

氨基葡萄糖 3 种含量测定方法的比较

王英瑛¹, 李俊¹, 曾 苏² (1. 浙江省台州市食品药品检验所, 浙江 台州 318000; 2. 浙江大学药学院, 杭州 310030)

摘要:目的 比较了 USP 法、HPLC 衍生化法和紫外分光光度法测定氨基葡萄糖含量的准确性和可靠性。方法 ①USP 法参照 USP28, 采用 C₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-0.05% 磷酸溶液(调 pH 3.0) (40:60) 为流动相, 检测波长 195 nm, 柱温:30 ℃; ②HPLC 衍生化法采用 C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈-0.05% 磷酸溶液(调 pH 3.0) 为流动相进行梯度洗脱, 检测波长 265 nm, 柱温:30 ℃, 氨基葡萄糖与茚甲氧羰琥珀酰亚胺(FMOC-OSu) 溶液反应的衍生物在上述条件下检测; ③紫外分光光度法采用在碳酸钠溶液环境下铁氰化钾与氨基葡萄糖反应后在 420 nm 处测定吸收值。结果 3 种方法的线性均较好, HPLC 衍生化法和 UV 法测定原料药的精密度和回收率均比 USP 方法好。USP 法测定氨基葡萄糖硫酸盐及其制剂的含量偏低。结论 USP 方法测定结果不理想, HPLC 衍生化法和 UV 法均适合氨基葡萄糖原料的测定, 而 HPLC 衍生化法更适合制剂的含量测定。

关键词:氨基葡萄糖; 含量测定; USP 法; HPLC 衍生化法; UV 法

中图分类号: R917.791 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2009)04-0307-03

The Comparative of Three Determination Methods of Glucosamine

WANG Yingying¹, LI Jun¹, ZENG Su² (1. Taizhou Institute for Drug Control, Taizhou 318000, China; 2. Collage of Pharmaceutical Science, Zhejiang University, Hangzhou 310030, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To compare determination of glucosamine using USP method, HPLC derivitization method and UV method, and inspect their actuality and reliability. **METHODS** ①Refer to USP28, C₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used with acetonitrile-phosphate buffer(pH 3.0)(40:60) as mobile phase, detect wavelength was 195 nm and column temperature was 30 ℃. ②HPLC derivitization method used C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase consisted of acetonitrile-phosphate buffer(pH 2.5)(40:60), the detected wavelength of 265 nm, and the temperature of 30 ℃. Glucosamine was derivitized with 9-fluorenylmethoxycarbonyl succinimide (FMOC-OSu) solution and the derivative was detected under the chromatography conditions. ③In the UV method, potassium ferricyanide reacted with glucosamine in sodium carbonate solution and determine the absorption value at 420 nm. **RESULTS** The linearity of three methods was good. The precision and recovery of HPLC derivitization method and UV method were better than USP method. The result of USP determination of glucosamine sulfate and its preparation was lower. **CONCLUSION** The result of USP method is not perfect. HPLC derivitization method and UV method are applied to determine the content of drug substances of glucosamine, and the first is more suitable to determination of glucosamine preparation. **KEY WORDS:** glucosamine; determination; USP method; HPLC derivitization method; UV method

作者简介: 王英瑛, 女, 硕士, 主管药师 Tel: (0576)88552833 E-mail: yingwang@hotmail.com

氨基葡萄糖是一种氨基单糖,是天然存在于结缔组织和胃肠道粘液中糖蛋白的一种成分。很多临床试验表明氨基葡萄糖和硫酸软骨素对于人体和动物体内的骨关节炎具有很好的疗效^[1],氨基葡萄糖具有构建软骨结构、上行调节软骨细胞的作用,还可减少软骨细胞降解的程度等功能^[2]。近年来国内相继地研制成功,并作为原料药大量出口,但其质量研究在国内外已经开展多年,有关氨基葡萄糖的检测方法文献报道有如高效液相色谱法^[3-5]、紫外分光光度法^[6-7]测定 D-氨基葡萄糖盐酸盐原料含量。笔者采用高效液相色谱衍生化法测定 D-氨基葡萄糖盐酸盐、硫酸盐的含量,方法具有准确、简便、精密度高、专属性强等特点,并对 3 种方法进行了比较。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪包括 Waters 2695 泵、2996 检测器及 Empower 色谱工作站(美国 Waters 公司),UV-265FW 紫外分光光度计(日本岛津公司)。氨基葡萄糖盐酸盐对照品(USP 标准品,批号:FOC363,纯度:100%),氨基葡萄糖硫酸盐及氨基葡萄糖盐酸盐原料(台州市丰润生物化学有限公司,批号分别为 2006081122、2005K06037),氨基葡萄糖盐酸盐片(江苏清江药业有限公司,批号:060810)和氨基葡萄糖硫酸盐胶囊(爱尔兰罗达药厂,批号:C04090A)。乙腈为色谱纯,水为注射用水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 测定方法

2.1.1 USP 方法 参照 USP28,色谱柱 Agilent Zorbax C₈ 柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为乙腈-0.05% 磷酸溶液(用氢氧化钾溶液调 pH 至 3.0)(40:60),检测波长 195 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 30℃。分别称取对照品和氨基葡萄糖硫酸盐供试品适量加水超声溶解,配制对照品溶液和供试品溶液(约相当于含氨基葡萄糖盐酸盐 1.0 mg·mL⁻¹),经滤膜过滤后直接进样分析。

2.1.2 HPLC 衍生化法 岛津 VP-ODS C₁₈ (250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相:A-乙腈,B-0.05% 磷酸溶液(用 KOH 溶液调 pH 至 2.5),比例为 40:60,梯度洗脱程序如下:0~4 min,A:B(40:60)等度洗脱;4~9 min,变化到 A:B(90:10);接着等度洗脱 1 min;9~14 min,变化到 A:B(40:60),检测波长:265 nm,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温:30℃。分别称取对照品和氨基葡萄糖硫酸盐供试品适量加水超声溶解,配制对照品溶液和供试品溶液(约相当于含氨

基葡萄糖盐酸盐 2.0 mg·mL⁻¹),精密量取此对照品溶液或样品溶液 1.0 mL 置 50 mL 量瓶中,加入 0.2% 的三乙胺溶液 1 mL 和 0.4% 的 FMO-C-OSu 乙腈溶液 5 mL,摇匀,置 60℃ 水浴中加热 30 min,再立即加入冷的乙腈-磷酸盐缓冲液(40:60)的流动相使反应停止,并稀释至刻度,摇匀,用 0.45 μm 微孔滤膜过滤后进样分析。

2.1.3 紫外分光光度法(UV 法) 分别精密称取对照品和供试品适量加水超声溶解,并稀释至约 50 μg·mL⁻¹。在洁净的具塞刻度试管中,先加入供试品溶液 3.0 mL,再加入 1 mg·mL⁻¹ 铁氰化钾溶液 2.0 mL、0.75 mol·L⁻¹ 碳酸钠溶液 2.0 mL,加塞摇匀,沸水浴 15 min,取出试管,用冷水冷却至室温,在紫外分光光度计上 420 nm 波长处测吸光度,同法取水作空白试验。

2.2 专属性试验

USP 法、HPLC 衍生化法在上述各自的色谱条件下,氨基葡萄糖的分离出峰良好,理论板数均较好,见图 1。氨基葡萄糖盐酸盐及氨基葡萄糖硫酸盐在水溶液中具有变旋现象^[8],故在 HPLC 衍生化法色谱图中出现的两个峰是氨基葡萄糖的两个异构体峰,所以本文按两个峰的总峰面积进行定量分析。

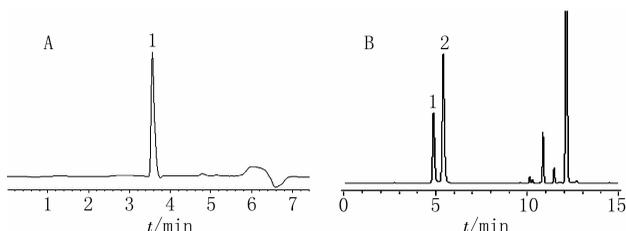


图 1 USP 方法及 HPLC 衍生化法色谱图
A - USP 方法(1 - 氨基葡萄糖);B - HPLC 衍生化法(1 - 氨基葡萄糖异构体 1;2 - 氨基葡萄糖异构体 2)

Fig 1 The chromatograms of USP method and HPLC derivitization method

A - USP method(1 - glucosamine);B - HPLC derivitization method(1 - glucosamine isomer 1;2 - glucosamine isomer 2)

2.3 线性关系考察

分别配制对照品系列溶液,按上述 3 种方法进行线性试验,结果 USP 方法、HPLC 衍生化法和紫外分光光度法 3 种方法的线性曲线如下:USP 法: $Y = 926\ 127X + 23\ 141$, $r = 0.999\ 4$;HPLC 衍生化法: $Y = 1.980 \times 10^6 X - 5.941$, $r = 0.999\ 7$;紫外分光光度法: $Y = 1.037\ 9X - 0.003\ 4$, $r = 0.999\ 4$ 。氨基葡萄糖盐酸盐对照品溶液浓度分别在 0.5~2.0,0.4~3.0,0.2~0.8 mg·mL⁻¹内,3 种方法的线性关系良好。

2.4 精密度考察

按上述方法操作进行重复性和中间精密度试验,分别配制6份氨基葡萄糖硫酸盐供试品溶液考察各方法重复性,由两人连续3d分别配制氨基葡萄糖硫酸盐供试品溶液进行分析,考察中间精密度,上述3种测定方法的精密度,结果见表1。

表1 精密度试验结果($n=6$)

Tab 1 The results of precision test($n=6$)

方法	重复性/%	中间精密度/%
USP法	5.6	6.7
HPLC 衍生化法	0.8	1.6
UV法	1.5	1.9

2.5 准确度考察

精密称取氨基葡萄糖盐酸盐标准品适量,按标示量的50%,100%,150%加入到氨基葡萄糖硫酸盐样品中,分别采用3种方法进行回收率测定,结果表明HPLC衍生化法和UV法的回收率较好,结果见表2。

表2 回收率试验结果($n=9$)

Tab 2 The results of recovery test($n=9$)

方法	回收率/%	RSD/%
USP法	104.2	3.4
HPLC 衍生化法	100.3	0.8
UV法	99.8	1.3

2.6 样品含量测定

按上述方法对氨基葡萄糖硫酸盐、氨基葡萄糖盐酸盐、氨基葡萄糖硫酸盐胶囊、氨基葡萄糖片4种样品的含量进行测定,结果见表3。

表3 4种样品的含量测定结果($n=3$)

Tab 3 The determination results of four samples($n=3$)

方法	氨基葡萄糖	氨基葡萄糖	氨基葡萄糖	氨基葡萄糖
	硫酸盐	盐酸盐	硫酸盐胶囊	盐酸盐片
USP法	103.9	98.9	105.8	103.1
HPLC 衍生化法	99.9	100.8	99.7	102.6
UV法	100.2	100.5	101.0	103.4

3 讨论

HPLC衍生化法中氨基葡萄糖的衍生化步骤至关重要,笔者对衍生化反应条件都进行了考察,如衍生化试剂加入量、三乙胺的浓度的影响以及衍生化反应的时间和温度等,试验表明,在“2.1.2”项下的衍生化条件下,衍生化反应效果最好,测的衍生化产物的峰面积最大。该方法不采用甲醇配制流动相主要是因为衍生化试剂在甲醇中的溶解性差,而采用梯度洗脱的方式是因为可以使未反应的衍生化试剂早点出峰,缩短分析时间。衍生化反应的产物经二极管阵列检测器扫描,最大波长为265 nm,故选择

该波长为检测波长。

氨基葡萄糖原料及制剂法定的含量测定方法采用USP方法的较多,如文献^[4-5],但经笔者试验,采用USP方法进行氨基葡萄糖硫酸盐的含量测定时会出现含量结果经常超过限度要求的现象,因此笔者采用新的方法——HPLC衍生化法对氨基葡萄糖硫酸盐进行测定,并将该方法与UV法和USP法一起进行了比较。试验结果显示HPLC衍生化法和UV法测定氨基葡萄糖硫酸盐的精密度、回收率都要优于USP法,同时样品的含量测定结果也表明USP法测定氨基葡萄糖硫酸盐及其胶囊的含量均比HPLC衍生化法和UV法测得结果偏高,而对于氨基葡萄糖盐酸盐及其片剂的测定结果影响不大,上述试验结果也符合笔者前面提到的采用USP方法进行氨基葡萄糖硫酸盐的含量测定时会出现含量结果超出限度要求的现象,说明法定的USP方法存在一些问题,不适合用于测定氨基葡萄糖原料及制剂的含量,其原因有待于进一步研究。

本文中HPLC衍生化法和UV法均适合氨基葡萄糖原料的测定,而HPLC衍生化法更适合制剂的含量测定,相对而言,UV法需要的仪器设备简单,更适合于基层单位使用。

REFERENCES

- [1] DAS A, HAMMAD T A. Efficacy of a combination of FCHG49 glucosamine hydrochloride, TRHI22 low molecular weight sodium chondroitin sulfate and manganese ascorbate in the management of knee osteoarthritis [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2000, 8(5):343-350.
- [2] UEBELHART D, THONAR E J, ZHANG J, et al. Protective effect of exogenous chondroitin 4, 6-sulfate in the acute degradation of articular cartilage in the rabbit [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 1998, 6(Suppl A):6-13.
- [3] USP28 [S]. 2005:2101.
- [4] 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 (华西药科学杂志)*, 2005, 20(3):259-260.
- [5] LIU B J. Determination of the content of D-glucosamine hydrochloride and sulfate by RP-HPLC [J]. *Chin J Prev Med (中华预防医学杂志)*, 2007, 41(1):60-61.
- [6] State Medical Standard Local Standard of Chemical Drug upgrade to State Standard (book 16) (国家药品标准:化学药品地方标准上升国家标准第十六册) [S]. 2003:226-227.
- [7] SU C, XIA W S, YAO H Y. Determination method of glucosamine and N-acetylglucosamine [J]. *Sci Technol Food Ind (食品工业科技)*, 2003, 24(6):74-75.
- [8] ZHOU P G, YOU Y M, QI X Y, et al. Preparation and some properties of glucosamine hydrochloride [J]. *J Fisheries China (水产学报)*, 2000, 24(1):76-80.

收稿日期:2007-08-21