

维生素 C 注射液质量评价及现行标准分析

孙春艳, 定天明, 陈宁林, 胡敏, 姜红(湖北省食品药品监督检验研究院, 武汉 430064)

摘要: 目的 评价国内维生素 C 注射液质量现状及存在的问题, 并根据探索性试验结果对现行质量标准提高提出一些建议。方法 在依据现行国家标准检验的基础上, 开展探索性研究, 对不同分析方法测得的结果进行分析。结果 按照现行标准检验 309 批样品, 合格率为 100%。探索性研究显示, 采用 HPLC 测定有关物质, 68 批样品中有 6 批杂质总量超过 1.0%; 采用 HPLC 测定含量, 所检测的 23 批样品中有 1 批含量低于限度; 样品有关物质的含量、紫外吸收值、颜色呈正相关, 但没有线性关系, 样品溶液为黄色 5 号时杂质总量均超过 1.0%; 产生颜色的物质之一可能由维生素 C 及降解产物缩合而成; 以硫代乙醇酸为抗氧化剂的样品的细胞毒性反应强于以盐酸半胱氨酸为抗氧化剂的样品的细胞毒性反应。结论 目前维生素 C 注射液的产品质量基本能符合现行标准要求, 现行标准基本可行, 但需进一步完善现行质量标准, 增加有关物质检查项, 提高控制颜色的吸光度限值, 建立专属性强含量测定方法, 对毒性较大的辅料应慎用或限制加入量。
关键词: 维生素 C 注射液; 质量评价; 标准分析; 探索性研究

中图分类号: R926 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2014)07-0853-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2014.07.021

Quality Evaluation and Discussion on the Current Quality Standard of Vitamin C Injection

SUN Chunyan, DING Tianming, CHEN Ninglin, HU Min, JIANG Hong(*Hubei Institute for Food and Drug Control, Wuhan 430064, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To evaluate the quality of Vitamin C injection, and offer some suggestions on the current quality standards according to the exploratory results. **METHODS** On the basis of current quality standards, exploratory research methods were used to examine samples, analysis the results from the different methods. **RESULTS** The 309 batches of samples were tested under the current standard, with a pass rate of 100%. Exploratory research showed that 6 of 68 batches of samples' related substances were more than 1.0%, 1 of 23 batches of samples' content was below the limits determined by HPLC. The UV absorption and color of solution was positively correlated, but had no linear relationship. All of the tested samples' related substances were exceeded 1.0% when their colour were equal to NO.5 yellow standard colorimetric solution. One of the colored substances was probably associated by vitamin C and its degradation products. Samples with thioglycolic acid as antioxidant had stronger cytotoxicity than samples with hydrochloride cysteine as antioxidants. **CONCLUSION** The quality of Vitamin C injection can basically meet the current standards, but the current standards need to be further improved by adding check items of related substances, improving limits of absorption value for color check, establishing a highly specific method for the determination of content.

KEY WORDS: Vitamin C injection; quality evaluation; quality standard discussion; exploratory reaserch

维生素 C(vitamin C)又称 L-抗坏血酸(L-ascorbic acid), 能参与体内多种代谢过程, 帮助酶将胆固醇转化为胆酸排泄, 因而减少毛细血管的脆性, 增加机体抵抗能力, 用于防治坏血病, 各种急、慢性传染性疾病及紫癜等的辅助治疗。维生素 C 注射液是国家基本药物, 我国 1958 年开始生产, 至 2013 年 8 月, 全国共有维生素 C 注射液生产批准文号 561 个。维生素 C 注射液是国家评价性抽验品种。国家评价性抽验是在根据法定药品标准进行检验的基础上增加检验项目、方法以及其他的技术手段而进行的深层次抽验^[1], 其基本思路, 可概括为通过市场监督的手段, 分析同品种药品

的质量状况, 发现其主要质量问题; 并探讨在质量标准中增加相关质控项目或修订相应的质控指标; 通过药品质量标准的提高, 进而提高上市药品的质量^[2]。本次评价完成了 309 批维生素 C 注射液的法定检验任务, 并开展了一系列探索性研究工作, 根据法定检验和探索性研究的结果, 对该产品的质量进行评价及标准现状进行分析^[3]。

1 方法

1.1 法定检验方法

维生素 C 注射液在中国药典 2010 年版二部^[4]、BP2012^[5]、USP35^[6]、JP16^[7]均有收载。本次样品均按照中国药典 2010 年版二部检验, 检验项目与

作者简介: 孙春艳, 女, 硕士, 副主任药师

Tel: (027)87895875

E-mail: suncy25@126.com

方法包括：性状、鉴别(化学鉴别和薄层鉴别)、检查(pH 值、颜色、草酸、细菌内毒素、装量、可见异物)、含量测定(碘量法)。与其他几国药典比较，主要区别在于性状及含量测定。中国药典 2010 年版允许性状为无色至微黄色的澄明液体，而国外药典要求为无色的澄明液体。含量测定中国药典采用碘量法，而美国 USP 采用专属性强的 HPLC。

1.2 探索性研究

通过对维生素 C 原料及注射液生产厂家进行现场调研，掌握了大量与本品质量有关的信息，为探索性研究和质量分析奠定了基础。主要针对影响产品质量安全和稳定的关键因素(如颜色控制限度与有关物质检查、有色杂质结构推测、细胞毒试验、含量测定等)进行了如下研究。包括①维生素 C 注射液有关物质考察；②样品溶液颜色、吸光度和有关物质测定相关性的研究；③有色杂质结构推测；④细胞毒试验；⑤含量测定方法研究。

2 结果与分析

2.1 法定检验结果分析

309 批样品共涉及生产企业 72 个，占全国该品种生产企业 23.2%；批准文号 96 个，占全国该品种批准文号数的 11.4%。依照现行质量标准检验，全部符合规定，合格率为 100%。以下是对重要检测项目的结果分析。

2.1.1 性状 维生素 C 注射液在生产及贮藏过程中容易变黄，且随时间增加颜色逐渐变深。中国药典 2010 年版与国外药典主要区别在于性状及含量测定，中国药典 2010 年版对性状的描述为“无色至微黄色的澄明液体”，国外药典描述为“无色的澄明液体”。检验过程中发现，随着样品储存时间的延长，颜色逐渐加深。

2.1.2 颜色 为控制维生素 C 黄色降解产物，现行标准采用紫外分光光度法，将样品配成含维生素 C 50 mg·mL⁻¹ 的溶液，在 420 nm 处测定其吸光度，标准规定吸光度应<0.06。309 批样品吸光度值区间分布图见图 1。

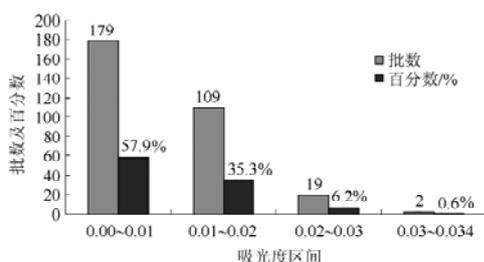


图 1 维生素 C 注射液吸光度区间分布

Tab. 1 The absorbance range distribution of Vitamin C injection

结果显示，309 批维生素 C 注射液的吸光度值在 0~0.034 之间，平均值为 0.012，远低于标准限度规定的 0.06。有 93.2% 的样品吸光度值<0.02，>0.03 的有 2 批，占 0.6%。将样品的颜色与标准比色液比较发现，吸光度最高的样品溶液的颜色相当于黄色 4 号。说明标准规定的吸光度值为 0.06 的限度范围可能过宽，因此有必要设置更合理的限度来控制产品质量。

2.1.3 含量 本次评价的样品含量结果均符合规定，其含量测定结果统计图见图 2。结果显示，大部分样品的含量在 95.0%~101.0% 之间，含量处于低限附近的样品数多于处于高限附近的样品，可能为样品在储藏及运输过程中含量下降所致。维生素 C 注射液含量测定采用的方法为碘量法，该方法专属性不强，故拟建立一种专属性较强方法，比较 2 种方法测定结果的差异。

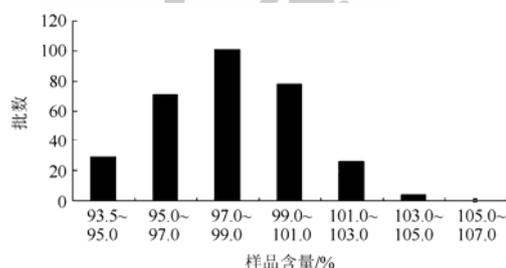


图 2 维生素 C 注射液含量结果分布

Tab. 2 The distribution of Vitamin C injection's contents

2.2 探索性研究结果

2.2.1 有关物质及含量测定方法的确立 参考欧洲药典 EP7.0^[8]维生素 C 原料的有关物质检查方法，建立维生素 C 注射液的有关物质及含量测定的 HPLC 并进行方法学验证。色谱柱为氨基柱，流动相为 0.05 mol·L⁻¹ 磷酸二氢钾溶液-乙腈(25:75)，流速为 1.0 mL·min⁻¹，有关物质检测样品溶液浓度为 5 mg·mL⁻¹，含量测定样品溶液浓度为 0.5 mg·mL⁻¹，进样量为 10 μL。采用 PDA 检测器对样品色谱图中的主峰及各杂质进行分析，确定有关物质检测波长为 210 nm，含量测定的检测波长为 266 nm。专属性试验显示色谱图中各杂质与主峰及杂质间分离度良好，空白溶剂及辅料无干扰，稳定性试验显示样品溶液不稳定，需临用现配。样品溶液在 0.102 1~1.021 2 mg·mL⁻¹ 内线性关系良好，检测限为 1 ng，定量限为 10 ng。

2.2.2 样品有关物质考察 采用建立的方法对 21 批维生素 C 原料药及 60 个生产企业 68 批维生素 C 注射液进行测定。结果显示，维生素 C 原料单

个最大杂质与总杂质含量均远 $<1.0\%$ ，维生素 C 注射液有 5 个厂家 6 批杂质总量 $>1.0\%$ ，说明所建立的方法能体现产品质量的优劣。维生素 C 原料及注射液有关物质测定研究表明，维生素 C 原料质量相对稳定，但维生素 C 性质活泼，水溶液不稳定，在空气暴露、氧化等条件下，维生素 C 注射液降解明显。调研发现，为保证产品含量在效期内合格，许多企业采用增加投料的方法，但未考虑降解杂质，故有必要对该产品的有关物质进行控制。

2.2.3 样品含量考察 按照不同厂家处方配置不同的空白辅料，采用碘量法滴定。结果发现，空白辅料仍然消耗碘滴定液，消耗的体积换算成维生素 C 的含量约为 $1\% \sim 2\%$ ，给维生素 C 注射液的含量测定带来了虚高的误差。采用建立的 HPLC 方法对 20 个厂家的 23 批样品进行含量测定，结果有 1 批样品含量不合格，而采用碘滴定法测定该样品含量合格。碘量法测定 23 批维生素 C 注射液的含量在 $93.3\% \sim 103.1\%$ 内，平均值为 97.2% ，有 1 批样品含量不合格。HPLC 测定 23 批维生素 C 注射液的含量在 $92.0\% \sim 102.1\%$ 内，平均值为 96.2% 。上述含量测定结果可知，碘量法测定的结果平均较 HPLC 测定的结果高 1.0% ，说明 HPLC 更适合维生素注射液的含量测定。

2.2.4 溶液颜色、吸光度和有关物质测定相关性的研究 据文献报道^[9]，其降解过程十分复杂，维生素 C 注射液的降解产物的多少可以通过样品溶液颜色的深浅变化做出初步判定。由于空气暴露氧化是维生素 C 主要的降解途径，且随着暴露时间的延长，样品溶液的颜色逐渐加深。故选取 5 个厂家的样品，采用空气暴露的方式制备与标准色号相比的不同色级的样品。通过测定不同颜色的样品溶液的有关物质含量和吸光度值，分析样品的颜色、有关物质的含量及吸光度三者之间的相关性。不同厂家破坏样品的杂质总量与溶液的颜色关系图见图 3，吸光度与颜色的关系图见图 4。

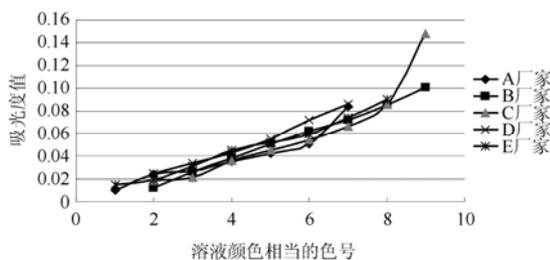


图 3 溶液的颜色与吸光度值的关系图

Tab. 3 The relationship of solution colour and absorbance

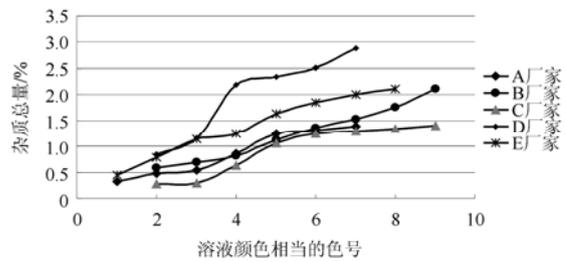


图 4 溶液的颜色与杂质总量的关系图

Tab. 4 The relationship of solution colour and total related substances

分析结果显示，随着维生素 C 注射液颜色的加深，吸光度值及杂质总量均明显增加。当溶液颜色超过黄色 5 号时，所有样品的杂质总量均 $>1.0\%$ ，有的样品颜色相当于黄色 3 号时杂质总量就已 $>1.0\%$ 。说明有关物质的量与颜色的变化呈正比例关系，但没有线性关系，故不能完全根据颜色的深浅来判定有关物质的多少。

从溶液的颜色与吸光度值的关系来看，当溶液的颜色相当于黄色 5 号时，吸光度值仍然 <0.06 ，当溶液颜色为 3 号时，所有样品的吸光值均 ≤ 0.04 ，大部分样品吸光值 <0.03 ，进一步说明现行标准控制溶液吸光度值 ≤ 0.06 的范围过宽，不能有效控制产品质量。

2.2.5 有色杂质结构初步研究 根据维生素 C 及可能的降解产物极性大、亲水的特点，采用高亲水的 HILIC 色谱柱^[10]，检测其有关物质，并通过 LC-MS 分析样品中黄色降解产物。采用的流动相为：醋酸铵($0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ，用氨水调节 pH 值至 6.8)-乙腈(24 : 76)；检测波长：紫外检测器 210 nm。ESI 电喷雾电离源；极性模式：负离子模式。

采用空气暴露的方式制备颜色明显变黄的样品，另取该批号样品不经破坏，配制同种浓度的样品溶液。有关物质和降解产物与主成分峰能有效分离，从空气暴露样品溶液色谱图中可以看出，在保留时间为 12.304 min 处的杂质峰面积增加最为明显，推测可能为维生素 C 注射液黄色降解产物之一。该处杂质紫外最大吸收波长为 266 nm；质谱图上，分子离子峰为 448.056 7，推测可能是维生素 C 及降解产物缔合而成的一种物质，对于其结构还有待进一步探索研究。

2.2.6 细胞毒试验 目前大部分企业的抗氧化剂均为盐酸半胱氨酸，少数企业使用特殊抗氧化剂如甲醛合次硫酸钠、硫代乙醇酸等。硫代乙醇酸属高毒类物质，大鼠经口急性毒性为 $\text{LD}_{50} < 50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ；

小鼠经口为 $250 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 。为探讨维生素 C 注射液中有色降解产物及处方中特殊抗氧化剂硫代乙醇酸的处方量对细胞毒性的影响，试验采用小鼠成纤维细胞，比较符合质量要求的样品和经空气暴露破坏变黄的样品对细胞毒性反应的差异以及比较用盐酸半胱氨酸和硫代乙醇酸 2 种辅料作为抗氧化剂的样品对细胞毒反应的差异。通过试验结果比较，未发现经破坏处理颜色变黄的样品及未破坏处理样品之间的细胞毒性之间存在差别，初步判断空气中暴露破坏处理产生有色物质对细胞毒性影响较小。比较用盐酸半胱氨酸和硫代乙醇酸 2 种辅料作为抗氧化剂的不同样品对细胞毒反应的差异，结果表明使用硫代乙醇酸作为稳定剂的样品毒性较强，应对其加入量进行有效控制。

3 质量风险分析

使用风险指数计算软件，对所抽取的 72 个厂家 309 批维生素 C 注射液进行了质量风险分析，计算了各批样品的批质量 RI、各生产企业维生素 C 注射液质量 RI 与国家药品该品种质量 RI。参与计算的检验项目包括鉴别、溶液的颜色、不溶性微粒、可见异物、草酸、装量差异、pH 值、细菌内毒素、无菌与含量。

计算结果显示，该品种质量风险指数 RI 值为 26。结果显示，各生产企业质量 RI 值在 11~61 之间分布，其中 55.5% 的厂家样品 RI 值 <30 ，309 批该品种 RI 值分布在 5~69 之间分布，批质量 RI 值差异较小。

4 讨论

在使用氨基柱对样品有关物质考察过程中，通过比较不同颜色样品的色谱图发现，保留时间约为 6.7 min 处的单个杂质不仅是色谱图中含量最大，而且其变化也随着样品颜色的加深明显增加，其色谱图如图 5、图 6 所示，此处杂质的相对保留时间约为主峰的 0.78，当样品溶液的颜色相当于黄色 3 号时，该杂质在 0.1%~0.4% 之间。

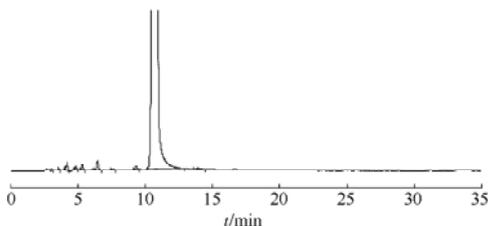


图 5 约相当于黄色 2 号的样品溶液色谱图

Tab. 5 The chromatogram of samples with their colour equal to No.2 yellow standard colorimetric solution

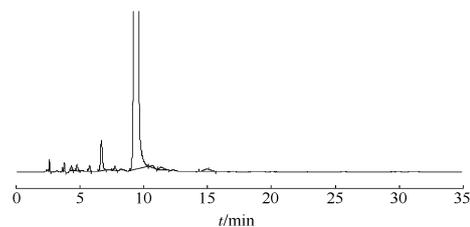


图 6 约相当于黄色 4 号的样品溶液色谱图

Tab. 6 The chromatogram of samples with their colour equal to No.4 yellow standard colorimetric solution

在制备相当于不同色号样品溶液的过程中还发现，当样品溶液的颜色超过黄色 4 号时，颜色加深变快。通过颜色与吸光度、杂质总量的关系可以看出，当颜色小于 4 号时，杂质总量变化相对平缓，当超过 4 号时，杂质总量急剧增加。说明溶液颜色显示为黄色 4 号时，样品降解可能处于临界状态，颜色继续加深杂质会大量增加。

通过测定不同颜色样品溶液的有关物质含量和吸光度值，统计分析样品的颜色、有关物质的含量及吸光度三者之间的相关性。笔者建议维生素 C 注射液的质量标准中应增加有关物质的限量检查项，其限量定为总杂质不得过 1.0%，相对保留时间约为主峰的 0.78 的单个最大杂质不得过 0.4%。同时建议颜色检查项下的吸光度限度由“不得过 0.06”修订为“不得过 0.03”。质量标准的如此修订符合目前该产品的实际质量状况，也有利于更好地控制产品效期内的稳定性。

维生素 C 注射液是国家基本药物，使用范围广、批准文号多、规格多，所以其质量状况更值得我们去关注。从本次抽验的检验结果看，全部维生素 C 注射液生产企业的产品符合规定。质量风险因子为 26，总体质量较好。但中国药典 2010 年版维生素 C 注射液标准存在不足之处，不能客观地、全面地反映药品的质量。主要表现在项目不齐全，方法限度存在一些欠缺之处。探索性研究表明，部分合格样品存在质量隐患。故有必要修订颜色检查项限度、增加有关物质检查项、采用专属性强的含量测定方法，同时加强不稳定注射剂中抗氧化剂的安全性评估，进一步保障用药安全性。

REFERENCES

- [1] WANG M. The role and significance of post marketing drugs [J]. Strait Pharm J(海峡药学), 2007, 19(6): 133-134.
- [2] HU C Q. Strategy on quality evaluation of post-marketing antibiotics in China [J]. Chin J of Antibiot(中国抗生素杂志),

- 2013, 38(1): 1-3.
- [3] AN Y, ZUO Z H, WANG W et al. Quality evaluation and discussion on the current quality standards of Montmoril Ionite powder [J]. Drug Standard China(中国药品标准), 2012, 13(3): 172-177.
- [4] Ch.P(2010)Vol II (中国药典 2010 年版. 二部) [S]. 2010: 907.
- [5] BP 2012 [S]. 2012: 2463.
- [6] USP 34 [S]. 2011: 2242.
- [7] JP 16 [S]. 2006: 302.
- [8] EP 7.0 [S]. 2012: 1418.
- [9] YANG L M, GAO M Y, SHEN Y. Color of Vitamin C injection, pH value and research of content stabilization [J]. Heilongjiang Med J(黑龙江医药), 2002, 15(6): 451-452.
- [10] NOVÁKOVÁ L1, SOLICHOVÁ D, PAVLOVICOVÁ S, et al. Hydrophilic interaction liquid chromatography method for the determination of ascorbic acid [J]. J Sep Sci, 2008, 31(9): 1634-1644.

收稿日期: 2013-09-04