

高效液相色谱法测定玻璃酸钠的含量

王海英, 郭学平, 栾贻宏, 杜国辉(山东福瑞达生物医药有限公司, 济南 250101)

摘要:目的 建立玻璃酸钠高效液相色谱测定法。方法 用玻璃酸酶(来源于 *Streptococcus zooepidemicus*) 特异性水解玻璃酸钠生成不饱和二糖, 反应体系为 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的醋酸钠溶液 (pH 6.0), $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 4 h, 酶解液用流动相稀释后进样。色谱柱为 Phenomenex Luna NH_2 ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$, $5 \text{ } \mu\text{m}$); 流动相为 $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸二氢钠溶液; 检测波长为 232 nm。结果 线性范围 $0.01 \sim 0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r = 0.9998$) 精密度和重复性良好, 平均回收率为 100.4%, RSD 为 0.8%。测定结果不被样品中包括硫酸软骨素在内的其他成分干扰。结论 该方法简便准确, 专属性强, 可用于玻璃酸钠原料和玻璃酸钠制剂的含量测定。

关键词:玻璃酸钠; 含量测定; 高效液相色谱法

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2011)23-1844-03

Determination of Sodium Hyaluronate by HPLC

WANG Hai-ying, GUO Xue-ping, LUAN Yi-hong, DU Guo-hui (Shandong Freda Biopharm Co. Ltd., Jinan 250101, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a HPLC method for determination of sodium hyaluronate. **METHODS** Sodium hyaluronate was specifically hydrolyze by hyaluronidase from *Streptococcus zooepidemicus* in $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ sodium acetate buffer (pH 6.0) at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ for 4 h. The mixture was diluted with mobile phase for analysis. The chromatography was performed on a Phenomenex Luna NH_2 ($4.6 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$, $5 \text{ } \mu\text{m}$) column with $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ sodium dihydrogen phosphate as the mobile phase. The eluent was detected at 232 nm. **RESULTS** This method had excellent linearity in the range of $0.01 \sim 0.1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($n = 6$, $r = 0.9998$) and good precision. The recovery was 100.4% with RSD of 0.8%. The determination results were not affected by other ingredients in the samples. **CONCLUSION** This method is convenient, accurate and specific for determination of sodium hyaluronate.

KEY WORDS: sodium hyaluronate; determination; HPLC

玻璃酸钠(sodium hyaluronate, NaHA)是广泛存在于动物组织细胞间质中的一种酸性黏多糖,由葡糖醛酸和 *N*-乙酰氨基葡萄糖双糖单位重复连接而成。由于 NaHA 具有优良的保湿性和润滑性、高度黏弹性以及良好的生物相容性而被广泛应用于临床^[1]。NaHA 应用于眼科手术,如人工晶体植入术、角膜移植术、视网膜剥离术等,可以作为安全理想的眼科手术辅助剂,大大提高了手术成功率; NaHA 应用于外科手术,具有防止术后组织粘连和促进伤口愈合的作用; NaHA 应用于骨关节炎,具有润滑关节、保护软骨、抑制炎症和减少疼痛的良好疗效;此外 NaHA 也可作为药物载体加入到眼用制剂中,起到提高药物生物利用度、减轻药物刺激性的作用。

目前 NaHA 含量测定最常用的方法是改良吡嗪法^[2]。这种方法专属性差,具有己糖醛酸结构的化合物(如硫酸软骨素)均可与吡嗪试剂发生显色反应,干扰 NaHA 的测定。本实验在使用特异性玻璃

酸酶对样品进行降解的基础上,使用高效液相色谱法检测 NaHA 酶解产生的不饱和双糖,从而计算得到 NaHA 的含量。本方法操作简便,结果准确,专属性强,可用于含有复杂成分样品中 NaHA 的含量测定。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 高效液相色谱系统(包括四元梯度泵、柱温箱、手动进样器和紫外检测器); SHIMADZU UV-2550 紫外可见分光光度计; METTLER TOLEDO AL104 电子天平; METTLER TOLEDO FiveEasy 台式酸度计; BHW₂-I 电热恒温水箱。

NaHA 对照品(Sigma 公司,含量 99.6%); NaHA 原料(山东福瑞达生物医药有限公司,批号 10060901; A 公司,批号 11041202; B 公司,批号 10092002; C 公司,批号 10111201; D 公司,批号 10070302); NaHA 关节注射液(生化学工业株式会

作者简介:王海英,女,工程师 研究方向:生物药物的分析检测 Tel: (0531) 82685920 E-mail: wanghyfreda@126.com

社批号 OFD232; 山东博士伦福瑞达制药有限公司批号 09042104); NaHA 眼科手术田黏弹剂(上海建华精细生物制品有限公司批号 081023; 比利时爱尔康公司 51987P); 来源于 *Streptococcus zooepidemicus* 的玻璃酸酶溶液(150 U · mL⁻¹, 山东药学院生物技术中心); 醋酸钠、冰醋酸、磷酸二氢钠为分析纯, 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Phenomenex Luna NH₂ 柱(4.6 mm × 250 mm 5 μm); 流动相: 0.4 mol · L⁻¹ 磷酸二氢钠溶液(取 NaH₂PO₄ 62.4 g 溶于 1 000 mL 水中); 流速 0.6 mL · min⁻¹; 柱温 35 °C; 检测波长 232 nm; 进样量 20 μL。

2.2 溶液制备

对照品贮备液: 精密称取 NaHA 对照品适量(约 0.1 g) 置 100 mL 量瓶中, 加入 0.3 mol · L⁻¹ 醋酸钠溶液(pH 6.0) 适量, 待其完全溶解后用相同溶剂定容至刻度。精密量取 9 mL, 加入玻璃酸酶溶液 1 mL, 混匀, 37 °C 水浴放置 4 h。

供试品溶液: 精密称取供试品适量, 置 100 mL 量瓶中, 加入 0.3 mol · L⁻¹ 的醋酸钠溶液(pH 6.0) 适量, 待其完全溶解后用相同溶剂定容至刻度, 浓度约为 1 mg · mL⁻¹。精密量取 9 mL, 加入玻璃酸酶溶液 1 mL, 混匀, 37 °C 水浴放置 4 h。取酶解液 0.5 mL 置 10 mL 量瓶中, 用流动相定容至刻度, 摇匀, 即得。

2.3 线性关系

精密量取对照品贮备液, 用流动相稀释成质量浓度分别为 0.01、0.02、0.04、0.06、0.08、0.1 mg · mL⁻¹ 的溶液。0.22 μm 滤膜过滤后, 取 20 μL 进样, 按照“2.1”项下的色谱条件进行测定, 记录色谱图。以样品峰面积为纵坐标(Y), 样品质量浓度为横坐标(ρ), 进行线性回归, 回归方程为 $Y = 28\,460.8\rho - 11.1$, 相关系数 $r = 0.999\,8$ ($n = 6$)。结果表明, NaHA 在 0.01 ~ 0.1 mg · mL⁻¹ 内线性关系良好。

2.4 精密度实验

取“2.3”项下质量浓度为 0.06 mg · mL⁻¹ 的对照品溶液, 按照“2.1”项下的色谱条件进行测定, 连续进样 5 次, 以峰面积计算精密度, RSD 为 0.8%, 表明精密度良好。

2.5 稳定性实验

取同一批号的供试品溶液置于室温, 分别于 0、

2、4、6、8、12 h 取样, 按照“2.1”项下的色谱条件进行测定, 以峰面积计算 RSD 为 0.9%, 表明样品溶液在 12 h 内基本稳定。

2.6 重复性实验

精密称取同一批号的样品(山东福瑞达生物医药有限公司批号 10060901) 适量, 按“2.2”项下的方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.1”项下的色谱条件进行测定, 计算样品含量平均值为 96.6%, RSD 为 0.9%。

2.7 回收率实验

精密称取已知含量的样品(山东博士伦福瑞达制药有限公司批号 09042104, 规格 2 mL: 20 mg) 9 份, 分别精密加入不同体积已知浓度的对照品溶液, 混匀后按“2.2”项下的方法处理样品, 制成不同浓度的供试品溶液。按“2.1”项下的色谱条件进行测定, 结果 NaHA 的平均回收率为 100.4%, RSD 为 0.8%。

2.8 专属性

配制一定浓度的 NaHA 溶液, 平行分为 2 份, 其中 1 份加入一定量的硫酸软骨素。按“2.2”项下的方法处理样品, 按“2.1”项下的色谱条件进行测定。2 份样品测定结果的偏差为 0.6%, 表明样品中硫酸软骨素的存在不影响 NaHA 的含量测定。

2.9 样品测定

NaHA 原料: 取不同厂家的 NaHA 原料, 按“2.2”项下的方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下的色谱条件进行测定, 以外标法计算 NaHA 的含量。同时用咔唑法测定供试品的含量, 并将 2 种方法的测定结果进行比较, 见表 1。NaHA 的酶解产物不饱和和双糖的色谱图见图 1。

NaHA 制剂: 取 NaHA 制剂, 按“2.2”项下的方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下的色谱条件进行测定, 以外标法计算 NaHA 的含量。并将测定结果与样品含量标示值进行比较, 见表 2(D/L 表示测定结果相当于标示量的百分含量)。

表 1 玻璃酸钠原料的含量测定结果, $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

Tab. 1 Determination results of sodium hyaluronate in raw material. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$

Company	Lot No.	Carbazole method/%	HPLC method/%	RSD /%
Shandong Fredu Biopharm Co. Ltd.	10060901	98.2 ± 0.8	97.8 ± 0.2	0.3
A	11041202	97.4 ± 0.9	96.4 ± 0.4	0.5
B	10092002	98.5 ± 0.7	97.8 ± 0.1	0.4
C	10111201	95.3 ± 1.2	96.8 ± 0.3	0.8
D	10070302	98.8 ± 0.6	71.2 ± 0.1	16.2

3 讨论

3.1 玻璃酸酶的使用

与动物组织提取的玻璃酸酶不同, *Streptococcus zooepidemicus* 产生的玻璃酸酶可以把 NaHA 降解为不饱和双糖^[3-4]。本实验使用 $0.3 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的醋酸钠溶液(pH 6.0) 作为反应体系, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴, 每隔 1 h 取样, 测定 NaHA 的酶解液在 232 nm 处的紫外吸收值, 绘制酶解反应曲线, 见图 2。结果显示, NaHA 酶解液的紫外吸收值在 3 h 时达到最大值, 4 h 后紫外吸收值不再增加, 表明 NaHA 已完全降解为不饱和双糖, 因此酶解反应时间定为 4 h。

3.2 色谱条件

用流动相稀释 NaHA 对照品的酶解液, 在 200 ~ 400 nm 处扫描, 其最大波长为 231.8 nm, 因此紫外检测波长选定为 232 nm。采用氨基柱, 以磷酸二氢钠为流动相, 可以获得良好的峰形, 且峰面积与 NaHA 的浓度呈线性关系。

3.3 方法的专属性

NaHA 和硫酸软骨素具有相似的结构和化学性质, 因此硫酸软骨素对 NaHA 的咔唑法、氨基己糖法等多种含量测定方法均有干扰。本实验所用玻璃酸酶只特异性降解 NaHA, 对硫酸软骨素类化合物没有裂解活性, 在此基础上使用特定的色谱条件检测 NaHA 酶解产生的不饱和双糖, 因此本方法有很高的专属性, 测定结果不被样品中其他成分影响。

3.4 NaHA 原料的含量测定

分别采用本实验方法和咔唑法测定山东福瑞达生物医药有限公司、A、B、C 公司的产品, 测定结果的偏差小于 1%。对于 D 公司的产品, 2 种方法测定结果的偏差高达 16.2%。分析其原因, 可能是产品中混入其他可以发生咔唑反应的化合物如硫酸软骨素等, 导致咔唑法测定结果偏高, 而本实验方法特异性强, 测得 NaHA 的真实含量仅为 71.2%。因此使用本实验方法可更准确地控制 NaHA 原料的质量。

3.5 NaHA 制剂的含量测定

本实验方法测定 NaHA 制剂的含量均在其标识范围的 99% ~ 104%。尤其是无菌眼用黏弹剂, 除含有 NaHA 还含有硫酸软骨素, 使用咔唑法无法准确测定 NaHA 含量, 本实验方法解决了这一问题, 因此此方法可以更广泛地测定 NaHA 制剂中 NaHA 的含量。

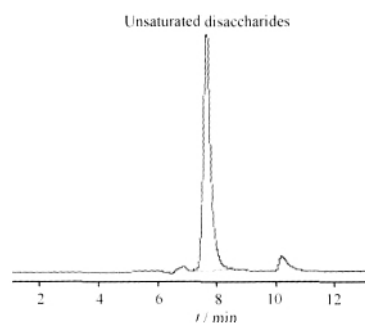


图 1 玻璃酸钠的酶解产物不饱和双糖的色谱图

Fig. 1 Chromatogram of unsaturated disaccharides

表 2 玻璃酸钠制剂的含量测定结果. $n = 3 \bar{x} \pm s$

Tab. 2 Determination results of sodium hyaluronate products. $n = 3 \bar{x} \pm s$

Sample(Lot)	Intended use	Labelled amount(L) / $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	Detected value(D) / $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$	D/L/%
Intra-articular hyaluronan(OFD232)	Osteoarthritis	15	15.1 ± 0.1	100.7 ± 0.007
Sodium hyaluronate injection(09042104)	Osteoarthritis	10	10.2 ± 0.3	102.0 ± 0.003
Medical sodium hyaluronate gel(081023)	Ophthalmic viscosurgical device	15	15.5 ± 0.1	103.3 ± 0.007
Sterile ocular viscoelastic solution(51987P)	Ophthalmic viscosurgical device	30	29.9 ± 0.2	99.7 ± 0.007

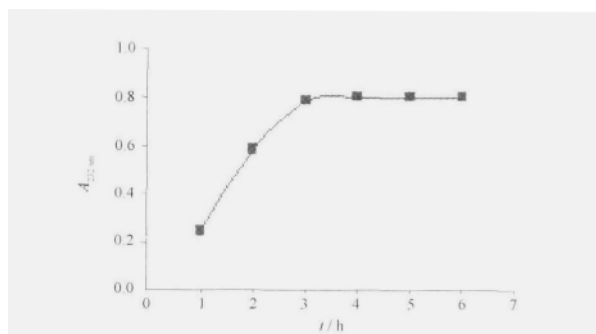


图 2 玻璃酸酶对玻璃酸钠的酶解反应曲线

Fig. 2 The digestion process curves of sodium hyaluronate by hyaluronidase from *Streptococcus zooepidemicus*

REFERENCES

- [1] KUO W J. *Practical Aspects of Hyaluronan Based Medical Products* [M]. New York: CRC Press, 2005.
- [2] PE 6. 3 [S]. 2007: 4300-4302.
- [3] GUO X P. Expression of a novel hyaluronidase from *Streptococcus zooepidemicus* in *E. coli* and its application for the preparation of HA oligosaccharides [J]. *Carbohydr Polym*, 2009, 77: 254-260.
- [4] WANG H Y. Determination of relative molecular mass and its distribution of sodium hyaluronate by size exclusion chromatography [J]. *Food and Durg (食品与药品)*, 2010, 12(7): 232-235.

(收稿日期: 2011-07-18)