

## 吡唑法同时测定玻璃酸钠和硫酸软骨素的含量

万秀玉<sup>1</sup>, 白若琬<sup>1</sup>, 姜雯<sup>2</sup>, 张天民<sup>3</sup> (1 山东博士伦福瑞达制药有限公司, 山东 济南 250101; 2 辽宁省食品药品检验所, 辽宁 沈阳 110023; 3 山东大学药学院, 山东 济南 250012)

**摘要** 目的: 建立吡唑法同时测定玻璃酸钠 (SH) 和硫酸软骨素 (CS) 含量的方法。方法: 通过醋酸钠调节样品的酸碱度和离子强度, 氯化十六烷基吡啶 (CPC) 可选择性地沉淀 CS 而 SH 不沉淀, 从而将 SH 和 CS 进行分离。结果: 样品预处理条件为: 精密量取 SH 和 CS 的混合溶液 10 mL, 加入醋酸钠 1.6 g (12.5 mmol/L CPC) 10 mL, 充分搅拌后, 静置 1 h, 20 μm 滤膜过滤; 滤液用于测定 SH 的含量; 滤饼经 1.4 mol/L 氯化钠溶液超声解离后, 用于测定 CS 的含量; SH 和 CS 的平均回收率分别为 101.2% 和 99.4%, RSD 分别为 1.05% 和 0.96%。结论: 本法可同时测定 SH 和 CS 的含量, 相互之间无干扰。

**关键词** 吡唑法; 玻璃酸钠; 硫酸软骨素; 氯化十六烷基吡啶; 含量测定

中图分类号: R94 文献标识码: A 文章编号: 1006-0111(2009)04-0282-03

## Carbazole method for simultaneous determination of sodium hyaluronate and chondroitin sulfate

WAN Xi-yu<sup>1</sup>, BAI Ruowan<sup>1</sup>, JIANG Wen<sup>2</sup>, ZHANG Tianmin<sup>3</sup> (1. Shandong Bausch & Lomb Freda Pharmaceutical Co., Ltd., Jinan 250101, China; 2. Liaoning Province Institute for Control of Food and Drug Products, Shenyang 110023, China; 3. School of Pharmacy, Shandong University, Jinan 250012, China)

**ABSTRACT Objective** To establish a carbazole method for the simultaneous determination of sodium hyaluronate (SH) and chondroitin sulfate (CS). **Methods** By regulating acidity or alkalinity and ionic strength with sodium acetate, CS was selectively precipitated with cetylpyridinium chloride (CPC), whereas SH was not. So SH and CS were separated. **Results** The sample pretreatment conditions were as follows: Measuring 10 mL mixture of SH and CS accurately, adding 1.6 g sodium acetate and 10 mL CPC of 12.5 mmol/L, standing for 1 h after stirring thoroughly, then, the solution was filtered with 20 μm filter membrane and the filtrate was used to determine the content of SH; the precipitates on the filter membrane were resolved with 1.4 mol/L NaCl solution by ultrasonic treatment for the determination of CS. The average recoveries of SH and CS were 101.2% and 99.4% with RSD of 1.05% and 0.96%, respectively. **Conclusion** This method can be used for the simultaneous determination of SH and CS without interference with each other.

**KEY WORDS** carbazole method; sodium hyaluronate; chondroitin sulfate; cetylpyridinium chloride; determination

玻璃酸钠 (sodium hyaluronate, SH) 和硫酸软骨素 (chondroitin sulfate, CS) 均为生物体内存在的酸性黏多糖, 其化学性质相近。近年来, 两者在临床中的应用很广泛, 同时含有 SH 和 CS 两种成分的制剂亦逐渐被研制开发。但当两者共存于制剂中时, 其含量测定相互干扰。国外曾报道<sup>[1]</sup>, 在 pH 9.1 的缓冲溶液中, 硫酸软骨素酶 ABC 可选择性地将 CS 降解为双糖, 而 SH 不被降解, 采用 HPLC 法可同时测定 SH 和 CS 的含量。但上述方法所用硫酸软骨素酶 ABC 和双糖对照品在国内较难得到。

本法通过醋酸钠调节样品的 pH 和离子强度, 氯化十六烷基吡啶 (CPC) 可选择性地沉淀 CS 而

SH 不沉淀, 从而将两者进行分离, 采用吡唑法<sup>[2]</sup>同时测定 SH 和 CS 的含量。

### 1 仪器与试剂

8435 紫外可见分光光度计 (美国 Agilent 公司); R160P 电子分析天平 (精度 ±0.01 mg 德国 Sartorius 公司)。

D-葡萄糖醛酸对照品 (中国药品生物制品检定所); SH (山东福瑞达生物化工有限公司); CS (烟台东诚生化有限公司); CPC (国药集团化学试剂有限公司, 进口分装); 其它测定用试剂均为国产分析纯。

### 2 方法与结果

**2.1 SH 与 CS 分离条件的选择** SH 和 CS 的水溶液均能与 CPC 形成沉淀。采用醋酸钠调节样品的酸碱

度和离子强度,按 2 2所示操作,加醋酸钠 1.6 g时,CS可选择性地与 CPC 形成沉淀,而 SH 不沉淀。

固定醋酸钠的用量和 CPC 溶液的浓度 (12.5 mmol/L),按 2 2和 2 3所示操作,改变 CPC 溶液的体积,SH 和 CS 的回收率变化分别见图 1和图 2。

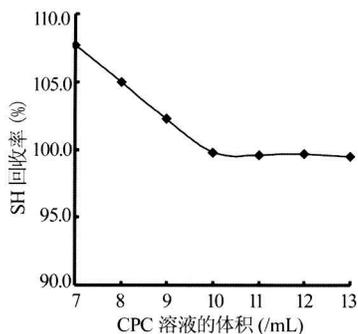


图 1 CPC 对 SH 回收率的影响

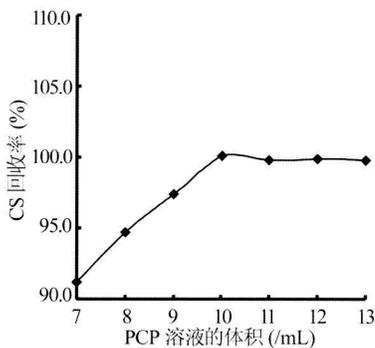


图 2 CPC 对 CS 回收率的影响

由图 1和图 2可见,本实验条件下,加入 12.5 mmol/L 的 CPC 溶液 10 mL 时,SH 和 CS 可完全分离,其含量测定互不干扰。

**2 2 SH 与 CS 的分离** 精密量取 SH 和 CS 的混合溶液 10 mL 置小烧杯中,加入醋酸钠 1.6 g 搅拌,使醋酸钠溶解后,精密加入 12.5 mmol/L 的 CPC 溶液 10 mL,充分搅拌,静置 1 h,20 μm 微孔滤膜滤过,滤液和滤饼备用。

**2 3 供试品溶液的制备**

**2 3 1 SH 供试品溶液** 2 2项下制备的滤液,用水定量稀释制成每 1 mL 中约含 SH 0.1 mg 的溶液。

**2 3 2 CS 供试品溶液** 2 2项下制备的滤饼,置小烧杯内,加 1.4 mol/L 氯化钠溶液约 30 mL,超声处理,将溶液定量转移至量瓶中,重复处理 3 次。用 1.4 mol/L 氯化钠溶液定量稀释制成每 1 mL 中约含 CS 0.1 mg 的溶液。

**2 4 对照品溶液的制备**

**2 4 1 测定 SH 对照品溶液** 取经 105 °C 干燥至恒

重的葡萄糖醛酸对照品,加水制成每 1 mL 中约含 0.1 mg 的溶液,即得。

**2 4 2 测定 CS 对照品溶液** 取经 105 °C 干燥至恒重的葡萄糖醛酸对照品,加 1.4 mol/L 氯化钠溶液制成每 1 mL 中约含 0.1 mg 的溶液,即得。

**2 5 供试品溶液的测定** 精密量取供试品溶液 1 mL,置 25 mL 具塞试管中,冷却至 4 °C 以下,在振摇下缓缓滴加 0.025 mol/L 硼砂硫酸溶液 5.0 mL,置沸水浴中加热 10 min 放冷,精密加入咪唑试液 (咪唑 0.25 g 加无水乙醇 200 mL) 0.2 mL,摇匀,置沸水浴中加热 15 min 放冷,在 524 nm 波长处测定吸光度 (波长的选择见 2.6)。对照品溶液按供试品溶液的操作,自“冷却至 4 °C 以下”起,同法操作,计算,即得。

**2 6 最大吸收波长的选择** 取 2.3 项制备的 SH 和 CS 供试品溶液和 2.4 项制备的 SH 和 CS 对照品溶液,按 2.5 项下的方法经咪唑显色后,在 500~600 nm 区间进行扫描。结果 SH 和 CS 的对照品溶液和供试品溶液在 524 nm 波长处均有最大吸收。

**2 7 方法回收率**

**2 7 1 SH 的回收率** 取 SH 原料适量,精密称定,加 1 mg/mL 的 CS 溶液制成每 1 mL 约含 SH 0.80、1.0 和 1.2 mg 的溶液,分别按 2.3.1 和 2.4.1 项制备 SH 供试品和对照品溶液,照 2.5 项测定 SH 的含量,结果 SH 的平均回收率为 101.2%,RSD 为 1.05%。

**2 7 2 CS 的回收率** 取 CS 原料适量,精密称定,加 1 mg/mL 的 SH 溶液制成每 1 mL 约含 CS 0.80、1.0 和 1.2 mg 的溶液,分别按 2.3.2 和 2.4.2 项制备 CS 供试品和对照品溶液,照 2.5 项测定 CS 的含量,结果 CS 的平均回收率为 99.4%,RSD 为 0.96%。

**2 8 干扰物质实验** 选用液体制剂中常用辅料三氯叔丁醇等作为干扰因素进行实验,各干扰物质在溶液中的用量及其影响结果见表 1。

表 1 各干扰物质对 SH 和 CS 含量的影响

干扰物质	质量浓度 (%)	RSD (%)	
		CS	SH
三氯叔丁醇	0.30	1.04	0.94
苯扎溴铵	0.03	0.87	1.16
羟苯乙酯	0.03	1.21	1.02
磷酸盐缓冲液 (pH 5.8)	等渗浓度	0.68	1.27
磷酸盐缓冲液 (pH 5.8)	等渗浓度	0.65	0.99

**3 讨论**

**3 1 SH 与 CS 不同浓度比对本方法的影响** 在已知浓度为 1 mg/mL CS 溶液中,分别加入不同浓度 (下转第 293 页)

HPLC-UV 方法,但是由于人参皂苷 R<sub>e</sub> 较弱的紫外吸收,只能选择末端吸收作为检测波长,势必带来较大的测定误差<sup>[9-12]</sup>。本实验结果表明,采用 HPLC-ELSD 方法测定人参茎叶总皂苷中人参皂苷 R<sub>e</sub> 的含量,简便、准确、可靠,可用于人参茎叶总皂苷的质量控制。

参考文献:

[1] 罗兰,殷惠军,张颖,等. 人参果总皂苷对高脂饲养大鼠胰岛素敏感指数的影响 [J]. 中西医结合学报, 2005 3 (6): 463.  
 [2] 李敏,凌昌全,黄雪强,等. 人参茎叶皂苷对热损伤大鼠不同脏器糖皮质激素受体的影响 [J]. 中西医结合学报, 2006 4 (2): 156.  
 [3] 李勇,李敏,王喜,等. 人参茎叶皂甙增强糖皮质激素受体转录激活效应的实验研究 [J]. 中国中西医结合杂志, 2004, 24(8): 710.  
 [4] 李敏,凌昌全,沈志雷,等. 人参茎叶皂甙提高机体耐热受能力作用 [J]. 中国公共卫生, 2003 19(12): 1473.  
 [5] 凌昌全,李敏,苏永华,等. 人参茎叶皂苷对失血性休克

大鼠糖皮质激素受体的影响 [J]. 中草药, 2003 34 (5): 433.  
 [6] 凌昌全,沈志雷,黄雪强,等. 人参茎叶皂苷对热损伤大鼠糖皮质激素受体的影响 [J]. 第二军医大学学报, 2003, 24 (8): S16 F003.  
 [7] 程俊霖,朱玲,赵妍妍. 人参茎叶总皂苷对衰老小鼠的作用研究 [J]. 四川生理科学杂志, 2004 26(3): 97.  
 [8] 庞慧民,朱玉琢,明月,等. 人参茎叶总皂苷对培养的人视网膜色素上皮细胞增生的抑制作用 [J]. 吉林大学学报 (医学版), 2002, 28(4): 363.  
 [9] 王光忠,胡迪,邹阳. RP-HPLC 测定五参芪口服液中人参皂苷 R<sub>g1</sub> 和人参皂苷 R<sub>e</sub> 的含量 [J]. 中成药, 2006, 28 (4): 495.  
 [10] 朱照静,邓开英. 红参中人参皂苷 R<sub>g1</sub> 和人参皂苷 R<sub>e</sub> 的含量测定 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2003 9(5): 10.  
 [11] 李长新,亓校鹏. 高效液相色谱法测定人参茎叶总皂苷胶囊中人参皂苷 R<sub>e</sub> 的含量 [J]. 黑龙江医药, 2005 18(4): 244.  
 [12] 朱文良,李发美. HPLC 法同时测定复方黄芪注射液中人参皂苷 R<sub>g1</sub>、R<sub>g2</sub> 含量 [J]. 沈阳药科大学学报, 2006, 23(9): 577.

收稿日期: 2008-11-05

(上接第 283 页)

的 SH (从 0 增加至 1 mg/mL, 因 SH 溶液的黏度较大,未对更高浓度的 SH 进行相关实验),测定 CS 的含量,测定结果均在本方法的误差范围内。同样在已知浓度为 1 mg/mL SH 溶液中加入不同浓度的 CS (从 0 增加至 5 mg/mL),测定 SH 的含量,结果也均在本方法的误差范围内。可见,本实验条件下 SH 和 CS 浓度的不同比例对本方法无影响。

**3.2 不同批次的 SH 对本方法的影响** 在已知浓度为 1 mg/mL CS 溶液中,分别加入 3 个不同批次的 SH (浓度均为 1 mg/mL),分别测定 CS 的含量,测定结果均在本方法的误差范围内。这表明,本实验条件下,不同批次的 SH 对本方法无影响。

**3.3 不同批次的 CS 对本方法的影响** 在已知浓度为 1 mg/mL SH 溶液中,分别加入 3 个不同批次的 CS (浓度均为 1 mg/mL),分别测定 SH 的含量,测定结果均在本方法的误差范围内。这表明,本实验条件下,不同批次的 CS 对本方法无影响。

参考文献:

[1] Koshiishi I, Takenouchi M, Hasegawa T, *et al*. Enzymatic method for the simultaneous determination of hyaluronan and chondroitin sulfates using high performance liquid chromatography [J]. Anal Biochem, 1998, 265 49.  
 [2] 凌沛学. 透明质酸 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2002 41.  
 收稿日期: 2008-07-01

(上接第 290 页)

发表的方法相比<sup>[4,5]</sup>,流动相简单,可节约成本,减少污染。由于采用梯度洗脱,分离效果好,简化了样品的预处理步骤,使测定方法更加快捷简便。

3 种菊花中木犀草素含量的测定结果显示,毫菊中含量最高,如从预防癌症和心血管病的角度出发,在选择食用菊花品种时应更多考虑毫菊。

参考文献:

[1] 江苏新医学院. 中药大辞典. 下册 [M]. 上海: 上海科技出版社, 1997 2008.  
 [2] 国家医药管理局中草药情报中心站. 植物药有效成分手册

[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1986 681.  
 [3] Chan EC, Pannan Gpeth P, Woodman OL. Relaxation to flavones and flavonols in rat isolated thoracic aorta: mechanism of action and structure-activity relationships. Cardiovasc Pharmacol 2000, 35 (2): 326.  
 [4] 胡碧波,蒋惠娣,杨俊,等. HPLC 法测定不同采收期杭白菊中木犀草素及其苷的含量 [J]. 浙江大学学报 (医学版), 2004, 33 29.  
 [5] 张洪坤,国兴明. 应用反相高效液相色谱法测定菊花中的木犀草素 [J]. 贵州大学学报 (农业与生物科学版), 2002 21 424.

收稿日期: 2009-01-06