

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

艾婕, 顾霄* (浙江省食品药品检验研究院, 国家药监局仿制药评价关键技术重点实验室, 杭州 310052)

摘要: 目的 建立葡萄糖酸钙注射液有关物质的测定方法, 对高温降解杂质[相对保留时间(relative retention time, RRT) 4.18]进行结构鉴定。方法 采用 HPLC 进行有关物质测定, 使用 Xbridge C₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为含 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸氢二钾与 1 mmol·L⁻¹ 四丁基氢氧化铵的混合溶液, 用磷酸调节 pH 值至 5.5, 检测波长为 210 nm。采用 HPLC-Q-TOF/MS 方法, 对 RRT 4.18 杂质做结构鉴定。结果 有关物质测定方法条件下主成分与杂质分离度良好, RRT 4.18 杂质鉴定为 5-羟甲基-2-糠酸。5-羟甲基-2-糠酸的线性范围为 0.18~2.26 μg·mL⁻¹ ($r=0.9990$), 检测限为 0.06 μg·mL⁻¹。结论 建立的方法能准确测定葡萄糖酸钙注射液中的有关物质, 可为本品的工艺优化和质量控制提供参考依据。

关键词: 葡萄糖酸钙注射液; 有关物质; 高效液相色谱法; 结构鉴定

中图分类号: R917 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2022)15-2001-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.15.013

引用本文: 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.

Determination of Related Substances of Calcium Gluconate Injection and Thermal Degradation Impurity Identification

AI Jie, GU Xiao* (Zhejiang Institute for Food and Drug Control, NMPA Key Laboratory for Core Technology of Generic Drug Evaluation, Hangzhou 310052, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop a method for related substances of Calcium Gluconate injection, and to identify the structure of impurity whose relative retention time(RRT) was 4.18. **METHODS** The related substances were determined by HPLC, which was performed on Xbridge C₈ column(250 mm×4.6mm, 5 μm), the mobile phase was 0.1 mol·L⁻¹ dipotassium phosphate and 1 mmol·L⁻¹ tetrabutylammonium hydroxide(pH adjusted to 5.5 by phosphoric acid), the detection wavelength was 210 nm. HPLC-Q-TOF/MS was used to identify the structure of impurity (RRT 4.18). **RESULTS** The separation of gluconic acid and its related substances was good. Impurity RRT 4.18 was supposed to be 5-hydroxymethyl furoic acid. The calibration curves of 5-hydroxymethyl furoic acid was linear in range of 0.18–2.26 μg·mL⁻¹ ($r=0.9990$), and its detection limit was 0.06 μg·mL⁻¹. **CONCLUSION** The HPLC method established is accurate to determine the related substances in Calcium Gluconate injection, which can provide references for the process optimization and quality control of Calcium Gluconate injection.

KEYWORDS: Calcium Gluconate injection; related substances; HPLC; structure identification

药品中有关物质的研究是药品质量研究的关键项目之一, 是反映药品纯度的直接指标。规范地进行有关物质的研究, 并将其控制在一个安全、合理的限度范围之内, 直接关系到药品的质量及安全性^[1-3]。葡萄糖酸钙注射液是一类钙补充剂, 临床上主要用于治疗钙缺乏症, 镁、氟中毒解救等。葡萄糖酸钙原料药与注射液质量标准目前在中国药典、美国药典、英国药典、日本药典^[4-7]均有收载, 但均未设置有关物质检查项, 也没有特殊杂质信息。目前只有个别文献对可能存在的杂质(如 5-羟甲基糠醛)做了测定报道^[8], 尚未见系统的有关物质分析的报道。

本研究建立了适用于葡萄糖酸钙注射液中有有关物质检查的反相离子对色谱方法, 对 3 家企业产品进行了考察, 并对有关物质来源进行了分析。方法学研究结果表明, 本方法操作简便, 灵敏度高, 准确性好, 可为本品的工艺优化和质量控制提供参考依据。此外, 还采用 HPLC-Q-TOF/MS 方法对高温降解产物进行结构鉴定, 并对其产生机制进行了探讨。

1 仪器与试剂

LC-20AD 高效液相色谱仪(日本岛津公司); 1290 Infinity 液相色谱-6538Q TOF 四级杆飞行时间质谱仪(美国 Agilent 公司), 色谱柱为 Waters

基金项目: 浙江省基础公益研究计划项目(LGC21H300001)

作者简介: 艾婕, 女, 硕士, 主管药师 E-mail: pencil_375@163.com

*通信作者: 顾霄, 男, 硕士, 主管药师 E-mail: guxiao@zjyj.org.cn

Xbridge C₈ 键合硅胶柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Boston pHlex ODS C₈ 键合硅胶柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Agilent SB-C₈ 柱(250×4.6 mm, 5 μm); XPE 205 型电子天平、S400-B 型 pH 计均购自瑞士梅特勒公司。

甲醇(色谱纯, 美国默克公司); 四丁基氢氧化铵(分析纯)、磷酸氢二钾(分析纯)均购自国药集团化学试剂有限公司; 甲酸(色谱纯, Sigma); 水为超纯水; 对照品: 5-羟甲基糠醛(北京百灵威科技有限公司, 批号: L810S155; 纯度: 98%); 5-羟甲基-2-糠酸(成都华夏化学试剂有限公司, 批号: 2017110601; 纯度: 97%); 葡萄糖酸钙注射液来自 A、B、C 3 家企业, 规格均为 1 g·10 mL⁻¹。

2 方法与结果

2.1 有关物质测定方法的建立与验证

2.1.1 色谱条件筛选 葡萄糖酸钙属于强极性小分子类化合物, 在传统的反相色谱上很难保留。本研究对多种不同类型的色谱方法进行了考察, 包括亲水色谱法、混合模式色谱法、反相离子对色谱法等。考察结果发现, 葡萄糖酸钙在亲水色谱法(Atlantis HILIC Silica 柱、Poroshell 120 HILIC-Z 柱)的高有机相流动相中溶解性较差, 导致供试品溶液浓度偏低, 无法检查出有关物质; 采用混合模式色谱法(Acclaim Trinity P1 柱)葡萄糖酸钙峰形较差, 无法分离出有关物质。因此选择采用反相离子对色谱法进行有关物质检查的色谱条件研究。

2.1.2 色谱条件确定 本研究对色谱柱(Inertsustain C₁₈ 柱、X bridge C₈ 柱)、流动相比比例(纯水相、加 5% 甲醇)、流动相浓度[含 0.025 mol·L⁻¹ 磷酸氢二钾与 0.25 mmol·L⁻¹ 四丁基氢氧化铵的混合溶液(用磷酸调节 pH 值至 5.5)、含 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸氢二钾与 1 mmol·L⁻¹ 四丁基氢氧化铵的混合溶液(用磷酸调节 pH 值至 5.5)]、流动相 pH(5.0, 5.5, 6.0)、柱温(25, 35 °C)等条件进行了考察。考察结果发现, 由于目标化合物极性较大, 必须采用纯水相的流动相体系才能有所保留; 随着缓冲盐浓度的提高, 葡萄糖酸钙与杂质的峰形有所改善; 葡萄糖酸钙的保留与杂质分离度随着柱温的升高而升高。

最终确定色谱条件, 色谱柱: Xbridge C₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 含 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸氢二钾与 1 mmol·L⁻¹ 四丁基氢氧化铵的混合溶液, 用磷酸调节 pH 值至 5.5; 检测波长 210 nm;

柱温 35 °C; 流速 1.0 mL·min⁻¹; 进样量 50 μL。

2.1.3 样品配制 供试品溶液: 精密量取本品 5 mL, 置 100 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 即得。

对照溶液: 精密量取供试品液 1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 即得。

对照品溶液: 取 5-羟甲基-2-糠酸约 10 mg, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 作为对照品储备液; 精密量取对照品储备液 1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液。

2.1.4 方法的专属性考察 取 A 企业产品 1 批, 进行强制降解试验, 考察方法专属性。

酸破坏溶液: 精密量取本品 5 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加入 3 mol·L⁻¹ 盐酸溶液 2.5 mL, 室温放置 1 h, 加入 3 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 2.5 mL, 用水稀释至刻度, 摇匀, 即得。

碱破坏溶液: 精密量取本品 5 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加入 3 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液 2.5 mL, 室温放置 1 h, 加入 3 mol·L⁻¹ 盐酸溶液 2.5 mL, 用水稀释至刻度, 摇匀, 即得。

高温破坏溶液: 取本品 1 瓶, 置 120 °C 烘箱放置 24 h, 精密量取 5 mL, 置 100 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 即得。

光破坏溶液: 取本品 1 瓶, 4 500 lx 光照箱中放置 24 h, 精密量取 5 mL, 置 100 mL 量瓶中, 用水稀释至刻度, 摇匀, 即得。

氧化破坏溶液: 精密量取本品 5 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加入 30% 过氧化氢溶液 2.5 mL, 室温放置 1 h, 用水稀释至刻度, 摇匀, 即得。

取上述溶液各 50 μL, 按“2.1.2”项下色谱条件, 分别进样, 记录色谱图。结果表明, 各强制降解产物与主峰均能获得良好的分离, 空白溶剂与空白辅料(乳酸)不干扰样品的测定, 方法专属性良好, 结果见图 1~2。

2.1.5 线性与范围 精密称取 5-羟甲基-2-糠酸对照品约 10 mg, 加水溶解并逐级稀释制成 0.16, 0.20, 0.50, 1.00, 1.50, 2.00 μg·mL⁻¹ 系列浓度溶液, 测定峰面积, 以峰面积 y 对浓度 x 进行线性回归, 结果表明 5-羟甲基-2-糠酸在 0.18~2.26 μg·mL⁻¹ 范围内线性方程为 $y=94\ 831x-2\ 715.1(r=0.999\ 0)$, 方法线性良好。

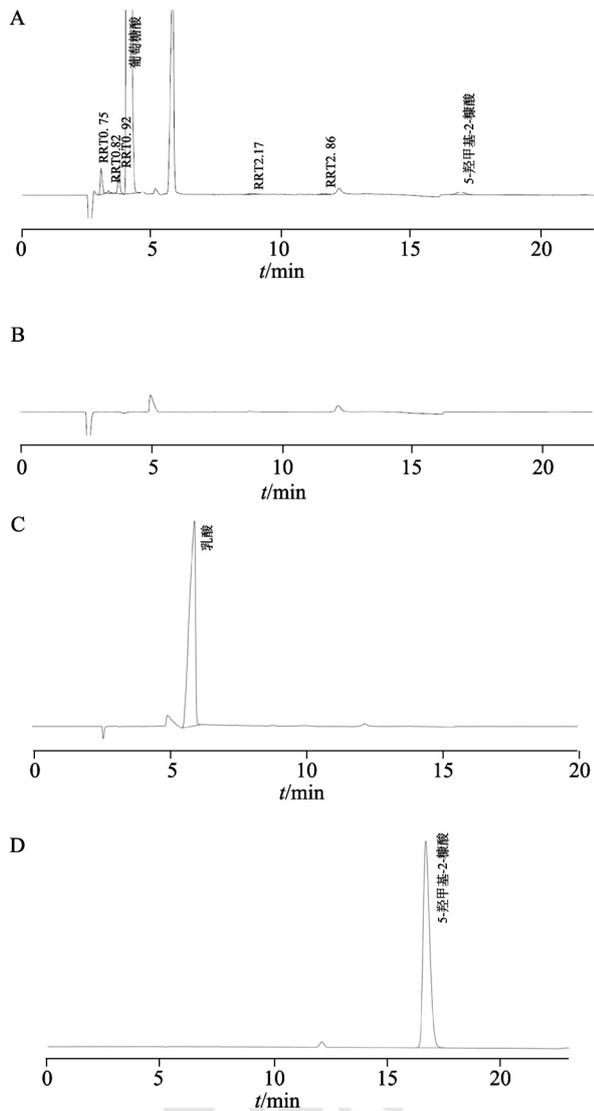


图 1 HPLC 色谱图

A-样品; B-空白溶剂; C-乳酸(辅料); D-5-羟甲基-2-糠酸。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-sample; B-blank; C-lactic acid (ingredient); D-5-hydroxymethyl furoic acid.

2.1.6 定量限与检测限 取线性溶液逐步稀释进样, 考察方法检测限与定量限。结果表明, 5-羟甲基-2-糠酸的定量限为 $0.18 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($n=6$, $\text{RSD}=1.9\%$), 相当于样品量的 0.003 6%; 检测限为 $0.06 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, 相当于样品量的 0.001 2%。

2.1.7 回收率试验 精密量取 A 企业产品 9 份, 每份 5 mL, 置 100 mL 量瓶中, 分别加入对照品储备液 0.5, 1.0, 1.5 mL, 每个浓度水平配制 3 份, 用水稀释至刻度, 摇匀, 作为低、中、高浓度回收率供试品溶液。考察结果表明 5-羟甲基-2-糠酸平均回收率为 100.6% ($n=9$), RSD 为 0.7%, 该方法回收率良好。

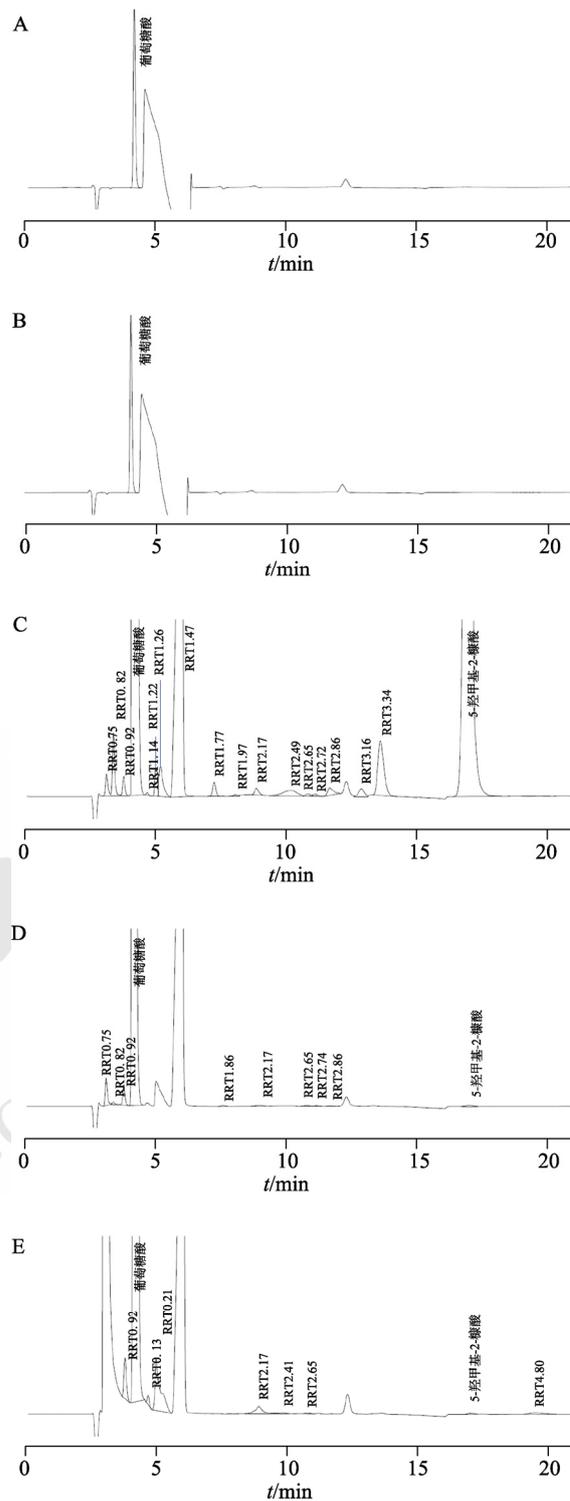


图 2 方法专属性考察高效液相色谱图

A-酸破坏; B-碱破坏; C-热破坏; D-光破坏; E-氧化破坏

Fig. 2 HPLC chromatograms of method-specific investigation

A-sample destructed by acid; B-sample destructed by alkaline; C-sample destructed by high temperature; D-sample destructed by light; E-sample destructed by oxidation.

2.1.8 重复性试验 取 A 企业同一批样品, 按“2.1.3”项下方法平行配制 6 份供试品溶液, 进样测定, 结果样品溶液杂质峰个数与含量基本一

致,表明方法重复性良好。

2.1.9 耐用性考察 按“2.1.2”项下色谱条件,改变柱温(30, 40 °C),测定 B 企业样品,考察柱温对测定结果的影响;改变流速(0.8, 1.2 mL·min⁻¹),测定 B 企业样品,考察流速对测定结果的影响;更换色谱柱[Agilent SB-C₈ 柱(250 nm×4.6 mm, 5 μm)],测定 B 企业样品,考察色谱柱对测定结果的影响。以上各条件下,测定结果基本一致,各组分分离度良好,表明方法耐用性良好。

2.1.10 样品测定 取 3 家企业样品各 1 批,按“2.1.3”项下方法配制相关溶液并测定,按外标法计算 5-羟甲基-2-糠酸含量,按自身对照法计算未知杂质含量,结果见表 1[未知杂质按相对保留时间(relative retention time, RRT)命名]。3 家企业的产品中共检出 7 个杂质,包括 5-羟甲基-2-糠酸,部分未知杂质含量较高,达到 0.5%以上,3 家企业杂质总量均在 1.5%左右,见表 1。

2.2 RRT 4.18 杂质的色谱-质谱结构鉴定

根据有关物质检查及强制降解试验结果,RRT 为 4.18 的杂质在 3 家企业样品中均存在,且为主要高温降解产物。前期推测 RRT 4.18 杂质为 5-羟甲基糠醛(葡萄糖的典型高温降解产物)^[6],但在之后的对照品比对试验中发现,在有关物质检查色谱条件下(检测波长改为 5-羟甲基糠醛的最大吸收波长 284 nm),3 家企业样品与专属性考察溶液中均未检出 5-羟甲基糠醛峰。考虑到本品生产工艺包含高温灭菌过程,高温降解产物的结构鉴定对于本品质量控制有重要意义。因此本研究采用 HPLC-Q-TOF/MS 方法对其进行结构鉴定。

2.2.1 液相色谱条件 色谱柱: Boston pHlex ODS(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相: 甲醇-0.05% 甲酸溶液(20:80);检测波长 254 nm;柱温 30 °C;流速 1.0 mL·min⁻¹;进样量 20 μL。

2.2.2 Q-TOF 质谱条件 电喷雾正离子化(ESI⁺)检测,喷雾电压 4 000 V,雾化气压力 35 psi,干燥气流量 10 L·min⁻¹,取溶剂温度 350 °C,质量数扫描范围: *m/z* 100~1 000。

表 1 有关物质测定结果

Tab. 1 Test results for related substances

厂家	RRT 0.75 含量	RRT 0.82 含量	RRT 0.92 含量	RRT 2.17 含量	RRT 2.86 含量	RRT 3.29 含量	5-羟甲基-2-糠酸 含量	总杂质 含量
A 企业	0.67	0.11	0.56	0.05	0.06	0.00	0.004	1.45
B 企业	0.77	0.18	0.59	0.08	0.00	0.05	0.010	1.68
C 企业	0.65	0.13	0.57	0.10	0.00	0.00	0.003	1.45

2.2.3 有关物质的色谱特征 由于有关物质检查条件采用流动相不适用于质谱检查,所以参考中国药典 2020 年版二部甲硝唑葡萄糖注射液中 5-羟甲基糠醛色谱条件对 RRT 4.18 杂质做研究,仅对流动相稍加调整(水相中加入 0.05% 甲酸以增强质谱响应),以 C 企业未破坏样品与高温强制降解样品作为典型样品进行分析,相应的色谱图见图 3~4。

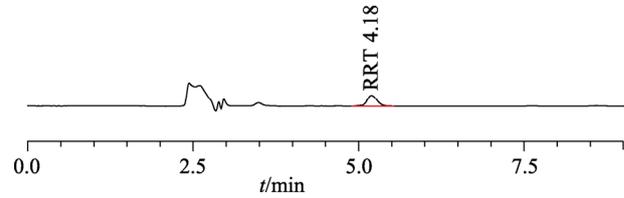


图 3 C 企业样品色谱图

Fig. 3 Chromatogram of sample of company C

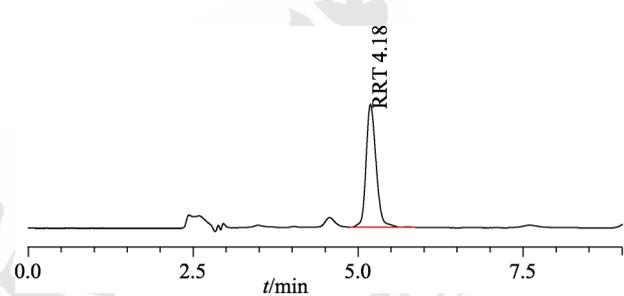


图 4 C 企业样品高温降解色谱图

Fig. 4 Chromatogram of sample of company C destructed by high temperature

2.2.4 RRT 4.18 杂质的质谱特征 RRT 4.18 杂质一级质谱显示其 [M+H]⁺ 离子的准确质量为 143.033 4,与离子式 C₆H₇O₄⁺ 相应,恰好与 5-羟甲基-2-糠酸一致,见图 5。其二级质谱主要碎片包括 *m/z* 125, 97, 79, 69 和 51,见图 6。*m/z* 125 和 97 分别与母离子脱去 1 分子水和 1 分子二氧化碳对应。*m/z* 79 和 69 分别与 *m/z* 97 脱去 1 分子水和 1 分子甲醛相应,前者进一步脱去 1 分子甲醛产生 *m/z* 51,质谱裂解途径见图 7。以上质谱特征均与 5-羟甲基-2-糠酸一致。通过对照品保留时间(图 1)比对及紫外光谱比对,证明高温降解产物(RRT 4.18 杂质)为 5-羟甲基-2-糠酸。

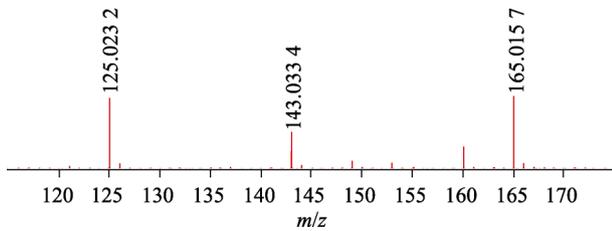


图 5 RRT 4.18 杂质一级质谱图

Fig. 5 Mass spectrum of RRT 4.18 impurity

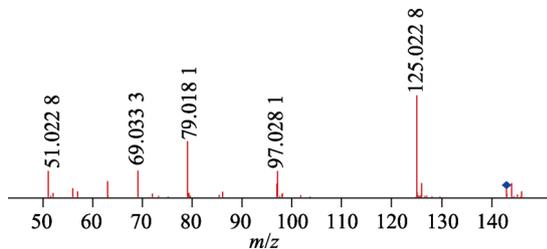


图 6 RRT 4.18 杂质二级质谱图

Fig. 6 Secondary mass spectrum of RRT 4.18 impurity

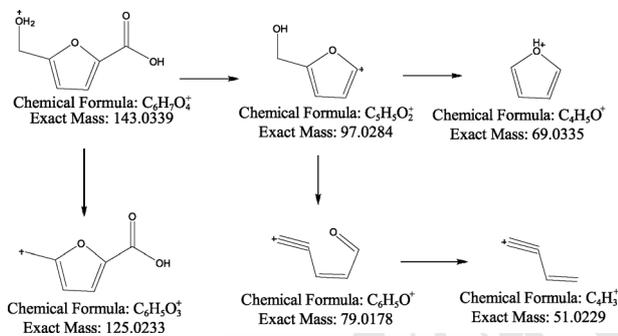


图 7 RRT 4.18 杂质可能的质谱裂解途径

Fig. 7 Proposed fragmentation route of RRT 4.18 impurity

2.2.5 5-羟甲基-2-糠酸产生机制讨论 葡萄糖酸受热降解产生 5-羟甲基-2-糠酸的机制推测类似葡萄糖受热降解产生 5-羟甲基糠醛^[9], 2, 3, 4, 5 位羟基经过连续 3 步脱水后形成呋喃环, 1 位羧基和 6 位羟基不变, 见图 8。由于葡萄糖酸钙注射液处方中不含葡萄糖, 结合实际试验结果, 推测 5-羟甲基糠醛成为葡萄糖酸钙注射液的主要有关物质的可能性较低。

3 讨论

本研究比较多种色谱方法后, 建立了葡萄糖酸钙注射液中有关注物质的测定方法, 并对 3 家企业产品进行了检查, 共检出 7 种有关物质, 杂质总量均在 1.5% 左右。本研究还采用 HPLC-Q-TOF/MS 方法, 对葡萄糖酸钙注射液中高温降解产

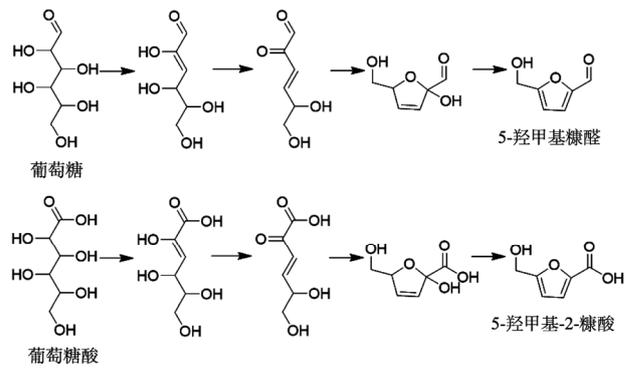


图 8 5-羟甲基糠醛与 5-羟甲基-2-糠酸降解机理

Fig. 8 Fragmentation mechanism of 5-hydroxymethylfurfural and 5-hydroxymethyl furoic acid

物(RRT 4.18 杂质)做了结构鉴定, 并结合对照品比对, 证明 RRT 4.18 杂质为 5-羟甲基-2-糠酸, 该杂质很可能来源于葡萄糖酸钙注射液生产过程中的高温灭菌过程。此外, 本研究还发现 5-羟甲基糠醛并非葡萄糖酸钙注射液的主要杂质。本研究建立的有关物质检测方法操作简便, 灵敏度高, 准确性好, 可为本品的工艺优化和质量控制提供参考。

REFERENCES

- [1] FENG W, FU P, LIU F, et al. Determination of related compounds in Procaterol Hydrochloride tablets by HPLC[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2021(18): 2239-2244.
- [2] XU Y C, ZHAO Z, LI D F. Determination of the related substances of potassium guaiaicolsulfonate by HPLC[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2021, 38(9): 1060-1064.
- [3] SUN Y, CHEN Z Y, ZHANG W, et al. Determination of related substances in triptorelin acetate injection[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2022, 31(3): 269-276.
- [4] 中国药典. 二部[S]. 2020: 1520.
- [5] USP43-NF38[S]. 2020: 697, 700.
- [6] EP10.0 Vol. II[S]. 2020: 2052-2054.
- [7] JP17[S]. 2016: 552-553.
- [8] 孙晓阳, 邵华. 葡萄糖酸钙注射液中 5-羟甲基糠醛杂质定量测定方法研究[J]. 黑龙江科技信息, 2015: 42.
- [9] EDOARDO C, VINCENZO F. Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies[J]. Food Sci Technol, 2011, 44(4): 793-810.

收稿日期: 2021-10-14

(本文责编: 陈怡心)