

参照《日本药典》第十七改正版中透明质酸的分析

Analysis of hyaluronic acid in accordance with the 17th edition of the Japanese Pharmacopoeia

透明质酸是D-葡萄糖醛酸和N-乙酰-D-氨基葡萄糖双糖单元结合形成的一种线型葡糖胺聚糖。据称其分子量可达百万以上。它是从鸡冠中分离或由微生物合成而得的生物材料，由于具有弹性和保水性，在医疗领域也得到广泛应用。典型应用实例有滴眼剂（干眼症用眼药、眼科手术佐剂）、关节功能改善剂（注射治疗关节疼痛）和内窥镜用粘膜下注射材料等。

日本药典第十七改正版（2016年4月）中的药品专论新收录了“精制透明质酸钠滴眼液”和“精制透明质酸钠注射液”。其中“精制透明质酸钠滴眼液”的定量检测方法采用HPLC法。所收录的方法是使用小分子分析用SEC色谱柱，将透明

质酸在排除极限溶解量附近洗出，用该色谱峰面积进行定量计算。

本报告介绍了依据日本药典第十七改正版，对透明质酸钠进行分析并确认系统合适性的实例。

分析色谱柱使用的是适合定量检测法试验条件的色谱柱TSKgel G2500PW_{XL}（7.8 mmI.D. x 300 mm, 7 μm）。在被收录的分析条件下，将流量设定为1.0 mL/min，透明质酸的保留时间为5.1分钟。

系统合适性确认结果为：1) 透明质酸和内标物ε-氨基己酸（IUPAC名：6-氨基己酸）的洗脱顺序、2) 透明质酸和ε-氨基己酸的色谱峰分离度、3) 重复测试时的透明质酸的峰面积相对标准偏差等项目都合格。

表1 日本药典收录的定量检测方法试验条件

色谱柱：在内径7.8mm、长度30cm的不锈钢管中装填液相色谱用7μm多孔聚甲基丙烯酸酯。
 流动相：将32.2g十水硫酸钠溶解于水，制成1000 mL溶液
 流量：将透明质酸的保留时间调节为约5分钟
 柱温：40℃左右的恒温
 检测器：紫外吸收光度计（测量波长：210nm）

表2 分析条件

Instrument:	Agilent 1200SL series
Column:	TSKgel G2500PW _{XL} (7.8 mmI.D. x 300 mm, 7 μm)
Eluent:	1.0 mol/L Sodium sulfate
Flow rate :	1.0 mL/min
Column temp.:	40 C
Injection volume :	20 μL
Detector :	UV 210 nm

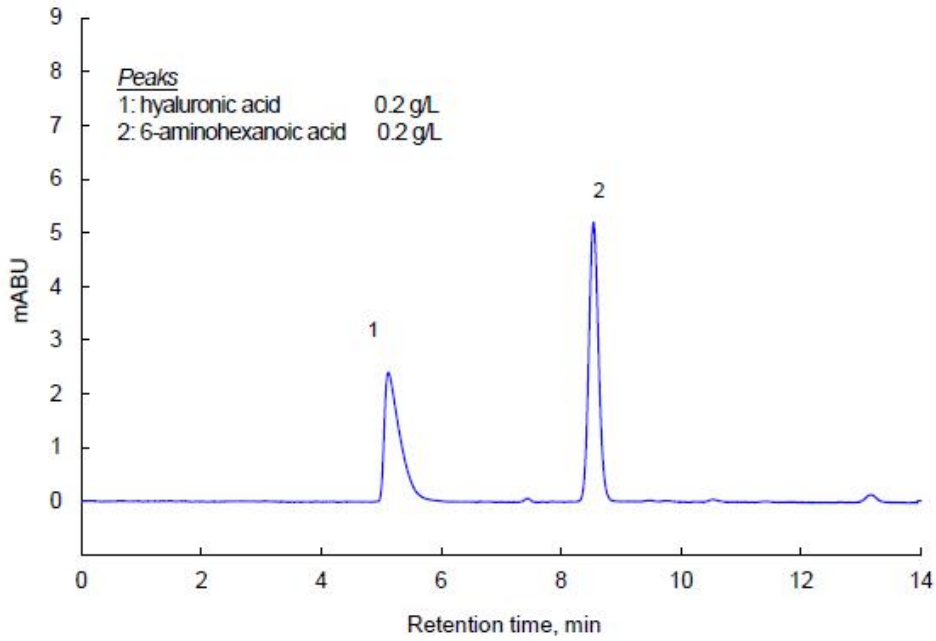


图 1 系统合适性试验样品色谱图

表 3 系统合适性试验

系统合适性试验用溶液:

将50 mg精制透明质酸钠溶解至50 mL氯化钠溶液(9→1000)中。

量取1 mL该溶液和2 mLε-氨基己酸溶液(1→500)，加入流动相，制成20 mL溶液。

系统合适性试验规定

1. 按顺序洗脱透明质酸、ε-氨基己酸
→ 规定的洗脱顺序
2. 透明质酸和ε-氨基己酸的分离度不小于5
→ 分离度9.0
3. 每进样20 μL，重复6次时的透明质酸的峰面积相对标准偏差不得超过2.0%
→ 相对标准偏差为 0.29 %

表 4 重复 6 次测试时的色谱峰面积值

Run	Peak area(mABU · sec)
1 st	43.172
2 nd	42.865
3 rd	43.098
4 th	43.126
5 th	43.039
6 th	42.902
Average	43.034
RSD(%)	0.29