

超高效液相色谱 - 串联质谱法测定葡萄糖注射液中 5- 羟甲基糠醛含量

LCMSMS-590

摘要： 本文建立了一种使用岛津三重四极杆液质联用系统测定葡萄糖注射液中 5- 羟甲基糠醛含量的方法。5- 羟甲基糠醛在优化后的色谱及质谱条件下，采用正离子模式进行电离，通过多反应监测 (MRM) 模式对目标化合物进行测定。结果表明：使用外标法定量，5- 羟甲基糠醛在 0.010 $\mu\text{g/mL}$ ~1.0 $\mu\text{g/mL}$ 线性范围内峰面积与其质量浓度线性关系良好，所得校准曲线线性相关系数均在 0.999 以上，各校准点准确度分别在 88.0% ~ 103.9% 之间，且精密度和回收率实验结果良好。

关键词： 三重四极杆质谱 葡萄糖注射液 5- 羟甲基糠醛

5- 羟甲基糠醛 (5-Hydroxymethylfurfural, 5-HMF)，是由葡萄糖、果糖等单糖在高温和酸性条件下经过美拉德反应或焦糖化反应脱水生成的一种醛类小分子化合物，广泛存在于含有糖类物质的食品和药品中。5- 羟甲基糠醛对人体横纹肌及内脏有损害，不仅具有潜在致癌作用，还具有基因毒性和致畸作用。葡萄糖注射液不但可以迅速补充葡萄糖治疗低血糖，还可以作为一种溶剂来溶解其它药物，广泛应用于临床治疗。为保证葡萄糖注射液的质量和临床用药安全，有必要对其中 5- 羟甲基糠醛的含量进行严格的控制。

目前，紫外 - 可见分光光度 (UV) 法和高效液相色谱 (HPLC) 法是检测 5-HMF 的两种常用方法。2020 年版中国药典二部收载的葡萄糖注射液中 5- 羟甲基糠

醛的检测方法即是紫外分光光度法，其在 284 nm 处有最大吸收，从而可检测 5- 羟甲基糠醛的吸光度，进行限度检查。据文献报道，5% 葡萄糖注射液稀释 5 倍后，在 284 nm 测定吸收度不大于 0.32，换算后相当于 5- 羟甲基糠醛浓度为 2.5 $\mu\text{g/mL}$ 。利用 HPLC 法对葡萄糖注射液中 5-HMF 进行含量测定也有大量报道。虽然上述两种方法易于实现，但均存在选择性差、灵敏度低的问题。近年来，高效液相色谱 - 串联质谱 (LC-MS/MS) 法由于具有检测灵敏度高、结果选择性好的特点。本文基于岛津超高效液相色谱 - 三重四极杆质谱联用技术，建立了葡萄糖注射液中 5- 羟甲基糠醛含量的测定方法。

■ 实验部分

1.1 仪器

岛津 LCMS-8045 三重四极杆液质联用系统。具体配置为：

系统控制器：	CBM-20A	脱气机：	DGU-20A _{5R}
输液泵：	LC-30AD×2	自动进样器：	SIL-30AC
柱温箱：	CTO-20AC	质谱仪：	LCMS-8045
色谱工作站：	LabSolutions Ver. 5.99		

1.2 分析条件

液相条件

色谱柱：InertSustain AQ- C18 (150 mm×2.1 mm I.D., 3 μm)
(P/N: 5020-89924, 岛津 (上海) 实验器材有限公司)

流动相：A 相 - 0.1% 甲酸水溶液； B 相 - 乙腈

流速：0.25 mL/min

进样体积：2 μL

柱 温 : 35°C

洗脱方式 : 梯度洗脱, B相初始浓度为 15%, 时间程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Time	Module	Command	Value
4.00	Pumps	Pump B Conc.	15
4.50	Pumps	Pump B Conc.	90
6.50	Pumps	Pump B Conc.	90
7.00	Pumps	Pump B Conc.	15
10.00	Controller	Stop	

质谱条件

离子源 : ESI, 正离子模式

脱溶剂管温度 : 200°C

离子源接口电压 : 4.0 kV

加热模块温度 : 400°C

雾化气 : 氮气 3.0 L/min

接口温度 : 300°C

干燥气 : 氮气 10 L/min

扫描模式 : 多反应监测 (MRM)

加热气 : 空气 10 L/min

MRM 参数 : 见表 2

碰撞气 : 氩气

驻留时间 : 100 ms

表 2 MRM 参数

化合物名称	英文名称	CAS No.	监测离子对	Q1 pre (V)	CE	Q3 Pre (V)
5-羟甲基糠醛	5-Hydroxymethylfurfural	67-47-0	127.0>109.0*	-14.0	-12.0	-22.0
			127.0>89.1	-22.0	-17.0	-18.0

注: * 表示定量离子对

1.3 样品溶液的制备

取 5% 葡萄糖注射液, 用超纯水稀释 5 倍, 过 0.22 μm 水相微孔滤膜后直接上机 LC-MS/MS 分析。

1.4 标准曲线的制备

精密量取 5-羟甲基糠醛标准品储备溶液适量, 用超纯水稀释配制成 5-羟甲基糠醛浓度为分别 0.010、0.020、0.050、0.10、0.20、0.50 和 1.0 μg/mL 的系列标准工作液, 上机测定。以定量特征离子质量色谱峰面积为纵坐标, 标准溶液浓度为横坐标, 绘制标准曲线。

■ 结果与讨论

2.1 标准样品的 MRM 色谱图

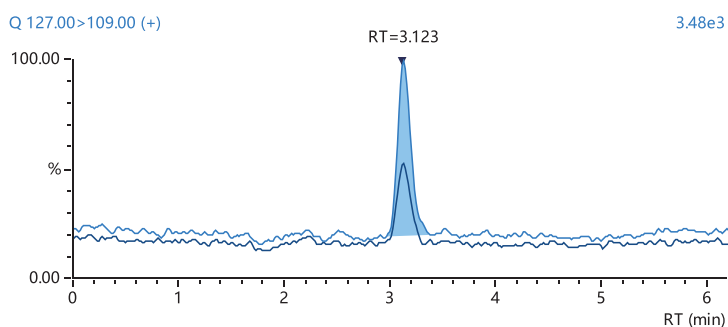


图 1 5-羟甲基糠醛 (0.020 μg/mL) 的 MRM 图谱

2.2 线性范围与检出限

将不同浓度的 5-羟甲基糠醛标准工作液,按照 1.2 中的分析条件进行测定,使用外标法定量。以浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制校准曲线如图 2 所示。所得校准曲线线性关系良好,线性方程及相关系数见表 3。

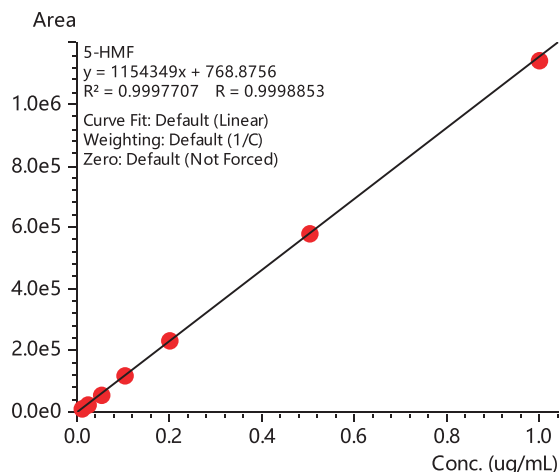


图 2 5-羟甲基糠醛的校准曲线

表 3 标准曲线与检出限信息

化合物名称	校准曲线	R	线性范围 (µg/mL)	准确度 (%)	检出限 (µg/mL)
5-羟甲基糠醛	$Y=11543.5X+768.9$	0.9998	0.010~1.0	88.0~103.9	0.0033

2.3 精密度实验

对不同浓度的 5-羟甲基糠醛标准工作液连续测定 6 次,考察仪器的精密度,保留时间和峰面积的重复性结果如表 4 所示。结果显示:不同浓度样品溶液中 5-羟甲基糠醛的保留时间和峰面积相对标准偏差分别在 0.15%~0.19% 和 0.59%~3.45% 之间,显示仪器精密度良好。

表 4 保留时间 (R. T.) 和峰面积 (Area) 重复性结果 (n=6)

名称	Conc. (µg/mL)	RSD% (R.T.)	RSD% (Area)
5-羟甲基糠醛	0.050	0.15	3.45
	0.10	0.15	0.59
	0.20	0.19	1.54

2.4 加标回收率实验

准确称取 1 mL 葡萄糖注射液样品,加入少量 5-羟甲基糠醛标准储备液,使得 5-羟甲基糠醛的加标浓度分别为 0.5 µg/mL、1.0 µg/mL 和 1.5 µg/mL。加标样品经过 1.3 样品前处理操作后,测定 5-羟甲基糠醛的加标回收率,加标回收率在 94.0%~99.3% 之间,结果见表 5。由结果可知,该方法简便,且结果准确率高。

表 5 5-羟甲基糠醛的加标回收率结果 (n=3)

名称	加标水平 (µg/mL)	稀释倍数	平均回收率 (%)
5-羟甲基糠醛	0.5	5	99.3
	1.0	5	94.5
	1.5	5	94.0

2.5 实际样品测定

准确称取少量某品牌葡萄糖注射液样品，用超纯水稀释 5 倍，过 0.22 μm 水相微孔滤膜后直接上机分析。根据实验结果计算，测得葡萄糖注射液样品中 5- 羟甲基糠醛的含量为 3.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。图 3 为葡萄糖注射液样品的 MRM 图谱。

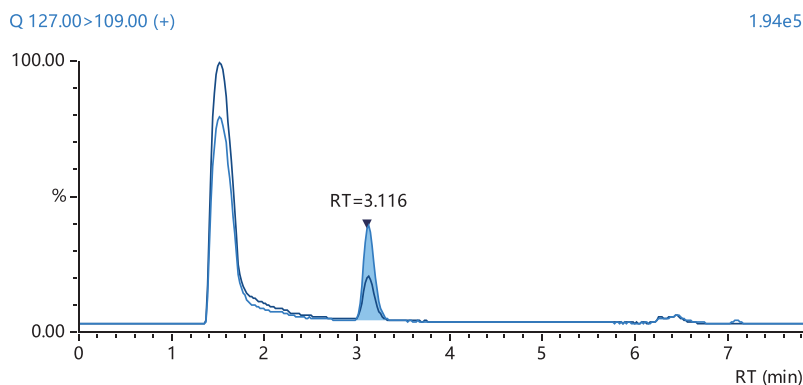


图 3 某品牌葡萄糖注射液的 MRM 图谱

■ 结论

本文建立了使用岛津三重四极杆液质联用系统测定葡萄糖注射液中 5- 羟甲基糠醛含量的方法。使用外标法定量，5- 羟甲基糠醛在 0.010 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 线性范围内峰面积与其质量浓度线性关系良好，所得校准曲线线性相关系数均在 0.999 以上，各校准点准确度分别在 88.0% ~ 103.9% 之间，且精密度和回收率实验结果良好。结果表明，本方法操作简便，检测灵敏度高，且结果准确性好，可用于葡萄糖注射液中 5- 羟甲基糠醛含量的快速测定。

岛津应用云

