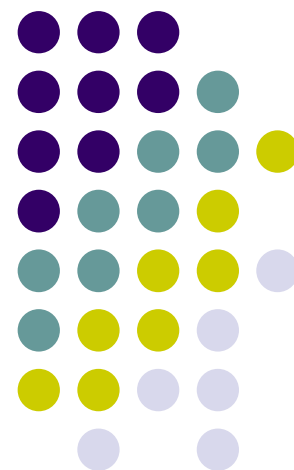


# 硫酸软骨素质量标准 及含量测定

青岛大学药学系

高华

gaohuaqy@126.com





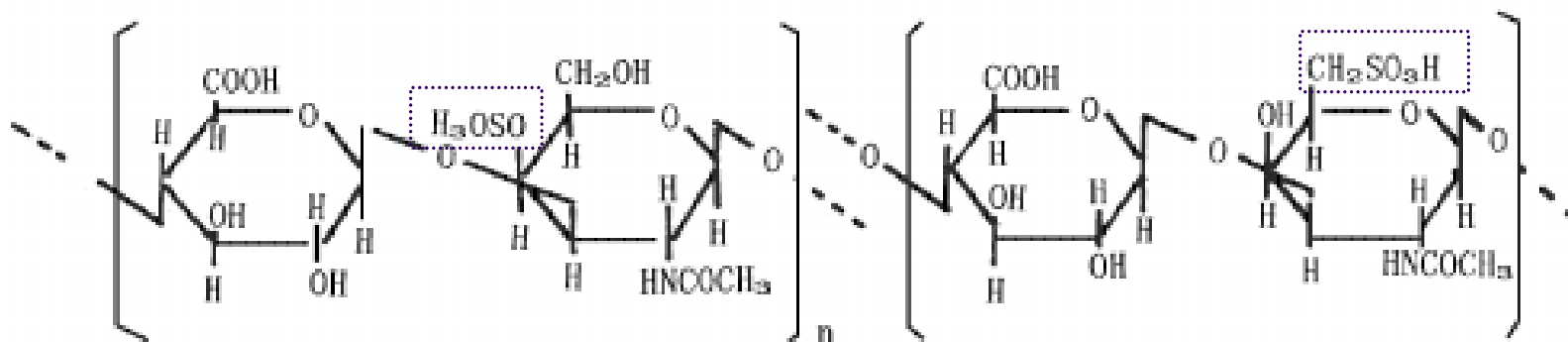
## 一、硫酸软骨素结构

- 硫酸软骨素(Chondroitin Sulfate, CS), 是一种重要的天然酸性粘多糖。
- 硫酸软骨素是由D-葡萄糖醛酸和N-乙酰基-D-氨基半乳糖以 $\beta$ -1,3糖苷键结合而成的双糖, 而双糖之间以 $\beta$ -1,4苷键连接而成生物大分子。
- CS相对分子质量一般为5000~50000Da。
- 根据硫酸基在半乳糖上位置不同主要分为硫酸软骨素A (CSA)硫酸软骨素C (CSC)



## 硫酸软骨素结构

- 根据硫酸基在半乳糖上位置不同主要分为硫酸软骨素A (CSA)和硫酸软骨素C (CSC)



硫酸软骨素A (CSA)

硫酸基团在半乳糖的第4位C上

硫酸软骨素C (CSC)

硫酸基团在半乳糖的第6位C上



## 二、硫酸软骨素存在形式

- ChS的来源有陆产动物和海洋动物两大类。陆产动物主要是牛、猪、羊和禽等软骨组织中，如喉骨、鼻中骨、气管、血管壁等，主要成分4-硫酸软骨素 (**CSA**)。海洋动物包括软骨鱼的软骨、海参和贝类等，主要成分6-硫酸软骨素 (**CSC**)。
- 软骨中的硫酸软骨素与蛋白质相结合以**蛋白多糖**的形式存在组织中。



### 三、硫酸软骨素质量标准

- **USP32--美国药典29版**  
硫酸软骨素（牛、猪、鸡、鲨鱼）
- **JPC1997 -- 《日本药局方外标准》(1997)**  
硫酸软骨素（牛、猪、鲨鱼）
- **WS-10001-(HD-0894)-2002硫酸软骨素A 钠**
- **WS-10001-(HD-0892)-2002 硫酸软骨素（供注射用）**
- WS-10001-(HD-0895)-2002 硫酸软骨素A钠胶囊  
WS-10001-(HD-0896)-2002 硫酸软骨素滴眼液  
WS-10001-(HD-0854)-2002 复方硫酸软骨素片

# 硫酸软骨素(USP32/JPC1997)



- 来源：牛、猪、鸡软骨
- 外观：白色至乳白色

## ● 理化指标

- ◎硫酸软骨素钠：≥90%
- ◎澄清度：无色透明
- ◎pH值(1%溶液)：5.5~7.5
- ◎干燥失重：≤10.0%
- ◎氯化物：≤0.142%
- ◎硫酸盐：≤0.240%
- ◎重金属：≤20 mg/kg
- ◎积灼残渣：23.0~30.0%
- ◎旋光度：-28° ~ -32°
- ◎氮含量：2.5~3.8%

## ● 微生物指标

- ◎细菌总数：≤100 CFU/g
- ◎霉菌和酵母：≤10 CFU/g
- ◎沙门氏菌，大肠杆菌，葡萄球菌，致病菌：不得检出

# 硫酸软骨素(USP32/JPC1997)



- 来源：鲨鱼软骨
- 外观：白色至乳白色

## 理化指标

- ◎硫酸软骨素钠：≥90%
- ◎澄清度：无色透明
- ◎pH值(1%溶液)：5.5~7.5
- ◎干燥失重：≤10.0%
- ◎氯化物：≤0.142%
- ◎硫酸盐：≤0.240%
- ◎重金属：≤20 mg/kg
- ◎积灼残渣：23.0~30.0%
- ◎旋光度：-12° ~ -18°
- ◎氮含量：2.5~3.8%

## 微生物指标

- ◎细菌总数:≤100 CFU/g
- ◎霉菌和酵母:≤10 CFU/g
- ◎沙门氏菌，大肠杆菌，葡萄球菌，致病菌：不得检出

WS-10001-(HD-0894)-2002

## 硫酸软骨素A 钠



- **来源:** 猪软骨
- **外观:** 白色或微黄色

### ● 理化指标

- ◎ 硫酸软骨素钠:  $\geq 90\%$
- ◎ 澄清度: 无色透明
- ◎ pH值(1%溶液): 5.5~7.5
- ◎ 干燥失重:  $\leq 5.0\%$
- ◎ 硫酸盐: 与标准硫酸钾溶液5.0ml对照液比较, 不得更浓(0.5%)
- ◎ 重金属:  $\leq 20$  mg/kg
- ◎ 平均分子量: 35000-5000
- ◎ 旋光度:  $-27^\circ \sim -33^\circ$
- ◎ 氮含量: 2.2~3.8%

### ● 微生物指标

- ◎ 细菌总数:  $\leq 1000$  CFU/g
- ◎ 霉菌和酵母:  $\leq 100$  CFU/g
- ◎ 沙门氏菌, 大肠杆菌, 葡萄球菌, 致病菌: 不得检出

# WS-10001-(HD-0892)-2002 硫酸软骨素（供注射用）



- 来源：猪软骨
- 外观：白色或微黄色

## ●理化指标

- ◎硫酸软骨素钠： $\geq 90\%$
- ◎澄清度(5%溶液)： $A_{640\text{nm}} \leq 0.05$
- ◎pH值(1%溶液)：5.5~7.5
- ◎干燥失重： $\leq 10.0\%$
- ◎硫酸盐：与标准硫酸钾溶液5.0ml对照液比较，不得更浓(0.5%)
- ◎重金属： $\leq 20 \text{ mg/kg}$
- ◎氯化物： $\leq 1.0\%$
- ◎旋光度： $-27^\circ \sim -33^\circ$
- ◎氮含量：2.5~3.8%

## ●微生物指标

- ◎细菌总数： $\leq 1000 \text{ CFU/g}$
- ◎霉菌和酵母： $\leq 100 \text{ CFU/g}$
- ◎沙门氏菌，大肠杆菌，葡萄球菌，致病菌：不得检出



## 四、硫酸软骨素含量测定方法

- 各个国家对**CS**含量测定方法不尽相同。
- 对几个主要国家**CS**含量测定方法进行介绍。
- 对目前精确度专属性较好的一些方法进行比较，并对**CS**含量测定方法进行评价。



# 1. Elson-Morgan法

- 该法主要用于测定**CS**，包括**CS片**、**CS(供注射用)**、**CS注射液**、**CS滴眼液**、**复方CS片**等。
- 方法原理：供试品先用**6 mol/L**盐酸加热水解生成氨基己糖，然后在碱性条件下与乙酰丙酮反应，生成色原物质，再与对二甲氨基苯甲醛溶液反应产生红色。以氨基葡萄糖为对照品，用分光光度法在**525 nm**波长处测吸光度，乘以系数**0.8309**计算氨基葡萄糖的量。
- 该法不仅不能准确测定**CS**的主体结构的真实含量，而且结果重现性不好。



## 2. 吡啶分光光度法

- 该法主要用于测定**CS-A**钠。包括**CS-A**钠胶囊等。
- 方法原理：硫酸软骨素在酸性溶液中水解生成**D-葡萄糖醛酸**和**N-乙酰-D-氨基半乳糖**。本方法是基于**CS**溶液中加热水解生成等摩尔数的葡萄糖醛酸，与吡啶溶液发生缩合反应生成紫红色化合物。
- **CS**中的葡糖醛酸在饱和硼酸溶液和四硼酸钠硫酸溶液的作用下加热生成糠醛，在**0.2%**吡啶无水乙醇溶液中加热显红色，在**520 nm**波长有最大吸收。



## 2. 呋唑分光光度法

- 测定时以葡萄糖醛酸为对照品。
- 该法准确度有所提高。但专属性仍然不是很好。
- 测定时先水解后显色。对产品中掺入葡萄糖醛酸造成测定结果偏高的问题无法解决，该法测定耗时，因使用浓硫酸给测定操作带来不便。
- 该法不用大型仪器，准确度较高，重现性和稳定性好，适用于中小型企业CS产品测定。



### 3. 浊度分光光度法

- 本方法是利用硫酸软骨素可与氯化十六烷基吡啶缔合生成稳定乳浊液的性质，建立的**CS**浊度分光光度测定法。
- 样品不需水解可直接测定，因而简便快速。
- 由于该方法测定结果偏高及CS澄清度影响测定结果，故适用于澄清度较高的CS测定及生产企业粗略快速检测CS的需要。

## 4. CPC电位滴定法

---氯化十六烷基吡啶（**cetylpyridinium chloride, CPC**）



- 该法主要用于测定原料及产品等。
- 方法原理：**CS**为聚阴离子，可与**CPC**结合，在适宜条件下生成稳定的乳浊液，与**CS**对照品溶液比较混悬液的透光度。可知检测物的含量。
- 该法实验的影响因素少、便于操作。但其他酸性粘多糖也有类似的沉淀反应，专属性不好。



## 4. CPC电位滴定法—测定步骤

- 测定时，以含聚山梨醇酯80的pH 7.0磷酸盐缓冲液作为稀释液。
- 将CS对照品稀释为约1.5, 1.0, 0.5 mg/mL三种标准溶液。各取5.0 mL，分置3个滴定容器中。用CPC溶液进行光度滴定。
- 在420, 550或660 nm波长处测定。滴定前将仪器设置成吸光度为0。用所取标准溶液含CS毫克数及消耗CPC体积作回归方程。
- 另取供试液5.0 mL。同法测定。计算CS的百分含量。



## 5. 高效液相色谱法(HPLC)

- 通过色谱柱分离后定量测定CS含量，同时可检测CS产品纯度。
- 该法专属性强、精密度和准确度较高，样品溶解可直接测定CS含量以及确定CS纯度。
- 但因需要的仪器昂贵，该方法适用于科研单位、商检部门及生产企业鉴定CS产品纯度和含量测定。



## 6. 酶解-高效液相色谱法

---- 《中国药典》2010年版方法

- 方法原理：**CS**钠在硫酸软骨素**ABC**酶作用下，酶解为三种不饱和的二糖。用强阴离子交换硅胶为填充剂，以水(用稀盐酸调节pH值至3.5)为流动相**A**，以**2 mol/L NaCl**溶液(用稀盐酸调节pH值至3.5)为流动相**B**，进行线性梯度洗脱。流速为**1.0 mL/min**，检测波长为**232 nm**。
- 用**CS**钠对照品作为对照，按外标法以**3种**不饱和和二糖的面积之和计算，即得。
- 该法准确度、精确度、专属性都很好。



## 6. 酶解-高效液相色谱法

- 各种软骨素酶，如**chondroitinase ABC**的发现和应  
用，为**CS**多糖的定性和定量，尤其为不同来源**CS**  
细微结构分析提供了重要基础。
- 通过采用组合酶解技术，得到结构不同的二糖，  
再用高效离子色谱法或者高效液相色谱法。
- 对各种二糖进行定量分析，可以准确地确定多糖  
的结构类型及其比例。
- 该方法尤其适合**CS**钠(口服)、**CS**钠片、**CS**钠胶囊  
等制剂中的**CS**分析，并已经作为硫酸软骨素质量  
控制的理想方法之一。



## 其他国家CS测定方法

- 我国的**CS**主要出口到美国、英国、其它欧盟国家等。这些国家是药品生产技术比较先进、药品质量控制比较完善的国家。
- **CS**在这些国家的使用有所不同，因此质量控制也各有侧重。



## ○ 美国CS测定--CPC法

- 美国美国是**CS**的消费大国，主要用为膳食补充剂。
- **CS**为聚阴离子，可与 **CPC**结合，在适宜条件下生成稳定的乳浊液，与**CS**对照品溶液比较混悬液的透光度。可知检测物的含量。
- 该法实验的影响因素少、便于操作。但其他酸性黏多糖也有类似的沉淀反应，专属性不好。



## ○ 英国CS测定--CPC法

- 原理与美国药典相同，具体操作稍有差异。
- 测定时，取**CS**对照品溶液(**1.0 mg/mL**)和供试品溶液(**1.0 mg/mL**)各**5.0 mL**，分别转移至单独的滴定容器中。加水稀释至**50 mL**，调滴定仪于**555 nm**波长处空白溶液的透光率为**100%**。分别用**CPC**溶液进行滴定，滴定至浑浊最大值。曲线下降的最快点即为终点。
- 分别记录标准溶液和供试品溶液所消耗的**CPC**的体积，计算**CS**百分含量。



## ○ 欧洲CS测定--CPC法

- 欧洲药典关于**CS**的质量标准中含量测定项下规定与英国药典相同。
- 美国药典、英国药典和欧洲药典**CS**含量测定均采用的是**电位滴定法**，原理相同但操作方法有所不同，专属性不好。



## ○ 我国CS测定方法

- 我国卫生部药品标准中采用的分光光度法是用盐酸氨基葡萄糖为对照品进行测定。**CS**水解产生的是氨基半乳糖，不仅不能准确测定**CS**的主体结构的真实含量，而且结果重现性不好；
- 酶解液相法不仅操作简单。分离度高。而且通过对**CS**中的二糖单元准确定量，能够精确地反映**CS**钠的真实含量，具有较高的专属性。



## 五、CS测定方法建议

1. 酶解液相色谱法测定--**HPLC**仪器
2. **HPLC**法和**CPC**法同时测定--**HPLC**仪,电位滴定仪
3. **CPC**电位滴定法测定--电位滴定仪
4. 吡啶法测定--分光光度计
5. **CPC**滴定分析法测定--容量分析仪器