

HPLC-ELSD法同时测定银怡片中2种成分

于桂芳, 胡宝玲, 胡军华, 曹苗苗, 黄文哲, 王振中, 萧伟*

(江苏康缘药业股份有限公司, 江苏连云港 222001)

摘要: 目的 建立高效液相-蒸发光散射检测器 (HPLC-ELSD) 法同时测定银怡片 (骨碎补、葛根、D-氨基葡萄糖硫酸钾盐等) 中氨基葡萄糖、硫酸软骨素的含有量。方法 该药物水提液的分析采用 Waters Xbridge Amide 色谱柱 (酰胺柱, 4.6 mm×150 mm, 3.5 μ m), 以乙腈-50 mmol/L 乙酸铵 (含 0.6% 三乙胺) 为流动相, 等度洗脱 (75: 25); 体积流量 0.8 mL/min; 柱温 40 °C; 蒸发光散射检测器, 漂移管温度 105 °C; 载气 N_2 , 体积流量 2.5 mL/min。结果 氨基葡萄糖盐酸盐、硫酸软骨素钠分别在 0.172 5~0.689 9 mg/mL ($r=0.999\ 9$)、0.168 7~0.674 7 mg/mL ($r=0.999\ 4$) 范围内呈良好的线性关系, 平均加样回收率分别为 95.19%、103.72%, RSD 分别为 1.14%、2.84%。结论 该方法简便灵敏, 重复性好, 可用于银怡片的质量控制。

关键词: 银怡片; 氨基葡萄糖; 硫酸软骨素; HPLC-ELSD

中图分类号: R927.2

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2020)06-1589-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.06.038

氨基葡萄糖是一种从天然甲壳中提取的氨基己糖, 为人体及动物体内关节组织中糖蛋白的天然成分^[1]; 硫酸软骨素是一种从动物软骨中提取的酸性粘多糖^[2], 两者广泛用于增加骨密度类的保健食品中。目前, 国内外法规及文献报道的氨基葡萄糖常用检测方法有紫外分光光度法^[3-4]、HPLC-UV 法^[5-8]、HPLC-ELSD 法^[9-11], 其中紫外分光光度法样品需衍生化处理, 操作繁琐, 稳定性、重复性差; HPLC-UV 法 (包括衍生化法) 灵敏度低, 衍生操作繁琐; HPLC-ELSD 灵敏度高, 但色谱柱大多采用 C₁₈, 出峰时间短, 分离效果差, 少数采用氨基色谱柱, 但重复性差, 而硫酸软骨素常用的检测方法有 Elson-Morgan 法^[12]、咔唑法^[13]、滴定法^[14-15]、HPLC-酶解法^[16]、HPLC-UV^[17-18] 法、HPLC-ELSD 法^[19], 其中前三者操作繁琐, 专属性、准确性差; HPLC-酶解法专属性、准确性好, 但样品处理繁琐, 而且酶试剂价格较高; HPLC-ELSD 偶有报道, 但与氨糖一样, 配套的色谱柱大多为 C₁₈ 和氨基; 目前, 以氨基葡萄糖和硫酸软骨素为原料的保健食品中同时测定两者含有量时主要依据 GB/T 20365-2006^[20], 该方法采用紫外检测器、强阴离子 C₁₈ 色谱柱、离子对试剂, 存在灵敏度低、分离效果差、操作繁琐等不足, 故开发一种操作简便、灵敏度和准确度高、重复性好的方法具有重要意义。本实验针对氨基葡萄糖、硫酸软骨素紫外吸收弱和极性大的问

题, 采用高效液相-蒸发光散射检测器 (HPLC-ELSD) 法结合酰胺色谱柱同时测定银怡片中两者含有量, 以期为该制剂质量控制提供参考。

1 材料

1.1 试剂与药物 D-葡萄糖盐酸盐 (含有量 100%, 批号 140649-201304)、硫酸软骨素钠 (含有量 99.1%, 批号 140792-201702) 对照品均购自中国食品药品检定研究院。D-氨基葡萄糖硫酸钾盐 (批号 0220170355)、硫酸软骨素 (来源牛骨, 批号 072017020) 原料药 (江苏奥新生物工程有限公司)。银怡片为江苏康缘药业股份有限公司在研品种, 是由骨碎补、葛根、D-氨基葡萄糖硫酸钾盐、硫酸软骨素钠、柠檬酸钙、辅料经加工制成的保健食品, 批号 20180201、20180202、20180203。乙腈 (批号 17050287)、三乙胺 (批号 16050721) 为色谱纯 (美国 Tedia 公司); 乙酸铵为色谱纯 [批号 1704005, 阿拉丁试剂 (上海) 有限公司]; 超纯水 (18 Ω)。

1.2 仪器 Agilent 1260 高效液相色谱仪 (美国 Agilent 公司), 配置 Alltech 2000ES ELSD 检测器; XP6 电子天平 (瑞士 Mettler-Toledo 公司); BSA224S-CW 电子天平 (德国 Sartorius 公司); Milli-Q Academic 超纯水机 (美国 Millipore 公司); KQ-500DB 数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); CIMODHG-91438S-III 电热恒温鼓风干燥箱 (上海新苗医疗器械制造有限公司)。

收稿日期: 2018-10-29

作者简介: 于桂芳 (1983—), 女, 硕士, 中级工程师, 从事中药新药及保健食品质量标准研究。Tel: 15189010279, E-mail: gfyu100@126.com

* 通信作者: 萧伟 (1959—), 男, 博士, 研究员级高级工程师, 从事中药新药研究与开发。Tel: (0518) 81152337, E-mail: kan-ionlunwen@163.com

网络出版日期: 2019-06-12

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20190612.1314.002.html>

2 方法与结果

2.1 色谱条件 Waters Xbridge Amide 色谱柱(酰胺柱, 4.6 mm×150 mm, 3.5 μm); 以乙腈-50 mmol/L 乙酸铵(含0.6%三乙胺)为流动相, 等度洗脱(75: 25); 体积流量0.8 mL/min; 柱温40℃; 蒸发光散射检测器, 漂移管温度105℃; 载气N₂, 体积流量2.5 mL/min; 进样量5 μL。

2.2 对照品溶液制备 分别精密称取经105℃干燥4 h的氨基葡萄糖盐酸盐、硫酸软骨素钠对照品4.631、4.705 mg, 置于20 mL量瓶中, 加入2 mL乙腈振荡使其分散均匀, 加水超声溶解后冷却至室温, 水定容至刻度, 摆匀, 即得每1 mL分别含氨基葡萄糖盐酸盐、硫酸软骨素钠0.231 6、0.2 331 mg的低浓度对照品溶液, 同法制备每1 mL分别含两者0.587 7、0.589 3 mg的高浓度对照品溶液。

2.3 供试品溶液制备 取本品适量, 除去薄膜衣研细, 精密称取100 mg, 置于50 mL量瓶中, 加入5 mL乙腈超声1 min, 加水至接近刻度, 超声10 min, 水定容至刻度, 摆匀, 离心, 即得。

2.4 专属性试验 取不含氨基葡萄糖硫酸钾盐、硫酸软骨素钠的阴性样品, 按“2.3”项下方法制备阴性供试品溶液。精密吸取对照品、供试品、阴性供试品溶液各5 μL, 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 结果见图1。由图可知, 供试品呈现与对照品保留时间一致的色谱峰, 阴性供试品在相应保留时间处基本无杂质峰出现, 表明该方法专属性良好。

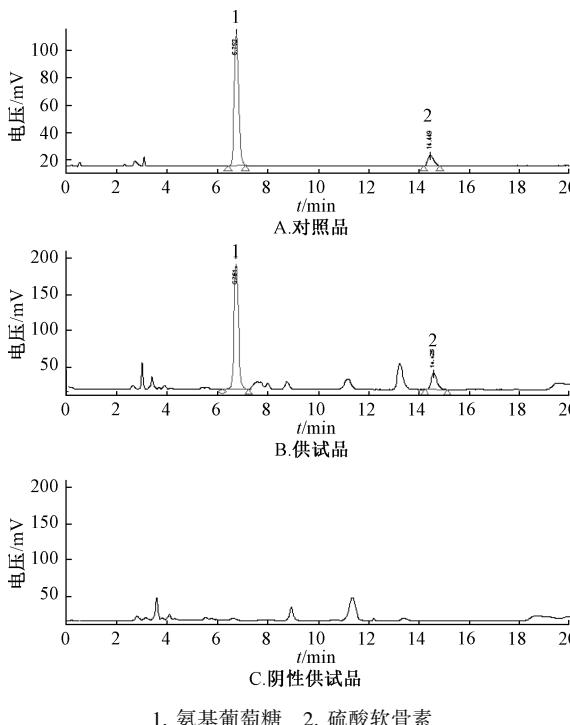


图1 各成分HPLC-ELSD色谱图

2.5 线性关系考察 分别精密称取105℃下干燥4 h的氨

基葡萄糖盐酸盐、硫酸软骨素钠对照品43.118、42.550 mg, 置于10 mL量瓶中, 加入1 mL乙腈振荡使其分散均匀, 加水超声溶解后冷却至室温, 水定容至刻度, 摆匀, 即得每1 mL分别含氨基葡萄糖盐酸盐、硫酸软骨素钠4.311 8、4.216 7 mg的贮备液, 精密量取0.4、0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6 mL于10 mL量瓶中, 水稀释至刻度, 制成每1 mL含氨基葡萄糖盐酸盐0.172 5、0.258 7、0.344 9、0.431 2、0.517 4、0.603 7、0.689 9 mg, 含硫酸软骨素钠0.168 7、0.253 0、0.337 3、0.421 7、0.506 0、0.590 3、0.674 7 mg的系列质量浓度的对照品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样测定。以质量浓度的自然对数为横坐标(X), 峰面积的自然对数为纵坐标(Y)进行回归, 得方程分别为氨基葡萄糖盐酸盐 $Y = 1.362 5X + 6.12$ ($r=0.999 9$)、硫酸软骨素钠 $Y = 1.398 6X + 5.075 8$ ($r=0.999 4$), 分别在0.172 5~0.689 9、0.168 7~0.674 7 mg/mL范围内线性关系良好。

2.6 定量限检测 取低质量浓度对照品溶液逐级稀释, 以S/N=10为定量限, 测得氨基葡萄糖盐酸盐、硫酸软骨素钠分别为0.162、0.283 μg。

2.7 精密度试验 取低、中、高质量浓度对照品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样测定6次, 测得氨基葡萄糖盐酸盐峰面积RSD分别为0.73%、0.66%、1.38%, 硫酸软骨素钠分别为2.47%、2.09%、1.57%, 表明仪器精密度良好。

2.8 稳定性试验 取同一对照品、供试品溶液, 于0、2、4、6、8、10、12、15 h在“2.1”项色谱条件下进样测定, 测得氨基葡萄糖盐酸盐峰面积RSD分别为0.96%、1.97%, 硫酸软骨素钠分别为1.65%、3.15%, 表明溶液在15 h内稳定性良好。

2.9 重复性试验 取同一批样品(批号20180201), 按“2.3”项下方法平行制备6份供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 测得氨基葡萄糖硫酸钾盐、硫酸软骨素钠含有量RSD分别为1.95%、0.32%, 表明该方法重复性良好。

2.10 加样回收率试验 精密称取本品50 mg(批号20180201, 氨基葡萄糖硫酸钾盐、硫酸软骨素钠含有量分别为27.02%、23.16%), 置于50 mL量瓶中, 对照品加入量与所取供试品中待测成分量之比为1:1(以固体形式加入), 按“2.3”平行制备6份供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下测定, 结果见表1。

2.11 样品含有量测定 取本品3批, 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 在“2.1”项色谱条件下进样测定, 结果见表2。此外, 由处方可测得氨基葡萄糖硫酸钾、硫酸软骨素钠理论含有量分别为28%、23%, 可知实测值与理论值较为接近。

3 讨论

3.1 色谱柱选择 亲水性色谱柱(HILIC)适合分离在反相色谱柱上不保留的极性化合物, 尤其是对强极性碱性化

表1 各成分加样回收率试验结果 (n=6)

成分	称样量/mg	原有量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
氨基葡萄糖	49.57	9.540	10.136	19.326	96.55	95.19	1.14
	50.06	9.634	10.248	19.199	93.34		
	49.85	9.594	10.222	19.300	94.96		
	49.35	9.497	10.069	19.072	95.09		
	49.12	9.453	10.128	19.172	95.96		
	49.24	9.476	10.005	19.007	95.26		
硫酸软骨素	49.57	11.480	11.904	23.402	100.15	103.72	2.84
	50.06	11.594	11.073	23.508	107.60		
	49.85	11.545	11.001	23.127	105.27		
	49.35	11.429	10.944	22.610	102.16		
	49.12	11.376	10.931	22.951	105.89		
	49.24	11.404	10.984	22.524	101.24		

表2 各成分含有量测定结果 (n=3)

批号	氨基葡萄糖硫酸钾/%	硫酸软骨素钠/%
20180201	27.02	23.16
20180202	26.64	23.04
20180203	28.01	21.97

注:样品中氨基葡萄糖的存在形式是硫酸钾盐,而相对对照品是盐酸盐,故测定含有量时需考虑换算系数1.404。

化合物的保留能力较强,通常用于分离水溶性极强的极性化合物,而且适配于LC-MS及LC-ELSD。酰胺色谱柱属于HILIC系列,本实验以其分离水溶性成分氨基葡萄糖和硫酸软骨素,保留时间由C₁₈色谱柱的2 min左右延长至7 min(氨基葡萄糖)和15 min(硫酸软骨素)左右,同时保留时间适中,分离效果较好。另外,氨基色谱柱虽也可用于糖类等大极性化合物的分离,但其重复性差,故综合考虑,本实验选择HILIC系列的Amide色谱柱。

3.2 检测器选择 ELSD作为通用型检测器,不依赖于化合物光学特性,对非挥发化学组分均有良好的响应,广泛应用于皂苷、萜类、生物碱、糖等中药成分的质量控制^[21]。另外,氨基葡萄糖、硫酸软骨素几乎无紫外吸收,可不经衍生化直接测定,操作简便,灵敏度高,故选择ELSD检测器。

3.3 流动相选择 本实验比较了乙腈-水、乙腈-甲酸,乙腈-三乙胺、乙腈-乙酸铵、乙腈-乙酸铵-三乙胺等流动相,发现乙腈-水洗脱时氨基葡萄糖、硫酸软骨素均未出峰;乙腈-甲酸洗脱时氨基葡萄糖裂峰,峰形差,而硫酸软骨素未出峰;乙腈-三乙胺洗脱时两者均未出峰;乙腈-乙酸铵洗脱时两者均出峰,但氨基葡萄糖裂峰,而且与硫酸软骨素几乎重合;乙腈-乙酸铵-三乙胺洗脱时,两者保留时间合适,峰形相对较好,故选择该流动相。然后,在此基础上考察乙酸铵、三乙胺的浓度,优选出分离效果最佳的乙腈-50 mmol/L乙酸铵(含0.6%三乙胺)。

3.4 与GB 20365-2006方法对比 前期取同一批样品(批号20180201),按照GB 20365-2006方法测定,发现氨基葡萄糖、硫酸软骨素几乎无保留,均在2 min左右出峰,与杂质峰的分离度小于1.0,无法准确测定两者含有量。本实验发现2种成分分别在6、14 min左右出峰,保留时间适

中,分离度大于1.5,而且所测含有量与相应理论值接近。

4 结论

本实验采用HPLC-ELSD法,参考GB/T 20365-2006中供试品处理方法同时测定银怡片中氨基葡萄糖、硫酸软骨素的含有量,经方法学验证发现,该成分专属性、精密度、准确性、重复性等较好,而且操作简便,灵敏度高,适合增加骨密度类保健食品中2种成分含有量的同时测定,并为该类产品质量控制提供参考依据。

参考文献:

- [1] 江敏.氨基葡萄糖的药理学研究进展[J].中国药房,2010,21(17):1622-1624.
- [2] 曹岳华,彭国庆,刘辉.硫酸软骨素在医学上的应用概况[J].中南药学,2010,8(3):222-225.
- [3] WS1-(X-090)-2005Z,国家药品标准[S].
- [4] 王维,尤瑜敏,周培根.D-氨基葡萄糖测定方法的比较[J].食品研究与开发,2003,24(2):84-87.
- [5] 李璟,李志伟,王立峰.HPLC法测定盐酸氨基葡萄糖口腔崩解片中盐酸氨基葡萄糖的含量[J].河北医科大学学报,2010,31(1):69-71.
- [6] 廖栩,王淑君,佟岩,等.柱前衍生化法测定盐酸氨基葡萄糖软膏的含量[J].沈阳药科大学学报,2011,28(5):380-383.
- [7] 杨华良,雷勇胜.HPLC法测定盐酸氨基葡萄糖颗粒中盐酸氨基葡萄糖的含量[J].天津药学,2011,23(6):17-19.
- [8] 张洁,马青青,张欣烨,等.反相HPLC测定盐酸氨基葡萄糖含量[J].环境卫生学杂志,2015,5(6):552-555.
- [9] 王太亮,王子秦.HPLC-ELSD法测定氨糖美辛肠溶胶囊中盐酸氨基葡萄糖及相关物质[J].中国生化药物杂志,2016,36(6):194-196.
- [10] 潘柏良,刘霞.HPLC-ELSD法测定盐酸氨基葡萄糖胶囊中主成分的含量[J].中国药房,2013,24(16):1517-1518.
- [11] 杨淮,王崇益.HPLC-ELSD法测定盐酸氨基葡萄糖胶囊中盐酸氨基葡萄糖的含量[J].淮阴师范学院学报(自然科学版),2015,14(1):48-51.
- [12] 中华人民共和国卫生部药典委员会.中华人民共和国卫生

- 部颁药品标准抗生素生化药品注释（第一册 1989）[S]. 1990; 43-45.
- [13] 于兹东, 杨桂明, 高华, 等. 呋唑分光光度法测定硫酸软骨素[J]. 青岛大学学报(自然科学版), 2005, 18(3): 41-44.
- [14] The United States Pharmacopeial Convention. United States Pharmacopoeia (USP37-NF32) and First Supplement to USP37-NF32[S]. 2014: 6529-6532.
- [15] European Directorate for the Quality of Medicines & Health-Care. European Pharmacopoeia 8.0[S]. 2009: 1876-1878.
- [16] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015年版二部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 1340-1341.
- [17] 姜欣悦, 张辉珍, 高华. HPLC法测定软骨素复合胶囊中硫酸软骨素的含量[J]. 青岛大学学报(工程技术版), 2015, 30(2): 80-82; 113.
- [18] 王敏娟, 聂晓玲, 胡佳薇, 等. 亲水作用色谱法同时测定保健品中的硫酸软骨素和氨基葡萄糖[J]. 中国卫生检验杂志, 2017, 27(17): 2475-2477.
- [19] 林燕飞, 孙静芸. HPLC-ELSD法测定复方氨基葡萄糖片中硫酸软骨素的含量[J]. 中国现代应用药学杂志, 2006, 23(5): 388-390.
- [20] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 20365-2006 硫酸软骨素和盐酸氨基葡萄糖含量的测定 液相色谱法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2006.
- [21] 曹邦静, 苏娟, 叶霁, 等. 蒸发光散射检测器在中药分析中的应用[J]. 药学实践杂志, 2015, 33(1): 13-16.

基于延胡索投料情况研究宫炎康颗粒质量现状

曹欢, 袁杨, 林林, 笔雪艳*

(黑龙江省药品检验研究中心, 黑龙江哈尔滨 150088)

摘要: 目的 对延胡索投料情况进行全面分析, 以进一步反映宫炎康颗粒质量现状。方法 参照2015年版《中国药典》通则相关方法及要求, 首先建立异性有机物法, 其次优化统一延胡索薄层色谱法、金胺O染色检查法, 再采用HPLC法测定延胡索乙素含有量。结果 显微鉴别可快速检视成药中延胡索及非原粉投料药材中相应植物的组织特征。TLC斑点清晰, 分离度良好, 阴性无干扰, 可快速鉴别延胡索, 筛查金胺O染色情况。延胡索乙素在23.26~2325.68 ng范围内线性关系良好($r=1.0000$), 平均加样回收率为95.4%, RSD为3.6%。金胺O检查法分离效果好, 阴性无干扰。结论 该方法简便可靠, 结果稳定, 重复性好, 可从安全性、有效性、可控性等多方面综合控制宫炎康颗粒质量。

关键词: 宫炎康颗粒; 延胡索; 显微鉴别; TLC; HPLC

中图分类号: R927.2

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2020)06-1592-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.06.039

延胡索又名元胡, 为罂粟科植物延胡索 *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang 的干燥块茎, 能活血、行气、止痛, 用于胸胁、脘腹疼痛等症。如今其市场需求量较大, 逐渐出现不法商贩以次充好、以假冒真、牟取暴利等现象, 其常见伪品有薯蓣珠牙、天南星等, 经金胺O染色加工后使用, 对成药质量及消费者健康安全均有极大影响^[1-5]。

宫炎康颗粒由当归、醋香附、川芎、海藻、赤芍、炮姜、红花、盐车前子、北败酱、泽兰、柴胡、延胡索12味药材组成^[6], 具有活血化瘀、解毒消肿的功效, 临幊上用于治疗慢性盆腔炎^[7-8], 尚无不良反应报道。本品共2个规格, 规格一每袋装9 g(无蔗糖), 规格二每袋装9 g, 对近

20个生产企业的调研发现, 方中延胡索均是粉碎后, 原粉入药, 其他药材则为提取后的挥发油及清膏入药。现有标准中, 宫炎康颗粒及其他系列制剂的含有量测定指标大多为芍药苷^[9-10], 很少涉及阿魏酸^[11-12], 也尚无延胡索含有量控制的方法^[13]。因此, 本实验基于延胡索现状, 以及宫炎康颗粒工艺特点、标准缺陷等因素, 对方中该药材投料情况进行全面质量研究, 以期为其相关标准的完善提供依据, 保障人民用药安全。

1 材料

1.1 仪器 DM2500 Leica 荧光显微镜; Linomat5 半自动点样仪; Agilent 1100 液相色谱仪; Waters e2695 液相色谱仪;

收稿日期: 2018-12-07

基金项目: 2016年国家药品抽验计划(2016)

作者简介: 曹欢(1989—), 女, 硕士, 主管药师, 从事中药质量标准研究。Tel: (0451) 53638792-2704, E-mail: 996307262@qq.com

*通信作者: 笔雪艳(1973—), 女, 博士, 主任药师, 硕士生导师, 从事中药质量标准研究。Tel: (0451) 53638792-2601, E-mail: 65554629@qq.com