

腺苷钴胺的光解研究

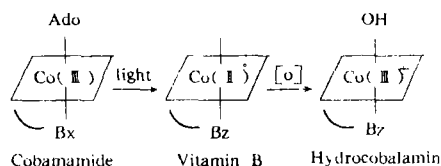
封淑华 李力更¹ 王丽萍

(河北省药品检验所, 石家庄 050011; ¹ 河北医科大学药学院, 石家庄 050017)

摘要 用 HPLC 和 UV 方法研究了腺苷钴胺在不同物理状态和不同 pH 溶剂中受不同光强度照射后的光解情况, 结果表明在相同光强下本品固体状态较液体状态稳定得多, 在酸性缓冲液中 (pH 2.0) 降解较中性缓冲液 (pH 7.0)、水 (pH 5.5) 慢, 在相同物理状态下光强度越大则光解速度越快, 提示本品原料应避光保存, 而溶液由于降解较快, 应避光操作并尽快测定。

关键词 腺苷钴胺; 光解

腺苷钴胺是维生素 B₁₂ 在体内的活性形式^[1], 其结构的区别在于腺苷钴胺是以 5'-脱氧腺苷基取代维生素 B₁₂ 分子中的氰基, 而且是以 5'-脱氧核糖中的 -CH₂ 直接与 Co 原子相连, 形成有机金属键, 即 Co-C 键, 由于烷基的强烈斥电子作用使 Co-C 键减弱, 所以腺苷钴胺性质不稳定, 对光敏感, 曝光后降解生成 vit B₁₂ 和 5', 8 脱氧腺苷, 进一步反应生成羟钴胺素^[1,2], 反应式 (简写) 如下:



本文用 HPLC 和 UV 方法分别研究了腺苷钴胺在不同物理状态和不同 pH 溶剂中受不同光强度照射后的光解情况。

1 仪器与试剂

SP-8800 高效液相色谱仪 (美国 SP 公司), SP-200 检测器, CR-3A 积分仪, YWG-C₁₈ 柱; UV-365 紫外分光光度计 (日本岛津), 腺苷钴胺由华北制药厂提供; 乙腈、磷酸为优级纯, 其它试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 HPLC 分析方法

将本品加水制成每 1 ml 中含 1.0 mg 的

供试品溶液, 照文献^[3]有关物质项下试验, C₁₈ 柱, 乙腈-0.05 mol/L 磷酸二氢钾 (17:83) 并用磷酸调 pH 至 3.2 为流动相, λ 为 260 nm, 液相色谱图见图 1, 图中 t_R 4.872 min 峰为腺苷钴胺峰, 其余为降解物峰, 说明在该色谱条件下腺苷钴胺与降解物可得到很好的分离。本品在 1000~10 μg/ml 范围内呈良好的线性关系, 回归方程为 Y=32522X+207268 (r=0.9995), 式中 Y 为峰面积, X 为浓度 (μg/ml)。

2.1.1 固体状态下的光解 取本品约 25 mg, 平铺于小称量瓶中, 分别置避光、室内弱光 (照度 50~60 Lx, 室内仅 40W 日光灯距样品 2 m 照射)、室内强光 (照度 3000~4000 Lx, 避免阳光直射, 为文献^[4]规定的光强) 下放置 0, 1, 2, 4, 6 h, 照“2.1”项下, 从“将本品加水…”起操作, 计算剩余含量 (%), 结果见表 1。

Tab 1. The photolysis of cobamamide under solid state

Light intensity	t/h				
	0	1	2	4	6
Protected from light	98.5		97.8		97.5
Weak light	98.5	97.0	—	96.4	95.2
Strong light	98.5	95.8	95.1	94.6	93.0

2.1.2 液体状态下的光解 取本品加水制成每 1 ml 中含 1.0 mg 的供试品溶液, 分别

收稿日期 1996 10 03

置于“2.1.1”项下所述的光强下照射,并从“放置 0,1,2…”起操作,计算剩余含量(%),结果见表 2。

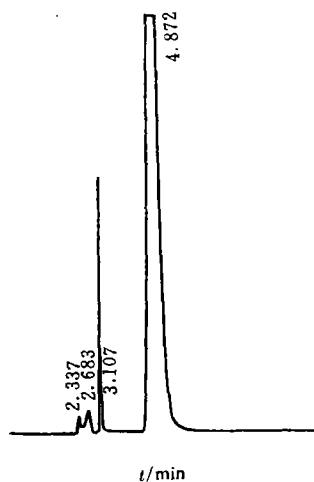


Fig 1. HPLC of cobamide

Tab 2. The photolysis of cobamide under liquid state

Light intensity	t/h				
	0	1	2	4	6
Protected from light	98.5		98.1		97.8
Weak light	98.5	94.6	91.4	86.5	80.4
Strong light	98.5	0.7			

2.2 UV 分析方法

2.2.1 pH 对腺苷钴胺光解的影响 腺苷钴胺水溶液在 pH 大于 3.5 时为红色,小于 3.5 时为黄色,据认为这是由于 5,6-二甲苯咪唑基从 Co 原子上解离的结果^[2,5],为此配制了一系列 pH 分别为 1.0,2.0,3.0,4.0、水(pH 5.5)、pH 7.0 的腺苷钴胺水溶液(浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$),分别置于“2.1.1”项下所述的光强下照射,在 0,1,2,3 h 测定,结果在光解前后,pH 为 1.0、2.0 溶液的颜色和吸收光谱的变化完全一致,但不同于 pH 大于 3.5 的三个溶液,pH 4.0、水、pH7.0 的溶液的颜色和吸收光谱的变化完全一致(参见图 2、图 3),而 pH 为 3.0 的溶液光解前为黄色,吸收光谱与 pH1.0、pH2.0 的溶液很相近,但光解后溶液颜色和吸收光谱转变为与 pH 大于 3.5 的三个溶液一致。

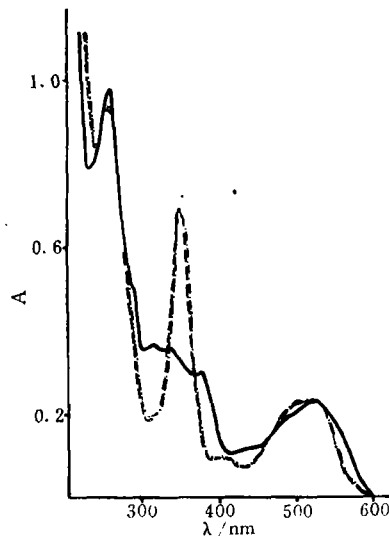


Fig 2. UV spectrum of cobamide in buffer(pH 7.0) and water(pH 5.5) under strong light

(—) 0 h, (···) 1 h, (---) 2 h, (- · -) 3 h

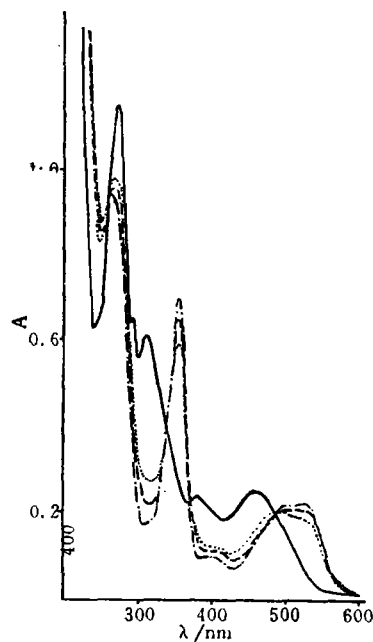


Fig 3. UV spectrum of cobamide in buffer (pH 2.0) under strong light

(—) 0 h, (···) 1 h, (---) 2 h, (- · -) 3 h

2.2.2 在二种缓冲液中的光解 根据腺苷钴胺水溶液在 pH 大于和小于 3.5 时吸收光

谱不同,文献^[6]采用差示分光光度法测定本品的含量,并且该方法收载于中国药典 1995 年版。照文献^[3]分别配制本品的二种缓冲液和水溶液,分别置“2.1.1”项下所述的光强下,在 0,1,2,3 h 分别测定,绘制吸收光谱,结果见图 2、图 3。

2.2.3 差示吸收光谱的变化 照文献^[3]以本品的 pH7.0 缓冲液溶液为空白,以 pH2.0 缓冲液溶液为测定液,置于“2.1.1”项下所述的光强下,在 0,1,2,3 h 分别测定,绘制差示吸收光谱,结果见图 4。

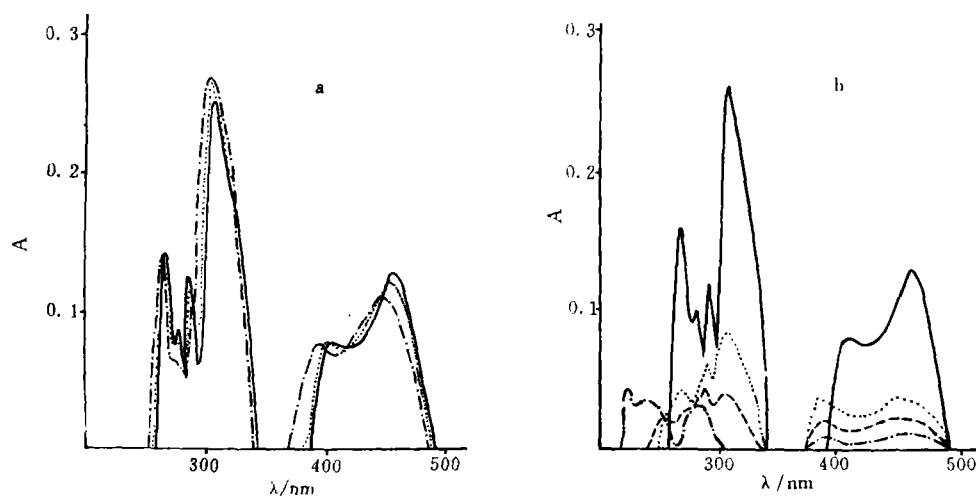


Fig 4. The differential spectrum of cobamide under two kinds of light intensity

(a) weak light; (b) strong light (—) 0 h, (····) 1 h, (---) 2 h, (- · - ·) 3 h

3 讨论

1) 从表 1、表 2 可以看到本品在相同光强下固态较液态相对稳定的多;在相同物理状态下,光解速度随光强度增加而加快,尤其是液体,强光照射 1 h 即降解完全,而弱光照射下光解反应为一级反应($r = -0.998$), $t_{1/2}$ 为 21 h。

2) 腺苷钴胺水溶液在 pH 为 3.5 时存在 5,6-二甲苯并咪唑基从 Co 原子上解离的平衡过程, pH 小于 3.5 与 pH 大于 3.5 的溶液颜色和吸收光谱不同,但 pH 小于 3.5 的 pH 1.0、pH 2.0 溶液则吸收光谱相同,光解情况相同, pH 大于 3.5 的 pH 4.0、水(pH 5.5)、pH 7.0 溶液吸收光谱相同,光解情况相同,而 pH 为 3.0 的溶液由于 pH 值处于解离平衡的边缘,光解后较 pH 1.0、pH 2.0 溶液更易转

化,吸收光谱与 pH 大于 3.5 的溶液吸收光谱一致。

3) 图 2、图 3 说明在强光下本品在不同 pH 缓冲液中光解程度不一致,在 pH 7.0 缓冲液中由于强光照射其吸收图谱迅速发生变化,1 h 即在 351 nm 出现强吸收峰(此峰为羟钴胺素的特征吸收峰),并且直到 3 h 此峰不再变化,说明光解反应在 1 h 即完全,本品水溶液(pH 5.5)的吸收光谱同 pH 7.0 缓冲液的变化一致(这与 HPLC 方法研究本品水溶液强光下光解的结果一致,即 1 h 降解完全),也说明缓冲液中离子对光解反应无影响;而 pH 2.0 缓冲液溶液曝光后,在 261 nm 的吸收度逐渐降低,305 nm 处的吸收峰消失,形成最小吸收,并不断下降,到 3 h 降到与 pH 7.0 溶液的吸收一致;在 351 nm 出现的吸收峰不断增强,3 h 增强到与 pH 7.0 溶

液的吸收一致。另以 pH 为 2.0 的盐酸溶液、磷酸盐缓冲液代替上述 pH2.0 的氯化钾缓冲液同法操作,光解情况相同,说明缓冲液中离子对光解反应无影响。在上述曝光条件下,pH 7.0 溶液和水溶液无明显的颜色变化,为红色溶液,而 pH2.0 溶液由原来的黄色,曝光 1 h 变为橙红色。2 h 变为红略带橙色,3 h 变为与 pH 7.0 溶液相同的颜色——红色溶液,但溶液的 pH 值仍为 2.0。在弱光下本品在三种溶剂中的光解速度均较强光下减慢,在避光下本品在三种溶剂中相对稳定,吸收光谱几无变化。

4) 由于本品在 pH 7.0 和 pH 2.0 缓冲液中吸收光谱变化情况不同,其差示吸收光谱也发生明显的变化,在强光下差示吸收光谱发生急剧的变化,在弱光下差示吸收光谱在

250~340 nm 波长范围内变化较小,其中在含量测定波长 304.5 ± 0.5 nm 处 ΔA 增加了约 4%,差示峰红移了约 1 nm,因此为保证含量测定的准确性,溶液应在避光条件下尽快完成测定。

参考文献

- 1 Metzler DE. *Biochemistry--The Chemical Reactions of Living Cells*. Academic Press, 1977. 502~504
- 2 Florey K. *Analytical Profiles of Drug Substances*. Academic Press, Vol. 10, 248~255
- 3 中华人民共和国药典委员会编. 中华人民共和国药典: 二部. 1995. 1028
- 4 卫生部新药(西药)临床前研究指导原则汇编. 1993. 30
- 5 *The Merck Index*. I 版. 1989. 382
- 6 朱代舜,封淑华. 差示分光光度法测定腺苷辅酶维生素 B₁₂ 的含量. 中国医药工业杂志, 1989, 20(5): 213

Study on Photolysis of Cobamamide

Feng Shuhua, Li Ligeng¹, Wang Liping

Hebei Institute for Drug Control, Shijiazhuang 050011; ¹Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017

Abstract The paper studied the photolysis of cobamamide under different light intensities. The result showed that the solid state of Cobamamide was more stable than the liquid state, and the photolysis of cobamamide in acid buffer(pH2.0) was slower than that in neutral buffer and water(pH 5.5) under the same light intensity. In the same physical state, the more light intensity, the more photolysis speed. The test indicated that the solid state must be protected from light, and the solution must be measured as quickly as possible under the conditions protected from light.

Key words Cobamamide; Photolysis