

HPLC 测定泛酸钙的有关物质

林丽琴¹, 杨直¹, 石云峰²(1.杭州市药品检验所, 杭州 310017; 2.浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310004)

摘要: 目的 建立高效液相色谱法测定泛酸钙的有关物质。方法 用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;以磷酸盐缓冲液(取磷酸二氢钾 8.34 g 与磷酸氢二钾 0.87 g, 加水 1 000 mL 溶解, 用磷酸调节 pH 值至 5.7)为流动相;检测波长为 205 nm。结果 杂质峰与主峰能够得到有效的分离, 特殊杂质泛解酸的最低检出限为 1.33 ng, 最低定量限为 4.42 ng; 3 批泛酸钙样品经检测泛解酸含量分别为 0.234%, 0.222%, 0.234%, 其他总杂质分别为 0.168%, 0.165%, 0.157%。结论 该方法准确可靠, 能有效检测出泛酸钙中的有关物质。

关键词: 泛酸钙; 高效液相色谱法; 有关物质

中图分类号: R917.101

文献标识码: B

文章编号: 1007-7693(2012)11-1035-04

Determination of the Related Substances of Calcium Pantothenate by HPLC

LIN Liqin¹, YANG Zhi¹, SHI Yunfeng²(1.Hangzhou Institute for Drug Control, Hangzhou 310017, China; 2.Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310004, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method for determination of the related substances of calcium pantothenate by HPLC. **METHODS** A C₁₈ column was used. The mobile phase was phosphate buffer solution composed of 8.34 g KH₂PO₄ and 0.87 g K₂HPO₄ in 1 000 mL water which pH was 5.7 adjusted by phosphoric acid. The wavelength was 205 nm. **RESULTS** The resolution of calcium pantothenate and related substances was good. The limit of detection of pantoic acid which was the special impurity was 1.33 ng, and the limit of quantitation of it was 4.42 ng. The related substances of three batches of calcium pantothenate were detected, and the contents of the pantoic acid were 0.234%, 0.222% and 0.234%, and the contents of other related substances were 0.168%, 0.165% and 0.157%. **CONCLUSION** The method is accurate and reliable, and could be applied to determine the related substances of calcium pantothenate.

KEY WORDS: calcium pantothenate; HPLC; related substances

泛酸钙系维生素 B 族物质, 是代谢环节中碳水化合物、蛋白质、脂肪及上皮功能维持正常所必需的辅酶 A 的组成部分, 临床上主要用于泛酸钙缺乏的预防和治疗、维生素 B 族物质缺乏时的辅助治疗, 以及一些其他疾病的辅助治疗。本品由泛解酸内酯与β-氨基丙酸合成, 在干燥状态下稳定, 其水溶液对热亦较稳定, 但在酸性或碱性溶液中易水解产生泛解酸、泛解酸内酯及β-氨基丙酸。BP 2009^[1]和 USP 31-NF26^[2]均采用薄层色谱法单独对β-氨基丙酸进行检查, 限度分别为 0.5%和 1.0%; 而对于泛酸钙的其他有关物质现有的相关标准未作任何规定, 仅有的文献报道是采用高效毛细管电泳进行测定^[3]。为控制泛酸钙产品的质量, 本研究采用灵敏度高、选择性好的 HPLC 对泛酸钙的其他有关物质进行检查。

1 仪器与试剂

SHIMADZU 20A 型高效液相色谱仪(日本岛津, 带 DAD 检测器); 泛解酸对照品(浙江杭州某

药业股份有限公司, 批号: 2008051201, 含量: 99.3%); 泛酸钙原料药样品(浙江杭州某药业股份有限公司, 批号: 2008101601, 2008101701, 2008101801); β-氨基丙酸对照品(Sigma 公司, 批号: 066K1248, 含量>99.0%)。磷酸二氢钾、磷酸氢二钾均为分析纯, 实验用水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件的选择

参考《国家食品药品监督管理局国家药品标准》中泛酸钙测定的色谱条件^[4], 试验表明, 在该色谱条件下, 主峰与泛解酸及其余有关物质分离良好。经试验发现, 泛酸钙和泛解酸均为末端吸收, 最大吸收波长均<200 nm, 而在 205 nm 处二者均有较强吸收; 流动相为纯水相, 在此波长处无干扰, 故将检测波长拟定为 205 nm。

2.2 色谱条件

色谱柱: Ultimate™ AQ-C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 磷酸盐缓冲液(取磷酸二氢

作者简介: 林丽琴, 女, 硕士, 主管药师 Tel: 13625817667

E-mail: linliqin_2000@yahoo.com.cn

钾 8.34 g 与磷酸氢二钾 0.87 g, 加水 1 000 mL 溶解, 用磷酸调节 pH 值至 5.7); 检测波长: 205 nm; 流速: $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 进样量: $20 \mu\text{L}$, 柱温: 室温。

2.3 溶液的制备

2.3.1 供试品溶液的制备 取本品适量, 精密称定, 加流动相适量振摇使溶解, 并稀释制成 $0.50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 作为供试品溶液。

2.3.2 对照品溶液的制备 精密量取供试品溶液适量, 用流动相定量稀释制成 $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 作为对照溶液; 取泛解酸对照品适量, 精密称定, 加流动相溶解并定量稀释制成 $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 作为对照品溶液。

2.4 方法专属性考察

2.4.1 系统适用性试验 取泛解酸适量, 加入待测的泛酸钙原料药中, 用流动相溶解, 稀释, 作为系统适用性溶液进样测定, 结果泛解酸与泛酸钙分离良好。取 β -氨基丙酸对照品适量, 加流动相溶解并稀释后进样测定, 结果其保留时间与溶剂峰一致, 故该峰可以和溶剂峰一起扣除。溶剂和 β -氨基丙酸对泛酸钙有关物质的检查均无干扰, 在“2.2”项下色谱条件, 泛解酸和泛酸钙的理论板数分别为 7 183 和 6 754, 分离度良好。结果见图 1。

2.4.2 专属性试验 分别取本品 6 份(批号: 2008101601), 每份约为 0.025 g, 分别置 50 mL 量瓶中, 加流动相适量振摇使溶解, 并稀释至刻度。分别加入 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液 5.0 mL, 放置 8 h, 中和后作为酸破坏供试品溶液; 加入 $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液 5.0 mL, 放置 2 h, 作为碱破坏供试品溶液; 加入 30% 的过氧化氢溶液 2 mL, 放置 24 h,

作为氧化破坏供试品溶液; 在 6 000 lx 的光照下放置 24 h, 作为光破坏供试品溶液; 在 80°C 水浴中加热 24 h, 作为热破坏供试品溶液; 在暗处放置 12 h, 作为未破坏供试品溶液。上述酸、碱破坏供试品溶液分别中和后与其余样品均用流动相稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 取续滤液作为测定液。按“2.2”项下色谱条件, 各进样 $20 \mu\text{L}$ 。试验结果表明, 泛酸钙的酸、碱、氧化、光照与热破坏的降解物与主峰均能获得良好的分离, 且泛解酸与其他降解物亦能达到良好分离, 同时各降解杂质均在 205 nm 的波长处有吸收, 专属性良好。结果见图 2。

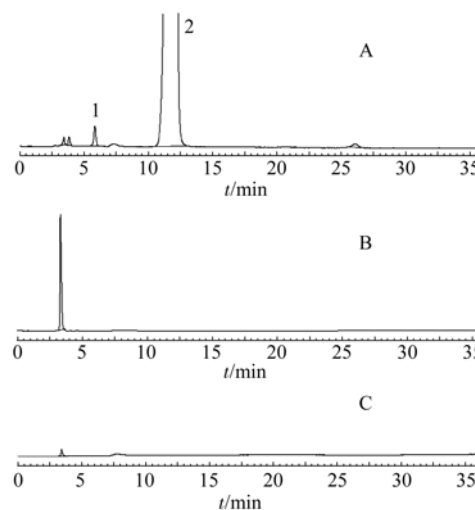


图 1 高效液相色谱图

A-系统适用性溶液; B- β -氨基丙酸溶液; C-空白溶剂; 1-泛解酸; 2-泛酸钙

Fig 1 HPLC chromatograms

A-system suitability solution; B- β -Aminopropionic acid; C-diluents solvent; 1-pantoic acid; 2-calcium pantothenate

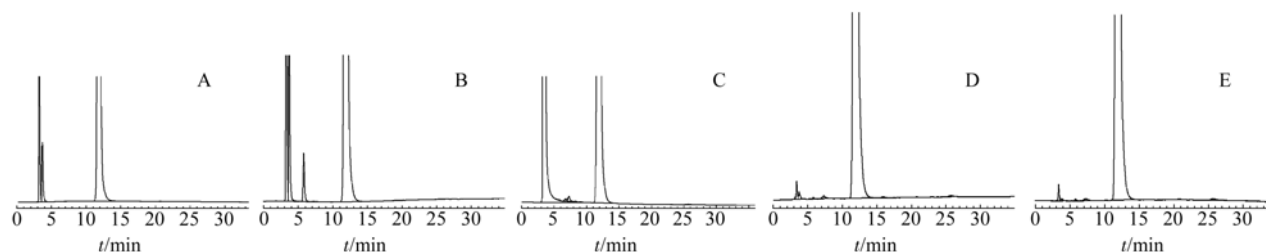


图 2 破坏性实验的高效液相色谱图

A-酸; B-碱; C-氧化; D-光照; E-加热

Fig 2 HPLC chromatograms of destructive tests

A- $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl; B- $2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH; C-30% H_2O_2 ; D-strong light; E-heat

2.4.3 检测限和定量限 取泛解酸对照品适量, 精密称定, 加流动相逐级稀释制成一系列浓度, 取 $20 \mu\text{L}$ 注入高效液相色谱仪, 记录主药峰高约为噪音峰高的 10 倍时的色谱图, 得出定量限为 4.42

ng; 记录主药峰高约为噪音峰高的 3 倍时的色谱图, 得出检测限为 1.33 ng, 同法测得泛酸钙定量限为 1.00 ng, 检测限为 0.33 ng。

2.5 仪器精密度和重复性

取“2.3.2”项下对照品溶液，连续测定5次，测得峰面积的RSD分别为0.32%和0.59%，结果表明本方法的仪器精密度较好；取同一批样品，平行6份，按“2.3.1”项下方法处理，进样测定，结果有关物质测定结果：泛解酸含量为0.22%~0.23%，其他总杂质含量为0.16%~0.17%，表明方法重复性良好。

2.6 线性范围

精密称取泛解酸与泛酸钙对照品适量，加流动相逐级稀释制成一系列浓度，取20 μL 注入高效液相色谱仪，以峰面积对浓度建立线性回归方程，得泛解酸回归方程为 $Y=2\,047.2X+247.58$, $r=0.999\,4$ ，泛酸钙回归方程为 $Y=19\,636X-181.09$, $r=0.999\,8$ 。结果表明，泛解酸在 $0.221\sim 4.42\,\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好，泛酸钙在 $0.05\sim 5.00\,\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好。

2.7 方法耐用性试验

2.7.1 色谱柱的考察 考察了 UltimateTM AQ-C₁₈ 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)，Synergi Hydro-RP C₁₈ 柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 4 μm)，CAPCELL PAK AQ-C₁₈ 柱(150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)3根 ODS 色谱柱，发现用短柱分离效果不佳，而在长柱上泛解酸和其余有关物质均分离良好，故采用250 mm长的 ODS 柱子对泛酸钙进行有关物质测定。

2.7.2 pH 值的变化 改变流动相的 pH 值，在流动相 pH 值为 5.2, 5.7 和 6.2 的条件下，各杂质与主峰均分离良好，杂质测定稳定。

2.7.3 柱温的变化 在柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$ 和 10 $^{\circ}\text{C}$ 的色谱条件下，各杂质与主峰均分离良好，说明在室温(10~30 $^{\circ}\text{C}$)条件下，本色谱条件耐用性良好。

2.7.4 流速的变化 在流速为 0.8, 1.0, 1.2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 时分别进行试验，结果发现，流速的微小变化并不会影响各杂质与主峰的分离，耐用性良好。

2.8 回收率试验

取样品(批号：2008101601)约 10 mg，精密称定，置 20 mL 量瓶中，加泛解酸对照品溶液溶解并稀释至刻度，摇匀，重复制备 6 份，作为回收率测定溶液，进样测定，计算平均回收率为 98.24%，RSD 为 0.85%，结果见表 1。

2.9 有关物质测定的溶液稳定性

取供试品溶液，分别于 0, 3, 6, 9, 13, 16, 25 h 进样，考察溶液的稳定性，结果表明，供试品溶液在 25 h 内基本稳定，用外标法计算泛解酸

的含量为 0.228%~0.236%；其他总杂质含量为 0.160%~0.171%。

表 1 回收率试验($n=6$)

Tab 1 Results of recovery test($n=6$)

样品量/ μg	加入对照 品量/ μg	测得量/ μg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
22.39	49.55	71.43	98.97	98.24	0.85
23.35	49.55	71.54	97.26		
22.98	49.55	71.10	97.11		
24.26	49.55	73.12	98.61		
24.33	49.55	73.17	98.57		
23.98	49.55	72.99	98.91		

2.10 样品有关物质测定

取 3 批样品，按“2.2”和“2.3”项下方法测定，结果见表 2。

表 2 泛酸钙有关物质检查($n=2$)

Tab 2 Results of related substances of calcium pantothenate ($n=2$)

杂质含量	2008101601	2008101701	2008101801
泛解酸/%	0.234	0.222	0.234
其他总杂质/%	0.168	0.165	0.157

3 讨论

本系统流动相采用的是 100%的水相，故在选择色谱柱的时候应该选择能耐纯水相的 C₁₈ 柱，否则会使色谱柱使用寿命减短。由于泛酸钙、泛解酸与泛解酸内酯均易溶于水，本研究采用流动相即磷酸盐缓冲溶液作为溶剂，保证了整个检验过程的经济、方便和无污染，但泛酸钙在磷酸盐存在的条件下会生成溶解度较小的磷酸钙盐，浓度过大，有可能析出，故供试品的浓度不宜过大。

经试验发现，泛解酸内酯在该系统中的出峰时间约为 21 min，与泛酸钙亦能有效分离，根据现有的文献资料，未发现泛解酸内酯的毒性报道，而且在稳定性试验和参与试验的 3 个批次的样品的实际测试过程中，发现供试样品在泛解酸内酯出峰位置均未出峰，故本试验中仅用外标法对泛解酸进行控制，并采用不加校正因子的主成分自身对照法控制其他杂质总量。

本实验采用 HPLC 测定泛酸钙中除 β -氨基丙酸外的有关物质，方法简单，操作方便，可广泛推广用于本品的质量控制，提高泛酸钙产品的质量和安全性。

REFERENCES

- [1] BP 2009 [S]. 2009: 344-345.
- [2] USP31-NF26 [S]. 2008: 1615.
- [3] ZHANG Q, QIU J, LIAO N S. Simultaneous determination of calcium pantothenate and calcium-amino propionate and

γ -butyrolactone by High Performance Capillary Zone Electrophoresis [J]. Chin J Anal Lab(分析实验室), 2001, 20(1): 91-92.

- [4] WS₁-XG-005-2000-2006 [S]. 2007.

收稿日期: 2012-02-27

• 不良反应 •

注射用盐酸头孢替安致结膜充血 2 例

杜海英(杭州市中医院眼科, 杭州 310006)

中图分类号: R969.3

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2012)11-1038-01

患者 1, 男, 56 岁。因肛门反复肿物脱出, 于 2011 年 11 月 12 日住我院肛肠科治疗, 入院时全身查体未见结膜充血, 临床诊断: 混合痔。患者于 11 月 15 日腰麻下行混合痔外剥内扎手术, 术后当天, 给予注射用盐酸头孢替安(韩国大熊制药株式会社, 进口药品注册证号: H201100248, 批号: 063702)2.0 g, bid(皮试阴性, 静脉滴注给药), 预防性用药, 未应用其他静脉及口服药物, 用药 6 h 后, 出现眼结膜充血, 眼科会诊, 查体双眼视力 1.0, 球结膜充血, 无异常分泌物, 乳头增生及滤泡形成, 角膜透明, 前房清亮, 瞳孔光反射正常, 眼压正常, 眼底未见异常, 未作处理。11 月 16 日继续静脉应用头孢替安, 结膜充血加重再次眼科会诊, 考虑药物不良反应。11 月 17 日即停用头孢替安。停药 1 d 后, 结膜充血明显缓解; 3 d 后, 结膜充血消失, 随访 1 个月未再出现。

患者 2, 女, 14 岁, 2012 年 3 月 12 日因反复咳嗽咯痰伴低热就诊我院儿科门诊, 就诊时全身查体未见结膜充血, 实验室检查血白细胞 $6.1 \times 10^9 \cdot L^{-1}$, 中性粒细胞计数 83%; 给予注射用盐酸头孢替安(韩国大熊制药株式会社, 进口药品注册证号: H201100248, 批号: 064732)1.0 g, bid, 皮试阴性, 静脉滴注给药, 3 月 13 日因眼红就诊眼科, 诉眼部无异常分泌物, 查体视力双眼 0.8, 矫正 1.0, 双眼结膜充血, 未见乳头增生及滤泡形成, 角膜透明, 前房清亮, 眼底未见异常, 眼压正常,

患者无发热, 给予停用头孢替安。3 月 14 日复诊, 眼红明显缓解, 3 月 15 日完全消失, 随访 2 周未见复发。

讨论: 2 例患者均经静脉滴用盐酸头孢替安治疗, 治疗前结膜无充血, 用药后出现结膜充血, 第 1 例患者因药物说明书上无眼结膜充血的这一不良反应, 结膜充血待查, 第 2 日继续用药, 结膜充血明显加重。2 例患者除外结膜充血外无其他眼部不适, 局部未应用抗过敏药物。停用头孢替安后, 2 例患者结膜充血恢复正常范围。因此, 可以确定 2 例患者的结膜充血与静脉应用头孢替安有关。注射用盐酸头孢替安是第 2 代头孢霉素类抗菌药物, 为盐酸头孢替安加适量无水碳酸钠制成的无菌结晶性粉末, 是治疗中、重度感染的广谱抗生素, 对革兰阴性菌有较强的抗菌作用。临床上主要用于由敏感菌所致的呼吸道感染、胆道感染、尿路感染、手术及外伤感染等治疗。临床上常见的不良反应有恶心、呕吐、腹泻、过敏性休克、皮疹、荨麻疹、瘙痒、红斑、红细胞、粒细胞和血小板减少、嗜酸粒细胞增高、血清转氨酶增高等。目前, 注射用盐酸头孢替安致结膜充血文献上少有报道, 其引起该不良反应的机制还待进一步深入研究, 头孢替安所致结膜充血因不伴有其他眼部不适, 治疗以停药为主, 可以局部滴用抗过敏药物以改善局部过敏症状。

收稿日期: 2012-03-30

作者简介: 杜海英, 男, 硕士, 主治医师 Tel: (0571)85827552

E-mail: duhaiyinghaiying@163.com