

中图分类号: R927.2; R927.5

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2025)15-0084-04

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2025.15.015



高效液相色谱法同时测定葡萄糖酸钙注射液中 2 种成分含量

施务务¹, 杨 廷²

(1. 安徽省蚌埠市第一人民医院, 安徽 蚌埠 233000; 2. 蚌埠丰原医药科技发展有限公司, 安徽 蚌埠 233010)

摘要:目的 建立同时测定葡萄糖酸钙注射液中 2 种成分含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 YMC-Triart C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.03 mol/L 磷酸二氢钾-0.006 mol/L 四丁基硫酸氢铵溶液, 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 210 nm, 柱温为 30℃, 进样量为 20 μL。结果 葡萄糖酸钙、葡萄糖二酸钙的质量浓度分别在 1.201~2.809 μg/mL、0.062~0.142 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($r > 0.999$, $n = 5$); 检测限分别为 0.36, 1.16 μg/mL, 定量限分别为 1.25, 4.04 μg/mL; 中间精密性、日间精密性、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 1.0%; 加样回收率分别为 99.06% 和 99.31%, RSD 分别为 0.41% 和 0.57% ($n = 9$)。3 批样品中葡萄糖酸钙、葡萄糖二酸钙的含量分别为 99.56%~100.10% 和 99.82%~100.29%。结论 该方法操作简便、专属性强、结果准确, 可用于同时测定葡萄糖酸钙注射液中上述 2 种成分的含量。

关键词: 高效液相色谱法; 葡萄糖酸钙注射液; 葡萄糖酸钙; 葡萄糖二酸钙; 含量测定

Simultaneous Determination of Two Components in Calcium Gluconate Injection by HPLC

SHI Wuwu¹, YANG Ting²

(1. The First People's Hospital of Bengbu, Bengbu, Anhui, China 233000; 2. BBKA Medicine Science Development Co., Ltd., Bengbu, Anhui, China 233010)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the simultaneous determination of the two components in Calcium Gluconate Injection. **Methods** The chromatographic column was YMC-Triart C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was 0.03 mol/L potassium dihydrogen phosphate-0.006 mol/L tetrabutylammonium hydrogen sulfate solution, the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 210 nm, the column temperature was 30℃, and the injection volume was 20 μL. **Results** The linear ranges of calcium gluconate and calcium gluconate were 1.201-2.809 μg/mL

第一作者: 施务务, 男, 硕士, 主管药师, 研究方向为药剂学与临床药学, (电子信箱)281888258@qq.com。

甘草泻心汤中甘草苷的含量范围为 1.53~2.83 mg/g, 黄芩苷为 26.24~48.72 mg/g。

3.4 方法评价

本研究中建立的方法操作简便、专属性强、重复性好、结果准确, 可用于甘草泻心汤的质量控制。

参考文献

- [1] 刘渡舟, 毛雨泽. 伤寒论校注[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991: 131.
- [2] 刘渡舟. 金匱要略论解[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1984: 31.
- [3] 石可金, 张琦. 经典名方甘草泻心汤组方用药考究及临床应用概况[J]. 辽宁中医药大学学报, 2022, 24(4): 89-96.
- [4] 沈雁, 倪思忆, 郑华君, 等. 甘草泻心汤调控 PERK-eIF2α-CHOP 信号通路保护溃疡性结肠炎肠黏膜屏障的机制[J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(5): 2657-2663.
- [5] 戴凤翔, 邱联群. 甘草泻心汤联合针灸治疗白塞氏病临床疗效观察[J]. 中国中医基础医学杂志, 2020, 26(7): 971-973.
- [6] 国家药品监督管理局药品审评中心. 按古代经典名方目录管理的中药复方制剂药学研究技术指导原则[EB/OL]. (2021-08-27)[2024-08-31]. <https://www.cde.org.cn/main/news/viewInfoCommon/1c18dd163e7c9221786e5469889367d0>.
- [7] 唐红梅, 翟少钦, 陈春林, 等. 一测多评法同时测定甘草泻

心汤中 8 种成分[J]. 中成药, 2022, 44(5): 1410-1415.

- [8] 张天一. 黄芪桂枝五物汤和甘草泻心汤标准颗粒组方单味药质量表征研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2019.
- [9] 曹泽峰. 橘皮竹茹汤及甘草泻心汤质量表征方法研究[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2017.
- [10] 霍然. 经典名方甘草泻心汤物质基准研究[D]. 长春: 长春中医药大学, 2023.
- [11] 王孟缘, 霍然, 于孟涵, 等. 经典名方甘草泻心汤基准样品的量值传递研究[J]. 中草药, 2023, 54(16): 5214-5224.
- [12] 谭颖, 袁世清, 杨智豪, 等. 《伤寒论》与《金匱要略》中甘草泻心汤异同[J]. 河南中医, 2022, 42(4): 495-497.
- [13] 王志尧, 王韬, 张贵春, 等. 甘草泻心汤不同提取制备工艺比较[J]. 广东化工, 2022, 49(16): 48-50.
- [14] 何颖, 邹爱英, 涂正伟, 等. 甘草泻心汤配方颗粒与传统汤剂 HPLC 指纹图谱一致性研究[J]. 天津药学, 2022, 34(12): 14-21.
- [15] 庄欣雅, 张倩, 元雅丽, 等. 经典名方当归补血汤物质基准量值传递分析[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(2): 324-333.
- [16] 薛晓霞, 靳如娜, 王学圆, 等. 经典名方二冬汤基准样品的指标成分含量测定及量值传递规律探索[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(11): 1-7.
- [17] 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: 59-60.

(收稿日期: 2024-05-08; 修回日期: 2025-04-26)

and 0.062 – 0.142 $\mu\text{g} / \text{mL}$ ($r > 0.999\ 0, n = 5$), respectively. The limits of detection were 0.36 $\mu\text{g} / \text{mL}$ and 1.16 $\mu\text{g} / \text{mL}$, respectively, and the limits of quantification were 1.25 $\mu\text{g} / \text{mL}$ and 4.04 $\mu\text{g} / \text{mL}$, respectively. The RSDs of intermediate precision, intra-day precision, stability, and repeatability test results were all lower than 1.0%. The average recoveries of calcium gluconate and calcium gluconate were 99.06% and 99.31%, with RSDs of 0.41% and 0.57% ($n = 9$), respectively. The contents of calcium gluconate and calcium gluconate in the three batches of samples were in the range of 99.56% – 100.10% and 99.82% – 100.29%, respectively. **Conclusion** The method is simple, highly specific, and accurate, which can be used for simultaneously determination of the above two components in Calcium Gluconate Injection.

Key words: HPLC; Calcium Gluconate Injection; calcium gluconate; calcium gluconate; content determination

葡萄糖酸钙注射液是一种钙补充剂,临床广泛用于治疗钙缺乏及急性血钙过低、碱中毒、甲状旁腺功能低下所致手足搐搦症,过敏性疾病,镁、氟中毒时的解救,以及高血钾、低血钙、钙通道阻滞引起的心功能异常解救等^[1]。葡萄糖酸钙注射液最早由美国费森尤斯卡比公司成功研发并获批上市,为解决葡萄糖酸钙在水溶液中易产生结晶的问题,原研产品在处方中加入了葡萄糖二酸钙作为稳定剂^[2-7]。但2020年版《中国药典(二部)》、《美国药典(43版)》(USP 43)收录的葡萄糖酸钙注射液标准中均采用乙二胺四乙酸二钠滴定法测定产品中钙的总量,无法区分葡萄糖酸钙和葡萄糖二酸钙的含量,不利于产品生产及质量控制^[8-9]。戚龙献等^[10]采用高效液相色谱-示差检测器法同时测定葡萄糖酸钙注射液中葡萄糖酸钙和葡萄糖二酸钙的含量,但由于产品中葡萄糖二酸钙的浓度较小,示差检测器的灵敏度较低,且易受环境温度、流动相pH值等因素的影响^[11-13],故有必要开发更灵敏、更准确的方法。本研究中建立了同时测定葡萄糖酸钙注射液中葡萄糖酸钙和葡萄糖二酸钙含量的高效液相色谱-紫外检测器法,以指导国内注射剂的质量与疗效一致性评价过程中的生产及质量控制。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1260型高效液相色谱仪(美国Agilent公司);Waters 2489型高效液相色谱仪(美国Waters公司);MS105DU型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司,精度为0.01 mg)。

1.2 试剂

葡萄糖酸钙对照品(欧洲药典,批号为3.0,含量为100%);葡萄糖二酸钙对照品(批号为C2208281,含量为100%),四丁基硫酸氢铵(批号为J222594,离子对试剂),均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;葡萄糖酸钙注射液(自制,批号分别为231103,231104,231105);磷酸二氢钾(分析纯,国药集团化学试剂有限公司,批号为20230927);水为屈臣氏纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:YMC-Triart C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm,

5 μm);流动相:0.03 mol/L磷酸二氢钾-0.006 mol/L四丁基硫酸氢铵溶液;流速:1.0 mL/min;检测波长:210 nm;柱温:30 $^{\circ}\text{C}$;进样量:20 μL 。

2.2 溶液制备

供试品溶液:精密量取样品适量,加水稀释成每1 mL约含葡萄糖酸钙2 mg的溶液,摇匀,即得。

葡萄糖酸钙对照品溶液:取葡萄糖酸钙对照品适量,精密称定,加水溶解并稀释成每1 mL约含葡萄糖酸钙2 mg的溶液,摇匀,即得。

葡萄糖二酸钙对照品溶液:取葡萄糖二酸钙对照品适量,精密称定,加水溶解并稀释成每1 mL约含葡萄糖二酸钙0.1 mg的溶液,摇匀,即得。

阴性对照品溶液:按样品处方工艺制备缺葡萄糖酸钙、葡萄糖二酸钙的阴性样品,再按供试品溶液制备方法制备,即得。

2.3 方法学考察

专属性试验:分别精密量取2.2项下阴性对照品溶液、葡萄糖酸钙对照品溶液、葡萄糖二酸钙对照品溶液、供试品溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果供试品溶液色谱中,在与对照品溶液色谱相同保留时间处有相应色谱峰出现,且阴性对照无干扰,葡萄糖酸钙、葡萄糖二酸钙峰的分离度大于2.0,表明方法专属性良好。色谱图见图1。

线性关系考察:取葡萄糖酸钙对照品适量,精密称定,分别加水溶解并稀释成每1 mL约含葡萄糖酸钙1.201, 1.608, 2.000, 2.402, 2.809 mg的溶液,摇匀;另取葡萄糖二酸钙对照品适量,精密称定,分别加水溶解并稀释成每1 mL约含葡萄糖二酸钙0.062, 0.080, 0.100, 0.121, 0.142 mg的溶液,摇匀。取上述溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图,以峰面积(Y)为纵坐标、质量浓度(X, mg/mL)为横坐标进行线性回归。结果见表1,表明葡萄糖酸钙、葡萄糖二酸钙的质量浓度分别在1.201 ~ 2.809 mg/mL、0.062 ~ 0.142 mg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

检测限与定量限确定:精密量取葡萄糖酸钙对照品溶液、葡萄糖二酸钙对照品溶液各适量,分别加水逐级稀释至一定质量浓度后,按2.1项下色谱条件进样测

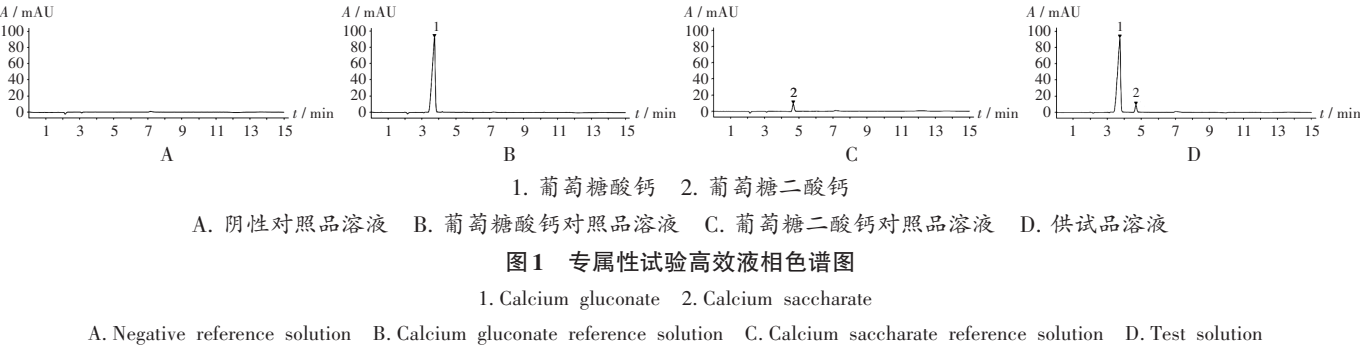


Fig. 1 HPLC chromatograms of the specificity test

表1 线性关系考察结果($n = 5$)

Tab. 1 Results of the linear relation test ($n = 5$)

成分	线性范围(mg/mL)	回归方程	r
葡萄糖酸钙	1.201~2.809	$Y = 567.93X + 2.4304$	0.9998
葡萄糖二酸钙	0.062~0.142	$Y = 694.85X + 0.1077$	0.9994

定,分别以信噪比(S/N)为3:1和10:1时的质量浓度作为检测限和定量限。结果葡萄糖酸钙的检测限为0.36 $\mu\text{g/mL}$,定量限为1.25 $\mu\text{g/mL}$;葡萄糖二酸钙的检测限为1.16 $\mu\text{g/mL}$,定量限为4.04 $\mu\text{g/mL}$ 。

中间精密度假试验:取样品(批号为231103)6份,由另1名试验人员按2.2项下方法平行制备供试品溶液6份,并使用不同液相色谱仪,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果葡萄糖酸钙和葡萄糖二酸钙含量的 RSD 分别为0.68%和0.75%($n = 12$),表明仪器中间精密度假良好。

日间精密度假:取样品(批号为231103)2份,按2.2项下方法平行制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件连续3 d进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果葡萄糖酸钙和葡萄糖二酸钙含量的 RSD 分别为0.74%和0.92%($n = 6$),表明仪器日间精密度假良好。

稳定性试验:取样品(批号为231103)适量,按2.2项下方法制备供试品溶液,分别于室温放置0,3,6,9,12,24 h时按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果葡萄糖酸钙和葡萄糖二酸钙峰面积的 RSD 分别为0.12%和0.86%($n = 6$),表明供试品溶液室温放置24 h内稳定性良好。

重复性试验:取样品(批号为231103)6份,由同1名试验人员按2.2项下方法平行制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果葡萄糖酸钙和葡萄糖二酸钙含量的 RSD 分别为0.10%和0.47%($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:按处方量的80%,100%,120%分别精密称取葡萄糖酸钙和葡萄糖二酸钙对照品,加入空白辅料溶液中,按2.2项下方法制备供试品溶液,各浓度平行制备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2,表明方法准确度假良好。

表2 加样回收试验结果($n = 9$)

Tab. 2 Results of the recovery test ($n = 9$)

加入量(mg)		测得量(mg)		回收率(%)		$\bar{X}$ (%)		RSD (%)	
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
75.18	3.64	74.24	3.61	98.75	99.18				
75.15	3.62	74.76	3.63	99.48	100.28				
75.26	3.59	74.33	3.55	98.76	98.89				
94.12	4.53	93.55	4.48	99.39	98.90				
93.85	4.58	92.90	4.54	98.99	99.13	99.06	99.31	0.41	0.57
94.06	4.52	93.85	4.53	99.78	100.22				
112.86	5.38	111.29	5.35	98.61	99.44				
112.78	5.44	111.36	5.39	98.74	99.08				
112.80	5.47	111.74	5.40	99.06	98.72				

注:A为葡萄糖酸钙,B为葡萄糖二酸钙。

Note: A refers to calcium gluconate, and B refers to calcium gluconate.

2.4 样品含量测定

取3批样品(批号分别为231103,231104,231105),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。结果见表3。

表3 样品含量测定结果(%)

Tab. 3 Results of the content determination of two components

in samples (%)			
成分	231103	231104	231105
葡萄糖酸钙	99.73	99.56	100.10
葡萄糖二酸钙	100.18	99.82	100.29

3 讨论

3.1 色谱条件考察

流动相:参考了国家药典委员会2021年发布的《葡萄糖酸钙氯化钠注射液国家药品标准修订草案公示稿》中葡萄糖酸根测定方法,以含10 mmol/L磷酸氢二钾溶液的5 mmol/L四丁基硫酸氢铵溶液(pH 7.0)–甲醇(98:2, V/V)为流动相,流速为0.6 mL/min。结果显示,此方法用于单独测定葡萄糖酸钙含量的系统适用性良好,但葡萄糖二酸钙的色谱峰峰形较差,有明显

拖尾现象,影响积分的准确性。本研究在上述方法基础上,对流动相中盐的种类和浓度、有机相比比例及流速进行了调整,结果显示,调整后的方法能同时较好地检出葡萄糖酸钙和葡萄糖二酸钙,系统适用性良好,验证结果表明该方法准确、可靠。故流动相选择0.03 mol/L磷酸二氢钾-0.006 mol/L四丁基硫酸氢铵溶液。

液相色谱仪:分别考察了Agilent 1260型和Waters 2489型高效液相色谱仪对含量测定结果的影响。结果显示,在其他色谱条件一致的情况下,2种品牌高效液相色谱仪对葡萄糖酸钙和葡萄糖二酸钙的理论板数、分离度及含量测定结果均无明显影响,但在保留时间方面,Agilent 1260型高效液相色谱仪的出峰相对较早,Waters 2489型高效液相色谱仪的出峰相对较晚,可能与液相色谱仪自身管线的内径和长度有关。

色谱柱:分别考察了YMC-Triart C₁₈柱、Agilent Zorbax Eclipse Plus C₁₈柱、Waters XBridge C₁₈柱对含量测定结果的影响。结果显示,在其他色谱条件一致的情况下,3种品牌色谱柱对含量测定结果均无明显影响,但在葡萄糖酸钙和葡萄糖二酸钙理论板数、分离度方面,YMC-Triart C₁₈柱要明显优于后2种色谱柱。另外,该色谱条件使用的流动相为纯水相,不含有机相,YMC-Triart C₁₈柱是一款耐水性相对较强的色谱柱。故色谱柱选择YMC-Triart C₁₈柱。

流速:分别考察了0.8,1.0,1.2 mL/min流速对含量测定结果的影响。结果显示,在其他色谱条件一致的情况下,3种流速对含量测定结果均无明显影响,葡萄糖酸钙和葡萄糖二酸钙的分离度均大于2.0。故流速选择1.0 mL/min。

3.2 与其他钙含量测定方法比较

葡萄糖酸钙注射液中的钙元素来源于处方中的葡萄糖酸钙和葡萄糖二酸钙2种成分,但其他常用的电位滴定法^[14-16]、原子吸收光谱法^[17]、电感耦合等离子体发射光谱法^[18]、电感耦合等离子体质谱法^[19]等只能测定注射液中钙元素的总量。本研究中采用高效液相色谱法能同时测定注射液中葡萄糖酸钙和葡萄糖二酸钙的含量,方法简单高效,且将2种成分的含量测定结果折算成钙含量后相加,与电位滴定法测定的钙总量相当,进一步说明该方法准确、可靠。

3.3 方法评价

本研究中建立的方法操作简便、灵敏度高、重复性好,可用于同时测定葡萄糖酸钙注射液中葡萄糖酸钙和葡萄糖二酸钙2种成分的含量。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典临床用药须知: 2020年版化学药和生物制品卷[M]. 北京:中国医药科技出

版社,2020:866-867.

- [2] PIZZA J, BEACH P. Calcium Gluconate Solution in Flexible Containers:US10342813B2[P]. 2019-07-09[2023-12-05].
- [3] NIAZI SK. Handbook of Pharmaceutical Manufacturing Formulations: *Sterile Products* (Second Edition)[M]. New York: Informa Healthcare USA, 2009: 218.
- [4] 周伟, 桂志娟. 影响葡萄糖酸钙注射液白色结晶析出的因素分析[J]. 中国现代药物应用, 2008, 2(20): 94-95.
- [5] GARCIA AC, VAVRUSOVA M, SKIBSTED LH. Calcium D-Saccharate: Aqueous Solubility, Complex Formation, and Stabilization of Supersaturation[J]. J Agric Food Chem, 2016, 64: 2352-2360.
- [6] DE ZAWADZKI A, SKIBSTED LH. Increasing calcium solubility from whey mineral residues by combining gluconate and delta-gluconolactone[J]. International Dairy Journal, 2019, 99: 104538.
- [7] GARCIA AC, HANSEN JS, BAILEY N, et al. Slow lactate gluconate exchange in calcium complexes during precipitation from supersaturated aqueous solutions[J]. Food Research International, 2020, 137: 109539.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 1520-1521.
- [9] The United States. United States Pharmacopeia 43th Edition[M]. Rockville: The United States Pharmacopoeial Conention, 2020: 700.
- [10] 戚龙献, 陆爱玲, 徐凡, 等. 葡萄糖酸钙注射液含量测定质量标准提高的研究[J]. 中国药品标准, 2022, 23(6): 614-617.
- [11] 李琼. HPLC-RID法测定食品中果糖、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖、乳糖的方法学验证[J]. 食品工程, 2022(2): 76-80.
- [12] 李燕平. 高效液相色谱-示差折光检测法测定茶叶中果糖、葡萄糖、蔗糖的含量[J]. 广东化工, 2016, 43(7): 187-188.
- [13] 于飞, 郭建亭. 液相色谱检测仪示差折光率检测器不确定度评定及影响因素[J]. 现代商贸工业, 2020, 41(23): 158-159.
- [14] 王丽, 王小艳, 李娜, 等. 电位滴定法测定葡萄糖酸钙的含量[J]. 中国动物保健, 2022, 24(8): 119-122.
- [15] 韩立坤. 葡萄糖酸钙中钙含量的测定[J]. 潍坊学院学报, 2012, 12(6): 32-34.
- [16] 李华岑. 电位滴定法测定硼葡萄糖酸钙注射液和硼葡萄糖酸钙溶液中的钙含量[J]. 河南畜牧兽医(综合版), 2020, 41(6): 7-8.
- [17] 房若宇, 厉位阳, 王宙阳, 等. 原子吸收光谱分析法测定补钙剂中钙含量[J]. 大学物理实验, 2015, 28(2): 1-2.
- [18] 李珏, 王佩强. ICP-OES法同时测定葡萄糖酸钙锌口服溶液中钙离子和锌离子的含量[J]. 中国药品标准, 2021, 22(4): 356-359.
- [19] 孙桐, 胡生俊, 葛雪松, 等. ICP-MS法同时测定葡萄糖酸钙锌口服溶液中钙离子和锌离子含量[J]. 中国药品标准, 2022, 23(1): 86-90.

(收稿日期: 2024-04-08; 修回日期: 2025-02-13)