

中图分类号: R917; R927 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)18-0057-06
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.18.013



氨糖美辛肠溶片中盐酸氨基葡萄糖有关物质研究*

薛巧如¹, 刘冰滢¹, 邹瑜¹, 黎淑贤², 陈华^{1△}

(1. 广东省药品检验所·国家药品监督管理局血液制品质量控制重点实验室, 广东 广州 510663; 2. 广东药科大学中药学院, 广东 广州 510006)

摘要:目的 建立测定氨糖美辛肠溶片中盐酸氨基葡萄糖有关物质的高效液相色谱法,并分析其影响因素。方法 色谱柱为纳谱 ChromCore AQ C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 3 μm),流动相为水-乙腈(梯度洗脱),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 280 nm,柱温为 30 °C,进样量为 20 μL。采用加速稳定性试验和辅料相容性试验,结合生产工艺分析有关物质的影响因素。结果 已知杂质果糖胺、2,5-脱氧果糖胺、吡嗪、5-羟甲基糠醛、糠醛、2-甲基吡嗪、吡咯-2-甲醛、5-甲基糠醛质量浓度分别在 0.20~3.30 μg/mL、0.20~3.00 μg/mL、0.25~7.54 μg/mL、0.18~7.04 μg/mL、0.25~10.10 μg/mL、0.25~10.18 μg/mL、0.25~10.17 μg/mL、0.26~10.50 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($R^2 \geq 0.999$);检测限为 0.3~5.0 μg/mL,定量限为 0.7~20.1 μg/mL;精密度、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 2.0%;平均加样回收率为 98.24%~101.20%,RSD 为 0.33%~2.19%($n=9$)。影响制剂有关物质产生的因素为工艺、温度和时间,影响有关物质含量增长速率的因素除工艺外,还有辅料(主要为羟甲基淀粉钠)和水分。结论 该方法简便、准确、专属性好,可用于氨糖美辛肠溶剂中盐酸氨基葡萄糖有关物质的检测。建议优化工艺中干燥温度及时间,考察添加辅料的合理性,并控制片剂中的水分,进一步提高制剂质量的均一性和稳定性。

关键词:氨糖美辛肠溶片;盐酸氨基葡萄糖;高效液相色谱法;有关物质

Study on Related Substances of Glucosamine Hydrochloride in Glucosamine Indometacin Enteric - Coated Tablets

XUE Qiaoru¹, LIU Bingying¹, ZOU Yu¹, LI Shuxian², CHEN Hua¹

(1. Guangdong Institute for Drug Control · NMPA Key Laboratory for Quality Control of Blood Products, Guangzhou, Guangdong, China 510663; 2. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou, Guangdong, China 510006)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the determination of related substances of glucosamine hydrochloride in Glucosamine Indometacin Enteric - Coated Tablets, and to analyze their influencing factors. **Methods** The chromatographic column was the NanoChrom ChromCore AQ C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 3 μm), the mobile phase was water - acetonitrile (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 280 nm, the column temperature was 30 °C, and the injection volume was 20 μL. The accelerated stability test and excipient compatibility test were used to analyze the influencing factors of related substances based on the production process. **Results** The linear ranges of known impurities including fructosazine, 2,5 - deoxyfructosazine, pyrazine, 5 - hydroxymethylfurfural, furfural, 2 - methylpyrazine, pyrrole - 2 - carboxaldehyde, 5 - methylfurfural were 0.20 - 3.30 μg/mL, 0.20 - 3.00 μg/mL, 0.25 - 7.54 μg/mL, 0.18 - 7.04 μg/mL, 0.25 - 10.10 μg/mL, 0.25 - 10.18 μg/mL, 0.25 - 10.17 μg/mL, 0.26 - 10.50 μg/mL within the range of peak area linear relationship good ($R^2 \geq 0.999$); detection limit was 0.3 - 5.0 μg/mL, quantitative limit was 0.7 - 20.1 μg/mL; precision, stability, repeatability test results RSD were all less than 2.0%; average sample recovery rate was 98.24% - 101.20%, RSD was 0.33% - 2.19% ($n=9$). Factors affecting the production of related substances in the preparation are process, temperature and time, factors affecting the growth rate of related substance content in addition to process, there are also excipients (mainly hydroxymethyl starch sodium) and moisture. **Conclusion** This method is simple, accurate, and specific, and can be used for the detection of related substances of glucosamine hydrochloride in glucosamine indometacin enteric-coated tablets. It is suggested to optimize the drying temperature and time in the process, and to investigate the rationality of adding excipients, and to control the moisture in the tablets, so as to further improve the uniformity and stability of the quality of the preparation.

* 基金项目: 广东省医学科学技术研究基金[B2021404]; 广东省药品监督管理局科技创新项目[2022TDB02]。

第一作者: 薛巧如, 女, 硕士研究生, 副主任药师, 研究方向为药品质量控制, (电子信箱)12236008@qq.com。

△通信作者: 陈华, 女, 大学本科, 主任药师, 研究方向为药品质量控制, (电子信箱)gdchenhua@sina.com。

causes Treg/Th17 imbalance via NOTCH signaling in immune thrombocytopenia[J]. Hematology, 2021, 26(1): 734 - 740.

[14] LI Q, LIU Y, WANG X, et al. Regulation of Th1/Th2 and Th17/Treg by pDC/mDC imbalance in primary immune thrombocytopenia[J]. Exp Biol Med (Maywood), 2021, 246(15): 1688 - 1697.

[15] 黄宝山, 徐佳丽, 姜帅, 等. ITP 患儿免疫球蛋白、淋巴细胞亚群及 Th17/Treg 的表达分析[J]. 重庆医学, 2022, 51(17): 2961 - 2965.

[16] LIU B, DING F, CAO D, et al. Pseudomonas aeruginosa outer membrane vesicles ameliorates lung ischemia-reperfusion injury by regulating the balance of regulatory T cells and Th17 cells through Tim-3 and TLR4/NF-κB pathway[J]. Inflamm Res, 2021, 70(8): 891 - 902.

[17] ZHONG W, LIU X, ZHU Z, et al. High levels of Tim-3 + Foxp3 + Treg cells in the tumor microenvironment is a prognostic indicator of poor survival of diffuse large B cell lymphoma patients[J]. Int Immunopharmacol, 2021, 96: 107662.

(收稿日期: 2023-08-28; 修回日期: 2024-02-20)

7.54 $\mu\text{g} / \text{mL}$, 0.18 - 7.04 $\mu\text{g} / \text{mL}$, 0.25 - 10.10 $\mu\text{g} / \text{mL}$, 0.25 - 10.18 $\mu\text{g} / \text{mL}$, 0.25 - 10.17 $\mu\text{g} / \text{mL}$, 0.26 - 10.50 $\mu\text{g} / \text{mL}$ ($R^2 \geq 0.999$) respectively. The limit of detection was in the range of 0.3 - 5.0 $\mu\text{g} / \text{mL}$, the limit of quantification was in the range of 0.7 - 20.1 $\mu\text{g} / \text{mL}$. The *RSDs* of precision, stability, and repeatability tests were all lower than 2.0%. The average recovery rate of the above known impurities was in the range of 98.24% - 101.20%, with *RSDs* in the range of 0.33% - 2.19% ($n = 9$). The factors that affected the generation of related substances in the formulation were process, temperature, and time; the factors that affected the growth rate of related substance content included process, excipients (mainly sodium hydroxymethyl starch) and moisture. **Conclusion** This method is simple, accurate, and specific, which can be used for the detection of related substances of glucosamine hydrochloride in Glucosamine Indometacin Enteric - Coated Tablets. We should optimize the drying temperature and time in the process, improve the rationality of adding excipients, and control the moisture in the tablets to further improve the uniformity and stability of the formulation quality.

Key words: Glucosamine Indometacin Enteric - Coated Tablets; glucosamine hydrochloride; HPLC; related substances

氨糖美辛肠溶片属消炎镇痛药, 每片含吲哚美辛 25 mg 和盐酸氨基葡萄糖 75 mg, 临床用于治疗强直性脊椎炎、颈椎病及肩周炎、风湿性或类风湿性关节炎等^[1]。吲哚美辛是非甾体类抗炎镇痛药, 通过抑制环氧合酶的活性, 减少前列腺素合成, 阻止炎性组织痛觉神经冲动形成, 从而抑制炎症反应^[2]。盐酸氨基葡萄糖为天然的氨基单糖衍生物, 又称 *D*-葡萄糖胺盐酸盐 (GAH)^[3], 可抑制关节软骨中的基质金属蛋白酶和磷脂酶 A_2 的活性, 减少受损细胞超氧化物自由基的生成及糖皮质激素对软骨细胞的损害, 从而缓解非甾体抗炎药 (如吲哚美辛) 对体内蛋白质多糖合成的抑制作用。研究显示, 在非甾体抗炎药中加入适当比例的氨基葡萄糖可有效增强药物的镇痛作用, 减少非甾体抗炎药的用量, 从而减少对患者造成的不适, 如胃损伤和肝损伤等^[4-7]。氨糖美辛肠溶片现行质量标准收载于 2020 年版《中国药典 (二部)》^[8], 其中缺少盐酸氨基葡萄糖有关物质检查项。盐酸氨基葡萄糖原料质量标准收载于 *USP43 - NF38*^[9]、*European Pharmacopoeia 11.0* (以下简称 EP)^[10]、*British Pharmacopoeia 2022* (以下简称 BP)^[11] 及《国家药品标准 化学药品地方标准上升国家标准 (第十六册)》^[12]。EP 和 BP 中盐酸氨基葡萄糖原料的有关物质限度为单个最大杂质 0.05%, 杂质总量 0.2%, 均不适用氨糖美辛肠溶片中盐酸氨基葡萄糖有关物质的测定。本研究中采用高效液相色谱法建立氨糖美辛肠溶片中盐酸氨基葡萄糖有关物质的检查方法, 并对产品的工艺和处方进行了考察, 分析有关物质的影响因素, 为优化制剂质量提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Thermo Scientific Ultimate 3000 型高效液相色谱仪, 配有 Chromleon 7 色谱工作站 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); CPA225D 型电子天平 (德国 Sartorius 公司, 精度为 0.01 mg); IKA Tube Mill Control 型研磨仪 (德国 IKA 公司); UV - 2550 型紫外分光光度计 (日本

Shimadzu 公司); BINDER KBF240 型恒温恒湿培养箱 (德国 Binder 公司); HX204 型卤素水分测定仪 (瑞士 Mettler Toledo 公司)。

1.2 试药

氨糖美辛肠溶片 [共 21 批, 企业 A - G (各 3 批), 为 2022 年国家评价性抽验样品, 见表 1]; 盐酸氨基葡萄糖对照品 (批号为 1140649 - 202007, 含量 100%), 5 - 羟甲基糠醛对照品 (批号为 111626 - 202215, 含量 99.5%), 2 - 甲基吡嗪对照品 (批号为 140849 - 201901, 含量 99.5%), 均购自中国食品药品检定研究院; 果糖嗪对照品 (批号为 21 - 06 - 1515, 含量 92.23%), 2,5 - 脱氧果糖嗪对照品 (批号为 21 - 06 - 0922, 含量 98.32%), 吡嗪对照品 (批号为 20 - 03 - 0401, 含量 99.74%), 糠醛对照品 (批号为 18 - 10 - 2125, 含量 99.45%), 吡咯 - 2 - 甲醛对照品 (批号为 20 - 06 - 0303, 含量 99.31%), 5 - 甲基糠醛对照品 (批号为 20 - 02 - 2704, 含量 95.87%), 均购自美国 Sinco Pharmachem 公司; 乙腈为色谱纯, 水为超纯水。

表 1 样品来源

Tab. 1 Source of samples

企业	样品批号	企业	样品批号	企业	样品批号
A	201005		210704		20210301
	210503		210901	F	20210902
	210701	D	207210321		20220405
B	2108304		207210821		20210903
	2109034		207211021	G	20200903
	20211004	E	20211001		20210301
C	210802		20201101		20210302

2 方法与结果

2.1 有关物质含量测定

2.1.1 色谱条件

色谱柱: 纳谱 ChromCore AQ C_{18} 柱 (250 mm \times 4.6 mm, 3 μm); 流动相: 水 (A) - 乙腈 (B) 梯度洗脱 (见表 2); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 280 nm; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量: 20 μL 。

表2 流动相梯度洗脱程序
Tab. 2 Program of gradient elution

t (min)	A (%)	B (%)	t (min)	A (%)	B (%)
0	100	0	26	50	50
10	96	4	27	100	0
20	90	10	35	100	0

2.1.2 溶液制备

杂质对照品溶液:取果糖嗪、2,5-脱氧果糖嗪、吡嗪、5-羟甲基糠醛、糠醛、2-甲基吡嗪、吡咯-2-甲醛、5-甲基糠醛(以下简称杂质1-8)对照品各适量,精密称定,加水分别制成每1 mL含0.1 mg的单一对照品溶液。量取适量,加水,摇匀,制成每1 mL各含5 μg的混合对照品溶液。

供试品溶液:取样品10粒,打粉,取约0.2 g(相当于盐酸氨基葡萄糖75 mg,下同),精密称定,置25 mL容量瓶中,加水溶解并定容,摇匀,即得。

空白溶液:按各企业处方,制备缺盐酸氨基葡萄糖

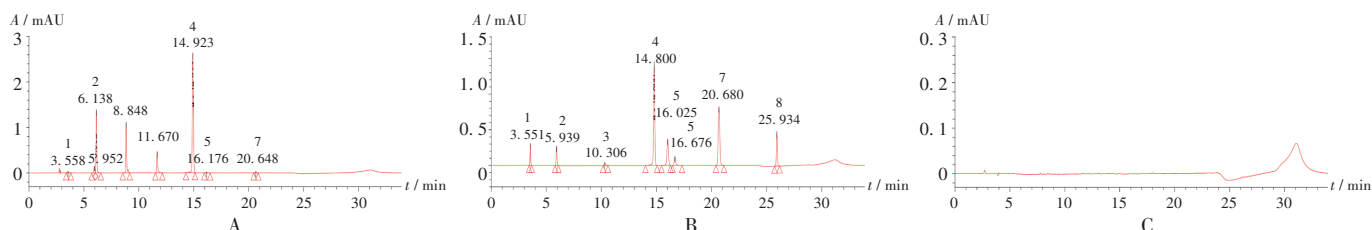
的空白片,打粉,取1片重,置25 mL容量瓶中,加水溶解并定容,摇匀,即得。

系统适用性溶液:取盐酸氨基葡萄糖对照品20 mg,精密称定,置具塞试管中,加水10 mL溶解,98 °C水浴加热3 h,摇匀,即得。

2.1.3 方法学考察

系统适用性试验:取2.2项下系统适用性溶液、混合对照品溶液及空白溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果系统适用性溶液色谱图中2,5-脱氧果糖嗪与相邻峰($t = 5.952 \text{ min}$)的分离度为1.2,理论板数均大于5 000;空白溶液在与混合对照品溶液色谱图保留时间相同处无干扰峰。详见图1。

破坏性试验:取氨糖美辛肠溶片装量差异项下细粉(批号为207211021)进行破坏试验(见图2)。1)酸破坏。取样品细粉约0.2 g,精密称定,置25 mL容量瓶中,加水2 mL溶解,加1 mol/L盐酸溶液1 mL,放置1 h后,加入1 mol/L氢氧化钠溶液1 mL中和,加水定容,



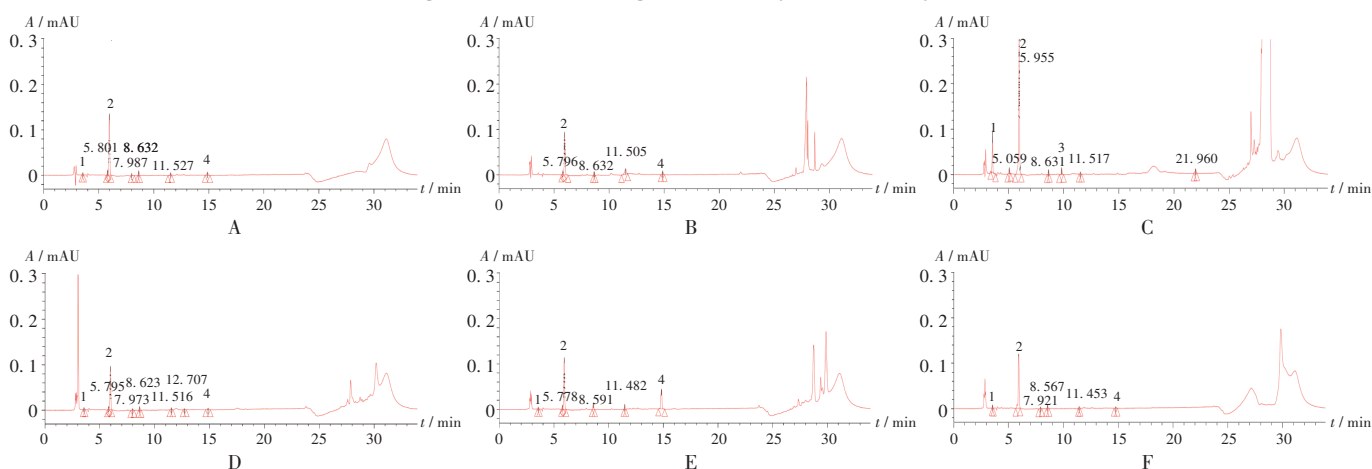
1. 果糖嗪 2. 2,5-脱氧果糖嗪 3. 吡嗪 4. 5-羟甲基糠醛 5. 糠醛 6. 2-甲基吡嗪 7. 吡咯-2-甲醛 8. 5-甲基糠醛
A. 系统适用性溶液 B. 混合对照品溶液 C. 空白溶液(企业D)

图1 系统适用性试验色谱图

1. Fructosazine 2. 2,5-Deoxyfructosazine 3. Pyrazine 4. 5-Hydroxymethylfurfural 5. Furfural 6. 2-Methylpyrazine 7. Pyrrole-2-carboxaldehyde 8. 5-Methylfurfural

A. System suitability solution B. Mixed reference solution C. Blank solution (enterprise D)

Fig. 1 HPLC chromatograms of the system suitability test



A. 未破坏 B. 酸破坏 C. 碱破坏 D. 氧化破坏 E. 加热破坏 F. 光照破坏

1. 果糖嗪 2. 2,5-脱氧果糖嗪 3. 吡嗪 4. 5-羟甲基糠醛

图2 破坏性试验色谱图

A. Non-destruction B. Acid destruction C. Alkali destruction D. Oxidative destruction E. Heating destruction F. Light destruction

1. Fructosazine 2. 2,5-Deoxyfructosazine 3. Pyrazine 4. 5-Hydroxymethylfurfural

Fig. 2 HPLC chromatograms of the destructive test

摇匀,作为酸破坏供试品溶液。2)碱破坏。取样品细粉约0.2 g,精密称定,置25 mL容量瓶中,加水2 mL溶解,加1 mol/L氢氧化钠溶液1 mL,放置1 h后,加入1 mol/L盐酸溶液1 mL中和,加水定容,摇匀,作为碱破坏供试品溶液。3)氧化破坏。取样品约0.2 g,精密称定,置25 mL容量瓶中,加水2 mL溶解,加30%过氧化氢100 μ L,放置1 h后,加水定容,摇匀,作为氧化破坏供试品溶液。4)加热破坏。取样品约0.2 g,精密称定,于80 $^{\circ}$ C烘箱加热1 h后,置25 mL容量瓶中,加水溶解并定容,摇匀,作为热破坏供试品溶液。5)光照破坏。取样品约0.2 g,精密称定,置25 mL容量瓶中,光照48 h,加水溶解并定容,摇匀,作为光照破坏供试品溶液。取上述5种供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果表明,各杂质均能较好分离(分离度 >1.5),表明方法专属性良好。样品对碱性条件和加热条件较敏感,杂质的个数和含量均有所增长。

线性关系考察:取2.2项下单一对照品溶液各适量,加水配制成不同质量浓度的系列单一对照品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,以各待测成分的质量浓度($X, \mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归。结果见表3。

表3 线性关系考察结果

Tab. 3 Results of the linear relation test

待测成分	回归方程	R^2	线性范围($\mu\text{g}/\text{mL}$)	检测限(ng)	定量限(ng)
果糖嗪	$Y_1 = 257.092X_1 + 2.483.1$	1.000	0.20~3.30	0.6	1.3
2,5-脱氧果糖嗪	$Y_2 = 281.283X_2 + 2.287.8$	0.999	0.20~3.00	0.6	1.2
吡嗪	$Y_3 = 75.801X_3 + 2.697.1$	1.000	0.25~7.54	5.0	20.1
5-羟甲基糠醛	$Y_4 = 1.415.903X_4 + 17.236.3$	1.000	0.18~7.04	0.3	0.7
糠醛	$Y_5 = 1.661.680X_5 + 12.400.3$	1.000	0.25~10.10	0.4	1.0
2-甲基吡嗪	$Y_6 = 274.660X_6 + 4.091.2$	1.000	0.25~10.18	2.0	5.1
吡咯-2-甲醛	$Y_7 = 1.557.189X_7 + 23.409.6$	1.000	0.25~10.17	0.4	1.0
5-甲基糠醛	$Y_8 = 954.006.X_8 + 11.075.3$	1.000	0.26~10.50	0.4	1.1

检测限与定量限考察:精密量取2.2项下混合杂质对照品溶液适量,加水倍比稀释,按2.1项下色谱条件进样测定,以比信噪比分别为3:1、10:1各待测成分的质量为检测限和定量限。结果见表3。

精密度试验:精密吸取2.2项下混合对照品溶液适量,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录色谱图。结果杂质1-8峰面积的RSD分别为0.22%, 0.31%, 1.38%, 0.26%, 1.06%, 1.04%, 1.27%, 1.35% ($n=6$)。表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取供试品溶液(批号为207211021)适量,分别于室温下放置0,6,12,18,24 h时按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果果糖嗪和2,5-脱氧果糖嗪峰面积的RSD分别为1.51%和1.20% ($n=5$),

表明供试品溶液室温下放置24 h内稳定。

重复性试验:取样品(批号为207211021)适量,精密称定,各6份,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果果糖嗪和2,5-脱氧果糖嗪含量分别为0.002%和0.05%,RSD为1.15%和0.33% ($n=6$),其余6种已知杂质均未检出。表明方法重复性良好。

耐用性试验:考察同型号(纳谱ChromCore AQ C₁₈)色谱柱的不同批次(17338-S01017、17338-S01018)、不同品牌[Agilent Pursuit 3 C₁₈柱(250 mm \times 4.6 mm, 3 μ m)]对检测结果的影响。结果有关物质(8种已知杂质、未知杂质及总杂质)含量均一致,表明色谱柱发生一定程度变化时,本方法能满足试验要求,耐用性良好。

加样回收试验:按企业D样品处方,取辅料0.1 g,加入8种杂质对照品适量,加水制成每1 mL中分别含上述杂质约4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液各3份。按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算回收率。结果见表4。

表4 加样回收试验结果(% , $n=9$)

Tab. 4 Results of the recovery test (% , $n=9$)

待测成分	\bar{X}	RSD	待测成分	\bar{X}	RSD
果糖嗪	99.04	0.98	糠醛	98.24	1.03
2,5-脱氧果糖嗪	100.84	0.54	2-甲基吡嗪	100.24	1.26
吡嗪	100.37	2.19	吡咯-2-甲醛	98.99	1.28
5-羟甲基糠醛	101.20	0.99	5-甲基糠醛	99.09	0.33

2.1.4 样品有关物质测定

取21批样品粉末各适量,精密称定,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算含量(EP中未知杂质以2-甲基吡嗪计,由于主要杂质果糖嗪在该色谱条件下与2-甲基吡嗪的校正因子基本一致,故以果糖嗪计)。结果仅检出果糖嗪和2,5-脱氧果糖嗪,其余6种已知杂质均未检出、对7家制剂不同来源的5批原料进行考察结果均未检出上述8种已知杂质,杂质总量小于0.01%。详见表5。

2.2 有关物质影响因素分析

加速稳定性试验:取7个企业各1批样品,去除纸盒包装,含铝塑包装置恒温恒湿箱(温度40 $^{\circ}$ C,湿度75%)中,分别于第1、第2、第3个月取样测定。结果见图3。能检出且含量发生变化的杂质为2,5-脱氧果糖嗪、5-羟甲基糠醛、果糖嗪;前2种杂质含量随着时间的延长均有不同程度的增加,部分企业样品中果糖嗪有少量增加。除企业G,其余6家企业样品在放置1个月后2,5-脱氧果糖嗪含量均超过0.2%,至第3个月最高达0.8%(企业E)。

表5 样品有关物质测定结果(%)

Tab. 5 Results of content determination of related substances in samples (%)

编号	果糖嗪	2,5-脱氧果糖嗪	最大未知单个杂质	杂质总量
1	0.011	0.125	0.020	0.199
2	0.006	0.077	0.009	0.117
3	0.007	0.170	0.018	0.223
4	0.014	0.186	0.004	0.214
5	0.011	0.150	0.005	0.176
6	0.003	0.158	0.005	0.173
7	0.101	0.292	0.009	0.424
8	0.077	0.296	0.007	0.403
9	0.081	0.312	0.009	0.412
10	0.003	0.121	0.009	0.155
11	0.007	0.116	0.010	0.148
12	0.002	0.067	0.005	0.085
13	0.009	0.140	0.006	0.157
14	0.003	0.106	0.006	0.115
15	0.003	0.122	0.007	0.136
16	0.004	0.088	0.005	0.098
17	0.001	0.029	0.002	0.032
18	0.001	0.037	0.002	0.041
19	0.005	0.114	0.006	0.139
20	0.004	0.098	0.005	0.120
21	0.003	0.111	0.009	0.139

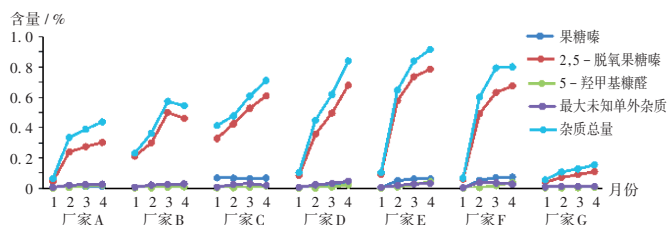


图3 加速稳定性试验结果

Fig. 3 Results of the accelerated stability test

辅料相容性试验:7家企业样品涉及辅料共11种,分别为玉米淀粉、预胶化淀粉、磷酸氢钙、糊精、羟丙甲纤维素、硬脂酸镁、低取代羟丙纤维素、羟甲基淀粉钠、蔗糖、聚维酮K30和微晶纤维素。按主药(盐酸氨基葡萄糖):辅料=1:1(m/m)的比例混合均匀后,置的称量瓶(规格为25 mm×25 mm)中,平铺,不加盖。置恒温恒湿箱(温度40℃、相对湿度75%)中,3 d后取样;同时放置盐酸氨基葡萄糖原料作对照。结果显示,羟丙甲纤维素、羟甲基淀粉钠和聚维酮K30能加速盐酸氨基葡萄糖的降解,其中羟甲基淀粉钠对盐酸氨基葡萄糖有关物质的增加影响最大(见表6),其余辅料未见杂质增长(<0.003%)。各企业3种辅料添加信息见表7。

制剂水分测定:取各企业样品适量,打粉后,采用卤素水分测定仪快速测定制剂水分。结果见表7。

表6 辅料相容性试验结果

Tab. 6 Results of the excipient compatibility test

辅料	性状	3 d后性状	含量增幅(%)		
			果糖嗪	2,5-脱氧果糖嗪	其他杂质
羟丙甲纤维素	白色	浅黄色	0.1	0.01	<0.003
羟甲基淀粉钠	白色	浅棕色	0.3	1.1	<0.003
聚维酮K30	白色	糊状、浅棕色	<0.003	0.1	0.02

表7 制剂信息

Tab. 7 Information of formulations

企业	干燥方式	干燥温度(℃)	干燥时间	辅料	水分(%)
A	烘箱	70	0.5~1 h	-	4.44
B	烘箱	55	4~5 h	羟甲基淀粉钠	1.78
C	烘箱	60~65	5 h	羟甲基淀粉钠	2.48
D	烘箱	40	1 h	-	3.74
E	流化床	45~65	30 min	羟甲基淀粉钠,聚维酮K30	4.94
F	流化床	30~50	40 min	羟甲基淀粉钠,聚维酮K30	2.92
G	流化床	35	30~40 min	羟丙甲纤维素	2.78

注:-表示未添加羟丙甲纤维素、羟甲基淀粉钠、聚维酮K30。

Note:- indicates that hydroxypropyl methylcellulose, sodium hydroxymethyl starch, and polyvinylpyrrolidone K30 are not been added.

生产工艺分析:7家企业样品的片芯均采用湿法制粒,生产工艺的主要区别是湿粒干燥的温度、方式及时间。结果见表7。

3 讨论

3.1 试验条件选择

色谱柱:目前,测定盐酸氨基葡萄糖有关物质常用氨基柱和C₁₈柱,但前者不能对系统适用性溶液的有关物质进行有效分离,柱效下降较快,且峰形至后期变化较大。故采用耐纯水相的C₁₈色谱柱。

流动相:研究表明,流动相为磷酸盐会干扰195 nm波长处的盐酸氨基葡萄糖检测^[13],参考EP项下方法,前期试验中考察了不同浓度含离子对的磷酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液和水。结果磷酸盐缓冲液在3~6 min出现多个倒峰,影响果糖嗪和2,5-脱氧果糖嗪的峰形和定量;以水-乙腈为流动相(梯度洗脱)可避免上述问题。同时,预试验中还考察了流动相A比例(±2%)、pH(5.2、6.2)、流速(0.8 mL/min、1.2 mL/min)和柱温(25℃、35℃),结果拟订方法稳定性良好。

检测波长:盐酸氨基葡萄糖无紫外吸收,不能采用自身对照法计算杂质的含量。现行标准和文献中常用检测波长为195 nm^[14-15];但氨糖美辛肠溶片采用蔗糖作为粘合剂,在195 nm波长处有吸收,与果糖嗪出峰位置重合,干扰测定。预试验中于200~300 nm波长范围内进行全波段扫描,测得杂质1-8的最大吸收波长分别为273,274,260,284,276,266,292,291 nm。结果选用280 nm作为测定波长,该波长处主要杂质果糖嗪、

2,5-脱氧果糖嗪与2-甲基吡嗪的校正因子基本一致,可参照EP中方法,采用单个杂质对其他已知和未知的杂质定量。

3.2 杂质分析

杂质限度:系统适用性溶液色谱图显示,氨糖美辛肠溶片中存在的杂质为果糖嗪、2,5-脱氧果糖嗪、5-羟甲基糠醛、糠醛及吡咯-2-甲醛及未知杂质。根据本研究中样品杂质含量测定及稳定性试验结果,并参照硫酸氨基葡萄糖胶囊进口注册标准(JX20160314),拟订2,5-脱氧果糖嗪的限度为0.20%,果糖嗪和其他杂质限度为0.10%,杂质总量为0.50%。

成分分析:专属性试验显示,本品对高温和碱不稳定。果糖嗪、2,5-脱氧果糖嗪及5-羟甲基糠醛为主要的已知降解杂质。采用质谱对系统适用性溶液中保留时间为5.952 min、8.848 min及11.670 min的未知杂质进行了初步研究,测得5.952 min的杂质分子式为 $C_{12}H_{20}N_2O_7$,分子量304.30,推测结构为2,5-脱氧果糖嗪的1位羟基脱氧产物;8.848 min和11.670 min的杂质分子式均为 $C_{12}H_{18}N_2O_6$,分子量均为286.30,推测结构为2,5-脱氧果糖嗪或其异构体的脱水产物。后续可进一步合成杂质进行验证。

3.3 有关物质影响因素分析

盐酸氨基葡萄糖的杂质产生与生产工艺相关^[16]。氨糖美辛肠溶片中的盐酸氨基葡萄糖有关物质的主要影响因素是制剂工艺中干燥的时间和温度。企业B和企业C是有关物质含量最高的企业,与其工艺过程中加热温度 $\geq 55^\circ\text{C}$ 、时间 $\geq 4\text{h}$ 有关。其中企业C 2,5-脱氧果糖嗪含量和杂质总量远高于其他企业,与其工艺过程中加热时间最长(5h)、温度高(60~65 $^\circ\text{C}$)有关。制剂在放置过程中,杂质含量的增长速率不同,除了与其工艺过程相关,影响因素还有辅料和制剂中的水分。制剂中的羟甲基淀粉钠是影响有关物质含量增长速率的主要辅料,且还存在聚维酮K₃₀和羟甲基纤维素的影响;水分越高,制剂有关物质含量增长越快。企业B,C,G 2,5-脱氧果糖嗪增加的含量均小于0.3%,3个企业制剂的水分均小于3.0%;企业A,D,E 2,5-脱氧果糖嗪增加含量均大于0.3%,3家企业的制剂水分均大于3.0%,其中企业E 2,5-脱氧果糖嗪增加最大,其制剂水分含量最高(4.94%)。企业A的制剂水分含量虽较高(4.44%),但其未添加羟甲基淀粉钠,且干燥时间较短(0.5~1h),故有关物质含量增长较慢。企业G样品各杂质增长明显低于其他企业,与其工艺中采用低温短时干燥、辅料中无羟甲基淀粉钠等有关。

3.4 方法评价

本研究中建立的测定方法操作简单,专属性强,可

有效检测氨糖美辛肠溶片中盐酸氨基葡萄糖有关物质。各企业氨糖美辛肠溶片中有关物质差异较大,影响因素较多,建议优化工艺中干燥温度及时间,考察添加辅料的合理性,并控制片剂中的水分,进一步提高制剂质量的均一性和稳定性。

参考文献

- [1] 陈刚,章菁. 浅析我国药物研发中杂质研究面临的挑战与思考[J]. 科技资讯,2018,16(32):227.
- [2] 吕倩,李婷婷,李珂. 紫外分光光度法测定吡啶美辛片含量及肠溶片的释放度[J]. 泰山医学院学报,2015,36(8):884-887.
- [3] 杨淮,王崇益. HPLC-ELSD法测定盐酸氨基葡萄糖胶囊中盐酸氨基葡萄糖的含量[J]. 淮阴师范学院学报(自然科学版),2015,14(1):48-51.
- [4] 刘康妍,凌龙,胡海澜. 氨基葡萄糖在骨关节炎中的应用疗效及安全性分析[J]. 中华关节外科杂志:电子版,2017,11(6):673-675.
- [5] WANG ZY, WANG JN, ZHANG L, et al. Diacerein plus glucosamine hydrochloride improves the safety and efficacy and inhibit inflammatory factors in the treatment of knee osteoarthritis[J]. Am J Transl Res,2023,15(1):548-555.
- [6] 张洪文,徐慧萍,于磊. 骨筋丸胶囊联合氨糖美辛治疗腰椎骨性关节炎的疗效及对血清学因子的影响[J]. 现代药物与临床,2021,36(3):521-524.
- [7] 朱惠琴. 氨糖美辛致高血压患者神经系统症状3例[J]. 首都医药,2002,9(9):63.
- [8] 中国药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2020:1382.
- [9] The United States Pharmacopoeial Convention. USP43-NF38[M]. Rockville: The United States Pharmacopoeial Convention, 2020:5045.
- [10] European Pharmacopoeia Commission. European Pharmacopoeia 11.0 [M]. Strasbourg: European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare, 2023:2892.
- [11] British Pharmacopoeia Commission. British Pharmacopoeia 2022 [M]. London: The Stationery Office, 2022:1178-1179.
- [12] WS1-XG-028-2001, 国家药品标准 化学药品地方标准 上升国家标准(第十六册)[S].
- [13] 张晓凤,梁建登. 用高效液相色谱法测定盐酸氨基葡萄糖片中有关物质的结果[J]. 当代医药论丛,2017,15(7):28-29.
- [14] 但晓梦,谢育媛,郭江红,等. 盐酸氨基葡萄糖颗粒有关物质方法的建立与验证[J]. 中国药师,2022,25(7):1282-1287.
- [15] 张德柱,宋愿智,沈登林. 盐酸氨基葡萄糖胶囊有关物质测定方法研究[J]. 西北药学杂志,2014,29(3):252-255.
- [16] 王琼芬,倪东宇,张梦奇,等. 盐酸氨基葡萄糖片中吡嗪类杂质含量测定及成因分析[J]. 中国药业,2023,32(18):72-77.

(收稿日期:2023-09-08;修回日期:2024-03-09)