高效液相色谱法和电位滴定法测定药物中硫酸氨基葡萄糖含量

邓美健*

(厦门蓝湾科技有限公司, 厦门 361026)

摘 要: 目的 探索高效液相色谱法和电位滴定法测定药物中硫酸氨基葡萄糖含量的适用性。**方法** 对两种方法测定硫酸氨基葡萄糖含量的专属性、线性、准确度、中间精密度等项目进行测试和结果分析。**结果** 两种方法进行硫酸氨基葡萄糖含量测定的结果无显著性差异, 方法的准确度和精密度等结果均较好。**结论** 两种方法均能够实现自动化检测、操作简便, 对于大批量检测具有着较大的实际应用价值。

关键词: 硫酸氨基葡萄糖; 含量测定; 电位滴定法; 高效液相色谱法; 方法对比

0 引 言

氨基葡萄糖是一种天然的氨基单糖, 在人体主要存在于关节软骨中, 对维持关节软骨的正常结构、改善骨质疏松有辅助作用[1-2]。其衍生物广泛应用于药品、保健食品等领域, 可单独给药治疗膝骨关节炎, 其疗效与 *L*-谷氨酰胺、塞来昔布相当[3-4], 也可与非甾体抗炎药、玻璃酸钠等联合用药[5-6]或结合中医技术进行治疗[7-8]。近年来, 氨基葡萄糖衍生物在人神经母细胞瘤细胞系 SH-SY5Y[9]、骨肉瘤细胞系 MG-63 和 SaOS-2[10]等多种细胞系的抗癌作用和机制已被证实, 氨基葡萄糖未来可能有新的应用领域。

硫酸氨基葡萄糖是氨基葡萄糖的一种重要衍生物, 由于其本身吸湿性强、稳定性相对较差的特性, 市售衍生物多为盐酸氨基葡萄糖或硫酸氨基葡萄糖氯化钠/氯化钾复盐, 因此硫酸氨基葡萄糖相关的质量研究并不多, 为严格控制产品质量, 提升检测效率, 需要探索适用于硫酸氨基葡萄糖的快速准确的含量测定方法。

本研究对高效液相色谱-蒸发光散射检测法和电位滴定法进行探究, 为实际生产中硫酸氨基葡萄糖的分析测定提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

D-盐酸氨基葡萄糖(含量 99.9%, 中国食品药品检定研究院); 盐酸、氢氧化钠(分析纯, 广东西陇科学股份有限公司); 乙腈[色谱纯, 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司]; 硫酸氨基葡萄糖(厦门某公司)。

1.2 仪器与设备

Waters AcQuity Arc-2424 高效液相色谱仪-蒸发光散射检测器[沃特世科技(上海)有限公司]; ZDJ-3D 全自动电位滴定仪(北京先驱威锋技术开发公司); AUW 120D 十万分级分析天平(日本岛津制作所); GH-252 十万分级分析天平(日本株式会社)。

1.3 方 法

1.3.1 高效液相色谱法

(1)标准工作曲线

精密称取 *D*-盐酸氨基葡萄糖适量, 用水溶解并稀释制成约 0.4、0.6、0.8、1.0、1.2 mg/mL 的标准工作曲线溶液。

(2)供试品溶液配制

精密称取硫酸氨基葡萄糖, 用水溶解并稀释成约 1 mg/mL 的溶液。

(3)测定参数

以氨基硅烷键合硅胶为填充剂(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 以乙腈:水(70:30, *V*:*V*)为流动相; 流速 1 mL/min; 柱温 35 ℃; 进样量 10 μL, 采集时间 10 min。

(4)测定方法

分别取标准工作曲线溶液 10 μL 注入液相色谱仪, 按 1.3.1(3)的条件测定, 记录色谱图。以溶液质量浓度的对数值为横坐标(*X*)和主峰面积的对数值为纵坐标(*Y*)计算线性回归方程。取供试品溶液 10 μL, 同法测定, 计算供试品含量。

第一作者/*通信作者: 邓美健, 中级工程师, 主要研究方向为食品及药品分析检测。E-mail: dengmeijian@bluebayst.com

1.3.2 电位滴定法

(1)试液准备

0.1 mol/L 盐酸溶液、氢氧化钠滴定液(0.1 mol/L)。

(2)测定方法

取硫酸氨基葡萄糖约0.2 g, 精密称定, 加50 mL水溶解; 加入 0.1 mol/L 盐酸溶液 1 mL, 用氢氧化钠滴定液(0.1 mol/L)滴定, 2 次突跃体积差为滴定体积, 每 1 mL 氢氧化钠滴定液(0.1 mol/L)相当于 22.82 mg 的硫酸氨基葡萄糖。

1.4 数据处理

液相数据处理采用 Empower 3 软件 7.0.3471.909, 其他数据采用 WPS 12.1.0.25225 软件进行统计分析。计数结果以例数和百分比表示, 组间数据差异比较采用 Z 检验。

2 结果与分析

2.1 高效液相色谱法相关参数

2.1.1 方法线性(一)

线性结果表明, 在 0.4~1.2 mg/mL 的质量浓度范围内, 回归方程 Y=1.7086X+6.8195, 相关系数 r=0.99991, 线性关系良好。

2.1.2 方法准确度试验(一)

以 D-盐酸氨基葡萄糖对照品按供试品溶液 80%、100%、120%浓度水平分别配制 3 份进行回收率测试, 9 份回收率结果为 101.49%~103.73%, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 0.9%; 回收率平均值±不确定度的范围处于 95.0%~105.0%之间(表 1), 准确度较好。

2.1.3 方法精密度试验(一)

平行称 6 份硫酸氨基葡萄糖进行检测, 含量结果为 95.9%~98.5%, RSD 为 1.0%(表 2), 符合限度规定, 精密度较好。

2.2 电位滴定法相关参数

2.2.1 方法线性(二)

依次称取约 0.12, 0.16、0.18、0.20、0.22、0.24 g 的 D-盐酸氨基葡萄糖进行滴定, 以称重量为横坐标(X, g), 滴定体积为纵坐标(Y, mL), 绘制标准工作曲线, 结果表明, 电位滴定法在称量为 0.12~0.24 g(对应限度的 60%~120%)内, 回归方程 Y=46.039X+0.0354, 相关系数 r=0.9999, 线性关系良好。

2.2.2 方法准确度试验(二)

以 D-盐酸氨基葡萄糖按方法的 80%、100%、120%称量模拟对应限度水平进行回收率测试, 9 份回收率结果为 100.47%~100.91%, RSD 为 0.2%; 回收率平均值±不确定度的范围处于 95.0%~105.0%之间(表 3), 准确度较好。

表 1 高效液相色谱法准确度测定结果

质量/mg	峰面积	计算质量浓度/(mg/mL)	回收率/%	RSD/%
81.88	4992378	0.8493	103.73	0.9
80.96	4828504	0.8329	102.88	
80.78	4875342	0.8376	103.69	
100.08	6777226	1.0157	101.49	
100.36	6853468	1.0224	101.87	
100.45	6966364	1.0322	102.76	
120.33	9308720	1.2230	101.64	
120.75	9402008	1.2302	101.88	
120.59	9360211	1.2270	101.75	
回收率平均值	102.4%	不确定度	0.7%	

表 2 高效液相色谱法精密度测定结果

质量/g	供试品溶液主峰峰面积	含量/%	平均含量/%	RSD/%
0.25271	6124137	96.9	97.3	1.0
0.25509	6117856	95.9		
0.25355	6261109	97.8		
0.25117	6129713	97.5		
0.25080	6222347	98.5		
0.25485	6240676	97.1		

表 3 电位滴定法准确度测定结果

质量/g	滴定体积/mL	回收率/%	RSD/%
0.1604	7.373	100.81	0.2
0.1604	7.372	100.80	
0.1603	7.368	100.81	
0.2001	9.181	100.61	
0.2009	9.233	100.77	
0.2007	9.222	100.75	
0.2405	11.043	100.66	
0.2401	11.051	100.91	
0.2405	11.022	100.47	
回收率平均值	100.7%	不确定度	0.2%

注: 氢氧化钠滴定液浓度为 0.1016 mol/L。

2.2.3 *方法精密度试验(二)*

平行称量硫酸氨基葡萄糖 6 份进行检测, 含量为 97.7%~98.7%, RSD 为 0.5%(表 4), 符合限度规定, 精密度较好。

表 4 电位滴定法精密度测定结果

质量/g	滴定体积/mL	含量/%	平均含量/%	RSD/%
0.2017	8.227	98.0	98.2	0.5
0.2014	8.189	97.7		
0.2006	8.241	98.7		
0.2016	8.204	97.8		
0.2008	8.224	98.4		
0.2009	8.229	98.4		

2.3 两种方法对比分析

由二人分别用两种方法测定同批硫酸氨基葡萄糖, 对结果进行 *Z* 检验(表 5)。

表 5 *Z* 检验结果表(%)

序号	电位滴定法含量		高效液相色谱法含量	
	实验员 1	实验员 2	实验员 1	实验员 2
1	98.0	98.0	96.9	98.2
2	97.7	98.5	95.9	96.9
3	98.7	98.4	97.8	97.9
4	97.8	97.9	97.5	99.8
5	98.4	98.6	98.5	96.8
6	98.4	98.4	97.1	98.3
平均值	98.2	98.3	97.3	98.0
RSD	0.5	0.3	1.0	1.2
双人平均值	98.2		97.6	
标准差(σ)	0.334		1.013	

假设这两个样本分别来自均值为 μ_1 和 μ_2 和的正态总体, 取检验统计量 *Z*, 则 *Z* 满足公式(1):

$$Z=\frac{\overline{X}-\overline{Y}-(\mu_1-\mu_2)}{\sqrt{\frac{\sigma_1^2}{m}-\frac{\sigma_2^2}{n}}}\sim N(0,1) \quad (1)$$

式中: $\overline{X}$ 和 $\overline{Y}$ 分别为两种方法测定的含量结果平均值, %; σ_1、σ_1 分别为两种方法双人 12 份测定结果的标准差, %; *m*、*n* 为样本量, 取值 12。假定 2 个方法的检测结果没有差异, 即假设 H_0: $\mu_1=\mu_2$ 成立, 代入得检验统计量的观测值为 *Z*=1.921, 在显著性水平 α=0.05 下, 查标准正态分布表得 $Z_{0.975}(m+n-2)$=2.074。

Z=1.921<2.074, 因此接受 H_0, 即两种方法结果的平均值没有显著差异, 可认为两种方法测定结果基本一致。

综合来看, 高效液相色谱法可同时用作定性鉴别, 专属性优于电位滴定法; 两种方法在指定范围内线性关系良好(r>0.995), 3 水平 9 份的回收率及 RSD 均较好, 结果准确; 电位滴定法的精密度稍优于高效液相色谱法; 两种方法测定结果没有显著性差异, 能通用于硫酸氨基葡萄糖的含量分析。

3 结 论

通过对两种方法测定硫酸氨基葡萄糖含量的专属性、线性、准确度、中间精密度等项目进行测试和结果分析, 确认两种方法均能准确、可靠地反映产品中硫酸氨基葡萄糖的含量。

相较于传统的分光光度法和近年来热门研究方向的衍生化法[11-12], 本研究的两种方法不使用显色剂或衍生化试剂, 前处理简单, 操作简便, 且能够实现自动化检测, 对于实际生产中硫酸氨基葡萄糖的含量分析, 尤其是对大批量产品的检测具有着较大的应用价值。但本研究未进行两种方法检测限和定量限的研究, 后续可根据实际应用需求进行完善, 以适用于不同含量水平的硫酸氨基葡萄糖的分析测定。

参考文献

[1] KWATRA B. Collagen supplementation: Therapy for the prevention and treatment of osteoporosis and osteoarthritis: A review [J]. World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 2020, 9(5): 589-604.

[2] CHELESCHI S, TENTI S, GIANNOTTI S, *et al*. A combination of celecoxib and glucosamine sulfate has anti-inflammatory and chondroprotective effects: Results from an *in vitro* study on human osteoarthritic chondrocytes [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(16): 8980.

[3] BRUYÈRE O, ALTMAN RD, REGINSTER JY. Efficacy and safety of glucosamine sulfate in the management of osteoarthritis: Evidence from real-life setting trials and surveys [J]. Seminars in Arthritis and Rheumatism, 2016, 45(4): S12-S17.

[4] HU Z, WANG C, CHEN W, *et al*. The comparative efficacy of *L*-glutamine, celecoxib, and glucosamine sulfate in osteoarthritis management [J]. Scientific Reports, 2025, 15(1): 8992.

[5] VERONESE N, ECARNOT F, CHELESCHI S, *et al*. Possible synergic action of non-steroidal anti-inflammatory drugs and glucosamine sulfate for the treatment of knee osteoarthritis: A scoping review [J]. BMC Musculoskelet Disord, 2022, 23(1): 1084.

[6] 陈志波. 采用氨基葡萄糖联合玻璃酸钠治疗膝关节骨性关节炎的临床效果研究[J]. 北方药学, 2025, 22(1): 75-77.

[7] 邹冕, 曹寅生, 危建文. 浮针联合硫酸氨基葡萄糖治疗肝肾亏虚型膝骨关节炎临床观察[J]. 山西中医, 2025, 41(6): 32-33.

[8] 李剑峰, 张君, 谭可可, 等. 增生疗法联合氨基葡萄糖治疗膝骨关节炎的疗效分析[J]. 中国疼痛医学杂志, 2024, 30(11): 873-875.

[9] SAHIN B, GUNES H, OZTURK A. Investigation of the mechanisms involved in anticancer effect of glucosamine sulfate on SH-SY5Y cell line [J]. Bratislavske Lekarske Listy, 2022, 123(5): 366-371.

[10] POHLIG F, ULRICH J, LENZE U, *et al*. Glucosamine sulfate suppresses the expression of matrix metalloproteinase-3 in osteosarcoma cells *in vitro* [J]. BMC Complementary Medicine and Therapies, 2016, 16(1): 313.

[11] 喻琼, 卢鑫, 黄康惠, 等. 邻苯二甲醛柱前衍生法测定食品中盐酸氨基葡萄糖的含量[J]. 食品科技, 2023, 48(2): 273-279.

[12] 李煜, 张淼, 孔祥文, 等. 柱后衍生-荧光检测-HPLC 法测定硫酸氨基葡萄糖胶囊的含量和溶出度[J]. 药物分析杂志, 2020, 40(7): 1292-1299.