

D-氨基葡萄糖硫酸钾盐含量测定方法探讨

曾茂法^{1,2}, 李俊², 王英瑛², 王黎² (1. 浙江工业大学药学院, 杭州 310032; 2. 台州市药品检验所, 浙江 台州 318000)

摘要:目的 对 D-氨基葡萄糖硫酸钾盐的含量测定方法的适用性进行验证。方法 采用 Zorbax C₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 流动相为乙腈-0.05%磷酸 (pH = 3.0) (40:60), 流速 0.6 mL·min⁻¹, 检测波长 195 nm。结果 D-氨基葡萄糖盐酸盐对照品和 D-氨基葡萄糖硫酸钾盐样品图谱中的主峰可能不是 D-氨基葡萄糖峰, 而是 Cl⁻ 峰; 在药典规定的色谱条件下, D-氨基葡萄糖硫酸钾盐中的 SO₄²⁻ 峰与主峰 Cl⁻ 峰重叠, 干扰主峰的测定。结论 需进一步改进和完善 D-氨基葡萄糖硫酸钾盐的含量测定方法。

关键词: D-氨基葡萄糖硫酸钾盐; 含量测定方法; Cl⁻; SO₄²⁻

中图分类号: R921.3/.7 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2008)03-0251-04

Discussion on Assay Method of D-Glucosamine Sulfate Potassium Chloride

ZENG Mao-fa^{1,2}, LI Jun², WANG Ying-ying², WANG Li² (1. College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310032, China; 2. Taizhou Institute for Drug Control, Taizhou 318000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To validate the validity of assay method of D-Glucosamine Sulfate Potassium Chloride. **METHODS**

作者简介: 曾茂法, 男, 硕士研究生, 副主任药师

Tel: (0576) 8552758

E-mail: zenmaofa@sina.com

The determination was performed on a Zorbax C8 column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) with acetonitrile-0.05% Phosphate buffer (pH = 3.0) (40:60) as the mobile phase, the flow was 0.6 mL · min⁻¹, wavelength of detection was 195 nm. **RESULTS** Main peaks in chromatogram of *D*-Glucosamine Hydrochloride RS and *D*-Glucosamine Sulfate Potassium Chloride may be not glucosamine peak but Cl⁻ peak. On the chromatography conditions in USP, SO₄²⁻ peak of *D*-Glucosamine Sulfate Potassium Chloride overlays with main peak of Cl⁻, and interfere the determination of main peak. **CONCLUSION** It is necessary to revalidate the method of analytical *D*-Glucosamine Sulfate Potassium Chloride.

KEY WORDS: *D*-glucosamine sulfate potassium chloride; assay method; Cl⁻; SO₄²⁻

USP29版中收载的 *D*-氨基葡萄糖硫酸钾盐^[1],其结构式为 (C₆H₁₄NO₅)₂SO₄ · 2KCl,含量测定方法采用反相高效液相色谱法,检测波长 195 nm,用 *D*-氨基葡萄糖盐酸盐为对照品。其标准中有“按氨基葡萄糖峰面积计算”的叙述。但我们在实验中意外发现,色谱图中的主峰是 Cl⁻峰, *D*-氨基葡萄糖没有吸收,而且样品中的 SO₄²⁻在标准色谱条件下与 Cl⁻峰重叠,干扰样品的测定。现报道如下。

1 仪器与试药

Waters 2695液相色谱仪,2996二极管阵列检测器。

D-氨基葡萄糖盐酸盐对照品为 USP标准品, *D*-氨基葡萄糖硫酸钾盐原料药由某生物化学有限公司提供,批号为 20050603,氯化钾、氯化钠、硫酸钾、硫酸钠均为分析纯试剂。

2 方法与结果

2.1 溶液配制

D-氨基葡萄糖盐酸盐对照品溶液:取 *D*-氨基葡萄糖盐酸盐对照品 10 mg,精密称定,置 10 mL量瓶中,加水振摇溶解,并稀释至刻度,浓度约为 1 mg · mL⁻¹。

D-氨基葡萄糖硫酸钾盐样品溶液:取 *D*-氨基葡萄糖硫酸钾盐样品 125 mg,精密称定,置 100 mL量瓶中,加水振摇溶解,并稀释至刻度,浓度约为 1.25 mg · mL⁻¹。

样品高温降解溶液:取 *D*-氨基葡萄糖硫酸钾盐样品 125 mg,精密称定,置坩埚中,在电炉上加热灼烧至完全炭化,待

样品冷却后,加水溶解并转移到 100 mL量瓶中,定容,摇匀,用滤纸过滤后得到的续滤液即为样品高温降解溶液。

氯化钾、氯化钠、硫酸钾和硫酸钠溶液:取氯化钾、氯化钠、硫酸钾和硫酸钠固体各 100 mg,精密称定,分别置 100 mL量瓶中,加水振摇溶解,并稀释至刻度,得到各溶液的浓度均约为 1 mg · mL⁻¹。

2.2 色谱条件

色谱柱:Zorbax C₈柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),PDA检测器,检测波长 195 nm,柱温 30 ℃,流动相为乙腈-0.05%磷酸(pH = 3.0) (40:60),流速 0.6 mL · min⁻¹。

2.3 SO₄²⁻峰与主峰的重叠的验证

按照 USP标准中的色谱条件和方法,取 *D*-氨基葡萄糖硫酸钾盐样品溶液 10 μL进样,得到色谱图见图 1A,色谱图中的主峰经峰纯度检查不纯,含有杂峰。将流动相比例改为流动相 II [乙腈-0.05%磷酸(pH = 5.0) (3:97)]后,样品溶液中分离出一个小杂峰,见图 1B。在此色谱条件下再分别取 *D*-氨基葡萄糖盐酸盐对照品溶液、硫酸钾溶液和硫酸钠溶液各 10 μL进样,得色谱图见图 1。对照品图谱中没有出现峰 2,而硫酸钾溶液、硫酸钠溶液图谱中的峰与图 1B中的峰 2 保留时间一致。各样品中 SO₄²⁻浓度与峰面积见表 1。从表 1 可见, *D*-氨基葡萄糖硫酸钾盐溶液、硫酸钾溶液、硫酸钠溶液的色谱图,即图 1B、1D及 1E三者峰 2 的各自面积与

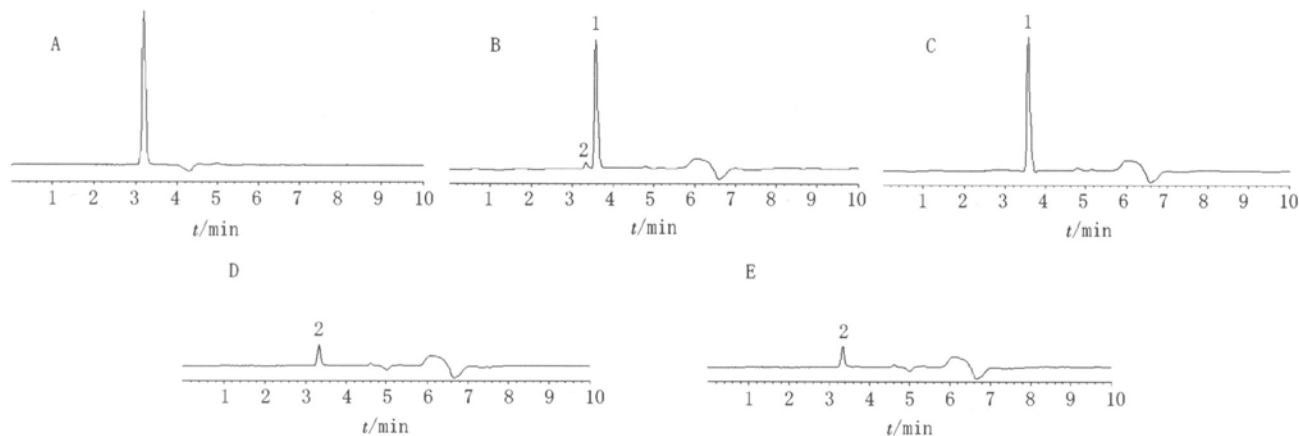


图 1 SO₄²⁻峰的验证色谱图

流动相 I [乙腈-0.05%磷酸(pH = 3.0) (40:60)]: A - *D*-氨基葡萄糖硫酸钾盐;流动相 II [乙腈-0.05%磷酸(pH = 5.0) (3:97)]: B - *D*-氨基葡萄糖硫酸钾盐; C - *D*-氨基葡萄糖盐酸盐对照品; D - 硫酸钾; E - 硫酸钠

Fig 1 The Chromatogram of validation of SO₄²⁻ peak

Mobile phase I [acetonitrile-0.05% Phosphate buffer (pH = 3.0) (40:60)]: A - *D*-Glucosamine Sulfate Potassium Chloride; Mobile phase II [acetonitrile-0.05% Phosphate buffer (pH = 5.0) (3:97)]: B - *D*-Glucosamine Sulfate Potassium Chloride; C - Glucosamine Hydrochloride RS; D - Potassium Sulfate; E - Sodium Sulfate

SO₄²⁻ 浓度的比值一致,证明 D-氨基葡萄糖硫酸钾盐图谱中的峰 2 为 SO₄²⁻ 峰,在 USP 规定的色谱条件下与主峰重叠。

2.4 图中的主峰为 Cl⁻ 的验证

按色谱条件(流动相 II),分别取 D-氨基葡萄糖盐酸盐对照品溶液、D-氨基葡萄糖硫酸钾盐样品溶液、氯化钾溶液、氯化钠溶液和样品高温降解溶液各 10μL 进样色谱图见图 2。图 2D 和 2E 中氯化钾溶液和氯化钠溶液图谱中所出现的峰的保留时间与图 2A 和 2B 中 D-氨基葡萄糖盐酸盐对照品和 D-氨基葡萄糖硫酸钾盐样品图谱中的主峰的保留时

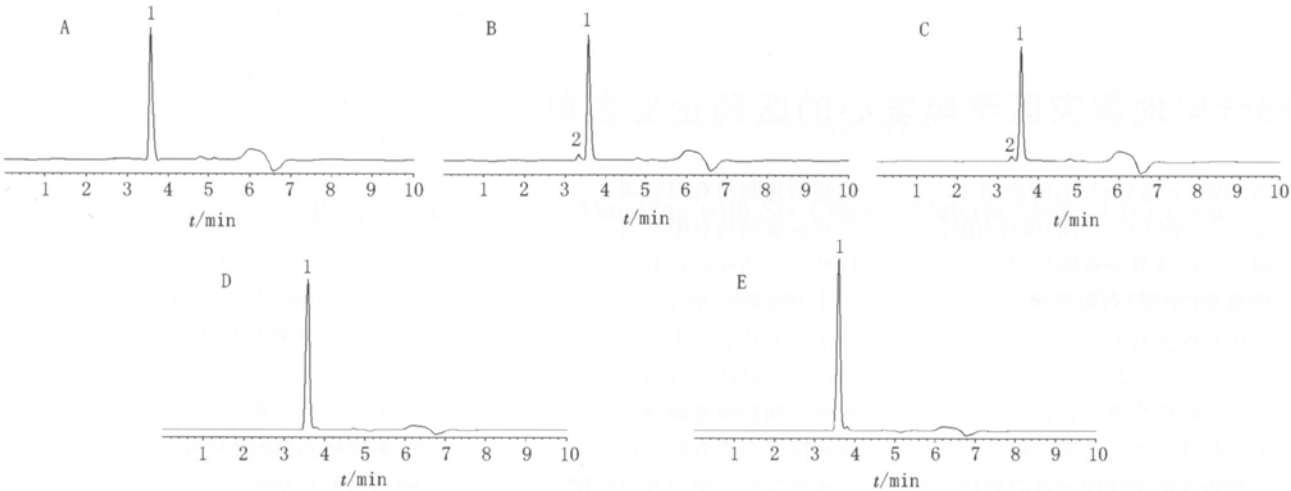


图 2 Cl⁻ 峰的验证色谱图

A - D-氨基葡萄糖盐酸盐对照品; B - D-氨基葡萄糖硫酸钾盐样品; C - D-氨基葡萄糖硫酸钾盐高温降解样品; D - 氯化钾; E - 氯化钠

Fig 2 The Chromatogram of validation of Cl⁻ peak

A - Glucosamine Hydrochloride RS; B - D-Glucosamine Sulfate Potassium Chloride; C - High temperature degraded D-Glucosamine Sulfate Potassium Chloride sample; D - Potassium Chloride; E - Sodium Chloride

间一致,图 2C 样品高温降解溶液图谱与图 2B 样品未降解溶液图谱一致(因氨基葡萄糖经灼烧肯定完全破坏,证明其在上述色谱条件下没有吸收峰)。各样品溶液中 Cl⁻ 浓度与峰面积的比值与 D-氨基葡萄糖盐酸盐对照品、D-氨基葡萄糖硫酸钾盐溶液中 Cl⁻ 浓度和峰面积的比值基本一致,表明该主峰就是 Cl⁻ 峰。文献^[2]中的色谱图与本实验中图 1A 相同,也将 Cl⁻ 峰当成氨基葡萄糖峰。D-氨基葡萄糖硫酸钾盐中 Cl⁻ 的加样回收率见表 3。

表 2 各样品溶液中 Cl⁻ 浓度与峰面积结果

Tab 2 Results of concentration and peak area of Cl⁻ in sample solutions

样品	样品浓度 /μg·mL ⁻¹	Cl ⁻ 浓度 C /μg·mL ⁻¹	峰面积 A	A/C 比值
D-氨基葡萄糖 盐酸盐对照品	1 000	164.4	763 862	4 646.4
D-氨基葡萄糖 硫酸钾盐	1 250	146.5	675 536	4 611.2
氯化钾	1 000	475.4	2 199 739	4 627.1
氯化钠	1 000	606.6	2 734 021	4 507.1
D-氨基葡萄糖硫酸 钾盐高温降解样品	1 250	146.5	660 165	4 506.2

表 1 各样品溶液中 SO₄²⁻ 浓度与峰面积结果

Tab 1 Results of concentration and peak area of SO₄²⁻ in sample solutions

样品	样品浓度 /μg·mL ⁻¹	SO ₄ ²⁻ 浓度 (C) /μg·mL ⁻¹	峰面积 (A)	A/C 比值
D-氨基葡萄糖硫 酸钾盐	1 250	198.3	32 806	165.4
硫酸钾	1 000	551.3	91 415	165.8
硫酸钠	1 000	676.3	111 524	164.9

表 3 D-氨基葡萄糖硫酸钾盐中 Cl⁻ 的加样回收率结果 (n=5)

Tab 3 Recovery results of Cl⁻ in glucosamine sulfate potassium chloride (n=5)

样品	原有量 /mg		加入量 /mg		测得量 /mg	回收率 /%
	D-氨基葡萄糖 硫酸钾盐 的量	Cl ⁻ 的量	添加氯化 钾的量	Cl ⁻ 的量		
D-氨基 葡萄糖 硫酸钾盐	125	14.65	20	9.51	24.09	99.3%

3 讨论

3.1 笔者采用短柱 (XB-C₈, 4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 提高流动相中有机相比比例 [乙腈-0.05% 磷酸 (pH = 3.0) (80:20)] 的色谱条件进行实验, 结果 D-氨基葡萄糖盐酸盐对照品溶液色谱图在 2 h 内未见“氨基葡萄糖”峰, 排除了氨基葡萄糖没有被洗脱出来的可能性。

3.2 USP27、USP28、USP29 收载的氨基葡萄糖硫酸钠盐 [(C₆H₁₄NO₅)₂·SO₄·2NaCl]、氨基葡萄糖盐酸盐、氨基葡萄糖片的含量测定^[1], 均按氨基葡萄糖盐酸盐项下的 HPLC 测定, 存在同样的问题。

3.3 通过测定 Cl⁻ 来计算样品含量, 常用银量法, 不会采用 HPLC, 即使采用 HPLC, 用 Cl⁻ 溶液作对照即可, 不必用价格

昂贵的 D-氨基葡萄糖盐酸盐对照品。D-氨基葡萄糖盐酸盐含量测定方法用于测定氨基葡萄糖盐酸盐时,尽管测得的不是活性成分的含量,测定结果在样品纯度较高时,仍能反映样品的含量。但当用于测定氨基葡萄糖硫酸钾盐、氨基葡萄糖硫酸钠盐时,由于用 D-氨基葡萄糖盐酸盐作对照品, SO_4^{2-} 的存在对测定结果的影响得不到校正,图 1b 中 SO_4^{2-} 峰面积约占 Cl^- 峰面积的 4.3%,测定结果肯定错误。

3.4 本实验结果有待 LC-MS 等联用分析方法的进一步

确证。

REFERENCES

- [1] USP29-NF24[S]. 2006: 2341-2343.
- [2] YANG L, LI T L, HANG T, *et al.* Determination of the content of Glucosamine Hydrochloride tablet by RP-HPLC[J]. West China J Pharm Sci(华西药学杂志), 2005, 20(3): 259-260.

收稿日期: 2007-07-22