

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.02.017

# 高效液相色谱 - 电喷雾检测器法测定甲钴胺注射液中甘露醇含量

顾晓风, 李玥琦, 田沛霖<sup>△</sup>

(江苏省苏州市药品检验检测研究中心, 江苏 苏州 215104)

**摘要:**目的 建立测定甲钴胺注射液中甘露醇含量的高效液相色谱 - 电喷雾检测器(HPLC - CAD)法。方法 色谱柱为 Agilent ZORBAX SB - C<sub>18</sub> 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为 15% 乙腈 - 80% 乙腈, 梯度洗脱, 流速为 0.5 mL/min; 检测器为 CAD, 雾化气体为氮气, 蒸发管温度为 35 °C, 增益值为 1, 幂函数为 1.0, 采集频率为 10 Hz, 过滤常数为 3.6。结果 甘露醇质量浓度在 0.105 ~ 1.05 mg/mL 范围内其对数值与峰面积对数值线性关系良好( $r = 0.9992$ ), 检测限和定量限分别为 0.21 μg/mL 和 0.70 μg/mL; 精密性、稳定性和重复性试验结果的 RSD 均小于 2.0%; 平均加样回收率为 98.37%, RSD 为 2.02% ( $n = 9$ )。结论 该方法操作简单、检测迅速、结果准确, 可用于测定甲钴胺注射液中甘露醇的含量。

**关键词:**甘露醇; 高效液相色谱 - 电喷雾检测器法; 甲钴胺注射液; 含量测定

中图分类号: R927 文献标志码: A 文章编号: 1006 - 4931(2023)02 - 0075 - 04

## Content Determination of Mannitol in Mecobalamin Injection by HPLC - CAD

GU Xiaofeng, LI Yueqi, TIAN Peilin

(Suzhou Institute for Drug Control, Jiangsu, Suzhou, China 215104)

**Abstract: Objective** To establish a high-performance liquid chromatography - charged aerosol detection (HPLC - CAD) method for the content determination of mannitol in Mecobalamin Injection. **Methods** The chromatographic column was Agilent ZORBAX SB - C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was 15% acetonitrile - 80% acetonitrile (gradient elution), the flow rate was 0.5 mL/min, the detector was CAD, the atomized gas was nitrogen, the temperature of the evaporation tube was 35 °C, the gain value was 1, the power function value was 1.0, the collection frequency was 10 Hz, and the filtration constant was 3.6. **Results** The linear range of mannitol was 0.105 - 1.05 mg/mL ( $r = 0.9992$ ), and the limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were 0.21 μg/mL and 0.70 μg/mL, respectively. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were all less than 2.0%. The average recovery of mannitol was 98.37% with an RSD of 2.02% ( $n = 9$ ). **Conclusion** The method is simple, rapid and accurate, which can be used for the content determination of mannitol in Mecobalamin Injection.

**Key words:** mannitol; HPLC-CAD; Mecobalamin Injection; content determination

甲钴胺是维生素 B<sub>12</sub> 在体内的活性形式之一, 可通过刺激神经细胞合成卵磷脂改善神经传导速度, 修复损伤后的髓鞘<sup>[1]</sup>。其制剂甲钴胺注射液, 临床用于治疗周围神经病及因缺乏维生素 B<sub>12</sub> 引起的巨红细胞性贫血, 对 2 型糖尿病(T2DM)引起的神经病变疗效也较好<sup>[2-3]</sup>。注射用辅料具有赋形、提高稳定性、增溶助溶等重要功能, 是影响药品质量、安全性和有效性的重要成分<sup>[4]</sup>。甲钴胺注射液中除注射用水外, 还添加了甘露醇作为药用辅料。甘露醇在注射剂中主要起填充剂<sup>[5]</sup>的作用, 对药物的稳定性有一定影响<sup>[6-7]</sup>。2020年5月, 国家药品监督管理局正式启动化学仿制药注射剂一致性评价<sup>[8]</sup>。建立准确有效的方法、研究注射剂辅料的种类和用量, 对于保障产品的质量及完成一致性评价均有一定意义。电喷雾检测器(CAD)是近年来兴起的通用型检测器, 其对化合物的结构无特定要求, 可检测不挥发或半挥发性物质, 特别适用于弱紫外吸收或无紫外吸收成分的分析, 灵敏度高、稳定性和重复性好, 结合高

效液相色谱(HPLC)法已广泛用于药物分析领域<sup>[9-12]</sup>。本研究中建立了测定甲钴胺注射液中甘露醇含量的 HPLC - CAD 法, 旨在为完善该制剂质量标准、保障其产品质量提供参考。现报道如下。

### 1 仪器与试剂

#### 1.1 仪器

UltiMate 3000型高效液相色谱仪, 配有 Corona Veo RS 电雾式检测器, 变色龙工作站(美国 Thermo Fisher 公司); XS205DU 型电子天平(梅特勒 - 托利多仪器有限公司, 精度为 0.01 mg); Millipore Synergy 超纯水机(密理博 < 中国 > 有限公司)。

#### 1.2 试剂

甲钴胺注射液(A 公司, 批号分别为 200611A, 200204A, 190405A)。甘露醇对照品(批号 100533 - 202006, 含量为 99.5%)、甲钴胺对照品(批号 100692 - 201805, 含量为 92.8%), 均购自中国食品药品检定研究院; 乙腈为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 水为去离子水。

第一作者: 顾晓风, 女, 硕士研究生, 副主任药师, 研究方向为药物分析, (电子信箱)645889151@qq.com。

<sup>△</sup>通信作者: 田沛霖, 女, 硕士研究生, 副主任药师, 研究方向为药物分析, (电子信箱)67214963@qq.com。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent ZORBAX SB - C<sub>18</sub> 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相: 15% 乙腈(A) - 80% 乙腈(B), 梯度洗脱(洗脱程序见表1); 流速: 0.5 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样量: 20 μL。检测器: CAD; 雾化气体: 氮气; 蒸发管温度: 35 °C; 增益值: 1; 幂函数: 1.0; 采集频率: 10 Hz; 过滤常数: 3.6。

表1 梯度洗脱程序

Tab. 1 Gradient elution program

时间(min)	A(%)	B(%)	时间(min)	A(%)	B(%)
0	100	0	12	0	100
5	100	0	13	100	0
6	0	100	25	100	0

### 2.2 溶液制备

对照品溶液: 取甘露醇对照品约 100 mg, 精密称定, 置 100 mL 容量瓶中, 用流动相 A 溶解并定容, 摇匀, 制成质量浓度为 1.0 mg/mL 的对照品溶液。

供试品溶液: 精密量取甲钴胺注射液 1 mL, 置 100 mL 容量瓶中, 用流动相 A 定容, 摇匀, 作为供试品溶液。

空白对照溶液: 取甲钴胺对照品约 10 mg, 精密称定, 置 20 mL 容量瓶中, 用流动相 A 溶解并定容, 摇匀; 精密移取 1 mL, 置 100 mL 容量瓶中, 用流动相 A 定容, 作为空白对照溶液。

### 2.3 方法学考察

系统适用性试验: 取空白对照溶液、对照品溶液(甘露醇质量浓度为 0.5 mg/mL)和供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。结果目标物峰理论板数大于 10 000, 拖尾因子小于 1.2, 且空白对照无干扰, 详见图 1。

线性关系考察: 分别精密量取甘露醇对照品溶液 1, 2, 3, 5, 8 mL, 置 10 mL 容量瓶中, 用流动相 A 稀释至刻度, 摇匀, 得系列对照品溶液。取 10 μL 进样测定, 记录峰面积, 以对照品系列溶液的质量浓度(mg/mL)对

数值(X)为横坐标, 以峰面积对数值(Y)为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程  $Y = 0.7188X + 1.1201$  ( $r = 0.9992$ )。结果表明, 甘露醇质量浓度在 0.105 ~ 1.05 mg/mL 范围内其对数值与峰面积对数值线性关系良好。

定量限与检测限考察: 精密量取质量浓度为 0.5 mg/mL 的对照品溶液, 逐级稀释并进样测定。取信噪比(S/N)约为 10:1, 3:1 时的待测成分质量浓度作为定量限和检测限, 结果分别为 0.70 μg/mL 和 0.21 μg/mL。

精密度试验: 取 2.2 项下对照品溶液(质量浓度为 0.5 mg/mL), 按 2.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次, 记录峰面积。结果甘露醇峰面积的 RSD 为 1.03% ( $n = 6$ ), 表明仪器精密度良好。

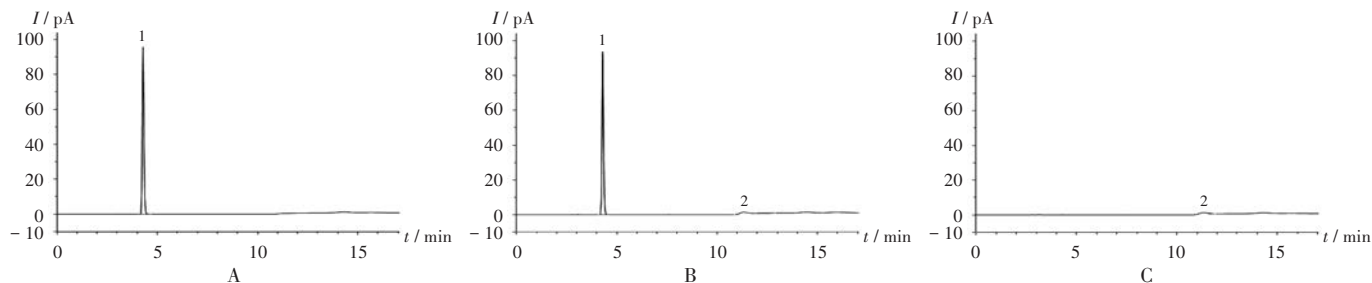
稳定性试验: 取供试品溶液(批号为 200611A)适量, 按 2.1 项下色谱条件, 分别于 0, 4, 8, 12, 16, 24 h 进样测定, 记录峰面积。结果甘露醇峰面积的 RSD 为 1.21% ( $n = 6$ ), 表明供试品溶液在室温放置 24 h 内基本稳定。

重复性试验: 取样品(批号为 200611A)适量, 按 2.2 项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 再按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果甘露醇峰面积的 RSD 为 1.32% ( $n = 6$ ), 表明方法重复性良好。

加样回收试验: 精密移取样品(批号为 200611A) 1 mL, 置 200 mL 容量瓶中, 平行制备 9 份, 分成 3 组, 每组 3 份。每组分别加入甘露醇对照品 70, 50, 30 mg, 用流动相 A 溶解并定容, 摇匀, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并计算加样回收率。结果见表 2。

### 2.4 样品含量测定

取 3 批样品适量, 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, 以标准曲线法计算含量。结果批号为 200611A, 200204A, 190405A 的样品中甘露醇含量分别为 50.71, 50.62, 50.21 mg/mL。



1. 甘露醇 2. 甲钴胺

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 空白对照溶液

图1 高效液相色谱图

1. Mannitol 2. Mecobalamin

B. Reference solution B. Test solution C. Blank control solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

表2 加样回收试验结果(n=9)  
Tab. 2 Results of the recovery test (n=9)

样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
50.71	70.19	118.93	97.19		
50.71	69.06	120.35	100.84		
50.71	71.34	119.27	96.10		
50.71	49.63	98.49	96.27		
50.71	50.52	99.23	96.04	98.37	2.02
50.71	50.75	101.67	100.41		
50.71	31.08	81.58	99.31		
50.71	30.22	81.04	100.36		
50.71	29.97	80.31	98.77		

### 3 讨论

#### 3.1 检测器选择及优化

甘露醇的含量测定多采用高效液相色谱-示差折光检测器(HPLC-RID)法<sup>[6]</sup>、高效液相色谱-蒸发光散射检测器(HPLC-ELSD)法<sup>[7]</sup>、离子色谱法<sup>[13]</sup>等。RID检测器对压力和温湿度的变化敏感,灵敏度低,且不能兼容梯度洗脱;ELSD检测器灵敏度比RID检测器高,对温度变化不敏感,可用于梯度洗脱,但重现性较差;而离子色谱仪器昂贵,普及性不如液相色谱,且其中使用的氢氧化钠(钾)可能导致糖类异构化和分解<sup>[14-15]</sup>。CAD检测器对化合物的结构无特定要求,适用于梯度洗脱,灵敏度、稳定性和重现性均具有明显优势<sup>[16]</sup>。

过滤常数分别考察了1.0, 3.6, 5.0, 10.0, 当设为1.0时,甘露醇峰分叉,设为10.0时,峰形明显展宽,理论板数下降,故选择3.6;采集频率考察了5, 10, 25 Hz, 色谱峰均无明显差异;试验中发现,幂函数增大,峰面积明显下降,但对检测结果的影响在2%范围内,考虑过高的幂函数可能会在接近动态范围下限的响应中产生或夸大“衰减”<sup>[14]</sup>,最终幂函数设为1.0;蒸发管温度考察了35℃和50℃,当温度为50℃时,峰面积下降10%,灵敏度较35℃差,故选择35℃。

#### 3.2 色谱条件优化

色谱柱:甘露醇测定常用的色谱柱有强阳离子钙型交换柱、氨基柱、C<sub>18</sub>柱等,甲钴胺则常用C<sub>18</sub>柱、氨基柱和氰基柱。强阳离子钙型交换柱使用时柱温要求较高(70~80℃),价格昂贵且耐用性差;氨基柱的耐用性亦较C<sub>18</sub>柱差,填料易塌陷,使用过程中柱压逐渐升高,对甘露醇及甲钴胺的吸附均大于C<sub>18</sub>柱,分析时间长。本试验中选择常规C<sub>18</sub>色谱柱进行分析。考察了Agilent ZORBAX SB-C<sub>18</sub>柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Phenomenex Luna C<sub>18</sub>柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)和Waters Symmetry C<sub>18</sub>柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),结果色谱峰形均较好。

流动相:考察流动相中乙腈不同比例对分离的影响,随着乙腈比例升高,甘露醇峰形展宽,在80%乙腈条件下,甘露醇峰出现肩峰,故选择乙腈比例较低的流动相;而低比例有机相对甲钴胺洗脱能力差,在15%乙腈条件下,甲钴胺保留时间超过40 min,故最终确定梯度洗脱,以保证甘露醇峰形良好并缩短分析时间。

流速与柱温:当流速为1.0 mL/min时,甘露醇保留时间过短,受溶剂峰干扰,故选择0.5 mL/min;不同柱温(30, 35, 40℃)对分离及峰形无明显影响。

#### 3.3 线性回归方式选择

本研究中目标物进样质量浓度约为0.5 mg/mL,在0.1~1.0 mg/mL范围内,以甘露醇质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标进行回归时,得相关系数为0.994,而分别取对数后进行回归,相关系数为0.999 2。参考2020年版《中国药典(四部)》,确定经对数转换后进行回归。

#### 3.4 方法评价

本研究中建立了测定甲钴胺注射液中甘露醇含量的HPLC-CAD法,该方法简单灵敏,准确度高,耐用性好,可用于甲钴胺注射液的质量控制。甘露醇为重要药用辅料,除传统化学药外,也广泛用于生物大分子药物,本研究所建立的方法也可为其中甘露醇含量测定提供参考。

#### 参考文献

- [1] 顾晓风,田沛霖. 顶空气相色谱法测定甲钴胺原料药的7种溶剂残留[J]. 西北药学杂志, 2021, 36(2): 198-201.
- [2] 张美琴,闫济民. 硫辛酸联合甲钴胺治疗2型糖尿病周围神经病变的临床研究[J]. 现代药物与临床, 2021, 36(2): 321-325.
- [3] 孙建娟,燕华,曾秋蓉,等. 参芪降糖颗粒联合甲钴胺对糖尿病周围神经病患者血清Cys-C、IGF-1、C肽水平的影响[J]. 药物评价研究, 2021, 44(4): 794-798.
- [4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 539-545.
- [5] 孙国先,徐德宇,刘微丽. 100种注射剂药品中所用辅料的调查分析[J]. 中国药事, 2015, 29(11): 1168-1171.
- [6] 郭宁子,张伊洁,许明哲,等. 多肽微球注射剂中甘露醇含量测定研究[J]. 药物分析杂志, 2020, 40(6): 999-1004.
- [7] 晏菊姣,汪鑫,陈蓉,等. 不同厂家注射用甲磺酸帕珠沙星中甘露醇的含量测定[J]. 医药导报, 2019, 38(10): 1311-1313.
- [8] 张兰平,王寅,陈俊辰. 化学仿制药注射剂一致性评价研究要点解析[J]. 中国医药工业杂志, 2021, 52(10): 1386-1395.
- [9] 王莹,李耀磊,岳洪水,等. 注射用益气复脉(冻干)中糖类成分研究[J]. 中国药业, 2020, 29(21): 41-44.
- [10] 邵天舒,丁锐,周长明,等. 人凝血因子VIII制品中聚山梨酯80残留量高效液相色谱-电喷雾检测器检测方法的建立