

- [21] REVERTER M, LUNDH T, LINDBERG JE. Determination of free amino acids in pig plasma by precolumn derivatization with 6-N-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate and high-performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr B: Biomed Sci Appl, 1997, 696(1):1-8.
- [22] 金苏英,林笑容,赵志红,等.高效液相色谱法测定奶粉及其他乳制品中的L-羟脯氨酸[J].饮料工业,2009,12(7):28-30.
- [23] 顾伟钢,张进杰,辛梅,等.柱前衍生-反相高效液相色谱法测定不同方法煮制的猪肉及其汤汁中的游离氨基酸[J].色谱,2011,29(10):1041-1045.
- [24] 汪明志,张华锋,周坚,等.柱前衍生-反相高效液相色谱法测定阿胶补血口服液液中主要氨基酸的含量[J].西北药学杂志,2020,35(1):42-45.
- [25] 诸永志,卞欢,吴海虹,等.提高鲫鱼汤原料蛋白溶出率的工艺优化[J].江苏农业科学,2018,46(8):189-192.
- [26] 瞿明勇,张瑞霞,赵思明,等.工艺参数对排骨汤营养特性的影响[J].食品科技,2007(12):123-126.
- [27] 李柳冰,林婷婷,曾晓房,等.前处理方式对鸽汤品质及风味的影响[J].食品工业科技,2021,42(11):15-22.
- [28] 王虎虎,黄明远,李潇,等.黄羽肉鸡汤煲炖煮工艺优化[J].中国食品学报,2021,21(5):272-277.
- [29] 马家骅,李霞,谭承佳,等.基于药效理化表征的当归补血汤质量控制模式初探[J].中草药,2012,43(5):901-905.
- [30] 靳如娜,齐晓甜,孙蓉,等.经典名方当归补血汤的药效物质基础和g量控制研究进展[J].中国实验方剂学杂志,2019,25(16):220-228.
- [31] 王静帆,黄峰,沈青山,等.低温长时蒸煮对猪肉品质的影响[J].中国农业科学,2021,54(3):643-652.
- [32] 陆路,金振涛,马勇,等.中华传统肉食煲汤的基本营养成分[J].食品与发酵工业,2010,36(1):187-190.

(收稿日期:2022-01-25,修回日期:2022-03-20)

引用本文:张新勇,葛雪松,孙桐,等.超高效液相色谱串联三重四极杆质谱法测定三种葡萄糖制剂中5-羟甲基糠醛的含量[J].安徽医药,2023,27(4):679-682.DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2023.04.010.

◇ 药物分析 ◇



超高效液相色谱串联三重四极杆质谱法测定三种葡萄糖制剂中5-羟甲基糠醛的含量

张新勇,葛雪松,孙桐,卓静

作者单位:宿迁市食品药品检验所,江苏 宿迁 223800

摘要: 目的 建立葡萄糖注射液、葡萄糖酸钙口服溶液与盐酸氨基葡萄糖胶囊中5-羟甲基糠醛的超高效液相色谱串联三重四极杆质谱测定方法。方法 2021年1—9月,采用ACQUITY UPLC HSS T3(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)色谱柱,流动相为0.05%甲酸溶液-甲醇(85:15),流速为0.3 mL/min,柱温30℃,进样盘温度5℃,进样体积2 μL。质谱条件:ESI源,正离子扫描,脱溶剂温度:400℃;干燥气流速:15 L/min;毛细管电压:3.0 kV。结果 5-羟甲基糠在2.07~155.25 μg/L浓度范围内,线性关系良好($r=0.999\ 7$),定量限为0.36 μg/L,平均回收率为99.54%,RSD为1.63%($n=9$)。结论 该方法专属性较强,灵敏度高,稳定性好,适用于三类制剂中5-羟甲基糠醛的质量控制。

关键词: 葡萄糖; 药物污染; 超高效液相色谱串联三重四极杆质谱(UPLC-MS/MS); 5-羟甲基糠醛; 质量控制

Determination of 5-Hydroxymethyl furfural in three glucose preparations by UPLC-MS/MS

ZHANG Xinyong, GE Xuesong, SUN Tong, ZHUO Jing

Author Affiliation: Suqian Institutes for Drug and Food Control, Suqian, Jiangsu 223800, China

Abstract: **Objective** To establish an UPLC-MS/MS method for determination of 5-Hydroxymethylfurfural (5-HMF) in Glucose Injection, Calcium Gluconate Oral Solution and Glucosamine Hydrochloride Capsules. **Method** From January 2021 to September 2021, an ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1 mm×100 mm, 1.8 μm) was used, the mobile phase was 0.05% formic acid solution-methanol (85:15), the flow rate was 0.3 mL/min, the column temperature was 30℃ and the sample plate temperature was 5℃, the sample volume was 2 μL. MS conditions: ESI ion source was used and positive ion scanning; the desolvation temperature was 400℃, the dry gas flow rate was 15 L/min and the capillary voltage was 3.0 kV. **Result** There was a good linear relationship within the range of 2.07-155.25 μg/L for 5-HMF ($r=0.999\ 7$), and the limit of quantitation of 0.36 μg/L, the average recovery of 99.54% with RSD of 1.63% ($n=9$). **Conclusion** The method shows promising specificity, high sensitivity and good stability, can be used in the quality control of 5-HMF in three preparations.

Key words: Glucose; Drug contamination; UPLC-MS/MS; 5-HMF; Quality control

5-羟甲基糠醛是以葡萄糖等单糖类物质在高温或酸性等条件下脱水生成的醛类化合物,其广泛存在于食品、药品(主要为含葡萄糖成分的制剂)和部分炮制后的中药材中,研究表明,5-羟甲基糠醛具有致敏性与基因遗传毒性^[1-3],为了提高药品的安全性,应尽量降低制剂中5-羟甲基糠醛的含量。现行药品标准中多采用紫外-可见分光光度法对制剂中5-羟甲基糠醛进行限量检查,此方法中5-羟甲基糠醛限量浓度较高,专属性不强,容易受制剂辅料与环境影响^[4-5]。现采用UPLC-MS/MS对葡萄糖注射液、葡萄糖酸钙口服溶液与盐酸氨基葡萄糖胶囊中5-羟甲基糠醛进行定量分析,降低了5-羟甲基糠醛测定下限,为三类葡萄糖制剂的杂质控制与质量标准的提升提供参考。

1 材料与方法

1.1 仪器 Waters XEVO TQ-S micro 三重四级杆液质联用色谱仪(美国 Waters 有限公司),梅特勒 XP205 电子天平(瑞士梅特勒托利多公司,精度 0.01 mg);

1.2 试药 5-羟甲基糠醛对照品(批号 111626-202114,含量 100%)、D-无水葡萄糖对照品(批号 110833-202109,含量 99.9%)与盐酸氨基葡萄糖(批号 140649-202007,含量 100%)对照品,均来自中国食品药品检定研究院;葡萄糖注射液 3 批(①焦作市民康药业有限公司,批号 20082203,规格 50%;②江苏大红鹰恒顺药业有限公司,批号 2020101803,规格 10%;③安徽双鹤药业有限责任公司,批号 1911254C,规格 5%)、葡萄糖酸钙口服溶液 3 批(④哈药集团三精制药有限公司,批号 21041313;⑤亚宝药业四川制药有限公司,批号 200708;⑥华润双鹤利民药业(济南)有限公司,批号 20120515;规格均为 10%)与盐酸氨基葡萄糖胶囊 3 批(⑦香港澳美制药厂,批号 6710973;⑧浙江诚意药业股份有限公司,批号 202001006;⑨北京葡立药业有限公司,批号 1210212;规格均为每粒 0.24 g),三种制剂来源为单位抽检或市售;甲醇(默克化工,色谱纯)、甲酸(恩科化学,色谱纯),水为自制超纯水。

1.3 方法

1.3.1 分析条件 色谱条件:色谱柱采用 ACQUITY UPLC HSS T3(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm)色谱柱,流动相为 0.05% 甲酸溶液-甲醇(85:15),流速为 0.3 mL/min,柱温 30 ℃,样品室温 5 ℃,进样体积 2 μL。

质谱条件:ESI 源,正离子扫描,脱溶剂温度:400 ℃,干燥气流速 15 L/min,毛细管电压 3.0 kV,5-羟甲基糠醛定量分析离子对为 127.10→109.00,锥孔电压:60 V,碰撞能量:15 V。

1.3.2 对照品溶液制备 取 5-羟甲基糠醛对照品 10 mg,精密称定,置 100 mL 量瓶中,加流动相使其溶解并稀释至刻度,摇匀,精密量取 1 mL,置于 100 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,作为对照品贮备液,分别精密量取对照品贮备液 1、2、5、10、20、50、75 mL,置于 500 mL 量瓶中,加流动相稀释至刻度,定量稀释制成含 5-羟甲基糠醛 2.07、4.14、10.35、20.70、41.40、103.50、155.25 μg/L 的对照品溶液。

1.3.3 供试品溶液制备 取供试品细粉 100 mg,精密称定,或精密量取供试品 1 mL,置 250 mL 量瓶中,加流动相适量超声使溶解并稀释至刻度,摇匀,制成供试品溶液。

1.4 方法学考察

1.4.1 干扰试验 取空白溶剂,加流动相适量,制备空白溶液。取葡萄糖与葡萄糖酸钙对照品适量,加入适量乳酸、氢氧化钙等辅料,制备葡萄糖注射液与葡萄糖酸钙注射液的阴性样品 1 溶液。取盐酸氨基葡萄糖对照品适量,加入适量硬脂酸镁,制备盐酸氨基葡萄糖的阴性样品 2 溶液。取上述三种溶液、对照品溶液与样品①的供试品溶液按“1.3.1”项下条件依法测定,结果表明空白溶液与阴性样品溶液对测定无干扰。色谱图见图 1。

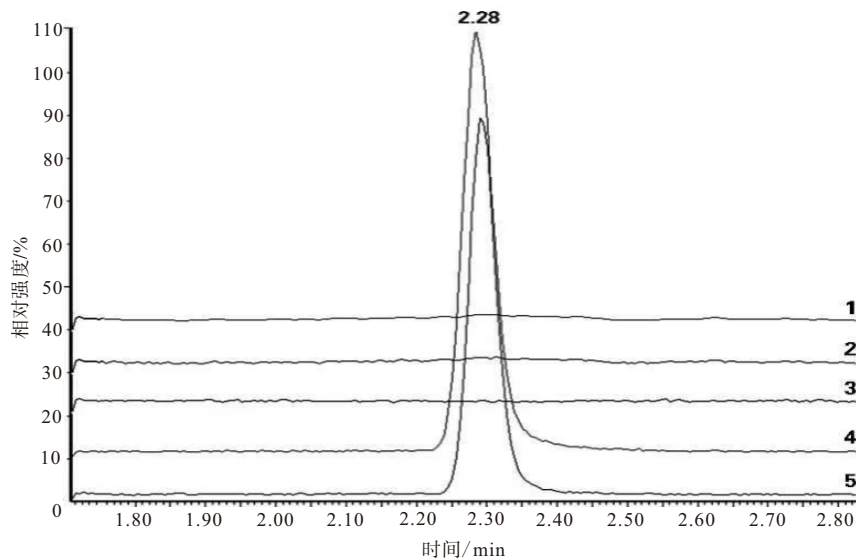
1.4.2 线性关系与定量限考察^[6] 取“1.3.2”项下的对照品溶液,按“1.3.1”项下条件进样测定,以浓度为横坐标,5-羟甲基糠醛峰面积为纵坐标,回归方程为: $y=1125.5x+801.16$ ($r=0.9997$)。表明 5-羟甲基糠醛在 2.07~155.25 μg/L 范围内线性关系良好。同时,以稀释后的 5-羟甲基糠醛对照品溶液按“1.3.1”项下条件进样测定,5-羟甲基糠醛峰信噪比为 10 时,确定定量限为 0.36 μg/L。

1.4.3 精密度试验 取对照品溶液(41.4 μg/L)按“1.3.1”项下条件,重复进样 6 次,记录 5-羟甲基糠醛峰面积的 RSD=0.88%($n=6$)。

1.4.4 稳定性试验 按“1.3.3”项下方法制备样品①、样品④、样品⑦的供试品溶液,分别在 0、2、6、12、24、48 h 取样按“1.3.1”项下条件进样测定,记录 5-羟甲基糠醛峰面积的 RSD 分别为 0.81%、0.62%、0.90%($n=6$)。结果表明,供试品溶液在 48 h 内基本稳定。

1.4.5 重复性试验 取样品① 6 份,按“1.3.3”项下方法制备供试品溶液,并按“1.3.1”项下条件进样测定,记录 5-羟甲基糠醛峰面积的 RSD 分别为 0.5%($n=6$)。

1.4.6 加样回收率试验 取已知含量的样品①供试品溶液 9 份,平分 3 组,置于 20 mL 量瓶中,每组分别加入(41.4 μg/L)对照品溶液 3 mL、5 mL、8 mL,



注:1—空白溶液;2—阴性样品 1;3—阴性样品 2;4—供试品;5—对照品。

图1 5-羟甲基糠醛的UPLC-MS/MS(MRM)色谱图

按“1.3.3”项下方法制备供试品溶液,并按“1.3.1”项下条件进样测定,记录5-羟甲基糠醛峰面积并计算,平均回收率为99.54%,RSD为1.63%($n=9$),测定结果见表1。

表1 5-羟甲基糠醛加标回收率结果			
样品含量/ng	添加量/ng	加样测得量/ng	回收率/%
243.01	124.20	364.11	97.50
243.01	124.20	369.83	102.11
243.01	124.20	365.04	98.25
243.01	207.00	447.19	98.64
243.01	207.00	451.95	100.94
243.01	207.00	452.97	101.43
243.01	289.80	527.42	98.14
243.01	289.80	532.33	99.83
243.01	289.80	529.92	99.00

注:平均回收率为99.54%,相对标准偏差(RSD)为1.63%。

2 样品测定

取①~⑨号样品各3份,按“1.3.3”项下方法制备供试品溶液,并按“1.3.1”项下条件进样测定,计算各样品中5-羟甲基糠醛的含量。测定结果见表2,3。

表2 葡萄糖注射液与葡萄糖酸钙口服溶液测定结果($n=3$)		
样品编号	平均含量/(mg/L)	RSD/%
50% 葡萄糖注射液样品①	15.91	0.41
10% 葡萄糖注射液样品②	9.71	0.96
5% 葡萄糖注射液样品③	6.89	0.90
葡萄糖酸钙口服溶液样品④	未检出	未检出
葡萄糖酸钙口服溶液样品⑤	2.55	1.02
葡萄糖酸钙口服溶液样品⑥	2.44	0.59

注:RSD为相对标准偏差。

表3 盐酸氨基葡萄糖胶囊测定结果($n=3$)

样品编号	称样量/mg	平均含量/ ($\mu\text{g/g}$)	相对标准 偏差/%
盐酸氨基葡萄糖胶囊样品⑦	100.51	23.36	0.58
盐酸氨基葡萄糖胶囊样品⑧	101.03	20.98	0.74
盐酸氨基葡萄糖胶囊样品⑨	100.29	20.05	0.91

3 讨论

据文献报道^[7],《中国药典》2020年版二部葡萄糖注射液项下与一部蜂蜜项下,5-羟甲基糠醛最大暴露量分别为1.75 mg/d与1.2 mg/d。而按照国际人用药品注册技术协调会(ICH)M7项下的指导原则要求,5-羟甲基糠醛为二类遗传毒性杂质,其最理想的暴露量可以参照毒理学关注阈值(TCC)为1.5 $\mu\text{g/d}$ 。以葡萄糖注射液每日常用量为5 g(以葡萄糖计),葡萄糖酸钙注射液每日最大用量为40 mL,盐酸氨基葡萄糖胶囊每日常用量约为1.5 g,折算成9个样品中5-羟甲基糠醛最大暴露量为0.16、0.49、0.69、0、0.10、0.09、0.04、0.03、0.03 mg/d。参照《中国药典》中葡萄糖注射液与蜂蜜项下的5-羟甲基糠醛的限量标准,9个样品中5-羟甲基糠醛的限量均合格,而参照TCC值时,几乎所有制剂均不符合要求,存在较大安全隐患。目前许多厂家出于工艺与成本等因素考量,生产的葡萄糖类制剂中5-羟甲基糠醛的限度值折算后远大于TCC值。以葡萄糖注射液为例,其最大用量为500 mL/d,以1.5 $\mu\text{g/d}$ 为限度,其最大的供试品溶液浓度为30 $\mu\text{g/L}$,此时紫外与液相方法均不能做到有效检测,该实验UPLC-MS/MS法有效检测下限为2.07 $\mu\text{g/L}$,可以进行有效检测,可以为三类临床常用的葡萄糖类制剂的质量标准提高与质量

控制方法提供参考。

3.1 色谱条件选择 通过考察甲醇-水、甲醇-甲酸溶液、甲醇-乙酸溶液三种文献报道的常用的流动相体系^[8-12],发现流动相中加入甲酸有利于减少色谱峰拖尾,水相增多有助于供试品的溶解,有机相增多有利于提升5-羟甲基糠醛的稳定性,综合考虑选用0.05% 甲酸溶液-甲醇(85:15)作为流动相,此时主峰保留时间适中、对称性和峰形均较好。

3.2 标准曲线范围 该方法标准曲线的浓度上限并未设定很高,一是考虑仪器过载与测定精度,在测定过程中发现在高浓度的5-羟甲基糠醛溶液易造成仪器过载与主峰变形,且易造成离子源污染而使得连续测定样品时背景干扰较大;二是考虑衔接5-羟甲基糠醛的液相方法测定浓度下限,有文献报道5-羟甲基糠醛的液相测定浓度下限约为100 $\mu\text{g/L}$ ^[13-18]。

3.3 标准考察^[19] 2020版《中国药典》二部葡萄糖注射液检查项下5-羟甲基糠醛的限度相对较低,葡萄糖酸钙注射液与盐酸氨基葡萄糖胶囊的现行标准中还未有5-羟甲基糠醛的限量检查项,但其制剂中5-羟甲基糠醛的含量较高,同时葡萄糖注射液临床应用广泛且制剂规格较多,葡萄糖酸钙注射液为儿童制剂,盐酸氨基葡萄糖胶囊也为中老年常用药品,因此三类制剂标准中增修5-羟甲基糠醛的限度检查显得更有意义。

参考文献

- [1] 方鑫,李愈,刘迎新. 5-羟甲基糠醛的分离纯化研究进展[J]. 浙江化工, 2021, 52(8): 10-13.
- [2] 冯云超,左森,曾宪海,等. 葡萄糖制备5-羟甲基糠醛[J]. 化学进展, 2018, 30(Z1): 314-324.
- [3] 梁美婷,贝家欣,王可欣,等. 非淀粉型结晶果糖注射液高温高压灭菌前后5-羟甲基糠醛及pH的变化[J]. 中国药业, 2019, 28(5): 11-14.
- [4] 李鹏阳,赵茜,王延吉. 糠醛和5-羟甲基糠醛双键加氢催化剂

及催化作用研究进展[J]. 高校化学工程学报, 2021, 35(2): 206-214.

- [5] 王梅,王越欣,武英茹,等. 5-羟甲基糠醛在中药加工过程中的变化及药理作用研究概况[J]. 药物评价研究, 2020, 43(11): 2319-2327.
- [6] 贾离离,祁志红,彭立军,等. 超高效液相色谱仪检出限计算方法的比较分析[J]. 现代食品科技, 2018, 34(2): 212-217.
- [7] 祝清芬,魏霞,王维剑,等. 基于杂质遗传毒性谈药物中5-羟甲基糠醛的质量控制[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(3): 485-489.
- [8] 刘真,朱丽霞. 5-羟甲基糠醛、糠醛、乙酰呋喃、呋喃酮、5-甲基糠醛的高效液相检测方法[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(18): 166-170.
- [9] 刘云,杨玉忠. 超高效液相色谱-串联质谱法定性定量检测中成药及保健食品中非法添加的17种化学药物[J]. 安徽医药, 2020, 24(1): 82-86.
- [10] 庞扬海,高裕峰,甄振鹏,等. 高效液相色谱串联质谱法测定红糖中5-羟甲基糠醛[J]. 甘蔗糖业, 2021, 50(2): 97-101.
- [11] 张玉荣,王瑞忠,鲁静. 药用蜂蜜中5-羟甲基糠醛的限量检查方法研究[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(2): 326-330.
- [12] 吴子静,梁大虎,杨斌,等. 高效液相色谱-串联质谱法同时测定五味子糖浆中7种木脂素的含量[J]. 安徽医药, 2020, 24(5): 869-873.
- [13] 李玲,王秋实. 葡萄糖酸锌口服溶液中5-羟甲基糠醛限量检查[J]. 中国药业, 2020, 29(11): 65-67.
- [14] 李玲,赵猛,戴丽娜. HPLC法同时测定氢溴酸右美沙芬糖浆中主药和降解杂质及防腐剂的含量[J]. 药学与临床研究, 2021, 29(1): 23-26.
- [15] 吴均成. HPLC法测定灯盏花素葡萄糖注射液中5-羟甲基糠醛的含量与限度修订[J]. 亚太传统医药, 2020, 16(9): 47-50.
- [16] 郑容,黄文平,程燕,等. UPLC测定水果制品中5-羟甲基糠醛的含量[J]. 现代食品, 2020, 26(17): 210-212, 222.
- [17] 刘雪涵,朱雯,秦楠,等. 红景天注射液中5-羟甲基糠醛HPLC含量检测方法的建立及分析[J]. 天津医科大学学报, 2019, 25(6): 659-661.
- [18] 李书迪,于景华,齐和日玛,等. HPLC法同时测定七味广枣散中4种成分的含量[J]. 中医药导报, 2021, 27(1): 69-72.
- [19] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020年版 二部[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 1516.

(收稿日期: 2021-10-12, 修回日期: 2021-11-09)

◇ 编读往来 ◇

《安徽医药》杂志关于书写论文作者单位名称的要求

单位名称书写不规范,将影响编辑部与作者、读者与作者之间的联系及文稿发表后文献计量学的统计等工作。为此,本刊就作者单位名称的书写要求如下:(1)作者在投稿时,应列出单位名称的全称,具体到所在科室,并且写明单位所在城市名及邮编。(2)单位的英文名称应根据所在单位统一的英文名称书写。(3)“论文投送介绍信及授权书”的公章内容,须与文稿中所书写的单位名称一致。(4)由不同单位共同撰写的文稿,各个单位的名称均须分别列出,由论文的资料提供单位(一般即为第一作者所在单位)开具“论文投送介绍信及授权书”。(5)如文稿作者为集体作者,英文摘要的作者项中,应列出本文稿第一整理者(即第一执笔者)的姓名及工作单位。(6)通信作者必须注明性别、职称、研究方向和电子信箱(Email)。