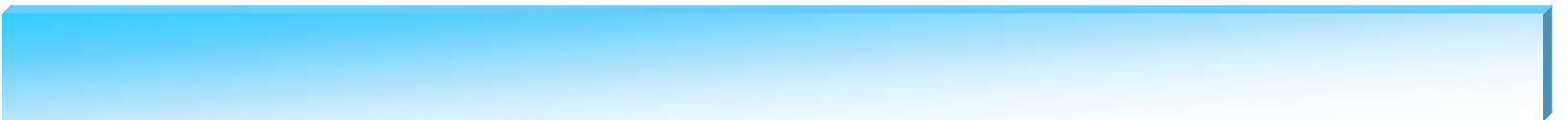
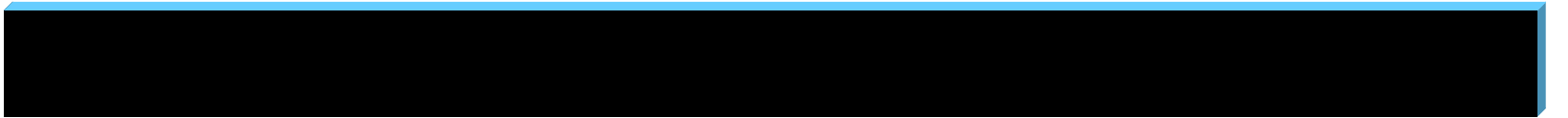
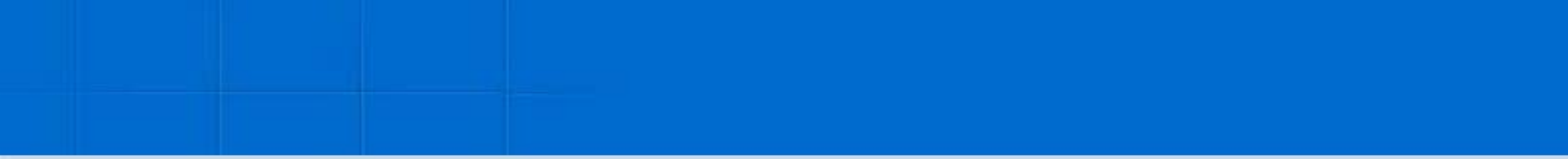




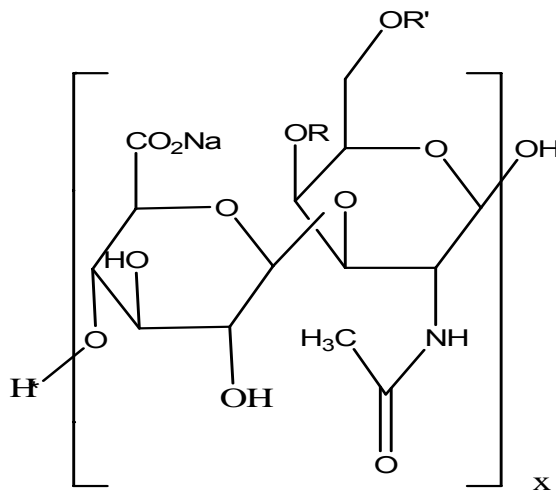
中国食品药品检定研究院

National Institutes for Food and Drug Control



(1/7)

结构



R=SO₃Na and R'=H
or
R=H and R'=SO₃Na

Chondroitin Sulfate Sodium CS

2-

-2-

- -D-

N-

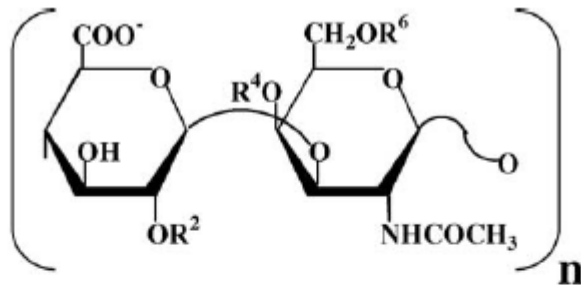
D-

-1 3

-1 4

(2/7)

结构



	R ²	R ⁴	R ⁶
△ Di-0S	H	H	H
△ Di-6S	H	H	SO ₃ ⁻
△ Di-4S	H	SO ₃ ⁻	H
△ Di-2,6 di S	SO ₃ ⁻	H	SO ₃ ⁻
△ Di-4,6 di S	H	SO ₃ ⁻	SO ₃ ⁻
△ Di-2,4 di S	SO ₃ ⁻	SO ₃ ⁻	H
△ Di-2,4,6 tri S	SO ₃ ⁻	SO ₃ ⁻	SO ₃ ⁻

Fig. 1. Structure of CS disaccharides and compositional properties.

•

•

4

6

背景介绍(3/7)

应用



国内注册的新药

- 原料

硫酸软骨素 硫酸软骨素A钠 硫酸软骨素钠

- 注射剂

硫酸软骨素注射液 注射用硫酸软骨素 硫酸软骨素A钠注射液

- 口服制剂

硫酸软骨素A钠胶囊 复方硫酸软骨素片 硫酸软骨素片

- 眼用制剂

硫酸软骨素滴眼液 复方硫酸软骨素滴眼液 复方硫酸软骨素眼用凝胶

国外药典收载情况 (USP)

- USP26: 硫酸软骨素钠 (增订)
 氨基葡萄糖和硫酸软骨素片 (增订)
- USP27: 硫酸软骨素钠
 硫酸软骨素钠片 (增订)
 氨基葡萄糖和硫酸软骨素钠片 (修订)
- USP28–USP30: 未有变化
- USP31: 硫酸软骨素钠
 硫酸软骨素钠片
 氨基葡萄糖和硫酸软骨素钠片
 氨基葡萄糖, 硫酸软骨素钠和二甲基砒片 (增订)
- USP32: 未有变化

国外药典收载情况 (EP)

硫酸软骨素钠 (从EP6.0版起增订)

国外药典收载情况 (BP)

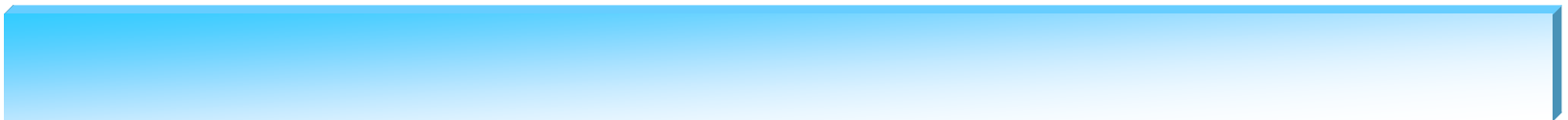
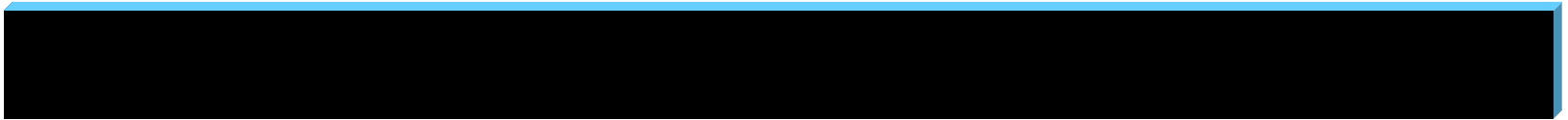
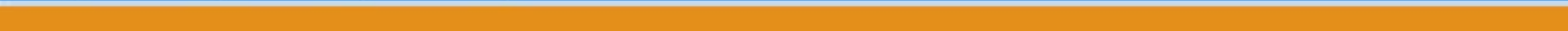
硫酸软骨素钠 (从BP2007版起增订)

中国药典收载情况（2010年版二部增订）

硫酸软骨素钠

硫酸软骨素钠片

硫酸软骨素钠胶囊



• 2010

硫酸软骨素钠 硫酸软骨素钠片 硫酸软骨素钠胶囊

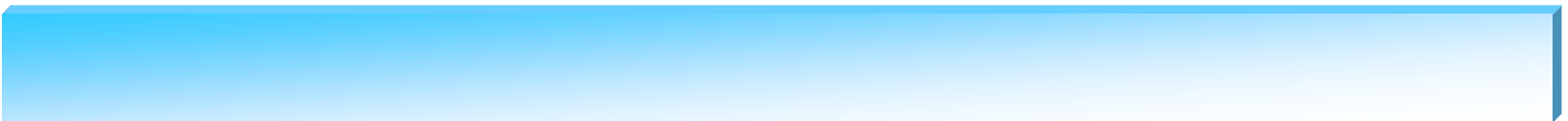
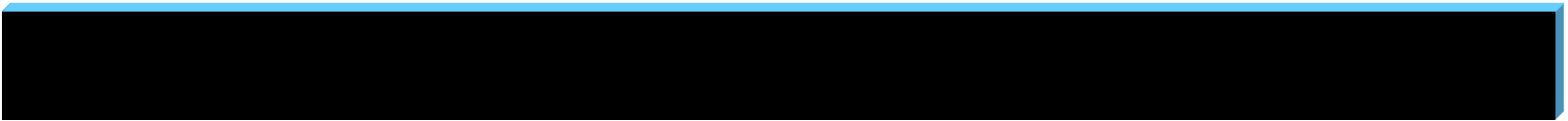
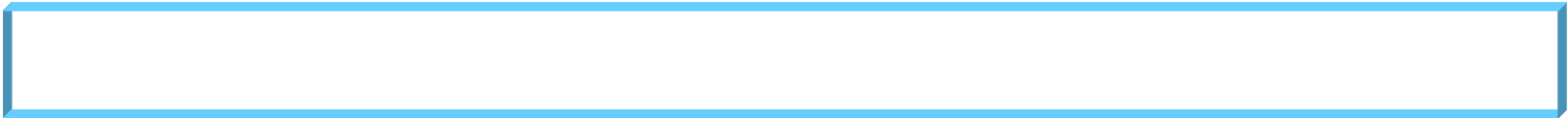
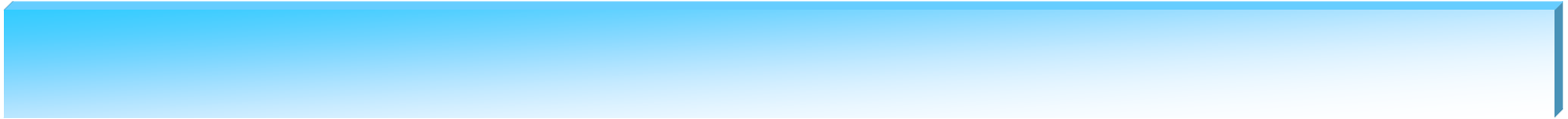
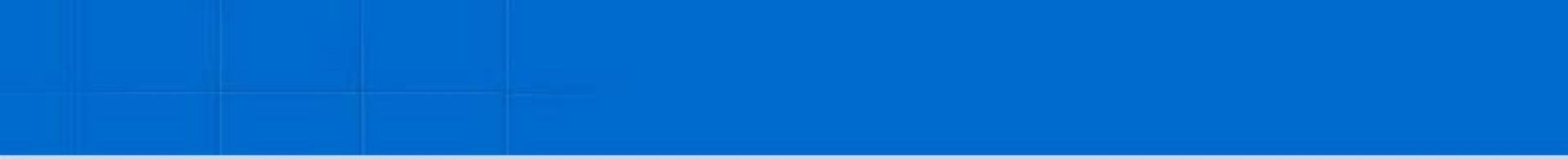
• 硫酸软骨素（供注射用） 硫酸软骨素A钠 硫酸软骨素A钠胶囊 硫酸软骨素注射液

复方硫酸软骨素片 硫酸软骨素滴眼液

• 注射用硫酸软骨素 YBH33642005

	EP7.0 BP2011	USP32	2010
	95% 105%	90.0% 105.0%	90.0% 105.0%)
	96%		
	-20° -30° 12° 19° -	-20.0° -30.0°	-25° -32°
	(
)		
			National Institutes for Food and Drug Control

	EP7.0 BP2011	USP32	2010
	0.5	0.5	0.5
		0.24	0.24
	12.0 105 4	10.0 105 4	10.0 105 4
		20.0 30.0	20.0 30.0
	20ppm	20ppm	20ppm
PH	5.5-7.5 5g/100ml	5.5-7.5 1g/100ml	6.0-7.0 5g/100ml
	CPC	CPC	
		5g/100ml 420nm 0.35	2.5% 3.5% National Institutes for Food and Drug Control



含量测定方法比较

1

- El son-Morgan
-
-

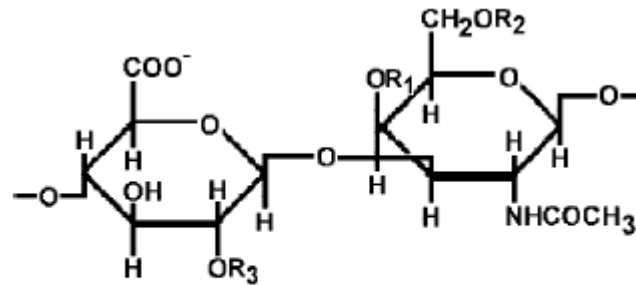
2

-
-

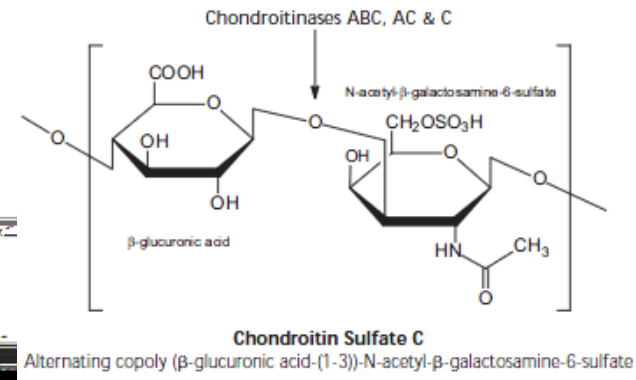
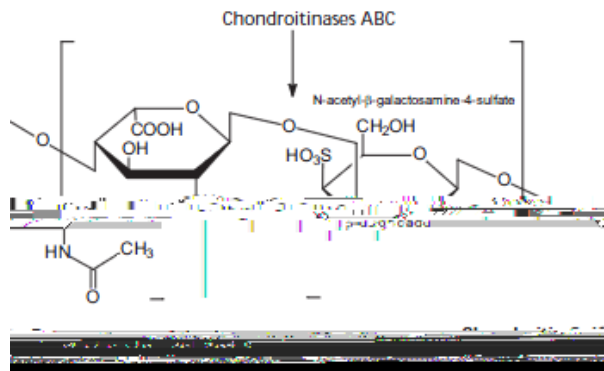
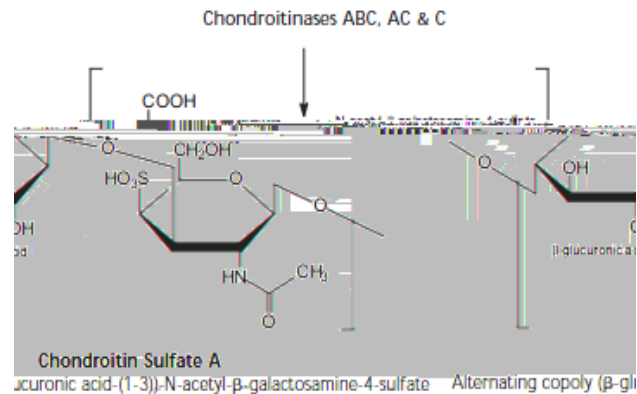
3

- BP USP EP
-
- CPC

原理



$R_1 = R_2 = R_3 = H$: nonsulfated chondroitin
 $R_1 = SO_3^-$ and $R_2 = R_3 = H$: chondroitin-4-sulfate, CSA
 $R_2 = SO_3^-$ and $R_1 = R_3 = H$: chondroitin-6-sulfate, CSC



仪器与试药

- Agilent1100高效液相色谱仪，美国安捷伦公司，四元泵G1311A，自动进样器G1313A，柱温箱G1313A，紫外检测器G1314A；离心机。
- 硫酸软骨素钠原料及制剂。
- 硫酸软骨素钠含量测定对照品（中国药品生物制品检定所，140792-201001），
- 软骨素二糖、6-硫酸化的软骨素二糖、4-硫酸化的软骨素二糖和硫酸软骨素ABC酶均购自sigma公司；
- 乙酸钠、氯化钠等为分析纯；水为超纯水。

溶液制备

- **2 mol · L⁻¹的氯化钠溶液 (pH 3.5)** 取氯化钠234.01 g, 加水1900 mL使溶解, 用盐酸调节pH 3.5, 加水稀释至2000 mL。
- **Tris缓冲液 (pH 8.0)** 取Tris 1.21 g、无水乙酸钠0.98 g, 加水180 mL使溶解, 用盐酸调节pH至8.0, 加水稀释至200 mL。4 °C冰箱保存, 备用。
- **硫酸软骨素ABC酶液** 称取硫酸软骨素ABC酶适量用Tris缓冲液 (pH 8.0) 制成每100 μL含0.1IU的溶液。
- **对照品和供试品溶液** 将硫酸软骨素钠对照品和供试品105 °C干燥4小时至恒重, 分别取0.1 g, 精密称定, 置10 mL的量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 0.45 μm的滤膜过滤, 精密量取100 μL, 置1.5 mL的离心管中, 加Tris缓冲液 (pH 8.0) 800 μL, 充分混匀, 再加入硫酸软骨素ABC酶液100 μL, 摇匀, 置于37 °C水浴中反应1 h, 取出, 在100 °C加热5 min, 用冷水冷却。以10000 r · min⁻¹离心20 min, 取上清液, 0.45 μm的滤膜过滤, 即得。

色谱条件

色谱柱：安捷伦 Zorbax SAX (250 mm×4.6 mm, 5 μm)；

流动相A为水溶液 (pH 3.5)；

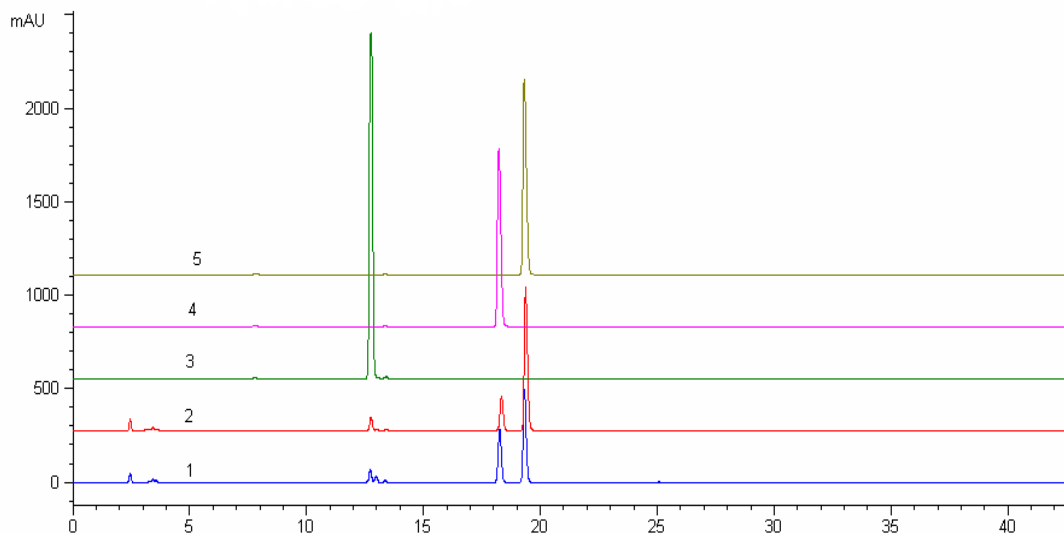
流动相B为2 mol·L⁻¹的氯化钠溶液 (pH 3.5)，

检测波长为232 nm；流速为1.0mL·min⁻¹；柱温：40 °C。

t/min	mobile phase/%	
	A	B
0	100	0
4	100	0
45	50	50

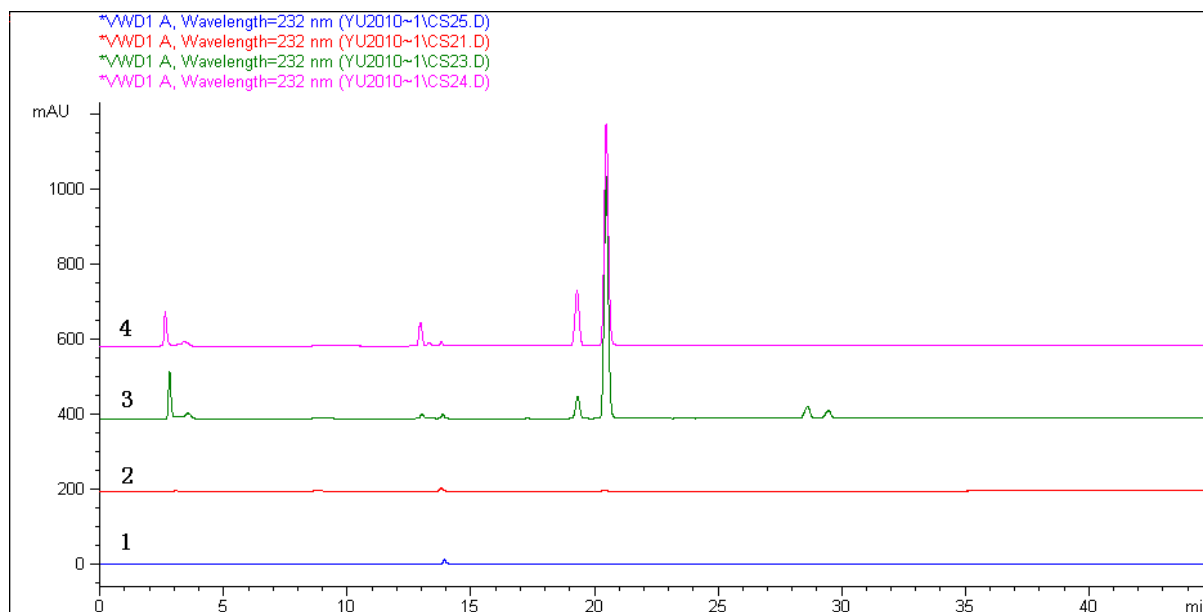
专属性

分别取硫酸软骨素钠对照品及供试品各0.1 g，按上述方法制备供试品溶液；另取软骨素二糖、6-硫酸化的软骨素二糖和4-硫酸化的软骨素二糖对照品适量，分别用Tris缓冲液（pH 8.0）溶解制得1 mg · mL⁻¹的对照品溶液；硫酸软骨素钠供试品3个组分峰与硫酸软骨素钠对照品的保留时间分别一致，供试品的三个组分峰按照出峰顺序分别为软骨素二糖、6-硫酸化的软骨素二糖、4-硫酸化的软骨素二糖。



- 1、硫酸软骨素钠供试品
- 2、硫酸软骨素钠对照品
- 3、软骨素二糖对照品
- 4、6-硫酸化软骨素二糖对照品
- 5、4-硫酸化软骨素二糖对照品

专属性



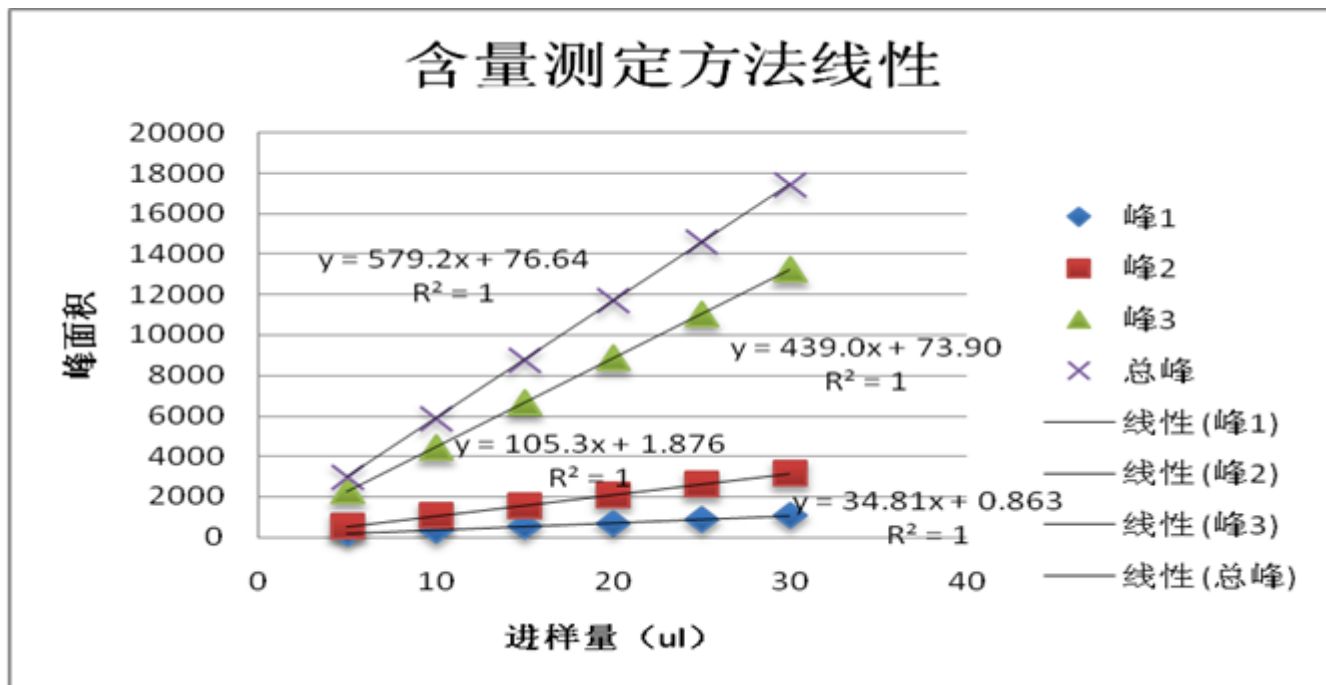
- 1、肝素钠对照品
- 2、硫酸皮肤素对照品
- 3、多硫酸软骨素对照品
- 4、硫酸软骨素钠样品

结果：肝素和硫酸皮肤素在该系统中均无响应；

多硫酸软骨素中酶解产生的多硫酸化的软骨素二糖与软骨素二糖、6-硫酸化软骨素二糖和4-硫酸化软骨素二糖均能完全分离；

多硫酸化的软骨素二糖峰的存在可区分硫酸软骨素和多硫酸软骨素。

线性



线性

	回归方程	相关系数r
软骨素二糖	$A=34.81C+0.863$	0.99999
6-硫酸化的 软骨素二糖	$A=105.3C+1.876$	0.99999
4-硫酸化的 软骨素二糖	$A=439.0C+73.90$	0.99999
总峰面积	$A=579.2C+76.64$	0.99999

结果表明：进样量为20 μ l（1.0 mg/ml）时，硫酸软骨素钠在0.25~1.5 mg/ml浓度范围内线性关系良好。

准确度—加样回收率试验

序号	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	3.2776	3.2722	99.83		
2	3.0591	3.0775	100.60		
3	3.0584	3.0726	100.46		
4	5.0835	4.9598	97.57		
5	4.8849	4.7965	98.19	99.37	1.3
6	4.8643	4.7536	97.72		
7	7.0106	6.9572	99.24		
8	7.2886	7.1452	98.11		
9	7.1099	7.1031	99.90		

中间精密度

序号	软骨素二糖峰面积	6-硫酸化的软骨素二糖峰面积	4-硫酸化的软骨素二糖峰面积	总峰面积
1	822159	2021721	7974942	10818822
2	779745	1998258	8001366	10779369
3	791572	2032943	8001998	10826513
4	791576	2007417	8054087	10853080
5	784060	2023617	8083934	10891611
6	787028	2043435	8101802	10932265
平均值	792690	2021232	8036355	10850277
RSD(%)	1.9	0.8	0.6	0.5

重复性

序号	软骨素二糖峰面积	6-硫酸化的软骨素二糖峰面积	4-硫酸化的软骨素二糖峰面积	总峰面积
1	680.6	2069.1	8763.1	11512.8
2	674.4	2060.5	8757.4	11492.3
3	674.5	2070.3	8761.3	11506.1
4	674.8	2074.3	8782.7	11531.8
5	676.1	2076.3	8813.9	11566.3
6	679.0	2078.5	8816.7	11574.2
平均值	676.6	2071.5	8782.5	11530.6
RSD(%)	0.4	0.3	0.3	0.3

3个主峰及总峰面积的相对标准偏差（RSD）均符合要求，色谱峰峰面积无差异，该方法重复性好。

峰响应度

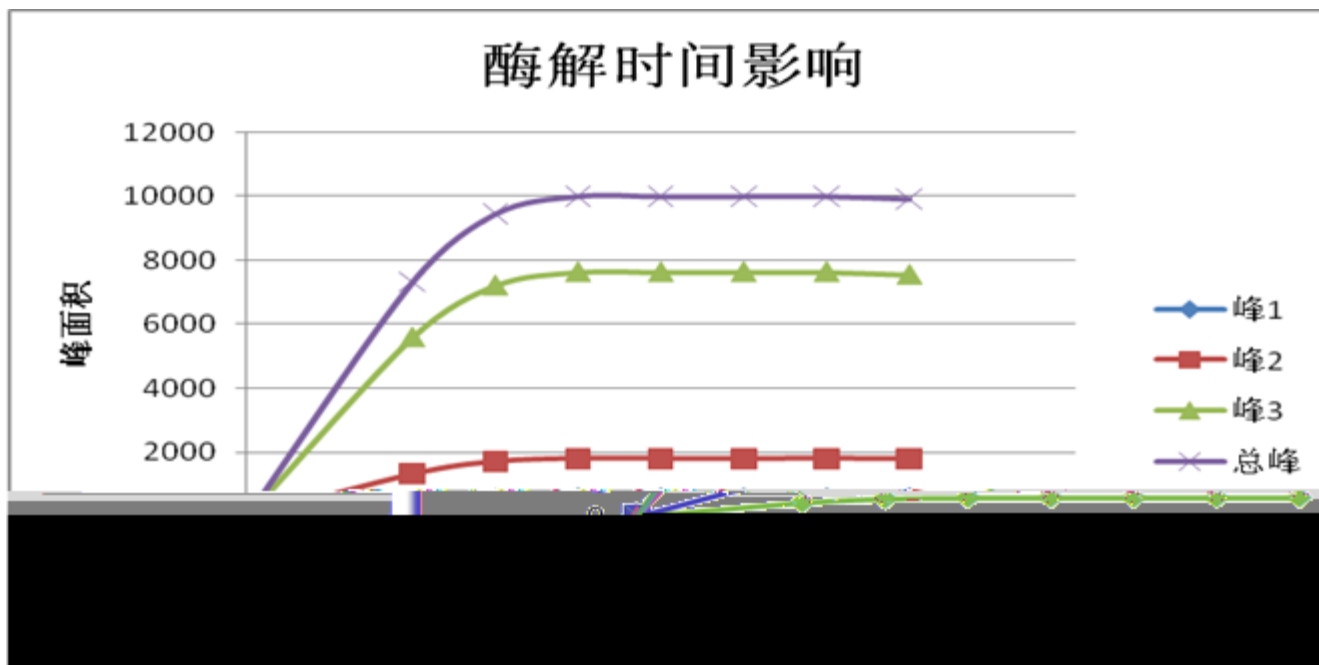
分别取3种二糖对照品适量，加Tris缓冲液（pH 8.0），分别制成药1 mg · mL⁻¹的溶液，进样分析，记录色谱图，按照峰面积的响应值与浓度之比计算3个组分峰的响应度。

样品	浓度 (mg/ml)	峰面积响应值	响应度
Δ di-0S	0.9875	10657.0	10791.9
Δ di-6S	0.9714	10030.1	10325.4
Δ di-4S	1.8367	18564.7	10107.6

耐用性——酶解时间考察

时间 (min)	软骨素二糖峰面积	6-硫酸化的软骨素二糖峰面积	4-硫酸化的软骨素二糖峰面积	总峰面积
0	0	0	0	0
20	418.1	1313.5	5590.1	7321.7
30	558.9	1791.3	7608.1	9958.3
40	565.9	1796.7	7625.4	9988.0
50	563.7	1795.3	7630.3	9989.3
60	571.1	1794.1	7635.9	10001.1
70	571.3	1799.1	7632.2	10002.6
80	577.2	1791.4	7550.2	9918.8

耐用性——酶解时间考察



结果：硫酸软骨素钠在酶解时间为30 min的时候已经酶解95%，40 min的时候已经酶解完全，酶解时间继续延长至80 min硫酸软骨素钠亦不继续分解，故选择酶解时间60 min。

耐用性---溶液稳定性

时间 (h)	软骨素二糖峰面积	6-硫酸化的 软骨素二糖峰面积	4-硫酸化的 软骨素二糖峰面积	总峰面积
0	558.9	1791.3	7608.1	9958.3
3	565.9	1796.7	7625.4	9988.0
6	563.7	1795.3	7630.3	9989.3
9	571.1	1794.1	7635.9	10001.1
10	571.3	1799.1	7632.2	10002.6
24	577.2	1791.4	7550.2	9918.8
平均值	568.0	1794.7	7613.7	9976.4
RSD(%)	1.1	0.2	0.4	0.3

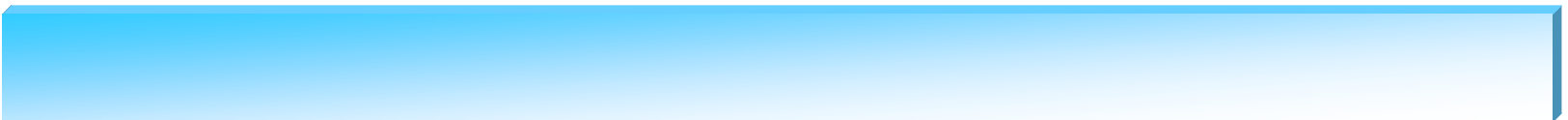
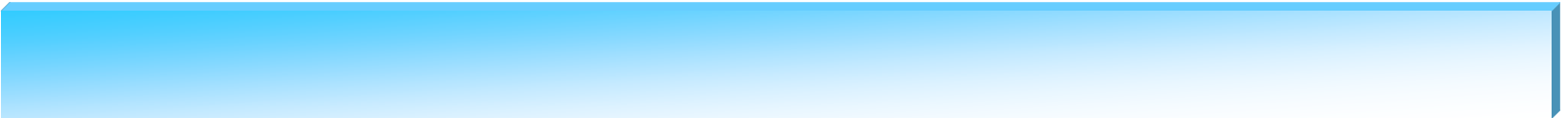
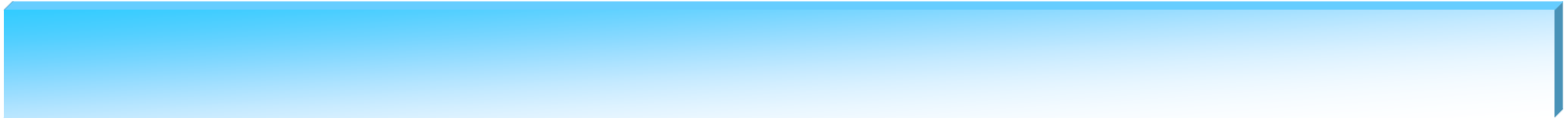
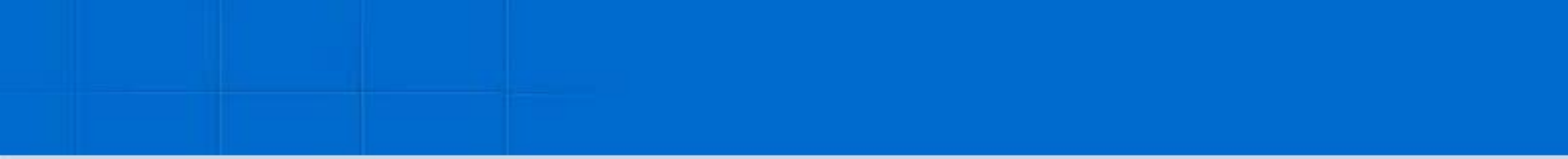
3个主峰面积及峰面积和的RSD分别为1.1%、0.2%、0.4%、0.3%，在24小时内色谱峰峰面积无差异，该方法下硫酸软骨素钠样品溶液稳定性好。

耐用性——不同类型色谱柱考察

分别用同种填料三个厂家的色谱柱依法进行试验，以3个组分的理论塔板数、分离度等条件为考察指标；

结果表明：

- 同种填料的三个厂家色谱柱，安捷伦公司 **ZORBAX SAX**和赛默飞公司的**Hypersil SAX**两种类型的色谱柱均适用于该方法，前者分离效果和使用寿命均强于后者。
- 菲罗门公司的**Phenosphere SAX**的色谱柱不适用于该方法。



对照品原料

分装前原料的检验结果

性状	白色粉末	(标准规定: 为白色或类白色粉末)
比旋度	-29°	(标准规定: -25° ~ -32°)
红外	与对照品图谱一致	(标准规定: 应与对照品的图谱一致)
钠盐	呈正反应	(标准规定: 应呈正反应)
酸度	6.7	(标准规定: 6.0~7.0)
氯化物	小于0.5%	(标准规定: 不大于0.5%)
硫酸盐	小于0.24%	(标准规定: 不大于0.24%)
干燥失重	5.1%	(标准规定: 减失重量不得过10.0%)
炽灼残渣	27.2%	(标准规定: 遗留残渣应为20.0%~30.0%)
重金属	小于百万分之二十	(标准规定: 不得过百万分之二十)
含氮量	2.7%	(标准规定: 含氮量应为2.5%~3.5%)

对照品的标化

依据2010版中国药典硫酸软骨素钠标准 待标品的检验结果

性 状 白色粉末 （标准规定：为白色或类白色粉末）；

引湿性 本品极具引湿性（增重百分率大于15%）；

比旋度 取本品40mg/ml水溶液，测定比旋度为 -29° （标准规定： $-25^{\circ} \sim -32^{\circ}$ ）；

鉴 别 按照HPLC含量项下方法，硫酸软骨素钠三个主峰的保留时间分别与USP对照品溶液的软骨素二糖峰、6-硫酸化的软骨素二糖峰和4-硫酸化的软骨素二糖峰的保留时间一致。（标准规定：保留时间应一致）；

组分峰确认 取SIGMA对照品软骨素二糖、6-硫酸化的软骨素二糖和4-硫酸化的软骨素二糖各精密称量，用水溶解后取20 μ l，按含量项下进行HPLC分析：硫酸软骨素钠三个主峰分别为软骨素二糖、6-硫酸化的软骨素二糖和4-硫酸化的软骨素二糖。

对照品的标化

酸度 6.2 （标准规定：应为6.0~7.0）。

氯化物 本品0.01g及标准氯化钠溶液5ml分别置于纳氏比色管中，加稀硝酸，加硝酸银试液，用水稀释至50ml，暗处放置5分钟观察比较。结果：待标品溶液的颜色浅于标准氯化钠对照液，氯化钠含量 $<0.5\%$ （标准规定：不大于0.5%）。

硫酸盐 本品0.1g及标准硫酸钾溶液2.4ml分别置于纳氏比色管中，加水40ml溶解，加25%的氯化钡溶液5ml，再加水稀释至50ml，暗处放置10分钟观察比较。结果：待标品溶液的颜色浅于标准硫酸钾对照液，硫酸盐含量 $<0.24\%$ （标准规定：不大于0.24%）。

干燥失重 105℃干燥4小时，减失重量为7.0%（标准规定：不得过10.0%）。

炽灼残渣 27.5% （标准规定：遗留残渣应为20.0%~30.0%）。

重金属 $<20\text{ppm}$ （标准规定：不得过百万分之二十）。

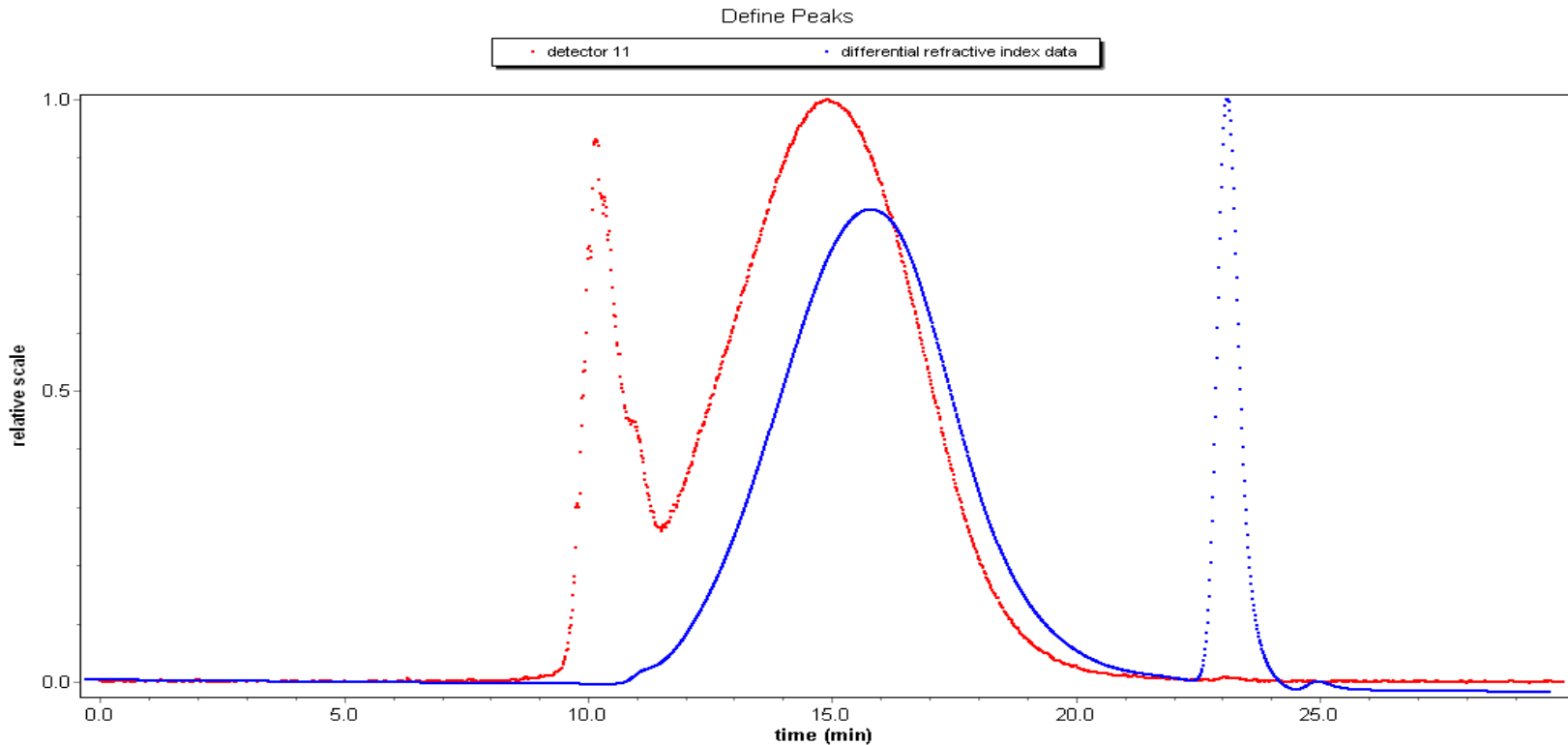
含氮量 照凯氏定氮法测定为2.6%（标准规定：含氮量应为2.5%~3.5%）。



对照品的标化

绝对分子量研究

分析条件：TSKG3000SWx1色谱柱，以2.84%的硫酸钠为流动相，流速0.5ml/min，柱温35℃，100ul进样，检测器：十八角度激光光散射器与示差检测器联用。结果：重均分子量（MW）为：16060，分布宽度（MW/ Mn）为：1.3，图谱如下：

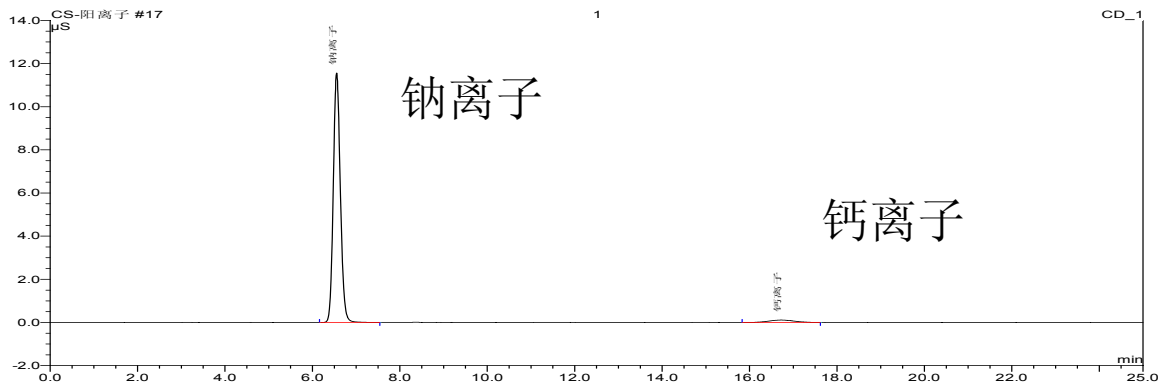


对照品的标化

无机杂质分析/钙离子测定

分析方法: DIONEX离子色谱仪, 分析柱IonPac CS17分析柱, 250mm*4mm, IonPac CS17保护柱, 50mm*4mm, ; 流动相: 40m mol/L 甲烷磺酸溶液; 流速1.0mL/min; 检测器: 电导检测器; 进样量25 μ L ; 对照品溶液: 钙单元素标准溶液.

供试品溶液的制备: 取干燥至恒重的样品100mg, 加水制成1mg/ml的溶液。



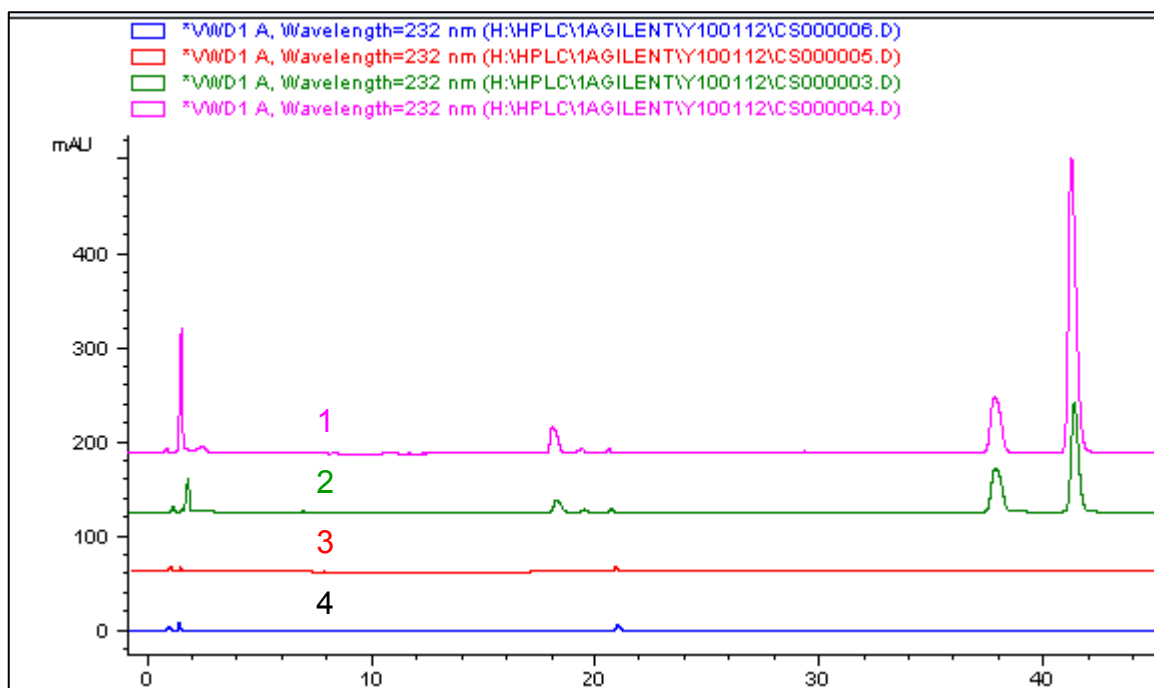
	CS 浓度 (mg/L)	保留时间 (min)	峰面积	离子浓度 (mg/L)	离子含量	平均	
	CS-1	102.0	16.697	0.093	0.3978	0.39%	
	CS-1	102.0	16.690	0.090	0.3876	0.38%	
钙离子	CS-1	102.0	16.650	0.097	0.4182	0.41%	0.40%
	CS-2	93.83	16.673	0.092	0.3970	0.39%	
	CS-1	93.83	16.673	0.092	0.3970	0.39%	

对照品的标化

二糖组成分析

分析方法：采用HPLC法，用强阴离子交换硅胶柱；以水（用稀盐酸调节pH为3.5）为流动相A、2mol/L氯化钠溶液（用稀盐酸调节pH为3.5）为流动相B；流速1.0ml/min；紫外波长232nm；20ul进样，梯度洗脱分析。

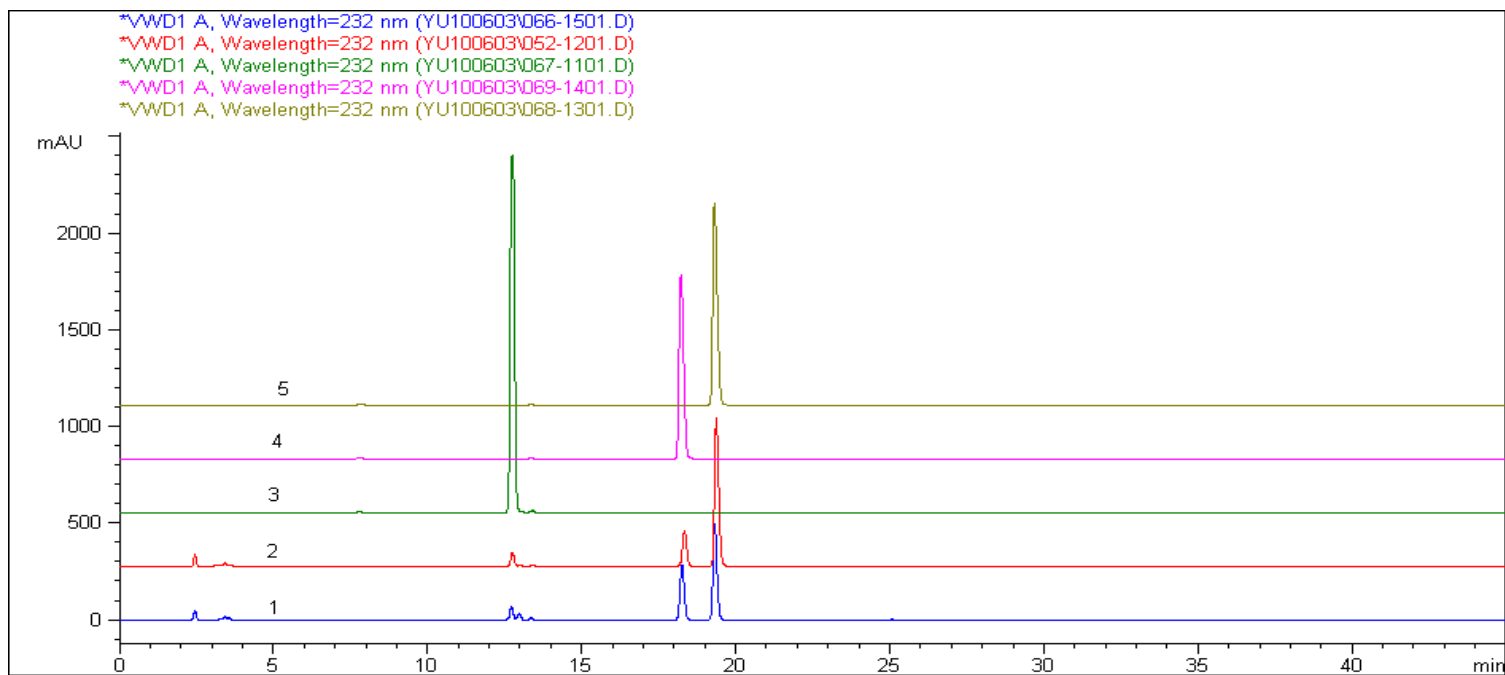
供试品制备：待标品、USP对照品（以干燥品计，纯度为100%）经105℃干燥恒重后，分别用水溶解制得10mg/ml溶液，取100ul加TRIS缓冲液、加硫酸软骨素ABC酶液于37℃水浴中反应1小时，100℃加热5分钟灭活，离心后滤膜过滤，进样分析，分析图谱如下：



- 1、硫酸软骨素钠待标对照品
- 2、硫酸软骨素钠usp对照品
- 3、硫酸软骨素钠待标对照品（未经酶解）
4. 空白溶液

对照品的标化

二糖组成分析



- 1、硫酸软骨素钠USP对照品
- 2、硫酸软骨素钠待标品
- 3、软骨素二糖对照品
- 4、6-硫酸化软骨素二糖对照品
- 5、4-硫酸化软骨素二糖对照品

对照品的赋值

- 溯源到国际标准物质

以usp对照品为对照外标法计算含量：99.1%；

usp对照品是牛来源，我国CS对照品是猪来源，二者来源不同，二糖组成比例不同；

我国CS对照品与usp对照品在质量标准中的适用方法不同：我国CS对照品（酶解液相色谱法）、usp对照品（电位滴定法）。

- 质量平衡法

- 赋值方法：含量=（100%-炽灼残渣-水分）×色谱纯度

- 炽灼残渣为27.5%，因钠和硫酸基团为该对照品的组成成分，将炽灼残渣值代入计算不合理；

- 在绝对分子量测定时发现，多糖大分子峰后存在明显的无机杂质，因此建立无机杂质的分析方法，计算出其中含有的钙离子、氯离子和硫酸根离子。

- 含量赋值

含量=（100.0%-无机杂质）×色谱纯度

=（100.0%-钙离子-氯离子-游离的硫酸根离子）×100.0%

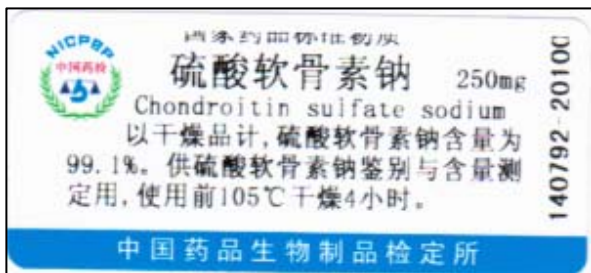
=（100.0%-0.40%-0.38%-0.10%）×100.0%

= 99.1%（以干燥品计）。

标签与说明书



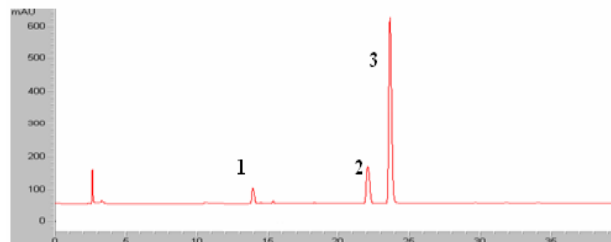
硫酸软骨素钠对照品



硫酸软骨素钠对照品标签

硫酸软骨素钠使用说明书
Chondroitin sulfate sodium
品种编号 140792

本品为硫酸软骨素钠化学对照品, 含量以干燥品计为 99.1%, 供硫酸软骨素钠鉴别与含量测定用。本品极具引湿性, 使用前 105℃干燥 4 小时, 快速称量使用。HPLC 特征色谱图如下:



图中 1 为软骨素二糖 (相当于硫酸软骨素 B); 2 为 6-硫酸化的软骨素二糖 (相当于硫酸软骨素 C); 3 为 4-硫酸化的软骨素二糖 (相当于硫酸软骨素 A)。

批号: 140792-201001

包装及装量: 2ml 西林瓶, 每瓶约 250mg。

保存条件: 密封、常温于干燥处保存。

硫酸软骨素钠对照品说明书

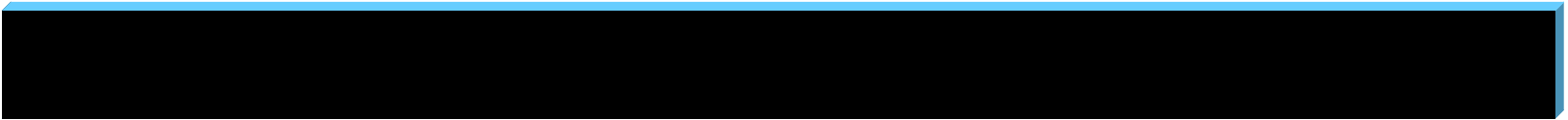
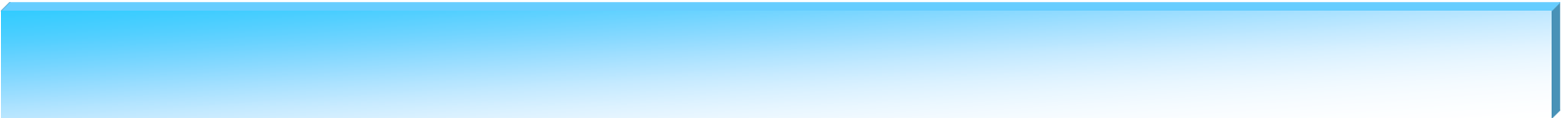
小结

-

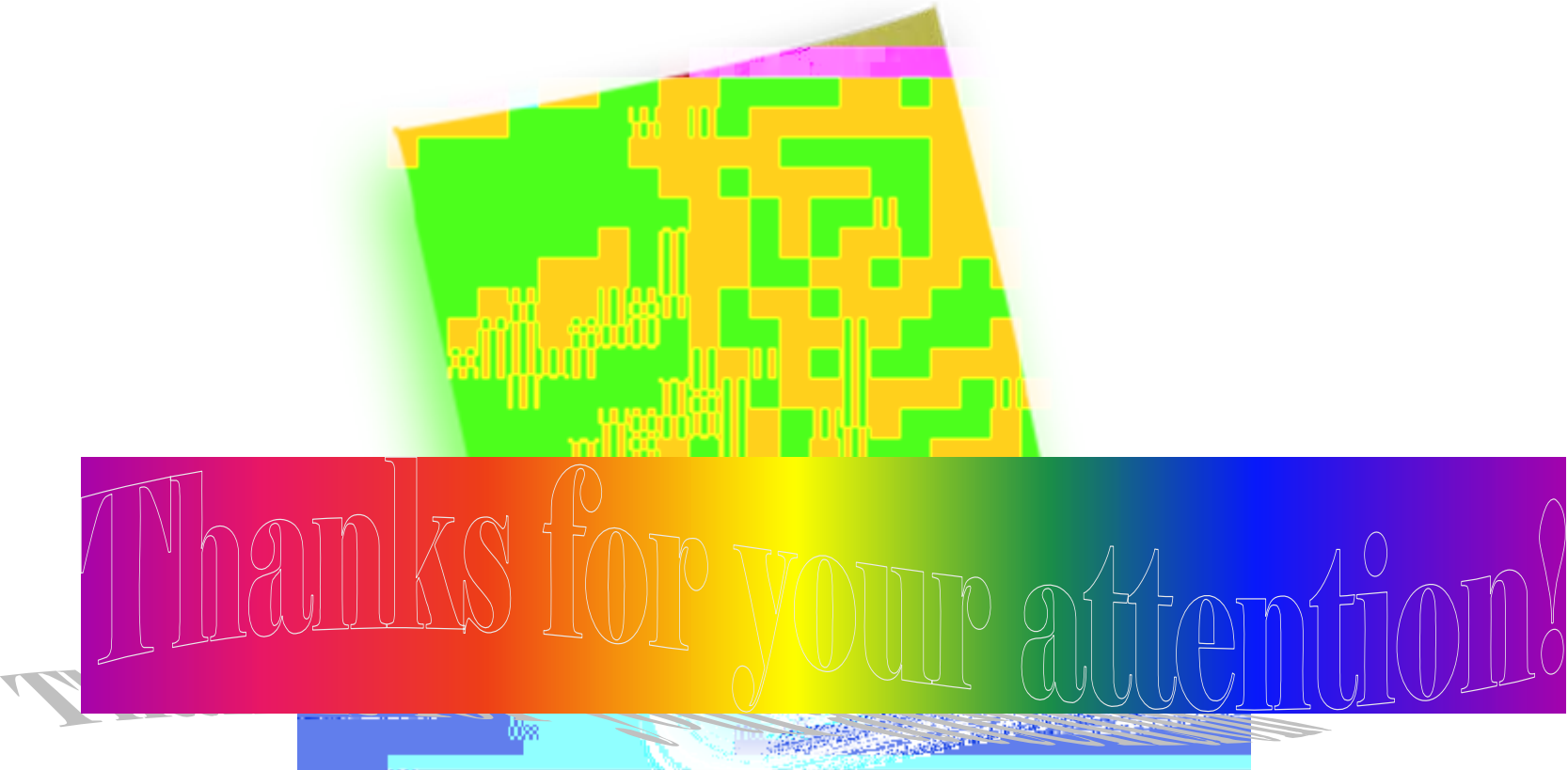
2010

ABC

-



- 研制建立硫酸软骨素钠分子量测定用对照品，将分子量与分子量分布项目增订入标准。
- 通过标准提高工作，硫酸软骨素钠注射剂也将增订入中国药典。



Thanks for your attention!