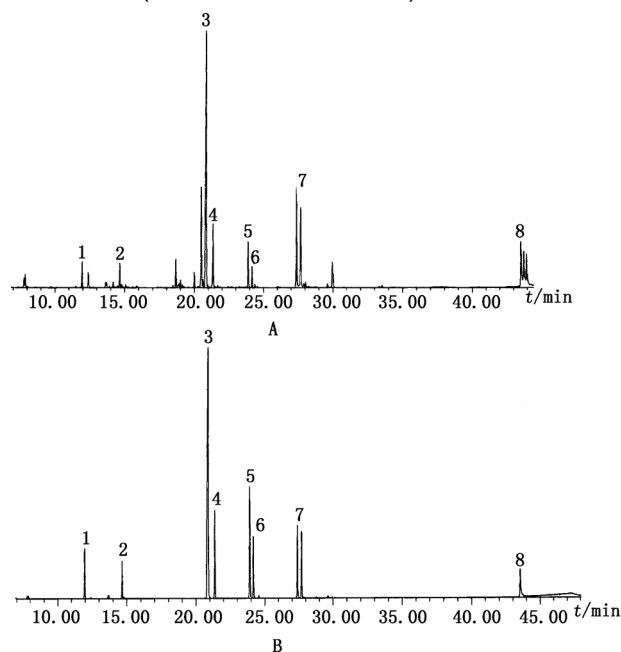


图 1 样品( A) 和混合对照品( B) GC-MS 总离子流图

Fig 1 TIC chromatograms of sample( A) and reference substances( B)

1. 赤藓醇( erythritol) 2. 阿拉伯糖( arabinose) 3. 葡萄糖( glu-  
cose) 4. 半乳糖( galactose) 5. 肌醇( inositol) 6. 甘露醇( manni-  
tol) 7. 果糖( fructose) 8. 蔗糖( sucrose)

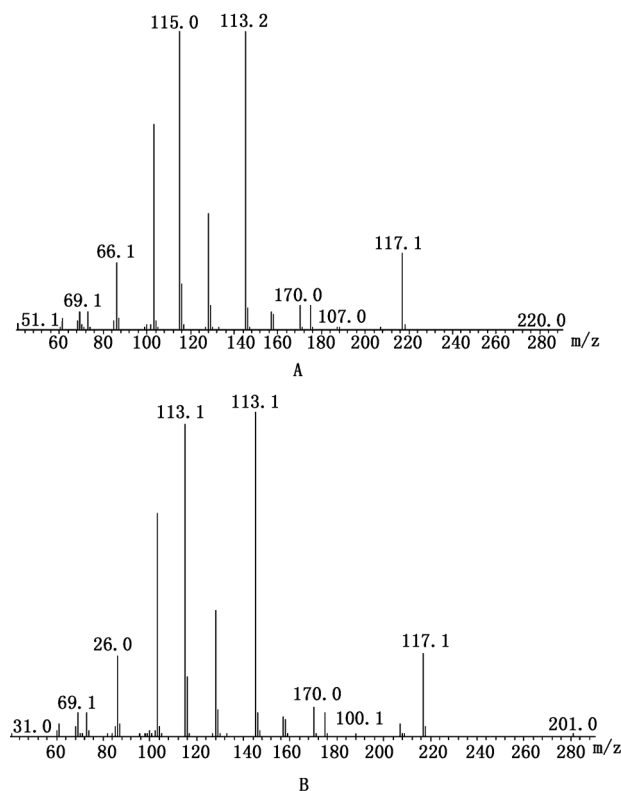


图 2 样品和赤藓糖对照品乙酰化衍生物色谱峰提取的 MS 图

Fig 2 MS of the acetylated derivative of the sample and erythritol refer-  
ence substance

A. 赤藓糖乙酰化衍生物( acetylated derivative of erythritol) B. 样品  
中赤藓糖乙酰化衍生物( acetylated derivative of erythritol in sample)

## 5 定量分析

### 5.1 溶液的制备

**5.1.1 对照品储备液** 精密称取赤藓醇对照品 7.26 mg、L-阿拉伯糖对照品 9.53 mg、D-无水葡萄糖对照品 87.49 mg、D-半乳糖对照品 20.86 mg、肌醇对照品 11.85 mg、甘露醇对照品 6.34 mg 置 10 mL 量瓶中,加水适量使溶解并稀释至刻度,摇匀,作为对照品储备液。

**5.1.2 对照品溶液** 精密吸取上述对照品储备液 1.0 mL,置具塞玻璃离心管中,在减压离心蒸发浓缩仪中干燥至干,精密加入盐酸羟胺-1-甲基咪唑溶液 ( $100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 1 mL,超声使溶解,置  $80^\circ\text{C}$  水浴中加热 5 min,取出,冷却,精密加入乙酸酐 1 mL,摇匀,置  $30^\circ\text{C}$  水浴中加热 5 min,取出,冷却,精密加入氯仿 5 mL,摇匀,加水洗涤 3 次,每次 5 mL,分取氯仿液,加适量无水硫酸钠除尽水分,氯仿液作为对照品溶液。

**5.1.3 供试品溶液** 同“3.2”项下。

**5.2 线性关系的考察** 精密吸取“5.1.2”项下对照品溶液,加氯仿稀释成 1~5 号系列浓度的溶液,分别精密吸取  $1 \mu\text{L}$ ,按上述色谱条件进行 GC-MS 分析,以各对照品的浓度 ( $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,并计算赤藓醇、阿拉伯糖、葡萄糖、半乳糖、肌醇、甘露醇的回归方程分别为:

$$Y = 5.217 \times 10^5 X - 1.636 \times 10^6 \quad r = 0.9997$$

$$Y = 3.062 \times 10^5 X - 1.528 \times 10^6 \quad r = 0.9995$$

$$Y = 3.722 \times 10^5 X - 8.381 \times 10^6 \quad r = 0.9999$$

$$Y = 3.593 \times 10^5 X - 2.690 \times 10^6 \quad r = 0.9998$$

$$Y = 8.329 \times 10^5 X - 3.003 \times 10^6 \quad r = 0.99995$$

$$Y = 7.940 \times 10^5 X - 2.546 \times 10^6 \quad r = 0.9998$$

线性范围分别为  $5.8 \sim 145.2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $7.6 \sim 190.6 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $70.0 \sim 1749.8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $16.7 \sim 417.20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $9.5 \sim 237.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,  $5.1 \sim 126.8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

**5.3 精密度试验** 取“5.2”项下 3 号对照品溶液,按上述色谱条件连续进样 5 次,记录峰面积,分别计算 RSD,结果赤藓醇、阿拉伯糖、葡萄糖、半乳糖、肌醇、甘露醇的 RSD 分别为 1.7%, 2.2%, 2.0%, 2.2%, 1.9%, 2.0%。

**5.4 重复性试验** 取同一批号(050302)样品 5 份,按“3.2”项下方法制备溶液,在上述色谱条件进行分析测定,分别计算各测定成分含量的 RSD。结果赤藓醇、阿拉伯糖、葡萄糖、半乳糖、肌醇、甘露醇

的 RSD 分别为 2.9%、2.2%、1.8%、2.7%、2.0%、2.7%，表明重复性较好。

**5.5 稳定性试验** 取同一份室温下放置的供试品溶液，按上述色谱条件在 0、2、4、8、12、24 h 分别进样测定，分别记录峰面积，计算 RSD。结果赤藓醇、阿拉伯糖、葡萄糖、半乳糖、肌醇、甘露醇峰面积的 RSD 分别为 2.0%、2.5%、2.4%、2.0%、2.6%、2.9%。表明供试品溶液室温放置 12h 内稳定性良好。

**5.6 加样回收率试验** 精密吸取上述对照品储备液 1.0 mL，置 10 mL 量瓶中，加水稀释至刻度，摇匀，精密吸取 1.0 mL，具塞玻璃离心管中，共取 6 份，置减压离心蒸发浓缩系统中，干燥，精密加入已知含量的注射用丹参(冻干)样品(050302) 10 mg，按“3.2”项下方法操作，进样 1  $\mu$ L，在上述色谱条件进行分析测定，计算回收率，结果( $n=6$ )：赤藓醇的平均回收率为 102.7%，RSD = 2.8%；阿拉伯糖的平均回收率为 104.4%，RSD = 1.8%；葡萄糖的平均回收率为 95.8%，RSD = 1.8%；半乳糖的平均回收率为 97.2%，RSD = 0.88%；肌醇的平均回收率为 101.4%，RSD = 2.8%；甘露醇的平均回收率为 104.1%，RSD = 2.9%。

**5.7 样品测定** 取 3 批注射用丹参(冻干)样品，按“3.2”项下的方法操作，在上述色谱条件下进样 1  $\mu$ L，测定注射用丹参(冻干)样品中葡萄糖等 6 个糖及糖醇类成分的含量，结果见表 1。

表 1 样品测定结果( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )

Tab 1 The determination result of contents of samples

| 批号<br>(Lot No.) | 赤藓醇<br>(erythritol) | 阿拉伯糖<br>(arabinose) | 葡萄糖<br>(glucose) | 半乳糖<br>(galactose) | 肌醇<br>(inositol) | 甘露醇<br>(mannitol) |
|-----------------|---------------------|---------------------|------------------|--------------------|------------------|-------------------|
| 050203          | 5.33                | 7.47                | 73.06            | 18.49              | 4.00             | 3.70              |
| 060405          | 2.00                | 2.59                | 29.22            | 7.88               | 3.81             | 2.36              |
| 071127          | 5.41                | 5.64                | 57.24            | 19.01              | 3.88             | 5.04              |

## 6 讨论

**6.1** 所拟定的 GC-MS 方法，操作简单，衍生化反应迅速，对各糖及糖醇类物质分离效果理想，是一种简便、快速、灵敏地对注射用丹参(冻干)样品中糖及糖醇类物质进行定性、定量分析的方法。

**6.2** 在进行方法学考察时发现果糖和蔗糖的线性较差，回收率偏低，故暂未对其含量进行测定。

**6.3** 从 3 批注射用丹参(冻干)样品中糖及糖醇定性、定量分析结果看，注射用丹参(冻干)样品中均含有赤藓醇、阿拉伯糖、葡萄糖等 8 个糖及糖醇成分，且含量较高。由于葡聚糖、半乳糖、甘露醇等在冻干成型工艺中常用作助溶剂和膨松骨架剂，本文

的分析结果为解释注射用丹参(冻干)工艺的可行性提供了一定的科学依据，但糖及糖醇成分的药理活性和助溶机制有待进一步研究。

**6.4** 实验结果显示，参与反应的各糖与糖醇之间存在正向促进作用，组分越多越利于衍生化反应的进行，但参与反应的糖与糖醇用量不宜超过理论上与肟化及乙酰化试剂完全反应所需量的 1/2，否则衍生化反应会受到抑制，衍生化效率降低。

**6.5** 为了保持试验的连续性，我们仅采用 GC-MS 对注射用丹参(冻干)中的糖及糖醇类成分进行了定性、定量的研究，如考虑实用性和降低检验成本，在利用 GC-MS 进行定性分析后，可以采用 GC-FID 对注射用丹参(冻干)样品中糖及糖醇类成分进行指纹图谱的分析，同样可达到控制产品质量和均一性的目的。

## 参考文献

- Loescher WH. Physiology and metabolism of sugar alcohols in higher plants. *Physiol Plantarum*, 1987, 70: 553
- FANG Ji-nian (方积年), WEI Yuan-an (魏远安). Application of high performance liquid chromatography to the analysis of carbohydrates (高效液相色谱法在糖类研究中的应用). *Chin J Chromatogr*, 1991, 9(2): 103
- XU Xiu-zhu (徐秀珠), XU Gen-liang (徐根良). Analysis of sugars and sugar alcohols by high performance liquid chromatography (糖和糖醇的高效液相色谱分析). *Chin J Anal Chem (分析化学)*, 1999, 27(5): 547
- JIA Guo-hui (贾国惠). Analysis of carbohydrate by high performance capillary electrophoresis (糖类的高效毛细管电泳分析). *Chin Hosp Pharm J (中国医院药学杂志)*, 2003, 23(8): 492
- HU Lei (胡磊), GUO Bei (郭蓓), LU Hai (陆海), et al. Gas chromatographic analysis of sugar and sugar alcohol derivatives through 1-methylimidazole catalyzed acetylation (植物组织中糖与糖醇乙酰化及毛细管气相色谱分析). *Chin Bull Bot (植物学通报)*, 2004, 21(6): 689
- JIANG Xiao-man (姜晓满), TIAN Wei (田卫), ZHANG Hai-xia (张海霞), et al. Determination of sugars by chromatography methods (糖类物质的色谱分析). *Chin J Pharm Anal (药物分析杂志)*, 2006, 26(8): 1181
- LI Tie-lin (李铁林), WU Chang-xian (吴昌贤), ZHANG Yan-xia (张燕霞). Gas chromatographic analysis of sugar and sugar alcohol (糖和糖醇的气相色谱分析). *Chin J Anal Chem (分析化学)*, 1981, 9(3): 295
- Chen CC, McGinnis GD. The use of 1-methylimidazole as a solvent and catalyst for the preparation of aldonitrile acetates of aldoses. *Carbohydr Res*, 1981, 90: 127

(本文于 2011 年 6 月 4 日修改回)