

基于柱前衍生 - 高效液相色谱 - 串联质谱联用技术的 骨肽注射液中 10 种生物胺定量测定方法及其稳定性研究*

林新丽^{1,2}, 吴畅³, 谭力², 孟长虹², 陆益红^{2,3}, 汪玉馨^{2**}, 史清水^{2**}

(1. 中国药科大学药物分析教研室, 南京 211198; 2. 江苏省食品药品监督检验研究院, 国家药品监督管理局化学药品杂质谱研究重点实验室, 南京 210019; 3. 徐州医科大学药物分析教研室, 徐州 221004)

摘要 目的: 采用柱前衍生化 - 高效液相色谱 - 串联质谱联用技术建立骨肽注射液中生物胺类物质定量测定方法, 并通过影响因素试验和加速试验考察其生物胺类物质的稳定性。方法: 采用丹磺酰氯衍生化法对样品进行前处理, 经 ZORBAX SB - C₁₈ 色谱柱梯度洗脱分离, 电喷雾离子源正离子模式下多反应监测, 对骨肽注射液中 10 种生物胺进行定量测定, 并于高温条件、强光照条件和加速试验条件下考察生物胺类物质的稳定性。结果: 方法学考察结果显示 10 种生物胺线性关系良好, 相关系数均大于 0.990, 方法检测限为 0.01 ~ 0.10 ng · mL⁻¹, 定量限为 0.05 ~ 0.30 ng · mL⁻¹, 准确性、重复性和耐用性较好。稳定性研究结果显示不同条件下骨肽注射液中生物胺类物质变化存在差异, 高温条件下腐胺增多, 精胺和亚精胺减少, 强光照条件及加速试验条件下生物胺类物质含量均存在变化。结论: 方法学验证表明该方法可用于同时测定骨肽注射液中 10 种生物胺, 为骨肽及其它药品质量标准中生物胺类物质检测方法的建立和完善提供了参考, 同时生物胺类物质稳定性研究结果表明高温及强光条件可对其稳定性产生影响, 提示药品生产及贮存过程中应加强质控和监管, 从而保障药品质量的稳定性。

关键词: 骨肽注射液; 生物胺; 柱前衍生化; 液相色谱 - 串联质谱; 稳定性研究

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254 - 1793(2024)03 - 0405 - 14

doi: 10.16155/j.0254 - 1793.2024.03.05

Research on determination and stability of 10 biogenic amines in osteopeptide injections based on HPLC - MS/MS with pre - column derivatization*

LIN Xin - li^{1,2}, WU Chang³, TAN Li², MENG Chang - hong²,

LU Yi - hong^{2,3}, WANG Yu - xin^{2**}, SHI Qing - shui^{2**}

(1. Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China; 2. Key Laboratory for Impurity Profile of Chemical Drugs, National Medical Products Administration, Jiangsu Institute for Food and Drug Control, Nanjing 210019, China; 3. Department of Pharmaceutical Analysis, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, China)

Abstract Objective: To establish a pre - column derivatization high performance liquid chromatography - mass

* 江苏省市场监督管理局科技项目计划 (No. KJ21125030)

** 通信作者 汪玉馨 Tel: (025) 86251278; E - mail: wyx_carrie@163.com

陆益红 Tel: (025) 86251220; E - mail: yihonglu@163.com

第一作者 张筱红 Tel: (010) 67079570; E - mail: zhangxh@chp.org.cn

林新丽 Tel: 15195805157; E - mail: lin252025@126.com

spectrometry to determine biogenic amines in osteopeptide injections and determine the changes of biogenic amines after the stability influence factor test and accelerated test. **Methods:** The osteopeptide injections were separated by a ZORBAX SB - C₁₈ chromatographic column and gradient elution after derivatization by dansyl chloride. Ten kinds of biogenic amines was determined by mass spectrometry with electrospray ion source and multiple reaction monitoring in positive mode. The osteopeptide injections were placed under high temperature, strong light and accelerated experimental conditions to inspect the stability of biogenic amines. **Results:** Method validation showed that the linear relationship of 10 biological amines was good, and the correlation coefficients were higher than 0.990. The detection limits were 0.01 - 0.10 ng · mL⁻¹, the quantitation limits were 0.05 - 0.30 ng · mL⁻¹. Good accuracy, repeatability and durability were obtained. Under different conditions, the changes of biogenic amines in osteopeptide injections were significant. The accumulation of putrescine increased under high temperature, while spermine and spermidine decreased. The biogenic amines were unstable under strong light and accelerated test. **Conclusion:** Method validation shows that the method can be applicable to simultaneous determine 10 biogenic amines in osteopeptide injections. It provided a reference to establish and improve the quality standards of biogenic amines in osteopeptide and other drugs. In addition, the research of the stability of biological amines shows that high temperature and strong light will affect the stability of biogenic amines. Therefore, quality control and supervision should be strengthened during drug production and storage to ensure the stability of drug.

Keywords: osteopeptide injections; biogenic amine; pre - column derivatization; liquid chromatography - mass spectrometry; stability

多组分生化药原料药多提取自动物组织或体液,普遍具有来源复杂,提取物成分不明确,稳定性差,易腐败等特点,动物源性原材料贮存或发酵过程中^[1],游离氨基酸极易通过脱羧反应降解为生物胺。虽然生物胺是由氨基酸脱羧生成的含氮小分子有机化合物,广泛分布于食品和人类有机体中,适量生物胺在体内具有生物活性,但过量摄入则会损害机体。在生物胺的不良反应报道中,组胺最为常见^[2]。目前在药品质量控制中,2020年版《中华人民共和国药典》(简称《中国药典》)针对组胺类物质,设置降压物质检查项,通过判断制剂引起麻醉猫血压下降的程度或其引起豚鼠离体回肠收缩的程度来考察并控制组胺类物质^[3]。但由于动物实验存在个体差异大,离体器官稳定性不易保证,实验技术要求高,过程复杂,耗时长等问题^[4],同时无法明确不良反应的物质基础,因此有必要建立灵敏、高效、快速的生物胺检测方法,并对多组分生化药中的生物胺进行筛查及研究,为临床不良反应的探究及控制提供依据及参考,为企业产品质控和政府监管提供新的科学手段。

骨肽注射液是一种取自猪或胎牛四肢骨的多组分生化药,临床上用于骨折、关节炎和风湿等疾病

治疗^[5]。近年来,骨肽注射液的不良反应引起关注,临床表现为皮疹、发热、呼吸困难和血压下降等^[6]。而骨肽注射液降压物质研究中发现其存在降压效应,故有必要进一步探究其降压效应的物质基础^[7]。药理学研究表明生物胺类物质的种类和含量与血压变化存在一定相关性,组胺激活 H1 受体,扩张小动脉和小静脉,外周阻力降低,血压下降;腐胺和尸胺可抑制组胺相关代谢酶的活性,从而增强组胺的作用^[8];亚精胺通过改善心肌舒张功能,扩张血管,血压下降^[9];色胺、苯乙胺、章鱼胺和酪胺使交感神经系统释放去甲肾上腺素,血压上升^[10],因此骨肽注射液中生物胺类物质检测方法的建立和筛查是探究其与药理相关性的基础。

生物胺类物质的检测中毛细管电泳 - 质谱(CE - MS)、超临界流体色谱 - 二极管阵列检测器(SFC - DAD)和气相色谱 - 质谱(GC - MS)等多种联用技术的应用逐渐广泛,上述方法虽具有分析时间短、灵敏度高的特点,但难以分离复杂基质样品中的生物胺,选择性较差^[11]。考虑到柱前衍生 - 高效液相色谱 - 串联质谱法(柱前衍生 - HPLC - MS/MS)具有高分离能力和高灵敏度的特点,其中衍生化

可降低生物胺类物质的极性,改善色谱分离情况;串联质谱可降低背景干扰,提高选择性,故该方法更适用于分析复杂基质中的痕量物质,是分离多组分生化药中生物胺的理想选择^[12]。本研究拟建立柱前衍生-HPLC-MS/MS生物胺类物质定量测定方法,从线性范围、检测限、精密度、准确度和耐用性多个角度进行方法学验证,并对骨肽注射液中10种生物胺进行筛查,依据影响因素试验及加速试验的研究结果,分析骨肽注射液中生物胺类物质的稳定性,从而为潜在风险药物及组分的排查和机制的阐述,生产工艺的优化和质量控制,临床安全用药提供更多的评价方法及技术支持。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Thermo TSQ Quantum Access MAX 串联三重四极杆质谱仪(Thermo Scientific 公司),配 Dionex Ultimate 3000 RS 高效液相色谱仪;AB Sciex 5500 型串联四极杆质谱仪(AB 公司);XP6 型/XS205DU 型万分之一电子天平(梅特勒-托利多仪器有限公司);超纯水机(Millipore 公司);DK-S26 电热恒温水浴锅(上海森信实验仪器有限公司);SI-T256 涡旋混合器(Talboys 公司);HPP 260 恒温恒湿箱(Memmert 公司);0.2 μm 聚四氟乙烯过滤器(安捷伦公司)。

1.2 材料

乙腈(色谱纯, Thermo Fisher 公司)、甲醇(色谱纯, Thermo Fisher 公司)、丹磺酰氯(色谱纯, Sigma-Aldrich)、丙酮(分析纯, 南京化学试剂股份有限公司)、无水碳酸钠(分析纯, 天津市化学试剂研究所有限公司)、氨水(色谱纯, Aladdin)、盐酸(分析纯, 国药集团化学试剂有限公司)。

生物胺对照品:腐胺(纯度 97.30%, 批号 G150059)、尸胺(纯度 98.80%, 批号 738356)、2-苯乙胺(纯度 98.62%, 批号 G941631)、酪胺盐酸盐(纯度 98.90%, 批号 G980212)、盐酸亚精胺(纯度 99.90%, 批号 168904)、盐酸章鱼胺(纯度 99.39%, 批号 G160376)、组胺盐酸盐(纯度 99.44%, 批号 G165368)均购自 Dr. Ehrenstorfer 公司;胍丁胺硫酸盐(纯度 97.00%, 批号 MKCH3294)、色胺(纯度 97.00%, 批号 BCBX4824)、精胺(纯度 97.00%, 批号 BCBZ7305)均购自上海 Sigma-Aldrich 公司。

骨肽注射液来源于 6 家企业 A(规格为 2 mL:10 mg)、B(规格为 2 mL:10 mg)、C(规格为 2 mL:10

mg)、D(规格为 2 mL:10 mg)、E(规格为 2 mL:10 mg)、F(规格为 5 mL:25 mg),每家企业各 3 批。

2 方法

2.1 色谱条件

采用 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ (2.1 mm × 150 mm, 1.8 μm) 色谱柱,流动相 A 为含 0.1% 乙酸的 0.01 mol · L⁻¹ 乙酸铵溶液-乙腈(90:10),流动相 B 为含 0.1% 乙酸的 0.01 mol · L⁻¹ 乙酸铵溶液-乙腈(10:90),梯度洗脱如表 1 所示,流速 0.3 mL · min⁻¹,柱温 45 °C,进样量 10 μL 。

表 1 梯度洗脱程序

Tab. 1 Gradient elution conditions

时间 (time)/min	流动相比例 (ratio of mobile phase)/%	
	A	B
0.00	80	20
5.00	40	60
5.01	30	70
11.00	0	100
15.00	0	100
15.01	50	50
18.00	50	50

2.2 质谱条件

电喷雾电离离子源(ESI);多反应监测扫描模式(MRM);喷雾电压为 4.3 kV;毛细管温度为 350 °C;鞘气压力为 0.241 MPa;辅助气流量为 5 arb;定量和定性离子对碰撞能量等参数见表 2。

2.3 溶液配制

2.3.1 生物胺混合对照品溶液

分别称取 10 种生物胺对照品 10 mg,用 0.1 mol · L⁻¹ 盐酸溶液溶解并稀释至 10 mL 量瓶中,质量浓度为 1 mg · mL⁻¹,分别准确量取 1 mL 至 10 mL 量瓶中,混合并摇匀。

2.3.2 丹磺酰氯衍生试剂

称取丹磺酰氯 80 mg,用丙酮溶解并稀释至 10 mL 量瓶中,摇匀,即得质量浓度为 8 mg · mL⁻¹ 的衍生试剂溶液,于 4 °C 冰箱中避光保存。

2.3.3 供试品溶液

用 0.1 mol · L⁻¹ 盐酸溶液稀释骨肽注射液供试品至 0.5 mg · mL⁻¹,使骨肽注射液中的生物胺的浓度在线性范围内。

表 2 10 种生物胺的质谱检测参数

Tab. 2 Determination parameters of ten biological amines by mass spectrometry

生物胺 (biogenic amine)	母离子 (precursor ion) m/z	子离子 (product ion) m/z	碰撞能量 (collision energy)/eV
苯乙胺 (phenylethylamine)	355. 3	157. 2	25
		170. 1 *	23
色胺 (tryptamine)	394. 3	130. 1	40
		144. 1 *	19
腐胺 (putrescine)	555. 1	170. 3	33
		321. 1 *	23
尸胺 (cadaverine)	569. 4	170. 0	35
		234. 3 *	30
组胺 (histamine)	578. 4	170. 0	32
		315. 4 *	24
亚精胺 (spermidine)	845. 5	305. 4 *	34
		360. 5	40
精胺 (spermine)	1135. 6	170. 0	65
		360. 3 *	48
章鱼胺 (octopamine)	620. 0	170. 0	32
		234. 0 *	37
胍丁胺 (agmatine)	364. 2	170. 0	29
		305. 1 *	20
酪胺 (tyramine)	604. 4	170. 0	35
		370. 4 *	25

注 (note): * 为定量离子 (mean quantitative ion)

2.4 衍生化方法

吸取生物胺混合对照品溶液和供试品溶液,置于不同的离心管内,分别加入 $0.2 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸钠溶液 $70 \mu\text{L}$ 调节 pH 8 ~ 9 和丹磺酰氯衍生化试剂 $300 \mu\text{L}$,将以上混合物涡旋 30 s 混匀,置于 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴加热,黑暗条件下开始衍生化反应,计时 30 min。冷却至室温,分别加入氨水 $10 \mu\text{L}$ 与溶液中过量的丹磺酰氯反应,置于 $60 \text{ }^\circ\text{C}$ 水浴加热,黑暗条件下反应,计时 15 min。终溶液加入 50% 乙腈溶液定容至 1 mL,经 $0.2 \mu\text{m}$ 聚四氟乙烯过滤器过滤后,进样检测分析。

2.5 稳定性影响因素试验

根据 2020 年版《中国药典》四部指导原则 <9001>《原料药物及制剂稳定性试验指导原则》^[13],研究骨肽注射液在高温、高湿、光照条件下杂质的变化情况。高温试验 (温度为 $60 \text{ }^\circ\text{C}$) 强光照射试验 (光照强度约 4500 Lx),取样时间点设定为 0、

5、10 d,采用建立的方法进行检测。由于骨肽注射液为含有水性介质的制剂,可不要求相对湿度,故未进行高湿试验。

2.6 加速试验

根据 2020 年版《中国药典》四部指导原则 <9001>《原料药物及制剂稳定性试验指导原则》,研究骨肽注射液中生物胺在加速条件下的变化情况。取待测物置于恒温恒湿箱中 (温度 $40 \text{ }^\circ\text{C}$,相对湿度 75%),取样时间点设定为 0 d、1 个月、3 个月、6 个月,采用建立的方法进行检测。

3 结果

3.1 基质效应

采用 Matuszewski 等^[14]提出的提取后添加法定量评价基质效应强度,分别将高、中、低浓度的混合对照品分别加入 6 家企业的骨肽注射液基质中,经衍生化反应后,进样分析,不同浓度平行测定 3 次,使用以下等式计算基质效应 ME:

$$\text{基质效应 ME} = \left(\frac{S_2 - S_0}{S_1} - 1 \right) \times 100\%$$

S_0 为骨肽基质基底峰面积

S_1 为稀释剂中加入相同高、中、低浓度的混合对照品峰面积

S_2 为骨肽基质中加入高、中、低浓度的混合对照品峰面积

基质效应包括 2 种方式,基质诱导色谱响应增强效应和基质诱导色谱响应抑制效应, $\text{ME} \leq 0$ 为基质诱导色谱响应抑制效应, $\text{ME} \geq 0$ 为基质诱导色谱响应增强效应, $-20\% \leq \text{ME} \leq 20\%$ 范围内被认为基质效应不显著,可忽略不计。不同企业的骨肽基质效应值如表 3 所示,同种骨肽注射液基质中,同种生物胺在不同浓度下表现相同的增强或抑制效应,6 种骨肽注射液的基质效应在 $-18.90\% \sim 18.56\%$,骨肽注射液的基质效应较小,即采用溶剂标曲代替基质标曲进行测定。

3.2 分析方法验证

3.2.1 专属性

取 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液、生物胺混合对照品溶液和供试品溶液,经衍生化后混合对照品终浓度为 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,分别进样,如图 1 所示,在对照品色谱峰相应的位置上,供试品溶液具有相同保留时间的色谱峰,空白溶液在此峰位无吸收,方法专属性良好。

表 3 骨肽基质效应考察 (n=3)
Table 3 Matrix effect of osteopeptide injection

生物胺 (biogenic amine)	生物胺浓度 (concentration of biogenic amines)/ (ng · mL ⁻¹)	骨肽注射液的企业 (enterprises of osteopeptide injection)											
		A	B	C	D	E	F						
		基质效应 平均值 (average value of matrix effect)/%	RSD/ %	基质效应 平均值 (average value of matrix effect)/%	RSD/ %	基质效应 平均值 (average value of matrix effect)/%	RSD/ %	基质效应 平均值 (average value of matrix effect)/%	RSD/ %	基质效应 平均值 (average value of matrix effect)/%	RSD/ %		
色胺 (tryptamine)	5	-10.48	1.7	-4.78	2.4	-8.71	3.7	4.09	2.5	3.29	3.3	3.80	2.7
	50	-0.07	0.30	-6.83	3.3	-7.64	0.20	5.64	0.50	12.38	2.80	13.29	1.1
	100	-4.98	1.1	-7.29	1.0	-2.13	0.80	7.63	1.2	1.21	0.30	3.59	1.50
苯乙胺 (phenylethylamine)	5	-0.81	2.2	-4.27	2.7	-4.16	1.9	5.85	2.2	-18.90	4.5	-17.60	0.80
	50	-1.98	1.7	-5.53	0.60	-11.20	2.9	2.15	1.8	-8.75	0.70	-17.17	1.7
	100	-4.27	2.4	-5.59	1.2	-1.61	1.0	1.30	2.4	-3.80	4.3	-6.69	2.1
腐胺 (putrescine)	5	-5.51	2.4	-6.53	1.4	-15.31	1.8	7.01	3.6	10.01	3.1	14.39	0.40
	50	-0.53	1.0	-5.32	2.2	-3.04	1.9	6.75	1.5	4.87	0.70	-0.22	2.9
	100	-3.61	2.4	-1.68	2.8	-1.88	1.2	5.05	1.0	3.43	0.60	2.10	1.4
尸胺 (cadaverine)	5	-2.49	0.80	5.84	2.5	-17.56	2.1	18.56	3.9	3.91	1.8	6.06	2.4
	50	-1.78	1.3	2.67	1.1	-3.23	1.9	14.06	3.8	3.28	1.2	1.86	2.4
	100	-2.75	1.2	1.81	0.40	-1.78	1.0	7.53	1.9	2.66	1.5	1.09	0.70
组胺 (histamine)	1	-15.88	1.2	-14.07	1.7	-8.95	2.7	1.54	2.3	0.34	2.9	1.53	2.9
	50	2.75	0.8	-3.65	0.80	-10.29	0.50	1.89	2.7	1.11	3.3	1.56	0.80
	100	-1.82	0.50	-4.02	2.5	-4.24	1.8	7.04	1.2	0.76	0.60	2.22	1.1
章鱼胺 (octopamine)	1	1.05	1.2	-2.57	0.80	-9.39	0.80	-4.28	0.30	2.49	1.6	5.72	2.9
	50	3.31	1.6	-5.90	1.3	-2.89	1.7	-3.09	1.3	3.88	2.2	5.88	3.3
	100	2.69	1.3	-7.46	2.8	-3.50	2.1	-0.64	0.20	4.89	1.9	6.11	1.1
胍丁胺 (agmatine)	5	-0.24	1.9	-4.13	3.1	-7.43	1.6	3.59	1.5	-5.95	2.0	-3.84	0.70
	25	-1.52	0.70	-4.45	2.0	-2.53	1.0	6.16	2.4	-6.65	2.1	-7.65	1.3
	50	-2.66	1.1	-1.94	0.60	-3.05	2.1	5.70	0.40	-1.49	0.1	-3.85	1.2
酪胺 (tyramine)	5	1.5	1.2	-3.89	1.6	6.03	3.5	-1.49	0.70	7.88	4.6	4.06	1.1
	25	6.25	2.3	-15.03	3.2	7.70	2.4	-16.82	7.1	9.51	2.3	14.13	3.3
	50	2.51	0.50	-2.56	1.7	9.00	0.40	-6.62	3.2	2.21	1.5	12.55	1.1
亚精胺 (spermidine)	10	2.45	1.3	9.36	2.4	9.40	3.5	4.63	3.0	-7.61	3.2	-3.67	0.90
	50	4.93	1.1	6.21	1.6	6.24	0.10	7.06	1.0	-5.77	1.7	-3.78	0.20
	100	0.7	0.20	1.80	1.9	1.81	0.20	1.67	0.20	-5.18	2.1	-3.13	1.6
精胺 (spermine)	5	3.91	1.2	-14.88	2.4	-14.91	3.7	-13.49	1.3	-17.21	0.40	-16.35	3.2
	50	5.33	0.80	-1.32	0.50	-1.34	2.4	-16.07	0.80	-14.08	0.50	-14.71	1.9
	100	0.86	0.80	-6.94	1.5	-6.95	0.90	-10.77	2.1	-13.76	0.70	-15.90	0.90

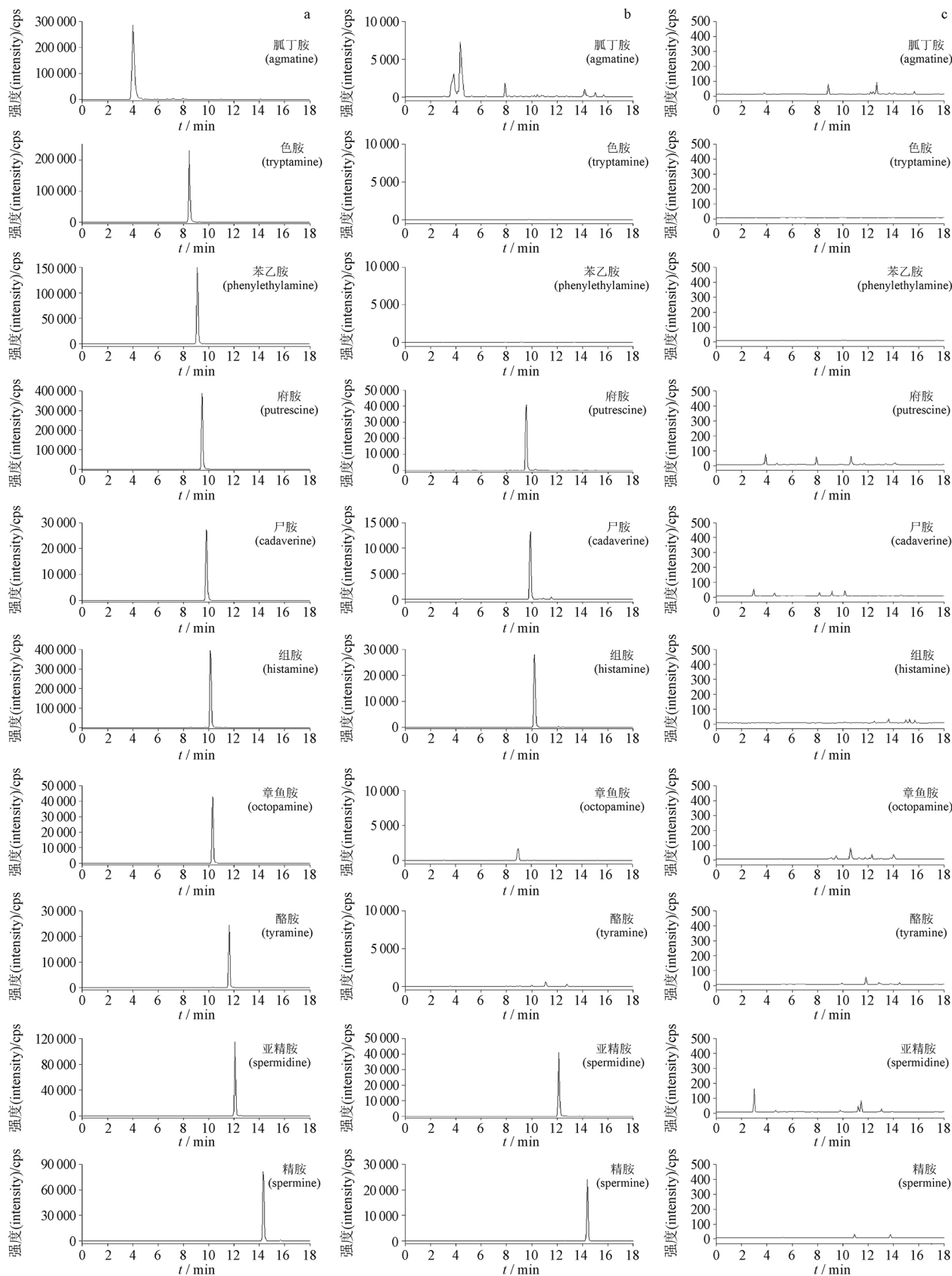


图 1 空白稀释剂衍生化溶液 (a)、混合对照品衍生化溶液 (b) 和企业 C 供试品衍生化溶液 (c) 的提取离子流图

Fig. 1 Extracted ion chromatograms of blank derived solution (a), mixed standard derivative solution (b) and enterprise C derivative solution (c)

3.2.2 线性范围、定量限和检测限

取 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 生物胺混合对照品溶液,用 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 盐酸溶液稀释至 1 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,逐级稀释,经衍生化后,混合溶液的生物胺终浓度稀释 10 倍,得到浓度为 100、50、25、5、1、0.5、0.1、0.05、0.01

$\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的生物胺混合标准溶液,从浓度低到高依次进样。以各生物胺的峰面积 Y 为纵坐标,以各生物胺的梯度浓度 X 为横坐标作线性回归计算,以 S/N 为 10 时的浓度作为定量限;以 S/N 为 3 时的浓度作为检测限。

表 4 线性范围、回归方程、相关系数、检测限和定量限

Tab. 4 Linear ranges, regression equations, correlation coefficients of analytes, limits of detection and limits of quantification

生物胺 (biogenic amines)	线性范围 (linear range)/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	回归方程 (regression equation)	r	LOD/ ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	LOQ/ ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)
色胺(tryptamine)	1 ~ 100	$Y = 122\ 406X + 44\ 389$	0.999 8	0.05	0.15
苯乙胺(phenylethylamine)	1 ~ 100	$Y = 122\ 041X - 28\ 701$	0.999 1	0.10	0.30
腐胺(putrescine)	1 ~ 100	$Y = 384\ 042X + 677\ 583$	0.997 6	0.01	0.05
尸胺(cadaverine)	1 ~ 100	$Y = 319\ 873X + 212\ 301$	0.999 8	0.10	0.30
组胺(histamine)	0.5 ~ 100	$Y = 266\ 589X + 79\ 442$	0.999 9	0.05	0.15
章鱼胺(octopamine)	0.5 ~ 100	$Y = 128\ 556X - 7\ 759.4$	0.999 6	0.05	0.15
胍丁胺(agmatine)	0.5 ~ 50	$Y = 548\ 352X + 735\ 514$	0.997 0	0.05	0.15
酪胺(tyramine)	1 ~ 50	$Y = 263\ 865X + 51\ 327$	0.999 0	0.05	0.15
亚精胺(spermidine)	1 ~ 100	$Y = 79\ 679X + 5\ 617.6$	0.999 6	0.10	0.30
精胺(spermine)	5 ~ 100	$Y = 48\ 990X + 707\ 442$	0.990 0	0.10	0.30

3.2.3 准确度和精密度 在企业 A 溶液中加入 3 个浓度水平的对照品,制备成生物胺高、中、低浓度的模拟样品,浓度的设定考虑样品的浓度范围。不同浓度各平行制备 3 份样品,进样分析。计算回收

率和各生物胺峰面积的 RSD 测得精密度。10 种生物胺的回收率均在 84.1% ~ 106.2% 范围内,峰面积 RSD 均不大于 2.4%,在可接受范围内,说明本法准确度和重复性良好,符合检测要求。

表 5 准确度实验结果($n=3$)

Tab. 5 Experimental results of accuracy

生物胺 (biogenic amine)	理论值 (theoretical value)/($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	实测值 (measured value)/($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	回收率 (recovery)/%	RSD/ %
色胺(tryptamine)	5	4.48	89.5	1.7
	50	49.97	99.9	0.30
	100	95.02	95.0	1.1
苯乙胺(phenylethylamine)	5	4.96	99.2	2.2
	50	49.01	98.0	1.7
	100	95.73	95.7	2.4
腐胺(putrescine)	5	4.72	94.5	2.4
	50	49.73	99.5	1.0
	100	96.39	96.4	2.4
尸胺(cadaverine)	5	4.88	97.5	0.80
	50	49.11	98.2	1.3
	100	97.25	97.2	1.2
组胺(histamine)	1	0.84	84.1	1.2

表 5(续)

生物胺 (biogenic amines)	理论值 (theoretical value)/(ng · mL ⁻¹)	实测值 (measured value)/(ng · mL ⁻¹)	回收率 (recovery)/%	RSD/ %
章鱼胺(octopamine)	50	51.37	102.7	0.8
	100	98.18	98.2	0.5
	1	1.01	101.0	1.2
胍丁胺(agmatine)	50	51.65	103.3	1.6
	100	102.69	102.7	1.3
	5	4.99	99.8	1.9
酪胺(tryramine)	25	26.56	98.5	0.70
	50	48.67	97.3	1.1
	5	5.08	101.5	1.2
亚精胺(spermidine)	25	24.62	106.2	2.3
	50	51.25	102.5	0.5
	10	5.12	102.4	1.3
精胺(spermine)	50	52.46	104.9	1.1
	100	100.70	100.7	0.2
	5	10.39	103.9	1.2
	50	52.76	105.3	0.8
	100	100.86	100.9	0.8

3.2.4 中间精密度

为考察随机变动的因素对中间精密度的影响,另一分析人员在不同日期另平行制备供试品加标溶液,

在相同的色谱和质谱条件下进行测定,将测定结果与准确度试验结果进行比较。结果表明 RSD 均不 > 6.1%,中间精密度良好,测定方法的精密度符合要求。

表 6 中间精密度试验

Tab. 6 xperimental results of Intermediate precision

生物胺 (biogenic amine)	理论值 (theoretical value)/(ng · mL ⁻¹)	实测值 (measured value)/(ng · mL ⁻¹)	回收率 (recovery)/% (n=6)	RSD/% (n=6)
色胺(tryptamine)	5	4.65	93.0	1.7
	50	50.71	96.2	2.7
	100	94.96	95.0	1.4
苯乙胺(phenylethylamine)	5	4.95	99.0	4.7
	50	50.69	102.0	6.1
	100	95.35	95.4	4.1
腐胺(putrescine)	5	4.73	94.6	3.3
	50	50.93	99.4	1.0
	100	96.99	97.0	2.0
尸胺(cadaverine)	5	4.80	96.0	1.6
	50	49.83	99.3	2.1
	100	95.90	95.9	2.9
组胺(histamine)	1	0.87	87.1	2.4
	50	51.07	92.8	2.2
	100	99.57	99.6	2.5
章鱼胺(octopamine)	1	1.01	100.7	2.9

表 6(续)

生物胺 (biogenic amine)	理论值 (theoretical value)/(ng · mL ⁻¹)	实测值 (measured value)/(ng · mL ⁻¹)	回收率 (recovery)/% (n = 6)	RSD/% (n = 6)
胍丁胺 (agmatine)	50	50.83	100.5	2.9
	100	99.34	99.3	2.8
	5	5.03	100.5	0.90
酪胺 (tyramine)	25	26.35	102.1	1.6
	50	48.64	97.3	0.90
	5	5.09	101.8	1.2
亚精胺 (spermidine)	25	24.50	99.5	2.1
	50	49.44	98.9	3.1
	10	10.40	103.3	1.0
精胺 (spermine)	50	52.32	103.4	0.80
	100	101.90	101.9	3.3
	5	5.07	102.1	1.6
	50	52.82	104.8	1.2
	100	97.01	97.0	3.0

3.2.5 稳定性

以 3.2.1 专属性项下的供试品加标溶液为样品,24 h 内不同时间点进样考察稳定性,10 种生物胺

的峰面积 RSD 均不大于 1.8%,结果如表 7 所示,说明衍生化样品稳定性良好。

表 7 稳定性实验结果

Tab.7 Experimental results of stability

生物胺 (biogenic amine)	峰面积 (peak area)						RSD/ %
	0 h	3 h	7 h	16 h	20 h	24 h	
色胺 (tryptamine)	4 119 183	4 045 376	4 069 937	4 128 617	4 085 385	4 119 501	0.70
苯乙胺 (phenylethylamine)	6 701 573	6 553 464	6 526 703	6 793 125	6 780 382	6 668 081	1.5
腐胺 (putrescine)	23 606 776	23 702 536	24 400 091	23 566 663	24 338 099	24 338 400	1.5
尸胺 (cadaverine)	18 369 289	18 673 109	18 741 316	18 597 267	18 201 829	18 587 268	1.0
组胺 (histamine)	14 103 184	14 391 824	14 681 918	14 234 286	14 100 206	14 308 824	1.4
章鱼胺 (octopamine)	6 373 315	6 571 230	6 503 622	6 229 026	6 335 332	6 471 839	1.8
胍丁胺 (agmatine)	27 231 170	27 101 667	27 335 916	27 832 552	27 393 184	27 533 305	0.90
酪胺 (tyramine)	13 440 670	13 332 678	13 288 106	13 337 480	13 363 843	13 222 083	0.50
亚精胺 (spermidine)	5 207 247	5 139 346	5 116 004	5 327 536	5 169 879	5 219 641	1.3
精胺 (spermine)	4 672 527	4 509 564	4 547 032	4 611 538	4 567 482	4 616 442	1.2

3.2.6 耐用性

以“3.2.1”专属性项下的供试品加标溶液为样品,采用不同仪器和不同色谱柱检测应满足系统适用性试验要求,以确保方法的可靠性。

3.2.6.1 仪器 采用 AB Sciex5500 液质联用仪进行检测,提取离子流图中 10 种生物胺均峰型良好,拖尾因子均在 0.95 ~ 1.05 范围内,信噪比均大于 3,

精密度实验 RSD 均不大于 4.0%,故使用不同仪器检测满足系统适用性试验要求,该方法耐用性良好。

3.6.6.2 色谱柱 分别采用 Thermo Hypersil GOLD aQ C₁₈ (1.9 μm, 2.1 mm × 150 mm) 和 Shimadzu Shim-pack Velox SP-C₁₈ (1.8 μm, 2.1 mm × 150 mm) 色谱柱进行检测。根据 LCQuan 数据处理软件系统, h_{0.5} 峰高处对称性不低于 90%,拖尾因子均在

0.95 ~ 1.05 范围内,信噪比均大于 3,即判定为系统适用性良好。结果如表 8 所示, Thermo Hypersil GOLD aQ C₁₈ 柱的系统适用性良好,且精密度实验

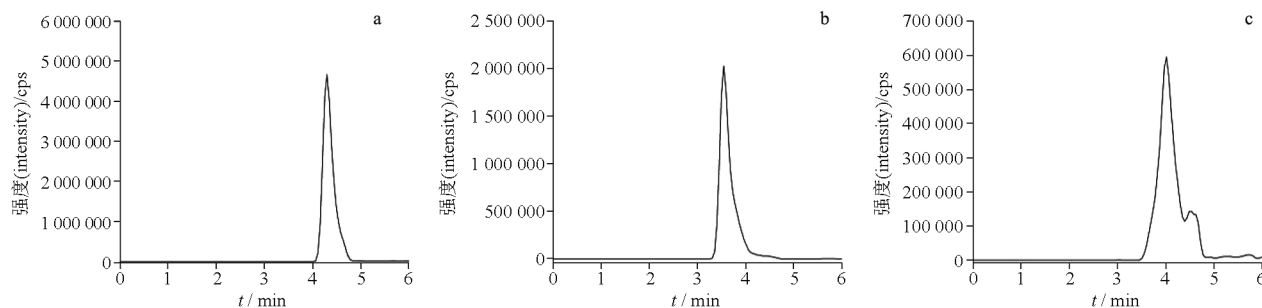
RSD 均不大于 2%, Shimadzu Shim-pack Velox SP-C₁₈ 柱的系统适用性较差,且胍丁胺峰型较差无法定量,如图 2 所示。

表 8 不同色谱柱系统适用性考察

Tab. 8 Experimental results of investigating different chromatographic columns

生物胺 (biogenic amines)	对称性 (symmetry)		拖尾因子 (trailing factor)		信噪比 (signal to noise ratio)	
	Thermo	Shimadzu	Thermo	Shimadzu	Thermo	Shimadzu
	Hypersil GOLD aQ C ₁₈	Shim-pack Velox SP-C ₁₈	Hypersil GOLD aQ C ₁₈	Shim-pack Velox SP-C ₁₈	Hypersil GOLD aQ C ₁₈	Shim-pack Velox SP-C ₁₈
色胺(tryptamine)	Passed	Failed	Passed	Failed	Passed	Passed
苯乙胺(phenylethylamine)	Passed	Failed	Passed	Failed	Passed	Passed
腐胺(putrescine)	Passed	Failed	Passed	Failed	Passed	Passed
尸胺(cadaverine)	Passed	Failed	Passed	Failed	Passed	Passed
组胺(histamine)	Passed	Failed	Passed	Failed	Passed	Passed
章鱼胺(octopamine)	Passed	Failed	Passed	Failed	Passed	Passed
胍丁胺(agmatine)	Passed	Failed	Passed	Failed	Passed	Passed
酪胺(tyramine)	Passed	Failed	Passed	Failed	Passed	Passed
亚精胺(spermidine)	Passed	Failed	Passed	Failed	Passed	Passed
精胺(spermine)	Passed	Failed	Passed	Failed	Passed	Passed

注 (note): Passed 为符合要求 (meet requirements); Failed 为不符合要求 (not meet requirements)



a. Agilent ZORBAX SB-C₁₈ b. Thermo Hypersil GOLD aQ C₁₈ c. Shimadzu Shim-pack Velox SP-C₁₈

图 2 不同色谱柱的胍丁胺提取离子流图

Fig. 2 Extracted ion chromatograms of agmatine with different columns

3.3 样品检测

采用所建立的方法对 18 批次骨肽注射液样品进行检测,以“2.3.3”项方法制备供试品溶液,“2.4”项的衍生化方法进行前处理,“2.1”和“2.2”项的分析条件进样测定,记录生物胺的峰面积,以随行标准曲线计算含量。结果表明,酪胺、胍丁胺、章鱼胺、苯乙胺均没有检出,而腐胺、色胺、尸胺、组胺、精胺、亚精胺均有不同程度的检

出,见表 9。

3.4 稳定性影响因素实验

高温试验结果显示,高温条件下腐胺和尸胺均有不同程度升高,腐胺含量增加 1.5%~56.5%,尸胺含量增加 36.5%~80.4%;组胺、精胺和亚精胺均有不同程度降低,组胺含量下降 25.9%~72.1%,精胺含量下降 15.4%~100%,亚精胺含量下降 23.2%~69.1%。结果见图 3。

表 9 骨肽注射剂液中实测含量
Tab.9 Measured values of osteopeptide preparations

企业 (enterprise)	批次 (lot No.)	含量(content)/(ng·mg ⁻¹)									
		腐胺 (putrescine)	苯乙胺 (phenylethylamine)	色胺 (tryptamine)	尸胺 (cadaverine)	组胺 (histamine)	精胺 (spermine)	亚精胺 (spermidine)	章鱼胺 (octopamine)	胍丁胺 (agmatine)	酪胺 (tyramine)
A	1	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
A	2	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
A	3	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
B	1	540.6	/	/	/	/	/	/	/	/	/
B	2	477.4	/	/	/	/	/	/	/	/	/
B	3	581.3	/	/	/	/	/	/	/	/	/
C	1	27.47	/	/	10.4	55.4	192.6	228.4	/	/	/
C	2	31.89	/	/	9.6	51.3	206.4	206.5	/	/	/
C	3	29.72	/	/	10.0	55.7	143.6	214.0	/	/	/
D	1	13.1	/	/	50.6	/	10.4	132.3	/	/	/
D	2	13.5	/	/	54.4	/	9.6	112.3	/	/	/
D	3	14.4	/	/	57.0	/	13.8	158.2	/	/	/
E	1	15.3	/	/	/	15.9	18.9	85.5	/	/	/
E	2	15.3	/	/	/	20.4	30.9	133.6	/	/	/
E	3	15.1	/	/	/	36.6	13.8	128.6	/	/	/
F	1	16.7	/	/	17.9	14.5	19.0	52.8	/	/	/
F	2	16.3	/	/	18.7	16.4	11.2	41.4	/	/	/
F	3	19.1	/	/	21.8	15.2	9.3	60.2	/	/	/

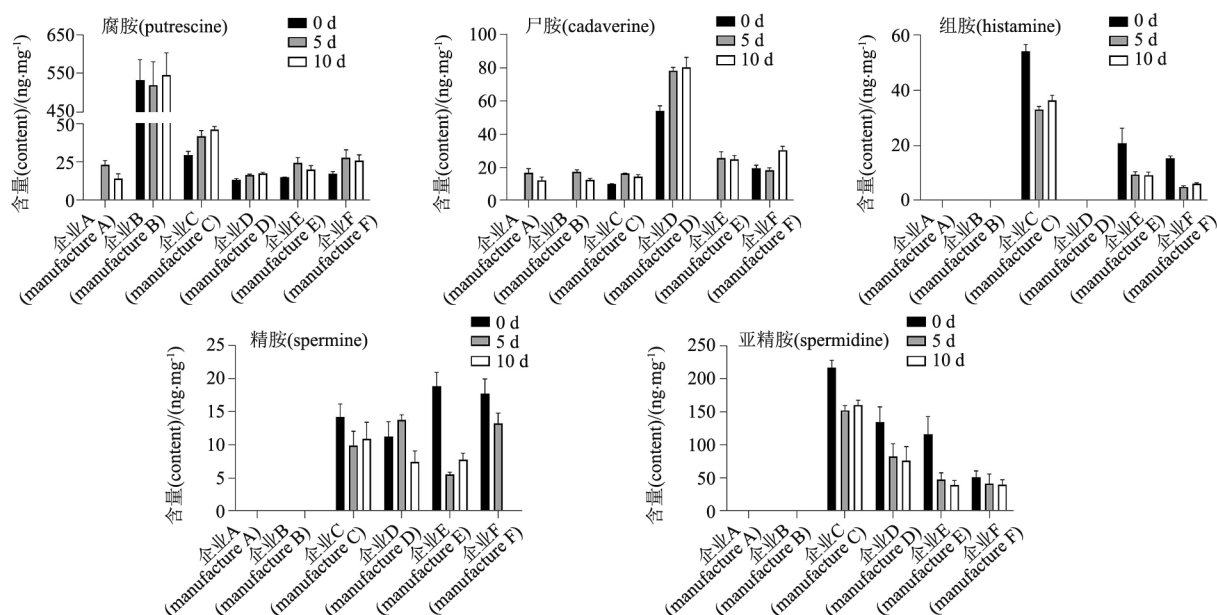


图 3 高温试验下骨肽注射剂中生物胺含量的变化

Fig.3 Change of biogenic amine contents in osteopeptide injections under high temperature test

强光照试验结果显示,腐胺在 0~5 d 内含量增加 7.0%~107.3%,5~10 d 内变化 9.5%~37.1%,0~10 d,尸胺含量增加 2.1%~11.0%;

组胺含量下降 12.2%~86.9%,精胺含量下降 24.0%~100.0%,亚精胺含量下降 7.7~27.7%。结果见图 4。

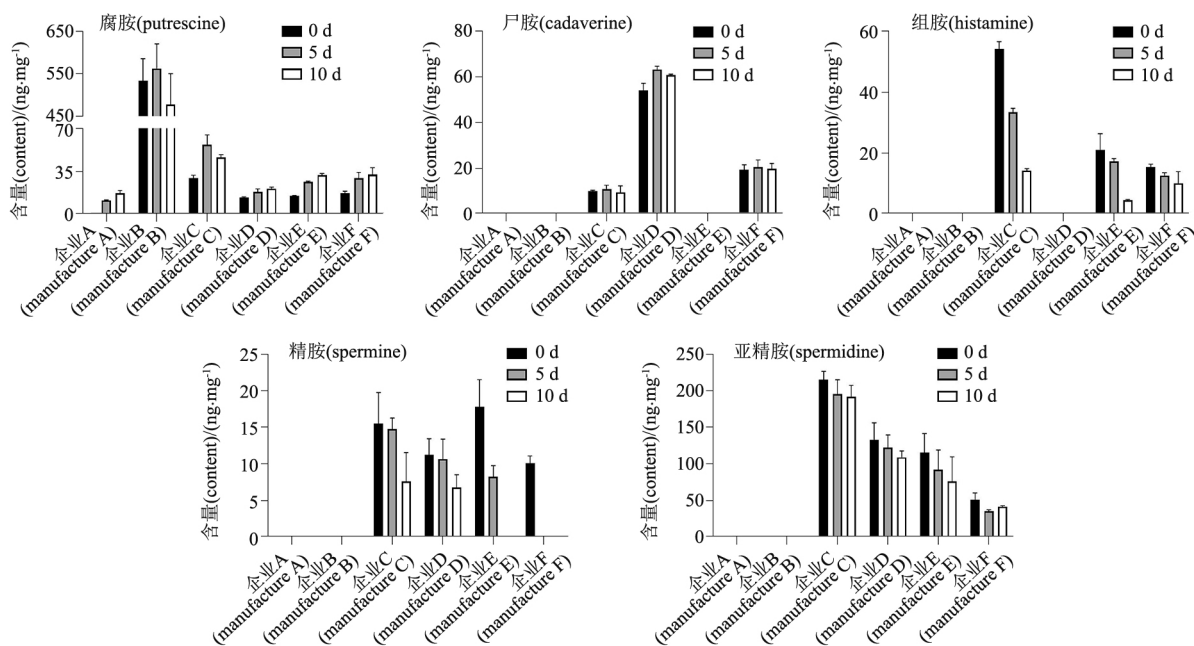


图 4 强光照试验下骨肽注射液中生物胺含量的变化

Fig. 4 Change of biogenic amine contents in osteopeptide injections under intense light test

3.5 加速试验

加速试验结果显示,0~3个月,企业B的腐胺含量下降14.2%,其他企业的腐胺含量增加89.7%~194.0%,考虑企业B中腐胺初始含量较高且生物胺转化酶可能存在差异导致企业B的腐胺含量

变化趋势与其它企业略有不同;尸胺含量增加76.0%~378.1%,组胺含量增加170.8%~430.8%。3~6个月,腐胺、尸胺和组胺含量出现不同程度的下降。0~6个月,精胺含量增加74.6%~242.8%,亚精胺含量变化3.6%~30.7%。结果见图5。

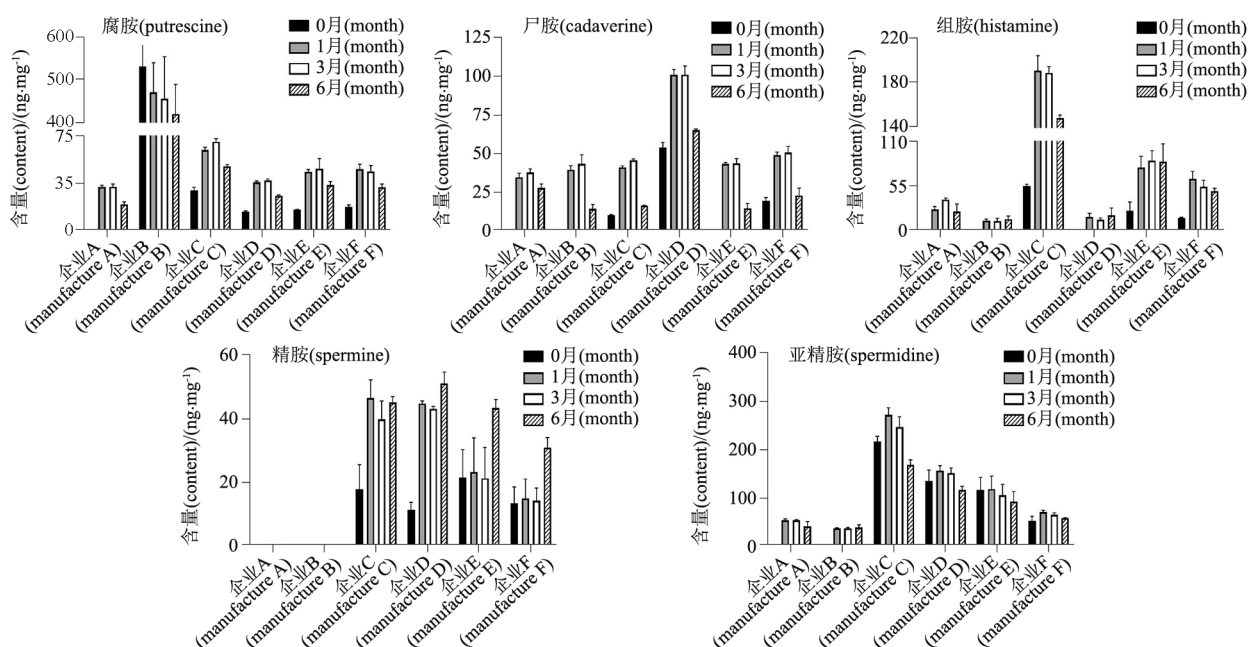


图 5 加速试验下骨肽注射液中生物胺含量的变化

Fig. 5 Change of biogenic amine contents in osteopeptide injections under accelerated test

4 讨论

通过采用柱前衍生-HPLC-MS/MS建立了骨肽注射液中10种生物胺类物质:苯乙胺、色胺、酪胺、章鱼胺、组胺、胍丁胺、尸胺、腐胺、亚精胺和精胺的定量测定方法,方法学验证显示,线性范围、检测限、精密度、准确度和耐用性均符合要求,与高效液相色谱法相比,该方法灵敏度高,检测速度快,适合高通量检测;相较于超高效合相色谱-四极杆质谱联用仪法,该方法通过一级MS得到带电离子、二级MS裂解获得更多分子结构的信息^[15],从而降低背景干扰,对目标物质定性和定量均更准确。

不同色谱柱耐用性考察发现,Thermo Hypersil GOLD aQ C₁₈分析柱对生物胺类物质中极性较大的化合物保留更强,考虑其填料为极性包埋C₁₈键合相,与传统的烷基键合相相比具有独特的选择性。Shimadzu Shim-pack Velox SP-C₁₈和Agilent ZORBAX SB-C₁₈虽填料均使用具有较大异丁基侧链基团的硅烷(不封端),较大的侧链基团增大了空间位阻,从而增加化合物的保留,不封端柱裸露较多的硅羟基,对分极性化合物的分析提供更好的分离效果,但在系统适用性考察中发现Agilent ZORBAX SB-C₁₈分离分析结果更优,Shimadzu Shim-pack Velox SP-C₁₈对于生物胺类化合物特别是胍丁胺拖尾因子及对称性均较差。

骨肽注射剂中生物胺类物质筛查发现,腐胺、色胺、尸胺、组胺、精胺、亚精胺均有检出,其中腐胺检出比例最高,达总批次的83%,其次为亚精胺、精胺;3家企业9批次骨肽注射液中检出组胺,其中组胺含量最高的3批次样品降压物质检查实验中降压效应较为明显,故有必要进一步对该类产品中生物胺类物质定量测定结果与临床不良反应相关性进行研究分析。

稳定性影响因素试验和加速试验结果显示,骨肽注射液中生物胺类物质含量存在变化,考虑骨肽注射液中的胶原蛋白可分解产生小分子多肽,进而水解产生多种氨基酸,为生物胺的产生提供前体物质^[16-17]。氨基酸在微生物产生的脱羧酶作用下可转化为生物胺,即使生产工艺中存在除菌过程对微生物进行控制,某些脱羧酶仍可脱离微生物细胞的完整性而维持其活性^[18]。同时在精胺合成酶和亚精胺合成酶的作用下,腐胺可进一步精胺和亚精胺转化^[19],而酶的活性受温度影响,酶在最适温度的

活力最大,积累的生物胺越多,反之越少,进而影响生物胺的含量^[20]。故通过对骨肽注射液中生物胺类物质含量的检测评估,并考察不同储存条件、时间,原料及成品中生物胺含量及变化,可为原料和制剂质量控制和临床安全性提供参考和依据。由于生物胺的种类较多,建立高效简便的检测方法是有效控制生物胺含量、监测其变化的前提。目前针对多组分生化药中的生物胺检测方法不多,因此根据样品类型与所检测生物胺的特点选取适宜的前处理与检测方法进行系统研究,并结合临床应用探究生物胺类物质含量与不良反应发生的可能性,进一步明确原料及制剂工艺及储存条件的影响和质控要求,可为多组分生化药安全性评估、风险因素排查分析、临床安全用药提供支持和保障。

参考文献

- [1] 黄裕. 浅谈对生化药源头的质量控制[J]. 上海医药, 2017, 38(15):52
HUANG Y. Discussion on quality control of biochemical medicine source[J]. Shanghai Med Pharm J, 2017, 38(15):52
- [2] VISCIANO P, SCHIRONE M, PAPARELLA A. An overview of histamine and other biogenic amines in fish and fish products[J]. Foods, 2020, 9(12):1795
- [3] 中华人民共和国2020年版. 四部[S]. 2020:182
ChP 2020. Vol IV[S]. 2020:182
- [4] 魏欣, 徐维平. 替代动物的实验伦理规范研究进展[J]. 生物学杂志, 2022, 39(3):1
WEI X, XU WP. Research progress on experimental ethical norms for alternative animal[J]. J Biol, 2022, 39(3):1
- [5] 马洁, 宋燕青. 骨肽注射液的临床应用及其药理作用[J]. 中国生化药物杂志, 2016, 36(2):16
MA J, SONG YQ. Clinical application of ossotide injection and its pharmacological action thereof[J]. Chin J Biochem Pharm, 2016, 36(2):16
- [6] 李二平. 91例骨肽和复方骨肽注射剂不良反应病例分析[J]. 中国药物警戒, 2021, 18(9):880
LI EP. 91 Cases of adverse reactions caused by osteopeptide and compound injection of osteopeptide[J]. Chine J Pharm, 2021, 18(9):880
- [7] 吴畅, 李晓洁, 吴殿因, 等. 离体豚鼠回肠法应用于骨肽类注射剂中组胺类物质检测[J]. 实验动物与比较医学, 2022, 42(2):159
WU C, LI XJ, WU YN, et al. Application of isolated Guinea pig ileum method for detection of histamine substances in osteopeptide injections[J]. Lab Animal Comp Med, 2022, 42(2):159
- [8] 曲映红. 发酵食品中生物胺的研究进展[J]. 食品工业,

- 2012, 33(3):115
 QU YH. Research progress of biogenic amines in fermented foods [J]. *Food Ind*, 2012, 33(3):115
- [9] EISENBERG TS. Dietary spermidine for lowering high blood pressure. [J]. *Autophagy*, 2017, 13(4):767
- [10] 杨姗姗, 王晓雯, 林翠苹. 水产品中生物胺的研究进展[J]. *青岛农业大学学报(自然科学版)*, 2021, 38(1):65
 YANG SS, WANG XW, LIN CP. Research progress of biogenic amines in aquatic products[J]. *J Qingdao Agrl Univ (Natl Sci)*, 2021, 38(1):65
- [11] 林新丽, 吴殷因, 谭力, 等. 生物胺类药物及理化测定方法研究进展[J]. *中南药学*, 2022, 20(7):1617
 LIN XL, WU YN, TAN L, *et al.* Pharmacological and physicochemical determination of biogenic amines [J]. *Cent South Pharm*, 2022, 20(7):1617
- [12] 张元, 刘佳, 闫加庆, 等. 生物胺前处理技术及分析方法研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(5):1596
 ZHANG Y, LIU J, YAN JQ, *et al.* Research progress on pretreatment techniques and determination methods of biogenic amines [J]. *J Food Saf Qualy*, 2017, 8(5):1596
- [13] 中华人民共和国 2020 年版. 四部[S]. 2020:457
 ChP 2020. Vol IV[S]. 2020:457
- [14] MATUSZEWSKI BK, CONSTANZER ML, CHAVEZ – ENG CM. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC – MS/MS[J]. *Anal Chem*, 2003, 75 (13):3019
- [15] GEORGE R, HAYWOOD A, KHAN S, *et al.* Enhancement and suppression of ionization in drug analysis using HPLC – MS/MS in support of therapeutic drug monitoring: a review of current knowledge of its minimization and assessment [J]. *Ther Drug Monit*, 2018, 40(1):1
- [16] 张苏苏, 苑冰冰, 赵子瑞, 等. 肉制品加工中有害物质检测及控制技术研究进展[J]. *食品安全质量检测学报*, 2017, 8(6):1954
 ZHANG SS, YUAN BB, ZHAO ZR, *et al.* Research progress of detection and control measures of hazards in meat products[J]. *J Food Saf Qual*, 2017, 8(6):1954
- [17] 杨泽岸, 张媛, 吴彦霖, 等. 基于生物活性测定的骨肽类制剂质量评价方法[J]. *中国药事*, 2019, 33(4):380
 YANG ZA, ZHANG Y, WU YL, *et al.* Quality evaluation method of bone peptide preparations based on biological activity determination[J]. *Chin Pharm Aff*, 2019, 33(4):380
- [18] BECKER K, SOUTHWICK K, REARDON J, *et al.* Histamine poisoning associated with eating Tuna burgers [J]. *JAMA*, 2001, 285(10):1327
- [19] 李美娜, 邹宇, 马堃, 等. 食品中腐胺的产生途径及其检测方法和防控技术研究进展[J]. *食品工业*, 2021, 42(8):242
 LI MN, ZOU Y, MA K, *et al.* Review of production, detection and control technology of putrescine in food[J]. *Food Ind*, 2021, 42(8):242
- [20] GARDINI F, ÖZOGUL Y, SUZZI G, *et al.* Technological factors affecting biogenic amine content in foods: a review[J]. *Fron Microbiol*, 2016, 7:1218

(本文于 2023 年 4 月 20 日收到)