

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.11.018

葡萄糖酸锌口服溶液中5-羟甲基糠醛限量检查

李玲,王秋实

(江苏省连云港市食品药品检验检测中心,江苏 连云港 222006)

摘要:目的 建立测定葡萄糖酸锌口服溶液中5-羟甲基糠醛(5-HMF)含量的高效液相色谱(HPLC)法。方法 色谱柱采用Phenomenex Luna C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm),流动相为乙腈-0.1%甲酸(8:92, V/V),流速为1.0 mL/min,检测波长为284 nm,柱温为30℃,进样量为20 μL。结果 5-HMF质量浓度在0.202~40.480 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好($r=0.9998$),平均回收率为99.58%,RSD为0.52%($n=9$),5-HMF检测限为1.0 ng。结论 该方法适用于葡萄糖酸锌口服溶液中5-HMF的限量检查,可为该品种质量标准的提升提供参考。

关键词:高效液相色谱法;葡萄糖酸锌口服溶液;5-羟甲基糠醛;限量检查

中图分类号:R932;R284.1;R286.0

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)11-0065-03

Limit Detection of 5-Hydroxymethylfurfural in Zinc Gluconate Oral Solution

LI Ling, WANG Qiushi

(Lianyungang Institute for Food and Drug Control, Lianyungang, Jiangsu, China 222006)

Abstract: Objective To determine the content of 5-hydroxymethylfurfural(5-HMF) in zinc gluconate oral solution by high performance liquid chromatography(HPLC) method. **Methods** A Phenomenex Luna C₁₈ column(250 mm×4.6 mm,5 μm) was used, and the mobile phase was acetonitrile-0.1% formic acid solution(8:92, V/V). The flow rate was 1.0 mL/min and the detection wavelength was set at 284 nm. The column temperature was 30℃ and the injection volume was 20 μL. **Results** The linear range of 5-HMF was 0.202-40.480 μg/mL($r=0.9998$), and the average recovery was 99.58%, RSD=0.52% ($n=9$); the limit of detection was 1.0 ng. **Conclusion** The method can be used for limit detection of 5-HMF in zinc gluconate oral solution and gives a reference to the improvement of its standard.

Key words: high performance liquid chromatography; zinc gluconate oral solution; 5-hydroxymethylfurfural; limit detection

5-羟甲基糠醛(5-HMF)是葡萄糖、果糖等单糖在高温、酸性条件或微生物的作用下脱水生成的醛类化合物,对人体横纹肌和内脏有损害,具有神经毒性,能与人体蛋白质结合产生蓄积中毒^[1-2],还有遗传毒性、致癌性和致突变性^[3]。葡萄糖酸锌口服溶液适用于小儿厌食症、皮肤痤疮、口腔溃疡、儿童生长发育迟缓等缺锌性疾病,其质量标准收载于2015年版《中国药典(二部)》^[4]¹²⁷⁶,但并未对杂质进行控制。葡萄糖酸锌合成的起始原料主要为葡萄糖,且口服溶液辅料中含有较多蔗糖,特别在高温灭菌过程中^[5],极易产生糖的降解产物5-HMF。

2015年版《中国药典(二部)》对以葡萄糖为载体的注射液均进行5-HMF的控制^[4]^{215,380,489,1290},且2015年版《中国药典(一部)》对药用蜂蜜进行了5-HMF的控制^[6]。本研究中采用高效液相色谱(HPLC)法对葡萄糖酸锌口服溶液中杂质5-HMF进行限量检查,为提高本品质量标准提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Waters 2695型HPLC仪,包括2998PDA检测器,Empower色谱工作站(美国Waters有限公司);Sartorius BP211D

第一作者:李玲,女,硕士研究生,副主任药师,研究方向为药品检验,(电子信箱)lilinghappy@163.com。

- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:66-244.
- [3] 何凤成,李守信,赵志全,等. 一测多评法测定五味子中4种木脂素类成分的含量[J]. 药学学报,2012,47(7):930-933.
- [4] 李伟,刘亚丽,宋永贵,等. UPLC-Q-TIO-MSE结合OPLS-DA模式快速鉴别南、北五味子化学成分与识别差异标志物[J]. 中草药,2015,46(15):2212-2218.
- [5] 杨孝容,向清祥,熊俊如,等. HPLC测定柏子养心丸中五味子酯甲、五味子甲素和五味子乙素的含量[J]. 药物分析杂志,2006,26(11):1558-1561.
- [6] 单鑫,陆兔林,毛春芹,等. HPLC同时测定复方五味含片中葛根素、甘草苷、甘草酸铵、五味子醇甲、五味子甲素、五味子

- 乙素[J]. 南京中医药大学学报,2014,30(1):82-84.
- [7] 李正国,于立佐,张爱琴. RP-HPLC测定降酶灵胶囊中五味子醇甲、五味子甲素和五味子乙素的含量[J]. 中成药,2004,26(8):618-621.
- [8] 谭生建,屈雪莲,杨成勇,等. 肝复康丸中五味子甲素和五味子乙素含量测定方法研究[J]. 解放军药科学,2000,16(5):270-272.
- [9] 杨炳友,陈张林,刘艳,等. 五味子藤茎化学组分的拆分与分析[J]. 中成药,2017,39(11):2334-2340.
- [10] 郑艳超,马琳,张坚,等. HPLC法测定五味子果梗中6种木脂素[J]. 中成药,2017,39(2):355-359.

(收稿日期:2019-10-10)

型电子分析天平(德国 Sartorius 公司,精度为十万分之一)。

1.2 试药

5-HMF 对照品(中国食品药品检定研究院,批号为 111626-201610,纯度为 99.2%);葡萄糖酸锌口服溶液(厂家和批号见表 1,规格为 0.35%);乙腈和甲酸均为色谱纯;水为超纯水。

表 1 8 批葡萄糖酸锌口服溶液的厂家及批号

厂家	批号
湖北纽兰药业有限公司	20190406
湖北纽兰药业有限公司	20180904
亚宝药业四川制药有限公司	181113
亚宝药业四川制药有限公司	180950
哈药集团三精制药有限公司	18120833
河南同源制药有限公司	181104
杭州华润老桐君药业有限公司	20181206
四川健能制药有限公司	180906

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Phenomenex Luna C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.1% 甲酸(8:92, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:284 nm;柱温:30 ℃;进样量:20 μL。

2.2 溶液制备

取 5-HMF 对照品 10.12 mg,精密称定,置 100 mL 容量瓶中,加水振摇使溶解,稀释至刻度,摇匀,作为对照品贮备液。精密量取对照品贮备液 2 mL,置 10 mL 容量瓶中,加水稀释至刻度,作为对照品溶液。取本品 5 mL,精密称定,置 10 mL 容量瓶中,加水振摇使溶解,稀释至刻度,摇匀,即得供试品溶液。

2.3 专属性试验

量取上述空白溶剂、对照品溶液与供试品溶液各 20 μL,注入液相色谱仪,按拟订色谱条件进样测定。结果溶剂不干扰测定,5-HMF 与相邻杂质均能完全分离,专属性良好,理论板数按 5-HMF 峰计不低于 3 000。色谱图见图 1。

2.4 破坏性试验

量取样品(批号为 20180904)5 mL,共 5 份,分别进

行酸破坏(加 0.2 mol/L 盐酸溶液 2 mL,室温放置 4 h,加 0.2 mol/L 氢氧化钠溶液 2 mL 中和,用水定容至 10 mL),碱破坏(加 0.2 mol/L 氢氧化钠溶液 2 mL,室温放置 4 h,加 0.2 mol/L 盐酸溶液 2 mL 中和,用水定容至 10 mL),氧化破坏(加 3% 过氧化氢溶液 5 mL,室温放置 4 h),光照破坏(置 4 500 lx,24 h,定容至 10 mL),高温加热(90 ℃ 水浴 4 h,放冷至室温,定容至 10 mL)。分别取上述破坏溶液 20 μL,进样测定,结果 5-HMF 色谱峰与上述破坏样品中相邻成分峰分离良好,破坏样品中产生的杂质对 5-HMF 的测定无干扰。其中,5-HMF 在碱和光照破坏条件下降解严重,稳定性差;在氧化条件下略有降解;在酸破坏条件下稳定性良好,基本无降解。结果见图 2。

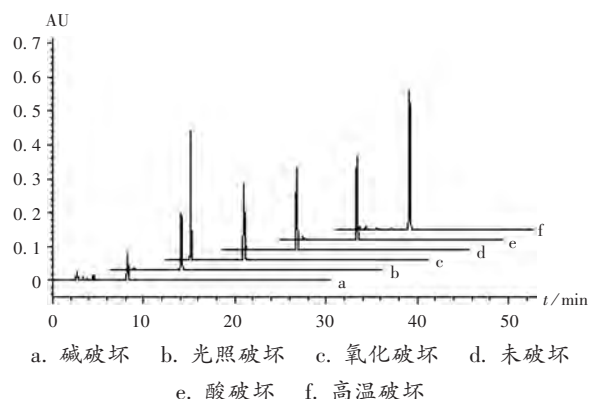


图 2 破坏性试验高效液相色谱图

2.5 方法学考察

线性关系考察:分别精密量取 2.2 项下对照品贮备液各适量,用水稀释成质量浓度分别为 0.2, 1, 4, 10, 20, 40 μg/mL 的系列线性对照品溶液,按拟订色谱条件进样测定,以对照品质量浓度(X)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程 $Y = 144\,134X - 23\,253$, $r = 0.999\,8$ ($n = 6$)。结果表明,5-HMF 质量浓度在 0.202 ~ 40.480 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好。

稳定性试验:取供试品溶液(批号为 20180904),分别于 0, 2, 8, 12, 18, 24 h 时进样测定,记录色谱图。结果 5-HMF 峰面积的 RSD 为 1.16% ($n = 6$),表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

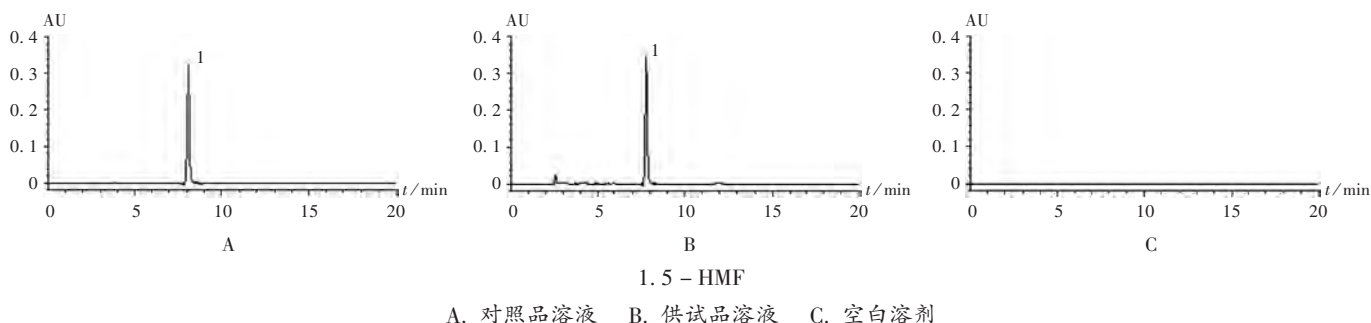


图 1 高效液相色谱图

精密密度试验:取对照品溶液,连续进样6次,测定5-HMF峰面积。结果的RSD为0.69% ($n=6$),表明仪器精密密度良好。

重复性试验:取同一批样品(批号为20180904)6份,按2.2项下方法平行制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定。结果5-HMF含量平均值为30.6 $\mu\text{g/mL}$, RSD为0.86% ($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量的样品(批号为20180904)9份,精密量取5 mL,分别置20 mL容量瓶中,平均分成3组,分别精密加入对照品贮备液1,1.5,2 mL,加水稀释至刻度,摇匀,即得供试品溶液。精密吸取20 μL ,注入液相色谱仪,计算加样回收率。结果见表2。

表2 5-HMF加样回收试验结果($n=9$)

样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
152.8	100.4	252.8	99.60		
152.8	100.4	251.9	98.71		
152.8	100.4	253.1	99.90		
152.8	150.6	303.8	100.27		
152.8	150.6	303.0	99.73	99.58	0.52
152.8	150.6	302.4	99.34		
152.8	200.8	351.7	99.05		
152.8	200.8	354.0	100.20		
152.8	200.8	352.5	99.45		

检测限和定量限确定:精密量取5-HMF对照品溶液适量,加水逐步稀释,进样,根据信噪比(S/N)为3和10分别确定检测限和定量限,结果检测限和定量限分别为1.0 ng和4.0 ng。

2.6 样品含量测定

取8批(批号分别为20190406,20180904,181113,180950,18120833,181104,20181206,180906)样品,按2.2项下方法制备供试品溶液,精密吸取20 μL ,按拟订色谱条件进行测定,并按外标法计算含量。结果前7批样品中5-HMF分别为1.95,30.56,39.14,39.25,0.70,3.77,41.46 $\mu\text{g/mL}$,仅批号为180906的样品中未检出。

3 讨论

3.1 提取方法选择

5-HMF易溶于甲醇、乙醇和水,曾比较甲醇、50%甲醇和水作为提取溶剂的差异,结果3种溶剂均能达到充分提取的效果。考虑到成本及安全问题,结果选择水作为提取溶剂,且杂质较少。同时,考察超声时间(0,5,10 min)对提取效率的影响,结果制备供试品溶液不需要超声,适当振摇即可提取完全。

3.2 检测结果分析

共收集销售较好的6个厂家共8批次的样品,试验结果

表明,8批样品中5-HMF含量在0.70~41.46 $\mu\text{g/mL}$ 范围,其中有1批未检出5-HMF,最高质量浓度与最低质量浓度相差近60倍。可见,目前市售葡萄糖酸锌口服溶液质量参差不齐,部分厂家在生产工艺、储存、质量控制等方面仍不完善。为保证成品质量,应重点考察工艺合理性,制订规范化的生产过程及合理的质量控制指标。

3.3 应用价值

葡萄糖酸锌口服溶液儿童及成人的口服剂量范围为10~40 mL/d,其中5-HMF的质量浓度范围为0.70~41.46 $\mu\text{g/mL}$,日暴露量则为7.0 μg ~1.66 mg。对比以下3种情况:1)2015年版《中国药典(二部)》对葡萄糖注射液、以葡萄糖为载体的注射液均规定了5-HMF的限量,经折算,日最大暴露量分别为1.75 mg(临床常用规格为5%)和5 mg^[3],本试验中样品中5-HMF含量均在允许范围内;2)2015年版《中国药典(一部)》对蜂蜜规定了5-HMF的限量,经折算,日最大暴露量为1.2 mg^[3],本研究中有4批样品均超过日最大暴露量限度;3)5-HMF属2类遗传毒性杂质,限度的制订需按遗传毒性杂质要求进行,最理想的限度是5-HMF的日暴露量为1.5 μg ^[3],本试验中有7批样品中5-HMF的含量远超过毒理学阈值(TTC)限度的要求,存在安全隐患,但TTC是一个高度保守的暴露量,控制指标过于严格会导致生产成本增加和生产工艺的难度。由于葡萄糖酸锌口服溶液属口服制剂,故参考蜂蜜的5-HMF日最大暴露量来制订本品的质控限度,经折算,将毒性杂质5-HMF限度定为应不得过30 $\mu\text{g/mL}$ 。建议本品质量标准增加5-HMF检查项,建议部分厂家完善生产工艺,提高产品质量,以保证临床用药安全性。葡萄糖酸锌口服溶液临床广泛应用于儿童,故控制遗传毒性杂质5-HMF的限量具有重要临床意义。

参考文献:

- [1] 赵玲,周臣清,朱婉清,等. 5-羟甲基糠醛的生物安全性和生物活性研究进展[J]. 食品工业科技,2016,37(11):372.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 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,2015.
- [5] 乔灵芝. 葡萄糖酸锌口服液的制备[J]. 饮食保健,2016,3(2):237-238.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:359-360.

(收稿日期:2019-09-30;修回日期:2019-11-29)