

HPLC-RID 法测定氨糖美辛肠溶片中盐酸氨基葡萄糖含量*

袁进焯, 陈琦, 薛巧如**, 陈华

(广东省药品检验所, 广州 510663)

摘要 目的: 建立高效液相色谱-示差折光检测器法测定氨糖美辛肠溶片中盐酸氨基葡萄糖含量。方法: 使用 Waters XBridge Amide (4.6 mm × 250 mm, 3.5 μm) 色谱柱, 流动相: 80% 乙腈溶液 (1 000 mL 中含 1 mL 氨水), 流速: 1.2 mL · min⁻¹; 柱温: 40 °C; 进样量: 20 μL, 示差折光检测器 (RID) 检测。结果: 盐酸氨基葡萄糖检测限为 0.03 mg · mL⁻¹, 定量限为 0.125 mg · mL⁻¹, 其在 0.72 ~ 7.56 mg · mL⁻¹ 质量浓度范围内呈良好的线性关系。平均回收率为 99.36% (RSD = 0.85%, n = 9)。测定氨糖美辛肠溶片 7 批, 盐酸氨基葡萄糖的含量在 93% ~ 107% 范围内。结论: 所建方法检测快速准确、专属性强、耐用性较好, 可用于盐酸氨基葡萄糖含量的测定, 为有效控制氨糖美辛肠溶片的质量提供参考。

关键词: 高效液相色谱法; 示差折光检测器; 氨糖美辛肠溶片; 盐酸氨基葡萄糖; 含量测定

中图分类号: R 921.2

文献标识码: A

文章编号: 1009 - 3656(2024)01 - 0062 - 06

doi: 10.19778/j.chp.2024.01.010

HPLC-RID method for the determination of glucosamine hydrochloride in amitriptyline enteric-coated tablets*

YUAN Jinye, CHEN Qi, XUE Qiaoru**, CHEN Hua

(Guangdong Institute for Drug Control, Guangzhou 510663, China)

Abstract Objective: To establish a method for the determination of glucosamine hydrochloride content in aminoglycine enteric coated tablets by high-performance liquid chromatography with differential refractive detector. **Methods:** Waters XBridge Amide (4.6 mm × 250 mm, 3.5 μm) column was used. The mobile phase was 80% acetonitrile solution (1 000 mL containing 1 mL ammonia) at the flow rate of 1.2 mL · min⁻¹. Column temperature was set on 40 °C; Injecting volume was 20 μL with differential refraction detector (RID) detection. **Results:** The detection limit of glucosamine hydrochloride was 0.03 mg · mL⁻¹, and the limit of quantification was 0.125 mg · mL⁻¹. It showed a good linear relationship in the mass concentration range of 0.72 - 7.56 mg · mL⁻¹. The average recovery was 99.4% (RSD = 0.85%, n = 9). The content of glucosamine hydrochloride in 7 batches of aminoglycine enteric-coated tablets was measured in the range of 93% - 107%. **Conclusion:** The proposed method is fast, accurate, specific and durable, and can be used for the determination of glucosamine hydrochloride, which provides a reference for effectively controlling the quality of aminoxymetacin enteric-coated tablets.

Key words: HPLC; RID; enteric-coated tablets of aspartame; glucosamine hydrochloride; content determination

骨关节炎的发病率在全球逐年增加, 临床上年轻群体占比也在逐渐增加, 有越来越年轻化的

趋势^[1]。氨糖美辛肠溶片作为新型复方消炎镇痛药物, 其中主要的成分是盐酸氨基葡萄糖。盐酸

* 基金项目: 广东省药品检验所内项目 (SN2022003)

第一作者简介: 袁进焯, 药师; 研究方向: 药品质量与标准。Tel: 020-81887684; E-mail: 694163022@qq.com

** 通讯作者简介: 薛巧如, 副主任药师; 研究方向: 药品质量与标准。Tel: 020-81887684; E-mail: 12236008@qq.com

氨基葡萄糖是甲壳素经盐酸水解得到的一种还原糖,氨基葡萄糖是一种广泛存在于自然界的单糖,主要作用就是抑制软骨面的破坏,参与软骨的合成,抑制由于无菌性炎症对于软骨面的破坏,临床上预防和治疗各种关节的骨关节炎疾病^[2-4]。氨糖美辛肠溶片含量测定法有 HPLC-CAD 法、HPLC 法等^[5-6]。

《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)2020 年版(二部)采用高效液相色谱法(HPLC),以氨基硅烷键合硅胶为色谱柱填充剂、磷酸盐缓冲溶液(pH 7.5)-乙腈(25:75)为流动相对氨糖美辛肠溶片中盐酸氨基葡萄糖含量进行测定。笔者在试验中发现,在该色谱条件下,柱效容易下降,主峰拖尾严重,检测波长 195 nm 处于乙腈末端吸收,影响测定结果,流动相相对复杂。因此,本研究参考相关文献以 80% 乙腈溶液(1 000 mL 中含 1 mL 氨水)为流动相、示差折光检测器测定盐酸氨基葡萄糖含量,为有效控制氨糖美辛肠溶片的质量提供参考。

1 材料

1.1 仪器设备

SHIMADZULC-20AT 日本岛津公司高效液相色谱仪,CPA225D 型十万分之一电子天平(赛多利斯科学仪器北京有限公司),Milli-Q 超纯水发生器(美国 Millipore 公司)。

1.2 药品与试剂

氨糖美辛肠溶片(广东逸舒,批号 220201;河南天方,批号 210704;山西振东,批号 20210301;浙江惠松,批号 201101;华夏国药,批号 20220405;江西制药,批号 2012123;石药欧意,批号 207210622);盐酸氨基葡萄糖对照品(中国食品药品检定研究院,批号 140649-202007,含量 99.99%);乙腈(广州化学试剂厂,批号 2021071429;99.5%);水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Waters XBridge Amide(4.6 mm × 250 mm, 3.5 μm);流动相为 80% 乙腈溶液(1 000 mL 中含 1 mL 氨水);流速为 1.2 mL · min⁻¹;柱温为 40 °C;进样量为 20 μL。

2.2 溶液制备

2.2.1 系统适用性试验溶液 精密称取氨糖美辛肠溶片(山西振东,批号:20210301)适量,用 50% 乙

腈溶液稀释制成每 1 mL 中含 3 mg 的溶液。

2.2.2 对照品溶液 精密称取盐酸氨基葡萄糖对照品适量,用 50% 乙腈溶液溶解制成每 1 mL 中含盐酸氨基葡萄糖 3 mg 的溶液。

2.2.3 供试品溶液 精密称取氨糖美辛肠溶片(山西振东,批号:20210301)适量,用 50% 乙腈溶液溶解制成每 1 mL 中含盐酸氨基葡萄糖 3 mg 的溶液。

2.2.4 阴性空白溶液 精密称取 A 企业辅料和吡啶美辛对照品适量,用 50% 乙腈溶液溶解并稀释至刻度,作为阴性空白溶液。

2.3 系统适用性试验

取“2.2”项下系统适用性溶液、对照品溶液、供试品溶液和阴性空白溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图。详见图 1。结果表明阴性空白溶液对主成分的检出无干扰。七家企业中氨糖美辛肠溶片剂的辅料包含蔗糖、淀粉等物质,在“2.1”项下色谱条件中会出峰的辅料只有蔗糖,主成分峰与蔗糖峰之间的分离度为 7.6。

2.4 专属性试验

2.4.1 未破坏供试品溶液 取供试品(山西振东,批号:20210301)约 0.2 g,置 25 mL 量瓶中,加 50% 乙腈溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,依法测定。

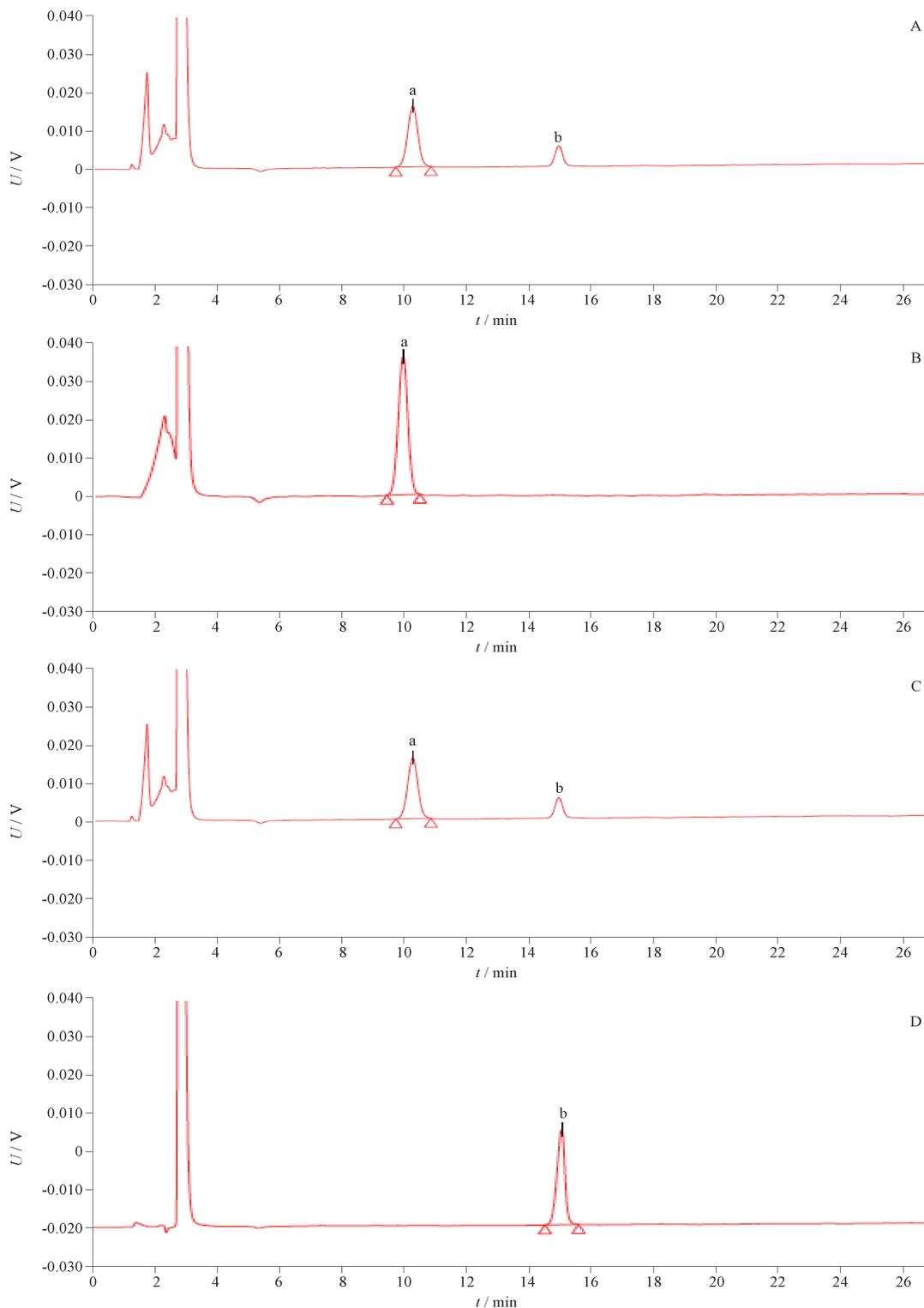
2.4.2 酸破坏供试品溶液 称取供试品(山西振东,批号 20210301)约 0.2 g,置 25 mL 量瓶中,加 1 mol · L⁻¹ 盐酸溶液 1 mL,放置 60 min 后,加 1 mol · L⁻¹ 氢氧化钠溶液 1 mL 中和,用 50% 乙腈溶液稀释至刻度,摇匀,依法测定。

2.4.3 碱破坏供试品溶液 取供试品(山西振东,批号 20210301)约 0.2 g,置 25 mL 量瓶中,加 1 mol · L⁻¹ 氢氧化钠溶液 1 mL,放置 60 min 后,加 1 mol · L⁻¹ 盐酸溶液 1 mL 中和,用 50% 乙腈溶液稀释至刻度,摇匀,依法测定。

2.4.4 氧化破坏供试品溶液 取供试品(山西振东,批号 20210301)约 0.2 g,置 25 mL 量瓶中,加 30% 过氧化氢溶液 100 μL,放置 60 min 后,用 50% 乙腈溶液稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。

2.4.5 热破坏供试品溶液 取样品(山西振东,批号:20210301)(100 °C 放置 60 min)0.2 g,置 25 mL 量瓶中,用 50% 乙腈溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,依法测定。

取上述各溶液 20 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,详见图 2。结果表明供试品在酸、碱、氧化和加热破坏下均稳定。



a. 盐酸氨基葡萄糖 (glucosamine hydrochloride) b. 蔗糖 (sucrose)

图1 系统适用性溶液(A)、对照品溶液(B)、供试品溶液(C)、阴性空白溶液(D)色谱图

Fig. 1 Chromatograms of system suitability solution (A), reference solution (B), test solution (C) negative blank solution (D)

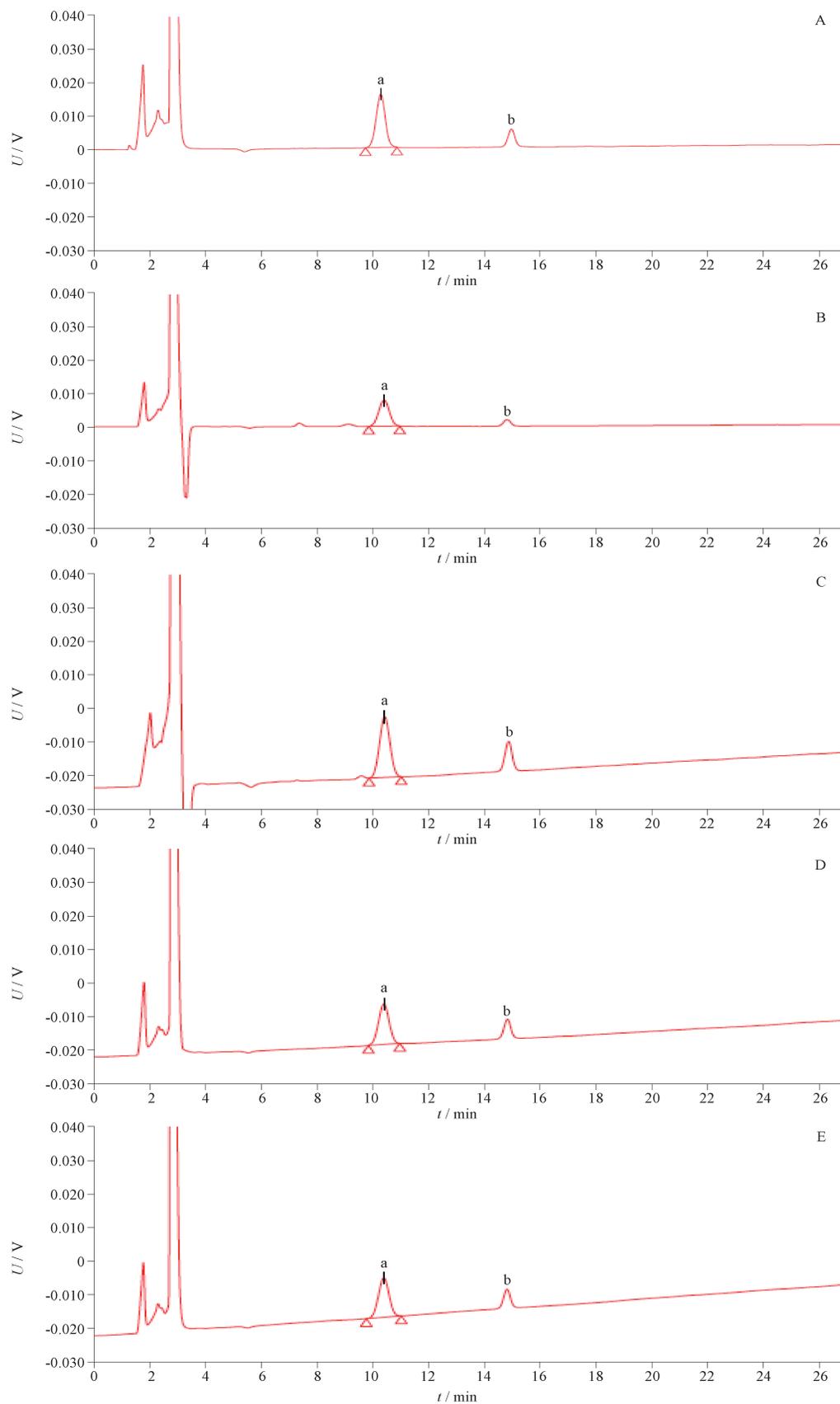
2.5 线性关系

取盐酸氨基葡萄糖对照品适量,精密称定,加50%乙腈溶液溶解并定量稀释制成不同浓度的溶液,以质量浓度 X 为横坐标、峰面积 Y 为纵坐标,得

线性方程:

$$Y = 13\,077X - 2\,972 \quad r = 0.999\,8$$

盐酸氨基葡萄糖的质量浓度 $0.72 \sim 7.56 \text{ mg} \cdot \text{mL}$ 与峰面积呈良好线性关系。



A. 未破坏样品(undamaged sample) B. 酸破坏(acid damage) C. 碱破坏(alkali damage) D. 氧化破坏(oxidative damage) E. 热破坏(thermal damage) a. 盐酸氨基葡萄糖(glucosamine hydrochloride) b. 蔗糖(sucrose)

图2 专属性试验 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of specificity test

2.6 定量限与检测限

精密量取“2.2.2”项下对照品溶液,逐级稀释后进样测定,以盐酸氨基葡萄糖峰信噪比3倍和10倍时的量作为检测限和定量限,结果盐酸氨基葡萄糖检测限为 $0.03 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,定量限为 $0.125 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

2.7 精密度与重复性试验

取“2.2.2”项下的对照品溶液,连续进样6次,峰面积RSD($n=6$)为0.8%,仪器精密度良好;取同一批号供试品(批号207000000)6份,平均含量为标示量的96.88%,RSD($n=6$)为0.76%,表明重复

性良好。

2.8 稳定性试验

取同一供试品溶液(批号:207000000),分别于0、2、4、6、8、12和24 h进样测定,记录峰面积,RSD为0.35%,表明配制溶液在24 h内稳定。

2.9 回收率试验

精密称取盐酸氨基葡萄糖对照品适量,辅料40 mg,吡啶美辛10 mg,共取9份,分3组,分别精密加入对照品24、30、36 mg,分别置10 mL量瓶中,用50%乙腈溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,依法测定。计算回收率,结果见表1。

表1 回收试验结果

Tab.1 Recovery test results

组别 (group)	加入量 (added)/ mg	辅料 (added of excipient)/ mg	吡啶美辛 (added of indomethacin)/ mg	测得量 (measured)/ mg	回收率 (recovery)/ %	平均回收率 (average recovery)/ %	RSD/ %
1	24.99	40.52	10.23	23.72	98.92	99.36	0.85
2	24.47	40.49	10.27	24.20	98.92		
3	24.55	40.78	10.63	24.46	99.64		
4	30.27	40.53	10.34	30.04	99.24		
5	30.16	40.38	10.79	29.85	98.98		
6	30.63	40.12	10.53	30.14	98.41		
7	36.51	40.49	10.61	36.58	100.18		
8	36.38	40.53	10.74	35.95	98.83		
9	36.93	40.64	10.71	37.35	101.14		

2.10 样品测定

取不同批次的氨糖美辛肠溶片,按“2.1”项下色谱条件测定。结果见表2。从表2样品测定结果可知,盐酸氨基葡萄糖的含量在93%~107%范围内,均符合规定。

表2 样品含量测定结果

Tab.2 Sample content determination results

厂家 (company)	批号 (lot No.)	含量 (content)/%
广东逸舒	220201	97.35
河南天方	210704	96.36
山西振东	20210301	98.98
浙江惠松	201101	97.45
华夏国药	20220405	95.25
江西制药	2012123	95.55
石药欧意	207210622	95.65

3 讨论

3.1 检测器的选择

紫外检测器只能检测出具有紫外吸收的物质,盐酸氨基葡萄糖的结构中没有发色基团,在检测波长195 nm处于乙腈末端吸收,所以在该低波长处检测的盐酸氨基葡萄糖灵敏度较低,吸收值小。相比之下,示差检测器具有广泛的使用范围,是一种高度稳定灵敏的通用型检测器,也是浓度型检测器,能够检测没有特征紫外吸收的物质或者用于无法选择其他检测器检测的样品。只要样品组分与流动相有足够的差别,即可用示差检测器检测。结果显示,采用示差检测器测定盐酸氨基葡萄糖含量的色谱图基线稳定,峰型保持良好,因此本实验采用了示差检测器。

3.2 溶剂的选择

方法学验证前对不同溶剂(80%乙腈溶液、50%乙腈溶液)进行了考察,以获得最佳的溶解效

率和较优的峰型。结果发现采用 80% 乙腈溶液作为溶剂时,部分厂家的氨糖美辛肠溶片未完全溶解,其测定结果盐酸氨基葡萄糖含量较低,查阅其处方组成,含有羧甲基淀粉钠、羟丙纤维素和聚维酮 K30 等辅料不易溶于有机溶剂,且肠溶衣膜的种类和加入增塑剂影响肠溶衣的溶解速率;采用 50% 乙腈溶液作为溶剂时,样品完全溶解,且峰型较好,盐酸氨基葡萄糖含量稳定均一。综上所述,为了避免氨糖美辛肠溶片中盐酸氨基葡萄糖溶解较低,本实验选用 50% 乙腈溶液作为样品溶剂。

3.3 样品前处理方法的考察

《中国药典》2020 年版氨糖美辛肠溶片的质量标准中,供试品溶液进行了超声处理,本研究对不同的超声时间进行了考察,考察其超声时间对氨糖美辛肠溶片中盐酸氨基葡萄糖的含量测定有无影响。将其样品于 50% 乙腈溶液溶解后,分别超声 0、5、10、15、20、25、30 min,依法测定,结果发现其不同超声时间处理的盐酸氨基葡萄糖含量基本一致,是否超声,及超声时间长短对氨糖美辛肠溶片中盐酸氨基葡萄糖含量测定无影响。因此,本研究供试品溶液采用直接溶解的方式,未做超声处理。

3.4 色谱柱的选择

本次试验,采用酰胺基键合亚乙基桥杂化颗粒色谱柱,设计用于亲水作用色谱,保留与分离强极性分离物,与硅胶氨基柱和硅胶酰胺基柱相比,柱寿命大大增强,适合用于糖、糖醇、高级性有机酸、肽、糖肽等的检测分析,盐酸氨基葡萄糖结构中含有醛糖,能与酰胺基键合亚乙基桥杂化颗粒色谱柱发生反应,所以本实验选用酰胺基键合亚乙基桥杂化颗粒色谱柱作为液相色谱分析柱。

3.5 小结

本文建立 HPLC-RID 法测定氨糖美辛肠溶片中盐酸氨基葡萄糖含量的方法,方法分析时间短、灵敏度高,准确性好,样品前处理操作简单、成本低,很好的解决了目前药典方法存在柱效容易下降,主峰拖尾严重的问题。

参考文献

- [1] TANG CH. Research of Pathogenesis and novel therapeutics in arthritis[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(7):1646.
- [2] 谢子立,宋倩. HPLC 法测定氨糖美辛肠溶片中盐酸氨基葡萄糖的含量[J]. 安徽医药,2010,14(6):648.
XIE ZL, SONG Q. Determination of glucosamine hydrochloride in glucosamine indomethacin enteric-coated tablets by HPLC [J]. Anhui Med Pharm J, 2010, 14(6):648.
- [3] YAMAGISHI Y, SOMEYA A, IMAI K, et al. Evaluation of the anti-inflammatory actions of various functional food materials including glucosamine on synovial cells[J]. Mol Med Rep, 2017, 16(2):1353.
- [4] ZHANG H K, LU Y T, WANG Y H, et al. D-glucosamine production from chitosan hydrolyzation over a glucose-derived solid acid catalyst[J]. RSC Advances, 2018, 8(10):5608.
- [5] 徐佳,段希英,吴珺,等. HPLC-CAD 法同时测定氨糖美辛肠溶片中两种成分的含量[J]. 中国药品标准,2023,24(1):52.
XU J, DUAN XY, WU J, et al. Simultaneous determination of two components in glucosamine indomethacin enteric-coated tablets by HPLC-CAD [J]. Drug Stand China, 2023, 24(1):52.
- [6] 宋怡,孔凡建,王泉. 氨糖美辛肠溶片中吲哚美辛含量测定方法的比较研究[J]. 中国药品标准,2018,19(2):130.
SONG Y, KONG FJ, WANG Q. Comparison and research of assay of indometacin in glucosamine indometacin enteric-coated tablets [J]. Drug Stand China, 2018, 19(2):130.

(收稿日期:2023-06-04)