

HPLC-ELSD法测定复方氨基葡萄糖片中硫酸软骨素的含量

林燕飞¹, 孙静芸² (1. 杭州创新中药标准化研究所有限公司, 杭州 310053; 2. 浙江省中医药研究院, 杭州 310007)

摘要:目的 建立以蒸发光散射为检测器(ELSD)测定复方氨基葡萄糖片中硫酸软骨素的高效液相色谱分析方法。方法 采用高效液相色谱法,以乙腈-水-三乙胺溶液(10:90:0.1)为流动相,ODS色谱柱为色谱柱,蒸发光散射检测器检测。结果 硫酸软骨素在1.5~21 μ g范围与峰面积呈良好线性关系;该方法3个不同浓度的平均回收率分别为99.33%,98.29%,98.95%,重复性实验的RSD为0.15%。结论 本方法准确、快速、重复性好。

关键词:硫酸软骨素;含量测定;高效液相色谱;蒸发光散射检测器

中图分类号:R917.791.1 文献标识码:B 文章编号:1007-7693(2006)05-0388-03

Determination of chondroitin sulfate sodium salt in compound glucosam in table by HPLC-ELSD

LIN Yan-fei¹, SUN Jing-yun² (1. Hangzhou Innovation TCM Standardization Research Institute Co., Ltd, Hangzhou 310053, China;

作者简介:林燕飞(1979~),女,浙江金华人,助理工程师,本科,2001年毕业于浙江大学,研究方向:中药质量标准和新产品开发。电话:0571-86674880。

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method by high performance liquid chromatography/evaporative light scattering detector (HPLC-ELSD) for the determination of chondroitin sulfate sodium salt. **METHODS** An Agilent C_{18} column (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m) was used. The mobile phase was acetonitrile-water-triethylamine (10:90:0.1) at a flow rate of 0.6 mL/min and the detector was evaporative light scattering detector. **RESULTS** The standard curves were linear within the range of 1.5 ~ 21 μ g for chondroitin sulfate sodium salt. The three different concentration sample's average recovery were 99.33%, 98.29%, 98.95% for chondroitin sulfate sodium salt. The relative standard deviations (RSD) within-days were 0.15%. **CONCLUSION** This method is precise, reproducibility, and reliable. It is suitable for determination of chondroitin sulfate sodium salt.

KEY WORDS: chondroitin sulfate sodium salt; determination; HPLC; ELSD

复方氨基葡萄糖片由盐酸氨基葡萄糖和硫酸软骨素组成。其中硫酸软骨素属于胺聚糖类物质,可防止抗依赖性细胞介导的细胞毒作用(ADCC)对组织的损伤,有利于组织修复;盐酸氨基葡萄糖是氨基单糖,天然存在于人体的关节软骨中,近年来,国外已成功地将这两种物质引入到骨关节炎的治疗中。有关硫酸软骨素的检测方法文献报道有 Emson-Morgan 比色法^[1]、吡唑比色法^[2]、间苯三酚分光光度法^[3]、离子对色谱法^[4-6]等,这些方法存在着或操作繁琐,或硫酸软骨素出峰拖尾严重,盐酸氨基葡萄糖和硫酸软骨素色谱峰重叠,末端吸收不稳定等问题,影响复方氨基葡萄糖片中硫酸软骨素的含量测定。笔者采用 HPLC-ELSD 法建立了复方氨基葡萄糖片中硫酸软骨素的含量的测定方法,分离度可达 2.0。

1 仪器与试剂

Agilent-1100 高效液相色谱仪; SEDEX75 蒸发光散射检测器; Agilent Chem Station 色谱工作站; 超声波清洗器 KQ-5200B(昆山市超声波仪器有限公司); 硫酸软骨素对照品(美国 Sigma Chemical 公司提供,批号: 084K1170); 乙腈(色谱纯); 三乙胺(色谱纯); 重蒸水; 复方氨基葡萄糖片由浙江亚克药业有限公司提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱: Extend- C_{18} 柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μ m); 流动相: 乙腈-水-三乙胺水溶液 (10:90:0.1); 流速: 0.6 mL/min; 柱温: 30 $^{\circ}$ C; 进样量: 5 μ L; ELSD 漂移管温度: 40 $^{\circ}$ C, 雾化气压 3.5 bar, 理论板数按硫酸软骨素计算不得低于 3000, 与氨基葡萄糖的分离度应符合要求。

2.2 对照品溶液制备

精密称取干燥至恒重的硫酸软骨素对照品适量,加乙腈 1 mL 分散,再加水超声使溶解并定容至 10 mL,摇匀,制成 6.060 mg/mL,作为对照品浓溶液。精密吸取硫酸软骨素对照品浓溶液适量,加水稀释成 0.303, 0.606, 1.212, 1.818, 3.03, 4.242 mg/mL 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取本品 20 片,用研钵研碎,精密称取粉末适量,置 25 mL 量瓶中,加乙腈 2.5 mL 分散,再加水超声使溶解并定容,摇匀,制成含硫酸软骨素约 1.0 mg/mL 的溶液,经 0.45 μ m 微

孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.4 阴性对照溶液的制备

按成药处方制成不含硫酸软骨素的阴性样品,按照“2.3”项下供试品溶液的制备方法,配制阴性对照品溶液,精密吸取阴性对照溶液 5 μ L,进高效液相色谱仪,记录色谱图,结果在与硫酸软骨素出峰时间一致的位置未发现干扰峰。

2.5 标准曲线的绘制

分别精密吸取不同浓度的对照品溶液 5 μ L,注入高效液相色谱仪。以进样量 (μ g) 对数值为纵坐标 (Y),峰面积对数值为横坐标 (X),绘制标准曲线。所得回归方程为: $\lg Y = 0.7608 \times \lg(X) - 3.6049$, $r = 0.9990$ 。结果硫酸软骨素在 1.5 ~ 21 μ g 范围内呈线性关系。

2.6 精密度试验

精密吸取 1.212 mg/mL 的对照品溶液 5 μ L,连续进样 6 次,测定峰面积,取对数值进行统计,结果 RSD 为 0.15%。

2.7 重复性试验

按 2.3 项下供试品溶液制备法平行配制同批样品 (批号: 050112) 6 份,分别进样 5 μ L,分别进样测试,计算硫酸软骨素的含量, RSD 为 0.6%。

2.8 稳定性试验

取供试品以 0, 1, 2, 3, 5, 6 h 分别进样,测定峰面积, RSD 为 1.82%, 则样品在 6 h 内稳定。

2.9 回收率试验

采用加样回收法。精密称取已知硫酸软骨素含量的样品 (批号: 050112) 9 份,其中 3 份相当于硫酸软骨素 10 mg,分别精密加入 12.516 mg 硫酸软骨素对照品; 3 份相当于硫酸软骨素 10 mg,分别精密加入 10.668 mg 硫酸软骨素对照品; 3 份相当于硫酸软骨素 15 mg,分别精密加入 12.516 mg 硫酸软骨素对照品。按供试品制备法制备,滤过,进样 5 μ L,按上述色谱条件测定,结果平均回收率分别为 99.33%, 98.29%, 98.95%, RSD 分别为 0.12%, 0.18%, 0.39%。

2.10 样品含量测定

将复方氨基葡萄糖片样品按供试品溶液制备方法制备,进样 5 μ L,按标准曲线方程计算结果见表 1。

3 讨论

3.1 通过选择和优化色谱流动相,以乙腈-水-三乙胺溶液 (10:90:0.1) 为流动相,以蒸发光散射检测器为检测器,建立

表 1 复方氨基葡萄糖片样品测定结果 ($n=3$)

Tab 1 Contents of compound glucosam in table($n=3$)

批号	050112	050113	050114
含量 (%)	34.91	35.40	35.26
RSD (%)	1.1	0.8	0.6

了复方氨基葡萄糖片中硫酸软骨素的 HPLC-ELSD测定法, 本法能避免盐酸氨基葡萄糖对硫酸软骨素测定的干扰, 有着良好的精密度、重复性和回收率。

3.2 硫酸软骨素直接用水溶极易结块, 故采用流动相的配比, 先以乙腈分散, 再加水超声使溶解。

3.3 三乙胺用量对分离的影响: 当流动相中不加三乙胺或加酸调节的时候, 硫酸软骨素峰形严重拖尾, 甚至出现分叉, 加少量三乙胺可以促进硫酸软骨素电离平衡, 改善峰形, 在 0.1% 的三乙胺浓度下, 峰形良好, pH 在柱子的耐受范围内。

参考文献

- [1] 董明, 曾正宏, 陈桂阳. 比色法测定复方硫酸软骨素片中硫酸软骨素含量. 中国生化药物杂志, 2002, 23(4): 191.
- [2] 张松林, 徐卫龙. 两种硫酸软骨素含量测定方法的比较. 中国生化药物杂志, 2002, 23(1): 38.
- [3] 刘坤, 高华, 于兹东. 硫酸软骨素快速测定方法的研究. 青岛大学学报, 2003, 16(2): 39.
- [4] 秦振顺, 常凤启, 韩会新. 硫酸软骨素的方法测定. 中国卫生检验杂志, 2002, 12(3): 306.
- [5] 牛增元, 张小吐, 刘钢. 反相离子对高效液相色谱法测定硫酸软骨素. 化学分析计量, 2000, 11(4): 7.
- [6] 石瑞平, 周庆英. HPLC法测定硫酸软骨素的含量. 山东医药工业, 2002, 21(2): 15.

收稿日期: 2005-04-26