

- 中的效果分析 [J]. 重庆医学, 2006, 35(11): 973-974.
- [3] 张献清, 穆士杰, 夏爱军, 等. 血小板输注在肿瘤化疗中的应用 [J]. 陕西医学杂志, 2004, 33(345): 204-208.
- [4] Benson K, Fields K, Hiemenz J, et al. The platelet-refractory bone marrow transplant patient prophylaxis and treatment of bleeding [J]. Sem in Oncol, 1993, 20(5 Suppl 6): 102-109.
- [5] 闫东河, 李廷孝, 孙衲廷, 等. 反复输血者血小板抗体对血小板输注效果的影响 [J]. 中国输血杂志, 2003, 16(1): 7-8.
- [6] 韩悦, 王兆铖, 朱明清, 等. 血小板的自身抗体的流式细胞仪检测与意义 [J]. 临床血液学杂志, 2000, 13(5): 222-223.
- [7] 刘孟黎, 徐华, 李凤琴. 微柱凝胶技术用于血小板交叉配型输注 [J]. 现代标记检验学杂志, 2002, 3(1): 12-13.
- [8] 范厚臻. 血小板抗体检测的意义与方法学进展 [J]. 中国全科医学, 2006, 9(10): 856-857.

[收稿日期] 2009-04-30

经验交流 ·

高效液相色谱法测定复方氨基葡萄糖咀嚼片中氨基葡萄糖的含量

宁 武, 石 涛, 缪玉山

(东南大学附属中大医院 药剂科, 江苏 南京 210009)

[摘要] 目的 建立高效液相色谱法, 测定氨基葡萄糖咀嚼片中氨基葡萄糖的含量。方法 以 Hypersil C₁₈ (50 mm × 4.6 mm, 5 μm) 为色谱柱; 以 0.05 mol·L⁻¹ 乙酸钠水溶液-甲醇 (90:10) 为流动相; UV 检测波长 340 nm; 流速 1.0 mL·min⁻¹。结果 氨基葡萄糖在 200~1600 mg·L⁻¹ 范围内具有良好线性关系 ($r=0.9996$), 平均加样回收率为 100.4%, (RSD) 为 1.0% ($n=9$); 3 批样品的标示含量分别为 99.5%、100.1%、99.4%。结论 高效液相色谱法准确、灵敏, 重现性好, 可用于氨基葡萄糖咀嚼片的含量测定。

[关键词] 氨基葡萄糖; 咀嚼片; 色谱法; 高压液相; 含量

[中图分类号] TQ460.72 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1671-7562(2009)06-0472-03

氨基葡萄糖^[1]是蛋白多糖合成的前体物质, 可刺激软骨细胞产生有正常多聚体结构的蛋白多糖, 提高软骨细胞的修复能力, 抑制可损害关节软骨的酶, 并可防止损伤细胞的超氧化物自由基的产生, 促进软骨基质的修复和重建, 从而可缓解骨关节疼痛, 改善关节功能, 并延缓关节病变的发展; 硫酸软骨素在关节中具有润滑和支撑功能, 还具有抗动脉粥样硬化与抗粥样斑块作用, 两者复方在临幊上主要用于骨性关节炎的防治, 减慢软骨退化和缓解疼痛。目前国内仅有氨基葡萄糖常规口服片剂和胶囊的生产与销售, 尚无复方氨基葡萄糖制剂 (氨基葡萄糖和硫酸软骨素)。为此我们开发了复方氨基葡萄糖咀嚼片, 为控制其质量, 建立了测定氨基葡萄糖咀嚼片含量的高效液相色谱法。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试药与试剂 硫酸氨基葡萄糖氯化钠复盐

(浙江海正药业股份有限公司); 氨基葡萄糖对照品 (中国药品生物制品鉴定所; 批号: 649-200001); 复方氨基葡萄糖咀嚼片 (规格: 氨基葡萄糖 硫酸软骨素 = 250 mg: 200 mg), 甲醇色谱纯, 乙酸钠、醋酸及邻苯二甲醛等为分析纯。

1.1.2 仪器 高效液相色谱仪 (Waters 600E 泵控系统), WatersTM 486 紫外检测器, Rheodex 7125 进样器, HW 色谱工作站。

1.2 色谱条件

色谱柱: Hypersil C₁₈ (50 mm × 4.6 mm); 流动相: 以 0.05 mol·L⁻¹ 乙酸钠水溶液 (取 6.80 g 三水合乙酸钠, 加入 700 mL 水使其溶解, 用醋酸调 pH 至 5.9, 加水至 1000 mL) 甲醇 (900:100) 为流动相; UV 检测波长 340 nm; 流速 1.0 mL·min⁻¹; 进样量为 20 μL。

1.3 溶液制备

1.3.1 衍生化试剂的制备 称取 50 mg 邻苯二甲醛置 14 mL 聚丙烯试管中, 加入 1.25 mL 无水甲醇使其溶

[作者简介] 宁武 (1965-), 女, 贵州贵阳人, 药师。

[通讯作者] 缪玉山, Email: yiwukeji@163.com

解,再加入 3 羟丙酸 50 μ l 和 0.2 mol·L⁻¹ 硼酸盐缓冲液 11.2 ml, 缓慢混匀, 置暗处 30 min (每 2 d 加入 3 羟丙酸 10 μ l 以保持试剂浓度, 于暗处室温保存, 2 周内使用)。

1.3.2 对照液与供试液的制备 精密称取盐酸氨基葡萄糖对照品适量, 加水制成每 1 ml 中含氨基葡萄糖 1 mg 的溶液, 作为对照品溶液; 取本品 20 片, 精密称定, 研细, 精密称取细粉适量 (约相当于氨基葡萄糖 100 mg), 置 100 ml 容量瓶中, 加稀释剂溶解并稀释至刻度。于快速混匀器上混匀使粉末悬浮, 65 水浴超声 20 min, 置磁力搅拌器上搅拌 5 min, 离心, 取上清液作为供试液。

1.3.3 衍生化方法的制备 取 0.2 mol·L⁻¹ 的硼酸盐缓冲液 400 μ l, 置一小瓶中, 加入 100 μ l 衍生化试剂和 100 μ l 对照液或供试液, 混合, 衍生化 1 min 后进样, 记录色谱图。异构体与 异构体的保留时间之比为 1.6~1.7。异构体的出峰时间在 4 min 左右, 以 异构体的峰面积计算氨基葡萄糖的标示含量。

1.3.4 空白辅料干扰试验溶液的制备 取 0.2 mol·L⁻¹ 硼酸盐缓冲液 400 μ l 置一小瓶中, 加入 100 μ l 衍生化试剂, 混合, 衍生化 1 min 后进样, 记录空白衍生化试剂色谱图; 取处方量硫酸软骨素及空白辅料适量 (约相当于氨基葡萄糖 100 mg 的辅料量), 置 100 ml 容量瓶中, 加稀释剂溶解并稀释至刻度。以下同 “1.3.2 项下 “于 离心 制备供试液”。

1.3.5 方法学有关溶液的制备 按本品 20 片处方量取硫酸氨基葡萄糖氯化钠复盐、硫酸软骨素及空白辅料适量, 置研钵中研匀, 作为模拟制剂粉末。另照处方量取硫酸软骨素及空白辅料适量, 置研钵中, 研匀, 作为空白辅料粉末; 精密称取模拟制剂粉末适量 (约相当于氨基葡萄糖 100 mg) 的粉末置 100 ml 容量瓶中, 分别置 100 ml 容量瓶中。取 1 份加稀释剂稀释至刻度, 以下同 “1.3.2 项下 “于 离心 制备供试液, 取供试液衍生化后进样; 再取 1 份加入稀释剂 1 ml, 置沸水浴中加热, 1 h 后加稀释剂稀释至刻度, 以下同 “1.3.2 项下 “于 离心 制备供试液, 取上清液衍生化后进样, 另取空白辅料粉末适量同法操作; 另取 3 份中分别加入 1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液、1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液、30% H₂O₂ 溶液各 1 ml, 放置 1 h 后分别调至中性, 加稀释剂稀释至刻度, 以下同 “1.3.2 项下 “于 离心 制备供试液, 取上清液衍生化后进样, 再分别取空白辅料粉末适量同法操作。

1.3.6 标准曲线的制备 精密称取氨基葡萄糖对照品 200.00 mg, 置 100 ml 容量瓶中, 加水适量使溶解并稀释至刻度, 摆匀作为储备液。精密量取储备液

1.0、2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 ml 置 10 ml 容量瓶中, 加水稀释至刻度, 摆匀, 得浓度为 200.00、400.00、600.00、800.00、1000.00、1200.00、1400.00、1600.00 mg·L⁻¹ 的系列溶液。分别取 100 μ l 按衍生化方法衍生化后进样, 记录色谱图, 并以浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线。

1.3.7 方法回收率试验 按本品 20 片处方量精密称取硫酸氨基葡萄糖氯化钠复盐原料适量 (分别相当于标示量 80%、100%、120%), 分别置研钵中, 再分别加入处方量的硫酸软骨素及空白辅料, 研匀作为模拟制剂粉末。分别取相当于氨基葡萄糖 80、100、120 mg 的粉末各 3 份, 精密称定, 置 100 ml 量瓶中, 以下同 “1.3.2 项下 “于 离心 制备供试液; 另精密称取氨基葡萄糖对照品适量, 用水溶解并稀释制成每 1 ml 中约含 1 mg 的溶液作为对照溶液。分别取对照液及供试液各 100 μ l, 衍生化后进样, 记录色谱图, 按外标法以 异构体的峰面积计算硫酸氨基葡萄糖的测得回收量, 计算回收率。

1.3.8 稳定性试验 精密称取氨基葡萄糖对照品适量, 用水溶解并稀释制成每 1 ml 中约含 1 mg 的溶液作为对照溶液。参考美国药典 版中复方硫酸氨基葡萄糖片的标准中规定对照液于室温条件下 1 h 内使用, 分别于 0、0.5、1、1.5、2、2.5 h 取对照液 100 μ l 按衍生化方法衍生化后进样, 以峰面积考察对照液的稳定性; 另取本品 20 片, 精密称定, 研细, 精密称取适量 (约相当于氨基葡萄糖 100 mg) 的粉末置 100 ml 容量瓶中, 加稀释剂溶解并稀释至刻度, 以下同 “1.3.2 项下 “于 离心 制备供试液。分别于 0、1、2、4、6、8 h 取 100 μ l 按衍生化方法衍生化后进样, 以峰面积考察供试液的稳定性。

1.3.9 进样精密度试验 取溶液稳定性项下对照液连续取样 6 份按衍生化方法衍生化后进样, 以峰面积计算相对标准偏差 (RSD), 考察精密度。

1.3.10 重复性试验 取样品 20 片, 精密称定, 研细, 精密称取粉末适量 (约相当于氨基葡萄糖 100 mg), 共 6 份, 分别置 100 ml 容量瓶中, 加稀释剂溶解并稀释至刻度。以下同 “1.3.2 项下 “于 离心 制备供试液。另精密称取氨基葡萄糖对照品适量, 用水溶解并稀释制成每 1 ml 中约含 1 mg 的溶液作为对照溶液。取对照液及供试液各 100 μ l 进行衍生化, 反应 1 min 后量取 20 μ l 进样, 记录色谱图, 按外标法以 异构体的峰面积计算其标示含量。

1.3.11 中间精密度试验 取同一样品由不同人员、在不同日期和不同仪器上按含量测定方法进行含量测定, 考察中间精密度。

1.3.12 含量测定溶液的制备 取本品3批各20片,精密称定,研细,精密称取粉末适量(约相当于氨基葡萄糖100mg),置100ml容量瓶中,加稀释剂溶解并稀释至刻度。以下同“1.3.7项下操作计算标示含量。”

2 结 果

2.1 色谱行为

在试验确定条件下,空白辅料和硫酸软骨素对氨基葡萄糖峰无干扰,且主峰分离较好,表明本色谱条件检测复方氨基葡萄糖咀嚼片中的氨基葡萄糖含量是可行的(分离度大于1.5)。

2.2 空白辅料干扰试验

空白辅料图谱与空白衍生化图谱相同,显示硫酸软骨素及空白辅料在此测定方法下对氨基葡萄糖的含量测定无干扰。

2.3 方法学研究

在试验条件下,主药和辅料在酸、碱、热及氧化等破坏条件下,酸、碱、热、氧化破坏的图谱与未破坏的供试液图谱相比,峰面积均减小,但无杂质峰。所以在此测定方法下,主药的降解产物对含量测定无影响。

2.4 线性关系

以对照品溶液浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,回归计算得回归方程:线性方程: $A = 1474.8C + 347.977$, $r = 0.9996$ ($n = 8$),表明本品在 $200 \sim 1600 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内与色谱峰面积线性良好。

2.5 方法回收率

见表1。

表 1 复方硫酸氨基葡萄糖咀嚼片回收率

编号	加入量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
1	78.86	79.25	100.5		
2	79.09	79.56	100.6		
3	79.03	79.69	100.8		
4	98.88	98.91	100.0		
5	98.83	100.52	101.7	100.4	1.0
6	98.92	100.21	101.3		
7	118.68	116.69	98.32		
8	118.68	118.61	99.94		
9	118.58	118.73	100.1		

2.6 稳定性试验

对照液与供试液的RSD分别为0.7%和0.8% ($n = 6$),表明对照液于室温条件下25h,供试液于室温条件下8h内稳定。

2.7 进样精密度试验

样品连续进样RSD为0.8% ($n = 6$),表明样品衍生化后的进样精密度良好。

2.8 重复性试验

6份样品在相同条件下操作测得的平均含量为99.4%,RSD为0.4% ($n = 6$),表明含量测定的重复性良好。

2.9 中间精密度试验

同一样品不同日期及不同仪器下操作的RSD为0.6% ($n = 6$),表明中间精密度良好。

2.10 含量测定

3批样品测定的标示含量分别为99.5%、100.1%和99.4%。

3 讨 论

本实验中使用的盐酸氨基葡萄糖(对照品)和硫酸氨基葡萄糖氯化钠复盐(原料药)是以氨基葡萄糖和衍生化试剂发生反应,与氨基葡萄糖是何种盐没有关系,并不影响复方氨基葡萄糖咀嚼片中氨基葡萄糖的含量测定。

氨基葡萄糖中含有 D-异构体和 L-异构体,其中 L-异构体含量较高(60%左右)且较稳定,所以测定时以 L-异构体的峰面积计算氨基糖的标示含量。

复方氨基葡萄糖咀嚼片是我们研究开发的3.2类新药,本研究主要介绍了氨基葡萄糖高效液相色谱法,将本品中另一有效成分硫酸软骨素视作辅料,与空白辅料图谱及空白衍生化图谱相同,显示硫酸软骨素及空白辅料在此测定方法下对氨基葡萄糖的含量测定无干扰,此法具有准确、可靠、灵敏度高等特点,对控制本品及相关制剂的质量具有重要意义。

[参考文献]

[1] 张象麟. 药物临床信息参考 [M]. 成都: 四川科学技术出版社, 2007: 1403-1404.

[收稿日期] 2009-09-14