

中图分类号: R917; R927 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2026)06-0098-04
doi: 10.3969/j.issn.1006-4931.2026.06.021



抗氧化剂对注射用辅酶 A 质量的影响

李逢春, 乔冲, 连莹

(河南省药品医疗器械检验院·河南省郑州市仿制药质量研究与评价重点实验室, 河南 郑州 450008)

摘要:目的 探讨抗氧化剂对注射用辅酶 A 质量的影响。方法 采用高效液相色谱串联质谱法, 色谱柱为 Agilent Eclipse Plus - C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相 A 为 20 mmol/L 醋酸铵溶液 (pH 7.0) - 甲醇 (94:6, V/V) (梯度洗脱), 流动相 B 为 20 mmol/L 醋酸铵 (pH 7.0) - 甲醇 (70:30, V/V), 梯度洗脱; 流速为 1.0 mL/min; 检测波长为 259 nm; 柱温为 25 °C; 进样量为 10 μL。电喷雾离子源 (ESI) 正离子检测模式, 电压 4 000 V, 雾化气压 45 psi, 辅助气压 10 psi, 毛细管温度 350 °C, 全扫描范围 m/z 310 ~ 1 600。检测样品及辅酶 A 原料的杂质, 并进行加速试验、抗氧化剂与辅酶 A 相互作用试验, 鉴定关键杂质。结果 3 批次辅酶 A 原料及 11 批次注射用辅酶 A 样品中共检出 5 种杂质, 其中使用盐酸半胱氨酸为抗氧化剂的 7 批次样品中均检出杂质 II, 含量为 3.71% ~ 15.24%。加速试验中使用亚硫酸氢钠作为抗氧化剂的样品中均未检出杂质 II。相互作用试验中仅辅酶 A 与辅料和盐酸半胱氨酸溶液, 以及盐酸半胱氨酸溶液的杂质 II 含量增加。杂质 II 经鉴定为辅酶 A 与半胱氨酸缩合形成的二硫键产物。结论 该研究中所建方法能较好地分离辅酶 A 中 5 种杂质; 制备注射用辅酶 A 时, 应避免使用盐酸半胱氨酸作为抗氧化剂。

关键词: 注射剂; 辅酶 A; 抗氧化剂; 杂质结构鉴定; 高效液相色谱串联质谱法

Effect of Antioxidants on the Quality of Coenzyme A for Injection

LI Fengchun, QIAO Chong, LIAN Ying

(Henan Institute of Drug and Medical Device Inspection · Zhengzhou Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Generic Drugs, Zhengzhou, Henan 450008, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of antioxidants on the quality of coenzyme A for injection. **Methods** The high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) method was used. The chromatographic column was Agilent Eclipse Plus - C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase A was 20 mmol/L ammonium acetate solution (pH 7.0) - methanol (94:6, V/V), the mobile phase B was 20 mmol/L ammonium acetate solution (pH 7.0) - methanol (70:30, V/V), gradient elution, the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 259 nm; the column temperature was 25 °C; and the injection volume was 10 μL. The electrospray ionization (ESI) with positive ion mode was adopted for detection the voltage was 4 000 V, the nebulizer gas pressure was 45 psi, the auxiliary gas pressure was 10 psi, the capillary temperature was 350 °C, and the full scan range was m/z 310 - 1 600. To detect the impurities of samples and coenzyme A bulk drug, and the accelerated stability test and the antioxidant-coenzyme A interaction test were used to identify the key impurities. **Results** Five impurities were detected in three batches of coenzyme A bulk drugs and 11 batches of coenzyme A for injection samples, in which impurity II was detected in all seven batches of samples using cysteine hydrochloride as the antioxidant, with content ranging from 3.71% to 15.24%. In accelerated stability test, Impurity II was not detected in samples using sodium bisulfite as the antioxidant. In interaction test, the content of Impurity II increased only in the mixture containing coenzyme A, excipients, and cysteine hydrochloride solution, and in the cysteine hydrochloride solution. Impurity II was identified as a disulfide bond product formed by the condensation of coenzyme A and cysteine. **Conclusion** The established method effectively separates the five impurities in coenzyme A. The use of cysteine hydrochloride as the antioxidant should be avoided in the preparation of coenzyme A for injection.

Key words: injection; coenzyme A; antioxidant; impurity structure identification; HPLC-MS

辅酶 A 作为生物体内酰基转移酶的辅酶^[1], 临床广泛用于白细胞减少症及心脏病及多种肝肾疾病^[2-6]的治疗。但其分子中的硫醇基在空气中易被氧化, 故通常加入抗氧化剂增加稳定性^[7-9]。目前国内注射用辅酶 A 均采用冷冻干燥工艺, 处方中的辅料主要包括右旋糖酐、甘露醇、葡萄糖酸钙等, 抗氧化剂主要使用亚硫酸氢钠或盐酸半胱氨酸, 但也有厂家处方中未使用抗氧化剂。注射

用辅酶 A 中添加抗氧化剂是否影响药品质量安全的报道较少, 本研究中结合国家药品抽检工作, 探讨注射用辅酶 A 中添加的抗氧化剂对制剂质量的影响时发现盐酸半胱氨酸的添加可能引入了杂质。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、Agilent 6224 TOF

第一作者: 李逢春, 男, 硕士研究生, 副主任药师, 研究方向为药品检验, (电子信箱)lihyang@126.com。

型质谱仪、Agilent Masshunter Qualitative Analysis 软件(美国 Agilent 公司)。

1.2 试药

辅酶 A 原料(A 厂、批号为 221229, B 厂、批号为 230217 - 01, C 厂、批号为 221101); 注射用辅酶 A(A 厂、批号为 221217213, B 厂、批号为 230804 - 2, C 厂、批号为 2309103 - 3, D 厂、批号为 2309073, E 厂、批号为 2212012, F 厂、批号为 FDLI230405, G 厂、批号为 221410045, H 厂、批号为 221102, I 厂、批号为 20230513K, L 厂、批号为 23140414, M 厂、批号为 230404); 对照品辅酶 A(批号为 140666 - 202203, 含量 268 IU / mg); 对照品 3' - 磷酸腺苷(批号为 SLBF9383V, 含量 $\geq 98\%$), 辅酶 A 三锂盐(批号为 BCBC5520V, 含量 $\geq 93\%$), 辅酶 A 同分异构体(批号为 F1516077, 含量 $\geq 85\%$), 氧化型辅酶 A(批号为 MK-BD9559, 含量 $\geq 85\%$), 3' - 脱磷辅酶 A(批号为 SL-BL2741V, 含量 $\geq 90\%$), 均购自美国 Sigma - Aldrich 公司; 甲醇为色谱纯, 其余试剂均为分析纯, 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 有关物质测定

2.1.1 试验条件

色谱条件: 色谱柱为 Agilent Eclipse Plus - C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相 A 为 20 mmol / L 醋酸铵溶液(pH 7.0) - 甲醇(94:6, V / V), 流动相 B 为 20 mmol / L 醋酸铵(pH 7.0) - 甲醇(70:30, V / V), 梯度洗脱(0 ~ 15 min 时 100%A, 15 ~ 35 min 时 100%A → 80%A, 35 ~ 45 min 时 80%A → 60%A, 45 ~ 48 min 时 60%A → 100%A, 48 ~ 58 min 时 100%A); 流速为 1.0 mL / min; 检测波长为 259 nm; 柱温为 25 °C; 进样量为 10 μL。

质谱条件: 电喷雾离子源(ESI)正离子检测模式; 电压 4 000 V; 雾化气压 45 psi; 辅助气压 10 psi; 毛细管温度 350 °C; 质谱全扫描范围 m/z 310 ~ 1 600。

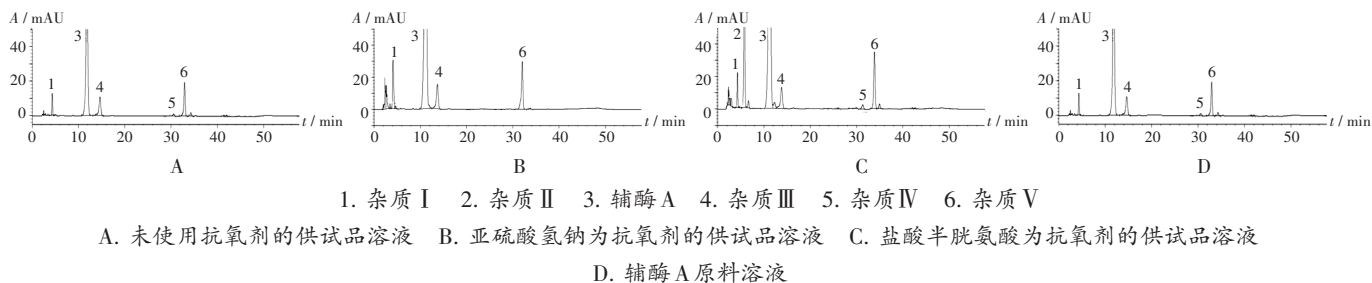
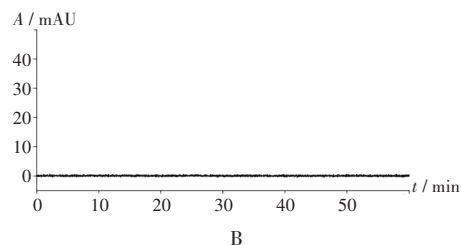
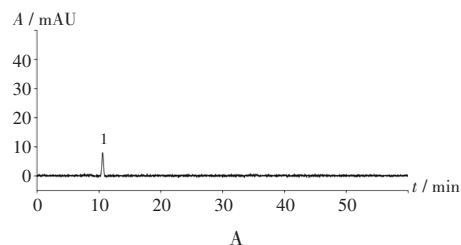


图2 注射用辅酶 A 及辅酶 A 原料的高效液相色谱图

1. Impurity I 2. Impurity II 3. Coenzyme A 4. Impurity III 5. Impurity IV 6. Impurity V

A. Test solution without antioxidant B. Test solution with sodium bisulfite as the antioxidant C. Test solution with cysteine hydrochloride as the antioxidant D. Coenzyme A bulk drug solution

Fig.2 HPLC chromatograms of coenzyme A for injection and coenzyme A bulk drug



1. 辅酶 A

A. 对照品溶液 B. 空白辅料溶液

图1 专属性试验高效液相色谱图

1. Coenzyme A

A. Reference solution B. Blank excipient solution

Fig.1 HPLC chromatograms of specificity test

2.1.2 溶液制备

取辅酶 A 对照品适量, 加水溶解, 制成质量浓度为 0.04 mg / mL 的对照品溶液。取样品适量, 加水制成每 1 mL 含辅酶 A 0.4 mg 的供试品溶液。取注射用辅酶 A 辅料(甘露醇、右旋糖酐 40、葡萄糖酸钙、亚硫酸氢钠、盐酸半胱氨酸)各适量, 按处方量加水溶解, 制成空白辅料溶液。

2.1.3 专属性考察

取对照品溶液、空白辅料溶液各适量, 按 2.1.1 项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。结果空白辅料在与对照品溶液色谱保留时间相同处无干扰峰, 表明专属性良好。详见图 1。

2.1.4 杂质检测结果

取样品及辅酶 A 原料各适量分别按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液, 再按 2.1.1 项下试验条件进样测定, 平

行测定3次。结果检出杂质3-5种,典型图谱见图2。杂质I(峰1)为3'-磷酸腺苷,杂质II(峰2)为未知杂质,峰3为辅酶A,杂质III(峰4)为辅酶A同分异构体,杂质IV(峰5)为氧化型辅酶A,杂质V(峰6)为3'-脱磷辅酶A^[10]。11批次样品根据抗氧剂的不同可分为3类,其中3批次处方中使用亚硫酸氢钠为抗氧剂,7批次处方中使用盐酸半胱氨酸为抗氧剂,1批次处方中未使用抗氧剂。原料、未使用抗氧剂和加亚硫酸氢钠为抗氧剂的供试品溶液中均未检出杂质II,使用盐酸半胱氨酸为抗氧剂的7批次样品中均检出杂质II,含量为3.71%~15.24%,推断杂质II的产生可能与盐酸半胱氨酸相关。

2.2 加速试验^[11]

取各厂家样品适量,平行3份,60℃下放置10d,按2.1.2项下方法制备供试品溶液,按2.1.1项下试验条件进样测定,记录峰面积并计算含量。结果表明,抗氧剂为盐酸半胱氨酸的供试品溶液,杂质II在加速试验中明显增加,其总杂含量也相应增加。未使用抗氧剂的供试品溶液中未检出杂质II,但杂质I含量增加较多,导致总杂含量相应增加。抗氧剂为亚硫酸氢钠的供试品溶液中未检出杂质II,总杂含量增加最少。

表1 加速试验结果(% , n = 3)

Tab. 1 Results of accelerated stability test (% , n = 3)

生产厂家	处方抗氧剂	杂质I	杂质II	杂质III	杂质V	杂质IV	总杂
A	亚硫酸氢钠	0.565	0.00	-0.025	-0.047	0.00	0.666
B	亚硫酸氢钠	0.272	0.00	-0.051	-0.023	0.01	0.311
C	半胱氨酸	-0.48	19.31	-0.33	0.017	0.38	22.820
D	半胱氨酸	-0.03	16.88	-0.70	0.054	0.22	17.510
E	无	16.9	0.00	-0.30	-0.420	0.03	21.760

2.3 相互作用试验

分别按处方量制备辅酶A、辅酶A亚硫酸氢钠、辅酶A盐酸半胱氨酸供试品,按2.1.2项下方法制备质量浓度均为0.4 mg/mL的供试品溶液。取适量,于室温放置12h,按2.1.1项下试验条件进样测定,记录峰面积并计算含量。结果见表2。11批次样品处方中的辅料包括甘露醇、右旋糖酐40、葡萄糖酸钙等,为进一步证实杂质II的产生与处方中其他辅料的相关性,取各批次样品适量,室温放置12h时按2.1.2项下方法制备供试品溶液,按2.1.1项下试验条件进样测定,记录峰面积并计算含

表2 抗氧剂放置12h杂质含量(%)

Tab. 2 Impurity content of antioxidants after 12 hours of storage(%)

抗氧剂	杂质I	杂质II	杂质III	杂质IV	杂质V	总杂
水	0.543	0	0.025	0.022	0.078	0.694
亚硫酸氢钠	0.125	0	0.052	0.004	0.002	0.274
盐酸半胱氨酸	0.043	3.172	0.157	0.009	0.008	3.278

量。结果见表3。结果表明,辅酶A与各辅料的溶液及辅酶A与亚硫酸氢钠溶液室温放置12h时均未检出杂质II。辅酶A与辅料和盐酸半胱氨酸的溶液放置12h时,杂质II含量明显增加,表明杂质II的产生与其他辅料无关。辅酶A水溶液和辅酶A亚硫酸氢钠溶液放置12h时也未检出杂质II。而辅酶A盐酸半胱氨酸溶液放置12h时杂质II含量增加3.2%,导致总杂含量也相应增加。

表3 辅酶A及辅料放置12h时杂质含量(%)

Tab. 3 Impurity content of coenzyme A and excipients after 12 hours of storage(%)

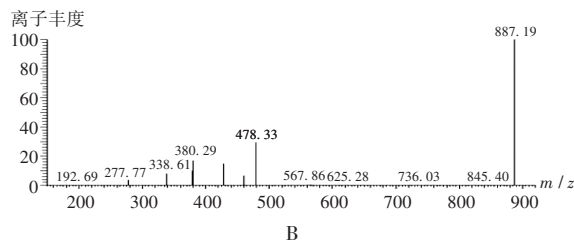
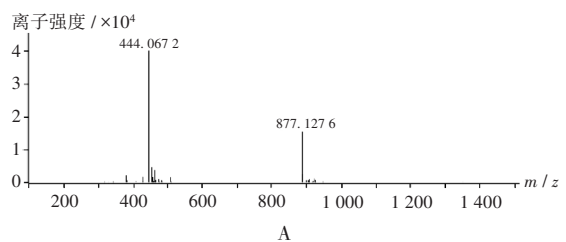
溶液	杂质I	杂质II	杂质III	杂质V	杂质IV	总杂
辅酶A+葡萄糖	0.314	0	0.0680	0.0057	0.0257	0.3921
辅酶A+乳糖	0.220	0	0.2295	0.0009	0.0059	0.5622
辅酶A+甘露醇	0.275	0	0.1307	0.1214	0	0.5410
辅酶A+葡萄糖酸钙	0.355	0	0.1975	0.4070	0	1.6589
辅酶A+右旋糖酐40	0.331	0	0.0193	0.0403	0	0.7346
辅酶A+辅料+亚硫酸氢钠溶液	0.0548	0	0.0375	0.1220	0.0818	0.2746
辅酶A+辅料+半胱氨酸溶液	0.0059	4.5313	0.096	0.3304	0.0637	5.2242

2.4 杂质鉴定

取放置后的辅酶A盐酸半胱氨酸溶液,按2.1.1项下试验条件进样测定,对杂质II进行扫描,其正离子一级、二级质谱图见图3。杂质II的准分子离子峰 m/z 为887.1276,碎片离子峰为478,428,380,278,利用Agilent Masshunter Qualitative Analysis软件推测相对分子质量为886.12,分子式为 $C_{24}H_{41}N_8O_{18}P_3S_2$,推测杂质II结构^[12-14](见图4),二级裂解途径见图5。进一步推测辅酶A与半胱氨酸缩合形成的二硫键产物——杂质II(见图6)。

3 讨论

辅酶A原料的生产采用发酵提纯,该工艺稳定性差,且在生产和贮存过程中易发生降解反应,因此原料



A. 一级图谱 B. 二级图谱

图3 杂质II质谱图

A. Primary mass spectrum B. Secondary mass spectrum

Fig. 3 Mass chromatograms of impurity II

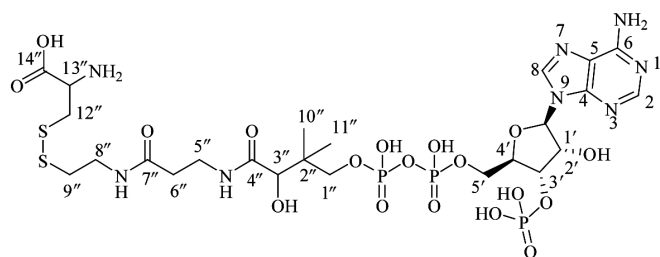


图4 杂质II结构

Fig. 4 Structure of impurity II

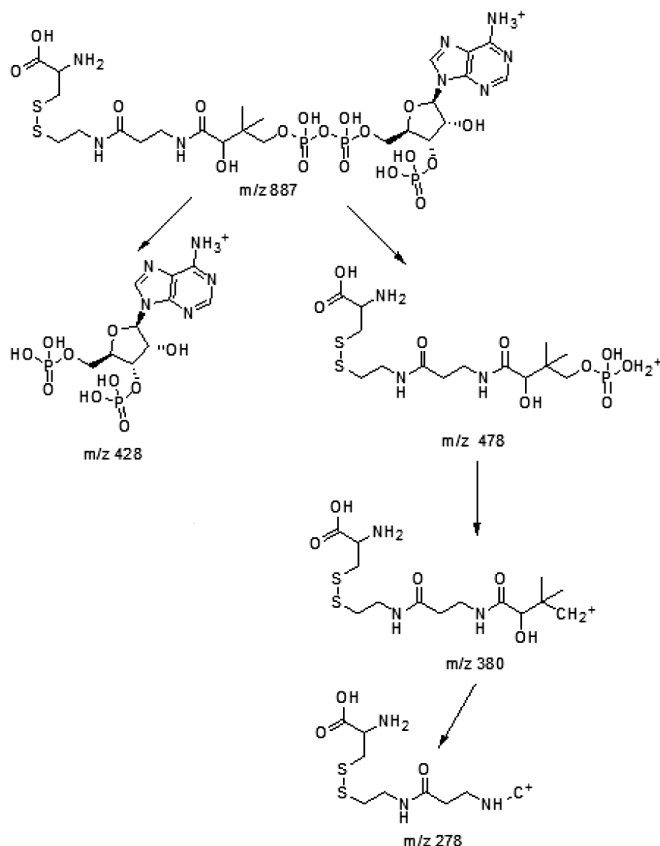


图5 杂质II $[M + H]^+$ 离子的二级质谱裂解途径

Fig. 5 secondary mass spectrum fragmentation pathway of the $[M + H]^+$ ion of impurity II

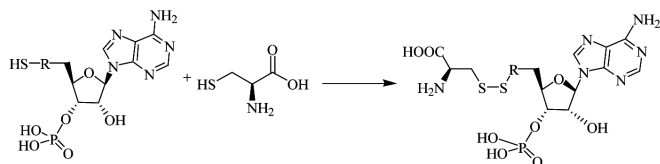


图6 辅酶A与半胱氨酸反应过程

Fig. 6 Reaction process between coenzyme A and cysteine

和制剂中杂质种类较多。现行质量标准中辅酶A原料及其制剂均未设置有关物质检查项,注册质量标准[原国家食品药品监督管理局标准(YBH03822005)]也仅以高效液相色谱法(等度洗脱)检查有关物质,但仅能控制总杂量。本研究建立的高效液相色谱法能较好地分离辅酶A中的5种杂质,同时流动相中以醋酸铵代替磷酸盐,实现与质谱联用,对杂质进行结构鉴定,以此分析

杂质的来源和影响因素,指导生产,提高辅酶A质量。

本研究中在国内11个生产厂家注射用辅酶A的处方进行了比较,研究处方中不使用抗氧化剂和使用抗氧化剂(亚硫酸氢钠、盐酸半胱氨酸)对辅酶A稳定性的影响,并对重要杂质进行结构鉴定。结果表明,抗氧化剂盐酸半胱氨酸能与辅酶A反应产生杂质II,导致生产和贮存过程中辅酶A含量降低,总杂含量升高。

综上所述,所建方法能较好地分离辅酶A中5种杂质,制备注射用辅酶A时,应避免使用盐酸半胱氨酸作为抗氧化剂,本研究为注射用辅酶A处方中抗氧化剂的选择提供了依据。

参考文献

- [1] 陈琼华. 生物化学(第三版)[M]. 北京:人民卫生出版社, 1992:136-137.
- [2] 国家卫生部药典委员会. 卫生部药品标准(第六册)[M]. 北京:化学工业出版社,1998:131-133.
- [3] CIGHETTI G, DELPUPO M, PARONI R, et al. Pantethine inhibits cholesterol and fatty acid syntheses and stimulates carbon dioxide formation in isolated rat hepatocytes[J]. J Lipid Res, 1987,28(2):152-161.
- [4] OSONO Y, HIROSE N, NAKAJIMA K, et al. The effect of pantethine on fatty liver and fat distribution[J]. J Antheroscler Thromb, 2000,7(1):55-58.
- [5] ARSENIO L, BODDRIA P, MAGNATI G. et al. Effectiveness of long-term treatment with pantethine in patients with dyslipidemia[J]. Clin Ther, 1986,8(5):537-545.
- [6] 李俊. 利血生联合辅酶A在治疗白细胞减少症中的临床应用[J]. 中华全科医学, 2012,10(12):1880.
- [7] 刘里,石柔. 辅酶A测定方法综述[J]. 煤炭与化工, 2022,45(6):140-157.
- [8] 赵颖辉,邹开鲁. 高效液相色谱-质谱联用技术在药物代谢分析中的应用[J]. 中国高科技, 2024(13):155-157.
- [9] 曾银珠,杨凤琼. 高效液相色谱-质谱联用技术在药物分析中的应用[J]. 生物化工, 2021,7(1):160-162.
- [10] YANG Y, LIAN Y, ZHONG P, et al. Characterization and quantitative analysis of related substances in Coenzyme A by HPLC and LC-MS/MS[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2018,150:220-232.
- [11] 郭漂亮. 浅谈化学药物强制降解试验的设计与开展[J]. 中国新药杂志, 2019,28(20):2468-2472.
- [12] 尹红锐,张颖,于继伟,等. 液质联用技术用于醋酸阿托西班注射液杂质结构鉴定[J]. 药物分析杂志, 2023,43(1):20-28.
- [13] 刘宝友,刘文凯,刘淑景. 现代质谱技术[M]. 北京:中国石化出版社, 2018:208-212.
- [14] 艾婕,顾霄. 葡萄糖酸钙注射液有关物质测定与高温降解杂质结构鉴定[J]. 中国现代应用药学, 2022,39(15):2001-2005.

(收稿日期:2024-06-14;二次修回日期:2025-09-27)