

## 炼蜜过程中 5-HMF 的近线检测新方法 with 质量控制策略

田晋茹<sup>1,3</sup>, 龙佳<sup>2,3</sup>, 赵小军<sup>1,3</sup>, 马世威<sup>1,3</sup>, 李明爽<sup>1,3</sup>, 何晗<sup>1,3</sup>, 王恺怡<sup>1,3</sup>, 曾敬其<sup>1,3</sup>, 王淑英<sup>4</sup>, 王田<sup>4</sup>, 姚璐<sup>4\*</sup>, 吴志生<sup>1,2,3</sup>, 李楠<sup>1,3\*</sup>

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488
2. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350122
3. 中药制药与新药开发教育部工程研究中心, 北京 102488
4. 北京同仁堂股份有限公司, 北京 100062

**摘要:** 目的 建立免疫磁分离-酶联免疫分析 (immunomagnetic separation-enzyme-linked immunoassay, IMS-ELISA) 法测定 5-羟甲基糠醛 (5-hydroxymethylfurfural, 5-HMF), 并用于炼蜜工艺参数优化。方法 将抗 5-HMF 抗体修饰在磁珠表面, 以实现 5-HMF 的特异捕获与分离富集。采用生物素化 5-HMF-BSA 偶联物 (BSA 为牛血清白蛋白) 作为竞争配体, 配合辣根过氧化物酶-链霉亲和素 (HRP-SA), 以 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (tetramethylbenzidine, TMB) 为底物进行比色显色。通过磁分离实现 5-HMF 的富集, 有效去除基质干扰并提高检测灵敏度。并开展线性关系考察、检出限、专属性、精密度与准确度等方法学验证。随后开展近线检测应用: 选取中药蜜丸制剂炼蜜过程中的关键影响因素 (温度、压力、时间、储存时长与复热温度), 以 IMS-ELISA 检测 5-HMF 含量。结果 建立的 IMS-ELISA 方法在 0.4~160.0 ng/mL 内线性良好 ( $R^2=0.9973$ ), 检出限 0.4 ng/mL; 对糠醛及 5-HMF 无明显交叉反应; 批内 RSD 为 4.29%; 实际样品含量检测结果与 HPLC 法无显著性差异 ( $P>0.05$ )。在 IMS-ELISA 的应用中, 成功对 5-HMF 含量进行了监测, 且适用性良好。试验结果表明, 推荐 75~85 °C、20.0 kPa、10~15 min 作为炼蜜的参考参数; 储存时长 $\geq 48$  h 及复热温度 $\geq 80$  °C 均促进 5-HMF 生成。结论 基于 IMS-ELISA 的 5-HMF 检测方法具有高灵敏、强专属性和低成本的特点, 可用于现代中药蜜丸制剂炼蜜、合坨等生产单元中的 5-HMF 近线监测, 为中药蜜丸制剂的工艺优化提供方法学依据。

**关键词:** 5-羟甲基糠醛; 免疫磁分离; 酶联免疫分析; 中药蜜丸制剂; 炼蜜工艺

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)08-3031-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.08.016

## Study on a novel near-line detection method and quality control strategy for 5-HMF during honey-refining process

TIAN Jinru<sup>1,3</sup>, LONG Jia<sup>2,3</sup>, ZHAO Xiaojun<sup>1,3</sup>, MA Shiwei<sup>1,3</sup>, LI Mingshuang<sup>1,3</sup>, HE Han<sup>1,3</sup>, WANG Kaiyi<sup>1,3</sup>, ZENG Jingqi<sup>1,3</sup>, WANG Shuying<sup>4</sup>, WANG Tian<sup>4</sup>, YAO Lu<sup>4</sup>, WU Zhisheng<sup>1,2,3</sup>, LI Nan<sup>1,3</sup>

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China
2. School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China
3. Engineering Research Center of Chinese Medicine Production and New Drug Development, Ministry of Education, Beijing 102488, China
4. Beijing Tongrentang Co., Ltd., Beijing 100062, China

**Abstract: Objective** To develop an immunomagnetic separation-enzyme-linked immunosorbent assay (IMS-ELISA) for the determination of 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) and to evaluate its applicability for near-line monitoring and process optimization of the honey-refining process in traditional Chinese medicine (TCM) preparations. **Methods** Anti-5-HMF antibodies were

收稿日期: 2025-11-17

基金项目: 国家重点研发计划 (2023YFC3504505); 国家自然科学基金资助 (82404857); 国家自然科学基金资助 (82274110); 北京科技新星交叉项目 (20230484458); 中华中医药学会立项项目 (CACM-2023-QNRC2-B10); 京津冀科技创新协同 (Z251100005225010)

作者简介: 田晋茹 (2001—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药质量评价。E-mail: tianjinru2023@163.com

\*通信作者: 姚璐, 副研究员, 研究方向为中药化学、生物学、新药开发及中药智能制造等。E-mail: chch9696@vip.sina.com

李楠, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向为中药质量评价。E-mail: linan@bucm.edu.cn

immobilized on magnetic beads to enable selective capture and magnetic enrichment of 5-HMF. Biotinylated 5-HMF-BSA served as the competitive antigen, while horseradish peroxidase-streptavidin (HRP-SA) and 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) were used for signal generation. Immunomagnetic separation was employed to reduce matrix interference and enhance analytical sensitivity. The method was systematically validated in terms of linearity, limit of detection (LOD), specificity, precision, and accuracy. Subsequently, the established IMS-ELISA was applied to near-line analysis by monitoring 5-HMF levels at key stages of the honey-processing workflow, including variations in temperature, pressure, processing time, storage duration, and reheating conditions. **Results** The IMS-ELISA exhibited good linearity over the concentration range of 0.4–160 ng/mL ( $R^2 = 0.9973$ ), with a detection limit of 0.4 ng/mL. No significant cross-reactivity was observed with structurally related compounds such as furfural or 5-methylfurfural. The intra-assay relative standard deviation was 4.29%, and the results obtained for real samples showed no significant difference from those measured by HPLC ( $P > 0.05$ ). Near-line application demonstrated that honey-processing conditions of 75–85 °C, 20.0 kPa, and 10–15 min were associated with relatively lower 5-HMF formation, whereas storage for  $\geq 48$  h and reheating at  $\geq 80$  °C markedly promoted 5-HMF accumulation. **Conclusion** The proposed IMS-ELISA method offers high sensitivity, good specificity, and low operational cost. It is suitable for near-line monitoring of 5-HMF during honey processing and pill manufacturing in TCM production, providing methodological support for process optimization and contributing to process visualization and intelligent manufacturing of TCM products.

**Key words:** 5-hydroxymethylfurfural; immunomagnetic separation; enzyme-linked immunosorbent assay; traditional Chinese medicine honeyed pill preparation; honey-refining process

中药蜜丸制剂为中药传统剂型，历史久远、应用面广，临床以“缓治其本”的用药特点见长<sup>[1]</sup>。其中，处方以蜂蜜为主要辅料，并经炼蜜处理，用于赋形黏合与药性协调<sup>[2]</sup>。在受热与脱水的弱酸条件下，蜂蜜中的单糖（以果糖、葡萄糖为主）易发生一系列糖基团转化反应，典型包括美拉德反应与焦糖化反应，从而生成并累积 5-羟甲基糠醛（5-hydroxymethylfurfural, 5-HMF）<sup>[3]</sup>。近年研究认为，5-HMF 具有剂量相关的双重效应<sup>[4]</sup>：低剂量可能呈现抗氧化、抗炎等调节作用<sup>[5-6]</sup>，而高剂量则提示 DNA 损伤、细胞毒性及致癌风险增加<sup>[7-8]</sup>。因此，《中国药典》2025 年版已把 5-HMF 列为需严格控制的限量指标<sup>[9]</sup>。

已有研究采用 HPLC 对某大蜜丸制剂开展批量测定，结果显示在 88 批次样品中有 7 批的 5-HMF 含量超过企业自拟限度，提示生产环节及辅料蜂蜜的质量控制仍需加强<sup>[10]</sup>。现行《中国药典》标准主要依赖 HPLC<sup>[11]</sup>，该法准确度与特异性优良，但仪器投入高、前处理与检测耗时，通常以离线检测为主，不能充分满足现代化中药智能制造生产现场的在线/近线（at-line）判定与反馈调控<sup>[12-13]</sup>。

为解决上述检测需求，《中国制造 2025》与《中医药振兴发展重大工程实施方案》均强调在中药制造中加速自动化、信息化与过程分析技术（process analytical technology, PAT）的落地，以实现实时数据采集与近线监测，并为后续精准控制提供支撑<sup>[14]</sup>。近红外光谱（near infrared spectroscopy, NIRS）因

快速、无损、易于在线部署，已广泛用于生产现场对水分、还原糖等整体性质的监测。然而，对于中药蜜丸制剂炼蜜单元场景中低含量、强基质干扰的 5-HMF，其选择性与定量能力有限<sup>[15-17]</sup>。相较之下，免疫磁分离-酶联免疫分析（immunomagnetic separation-enzyme-linked immunoassay, IMS-ELISA）通过抗体特异性识别与磁分离，实现对复杂样品中 5-HMF 的有效富集，更适合低含量目标的近线检测，并为中药复杂体系中痕量组分的高效分析提供了新的解决思路<sup>[18-19]</sup>。

基于当前中药智能制造对过程可视化与近线检测的需求，本研究建立了 IMS-ELISA 用于 5-HMF 的检测方法，该法利用特异性抗体的高亲和识别与磁分离富集优势，实现复杂基质中 5-HMF 的灵敏定量，兼具高灵敏、强专属性和低成本等特点，可有效弥补传统色谱法在生产端的应用局限。在此基础上，进一步将该方法应用于炼蜜单元关键参数（温度、压力、时间等）的优化，旨在为中药蜜丸制剂炼蜜单元关键质量属性（5-HMF）的过程监测提供可行技术路径。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

BeyoMag™ 型磁分离架，上海碧云天生物技术股份有限公司；ForteBio RED96 型生物分子层干涉分析仪（biolayer interferometry, BLI），美国 ForteBio 公司；Type 1550 REF A51119600 Multiskan SkyHigh 型酶标仪，美国赛默飞世尔科技公司；F7000 型荧

光光谱仪, 日本日立公司; 岛津 LC-20AT 型高效液相色谱仪, SPD-M20ADAD 检测器, SIL-20A 自动进样器, SIL-20A 柱温箱, 日本岛津公司; Agilent Zorbax Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 美国安捷伦科技公司; KQ-500DE 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司。

### 1.2 材料

5-HMF 对照品, 批号 13337, 质量分数 98.5%, 上海诗丹德标准技术服务有限公司; 1-乙基-3-[3-二甲基氨基丙基]碳二亚胺盐酸盐 (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride, EDC)、*N*-羟基丁二酰亚胺 (*N*-hydroxysuccinimide, NHS)、磺基-*N*-羟基琥珀酰亚胺-生物素 (sulfo-*N*-hydroxysuccinimide biotin, Sulfo-NHS-Biotin), 上海麦克林生化科技股份有限公司; 5-HMF 抗体 (anti-5-HMF, 5-HMF Ab, 货号 Ab00151)、5-HMF-BSA 人工抗原 (5-hydroxymethylfurfural-bovine serum albumin conjugate, 5-HMF-BSA), 深圳市绿诗源生物技术有限公司; 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA), 河北百灵威超精细材料有限公司; 磁珠, 海狸 (广州) 生物科技有限公司; 磷酸盐缓冲液 (phosphate-buffered saline, PBS)、0.05%磷酸盐-聚山梨酯 20 缓冲液 (0.05% phosphate-buffered saline containing Tween-20, PBST)、4-吗啉乙磺酸-

聚山梨酯 20 缓冲液 (4-morpholineethanesulfonic acid containing Tween-20, MEST)、辣根过氧化物酶标记链霉亲和素 (horseradish peroxidase-streptavidin, HRP-SA), 北京索莱宝科技有限公司; 3,3',5,5'-四甲基联苯胺 (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine, TMB), 上海碧云天生物技术股份有限公司; 碳酸钠-碳酸氢钠缓冲液 (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-NaHCO<sub>3</sub>), 上海源叶生物科技有限公司; 4-吗啉乙磺酸 (4-morpholineethanesulfonic acid, MES), 北京百瑞极生物技术有限公司。

## 2 方法与结果

### 2.1 IMS-ELISA 检测体系的建立

IMS-ELISA 结合了磁分离富集与酶联免疫吸附法检测的优势, 其基本原理如图 1 所示: 磁性微球表面偶联的特异性抗体可与目标物 5-HMF 特异性识别结合。当样品中游离的 5-HMF 与竞争分子 (5-HMF-BSA-Sulfo-NHS-Biotin) 同时加入反应体系时, 二者竞争磁珠上有限的抗体结合位点。结合的竞争分子经 HRP-SA 反应后与 TMB 显色底物作用产生比色信号, 其显色强度与结合的标记抗原量成正比, 而与样品中 5-HMF 浓度成负相关。由于磁分离过程可实现快速洗涤并显著降低基质干扰, IMS-ELISA 法在灵敏度、特异性和检测速度方面均优于常规 ELISA, 可用于中药大蜜丸等高糖复杂体系中 5-HMF 的定量检测。

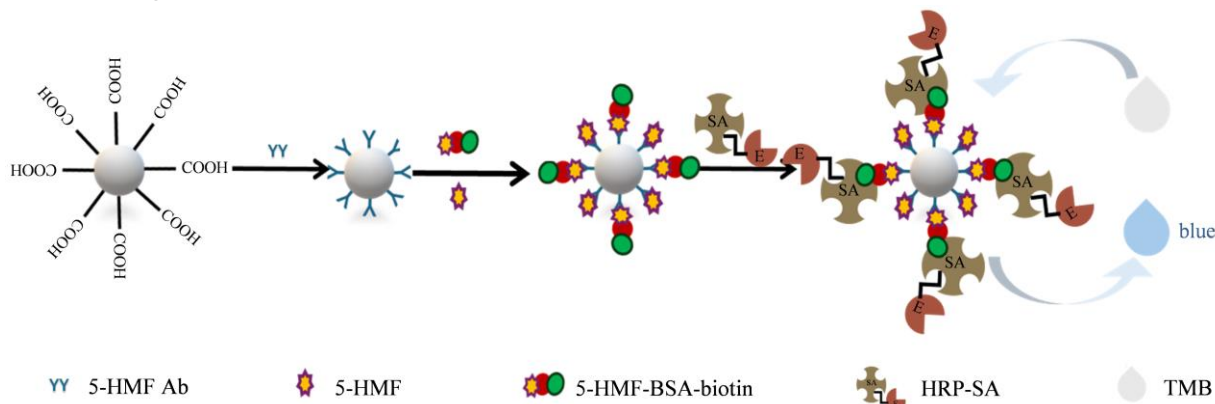


图 1 基于 IMS-ELISA 体系的检测 5-HMF 原理

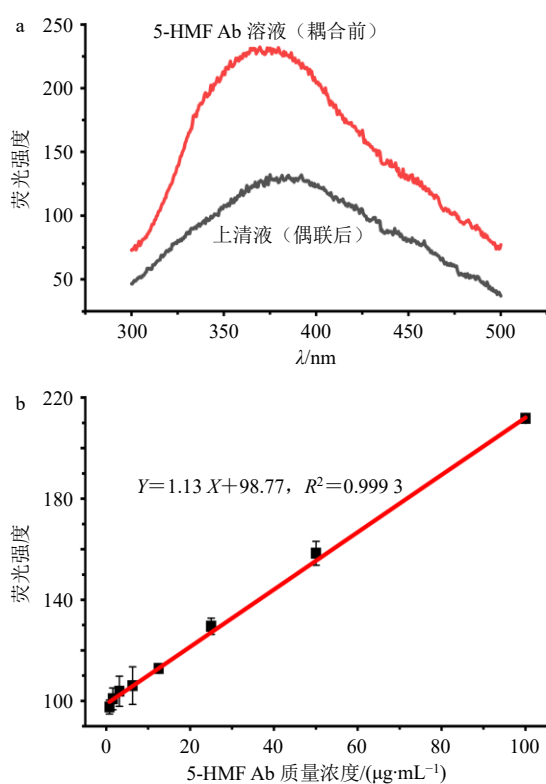
Fig. 1 Schematic illustration of IMS-ELISA system for 5-HMF detection

**2.1.1 抗体偶联磁珠的制备** 采用 EDC/NHS 活化法将羧基磁珠与抗 5-HMF 抗体 (5-HMF Ab) 偶联。取 100 μL (10 mg/mL) 羧基磁珠悬液于 1.5 mL 玻璃瓶中, 加入 1 mL MEST 缓冲液 (100 mmol/L MES, pH 5.0, 含 0.05% 聚山梨酯 20), 磁分离弃上清并重复洗涤 3 次。依次加入 EDC 与 NHS 溶液 (各 10 mg/mL, 100 μL), 室温 (25 °C) 旋转混合 30 min

活化羧基。磁分离弃上清后用 1 mL PBST (PBS 含 0.05% 聚山梨酯 20) 洗涤 1 次。加入 1 mL 5-HMF Ab 溶液 (100 μg/mL), 室温旋转反应 2 h。磁分离后留取上清用于测定未结合抗体。再加入 1 mL 含 20% BSA 的 PBS 封闭液, 室温孵育 1 h 后, 磁分离, 弃上清, 以 PBST 清洗 5 次除去游离 BSA。最终以 500 μL PBST 重悬, 制得 2 mg/mL 抗体偶联磁

珠, 4 °C 保存。

**2.1.2 偶联效率测定** 取 5-HMF Ab 溶液 (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 及偶联反应上清液各 100  $\mu\text{L}$ , 于荧光光谱仪检测荧光强度 ( $E_x=280\text{ nm}$ ,  $E_m=350\text{ nm}$ , 扫描范围 300~500 nm)。上清液荧光强度低于初始溶液表明抗体已成功偶联。为定量偶联量, 配制 5-HMF Ab 标准溶液系列 (0~50.00  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 8 个质量浓度梯度), 记录谱图并取峰顶波长 ( $\lambda_{\text{max}}$ ) 处的发射强度用于比较与定量, 并绘制标准曲线。依据反应上清液荧光信号计算剩余抗体量, 并求得磁珠表面偶联抗体的质量。荧光光谱法分析结果如图 2-a 所示, 偶联前的抗体溶液荧光强度为 212.7 au, 而偶联后上清液的荧光强度降至 108.1 au, 说明大量抗体已结合到磁珠表面。进一步考察不同浓度抗体的荧光强度关系 (图 2-b), 在各样品发射峰顶波长 ( $\lambda_{\text{max}}$ , 约 370 nm) 处发射强度与抗体浓度呈良好线性, 回归方程为  $Y=1.13X+98.77$ , 决定系数  $R^2=0.9993$ 。依据校准方程计算, 磁珠的表面实际修饰抗体量为



a-修饰前后上清发射谱; b-抗体质量浓度与荧光强度线性关系。  
a-emission spectra of the supernatant before and after modification;  
b-linear relationship between antibody concentration and fluorescence intensity.

图 2 5-HMF Ab 修饰磁珠的效果评价

Fig. 2 Evaluation of modification efficiency of 5-HMF Ab-functionalized magnetic beads

92.56  $\mu\text{g}$ , 表明该方法能有效实现抗体的定量固定, 且偶联反应稳定、可重复性良好。值得说明的是, 偶联反应后未结合的抗体, 主要存在于反应上清中, 并在随后的磁分离与多次洗涤步骤中被有效去除。由于后续 IMS-ELISA 检测体系以抗体修饰磁珠为固相载体, 所有免疫竞争与显色反应均发生于磁珠表面, 游离抗体不参与磁分离过程, 亦不会进入最终检测体系, 因此, 不会对后续免疫反应或检测结果产生干扰。

**2.1.3 免疫竞争反应与结合特性分析** 为验证所构建免疫竞争检测体系中, 各关键环节的可行性与结合特性, 采用 BLI 对配体固定、抗体识别及游离 5-HMF 竞争过程进行表征。BLI 通过监测链霉亲和素 (streptavidin, SA) 探针表面生物层结合引起的干涉光谱波长位移 ( $\Delta\lambda$ , nm), 实现对分子相互作用的无标记、实时检测; 信号幅度与表面结合质量成正比, 进而获得结合/解离动力学曲线。为保证操作规范与读数一致性, 本研究在同一块 96 孔板中预设各步骤溶液, 按照“装载-清洗-结合-清洗-竞争/置换”的顺序完成 BLI 检测: 首先将 SA 型传感探针于 PBS 中建立基线并活化 60 s; 随后转入预制的 5-HMF-BSA-Sulfo-NHS-Biotin 溶液中进行装载, 该装载溶液由 22  $\mu\text{L}$  生物素化 5-HMF-BSA 溶液以 PBS 稀释至 990  $\mu\text{L}$  配制而成 (终质量浓度 44.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 装载时间设定为 300 s, 直至响应信号趋于稳定。装载完成后, 探针转入 PBS 中清洗 120 s 以去除未结合分子; 必要时以生物素或生物素-BSA 封闭残余 SA 位点。随后将探针置于抗 5-HMF 抗体溶液中进行结合反应, 抗体质量浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 在 25 °C 条件下记录结合曲线 300 s; 再转入 PBS 清洗 120 s 以记录解离基线。在竞争/置换步骤中, 将探针依次浸入含游离 5-HMF 的标准溶液或样品溶液中, 于 300 s 内利用游离 5-HMF 与抗体之间的竞争作用引起信号变化, 实现定量分析。所有步骤均在室温条件下进行, 实验过程中实时记录干涉光谱波长位移信号。BLI 结合曲线结果 (图 3) 显示, 生物素化 5-HMF-BSA 在 SA 探针上的装载响应迅速上升并趋于稳态, 提示 SA-Biotin 固定充分且稳定; 其后抗 5-HMF 抗体与表面配体的结合曲线连续、平滑, 解离缓慢, 表明其具有良好的特异识别与结合稳定性; 当引入游离 5-HMF 时, 曲线出现显著位移, 位移幅度与游离 5-HMF 水平相关, 可用于后续检测。在竞争/置换步骤中, 抗体结合后的响应平台约为 8.4 nm,

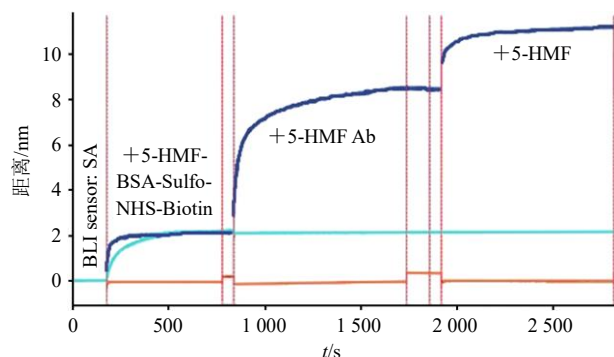


图3 BLI结合曲线 (SA型生物传感器)

Fig. 3 BLI sensorgrams (SA biosensor)

引入游离 5-HMF 后响应升至约 10.9 nm，对应位移幅度约为 2.5 nm，响应变化幅度约为 30%。综上，配体固定、抗体识别及游离 5-HMF 的竞争作用均符合预期，验证了竞争检测体系的可行性。BLI 读数为干涉光谱波长位移 ( $\Delta\lambda$ , nm)，与表面结合质量近似成正比。

**2.1.4 IMS-ELISA 监测体系参数优化** 为提高 IMS-ELISA 检测体系的灵敏度与稳定性，并降低非特异背景信号，对检测体系中的关键影响参数进行单因素优化。以检测信号与背景吸光度 ( $A$ ) 的信噪比 (signal-to-noise ratio,  $S/N$ ) 作为综合评价指标，在各实验条件下均进行 3 次平行测定，以保证结果的可靠性。

(1) 封闭剂 BSA 浓度的优化：考察不同 BSA 封闭质量浓度 (10、30、50、100、200、250 mg/mL) 对 IMS-ELISA 体系背景信号及检测稳定性的影响，结果见表 1。随着 BSA 质量浓度由 10 mg/mL 提高至 100 mg/mL，体系  $A$  值波动较小，相对稳定 (1.37~1.55)；当 BSA 质量浓度增加至 200 mg/mL 时，背景信号明显下降 ( $A_{450}=0.81$ )；继续增加至 250 mg/mL 时， $A$  值进一步降低 (0.39)，但质量浓度过高可能导致过封闭而影响后续抗体结合。综合考虑

表 1 不同 BSA 封闭质量浓度条件下 IMS-ELISA 体系  $A$  值的测定结果 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 1  $A$  values of IMS-ELISA system under different BSA blocking concentrations ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

| BSA 封闭质量浓度/(mg·mL <sup>-1</sup> ) | $A_{450}$   |
|-----------------------------------|-------------|
| 10                                | 1.42 ± 0.03 |
| 30                                | 1.55 ± 0.01 |
| 50                                | 1.38 ± 0.01 |
| 100                               | 1.37 ± 0.03 |
| 200                               | 0.81 ± 0.01 |
| 250                               | 0.39 ± 0.01 |

封闭效果与检测灵敏度，确定 BSA 200 mg/mL 为最优封闭质量浓度。

(2) 洗涤缓冲液体系的优化：比较 PBS、MES 和 PBST 3 种洗涤缓冲液对检测体系信号及背景的影响，结果见表 2。3 种缓冲体系在背景控制和重复性方面存在明显差异，其中 PBS 能够有效降低背景信号，且检测结果重复性良好，整体性能优于含表面活性剂的 PBST 以及弱酸性的 MES。因此，选择 PBS 作为 IMS-ELISA 体系的洗涤缓冲液。

表 2 不同洗涤缓冲液条件下 IMS-ELISA 体系  $A$  值的测定结果 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 2 Absorbance of IMS-ELISA system under different washing buffer conditions ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

| 缓冲液  | $A_{450}$   |
|------|-------------|
| MES  | 3.09 ± 0.12 |
| PBST | 2.70 ± 0.64 |
| PBS  | 0.60 ± 0.07 |

(3) HRP-SA 洗涤次数的优化：为降低 HRP-SA 结合后产生的非特异信号，考察不同洗涤次数 (2、4、6、8、10 次) 对检测结果的影响，结果见表 3。随着洗涤次数的增加，背景信号逐步降低，体系  $S/N$  值逐渐升高；当洗涤次数达到 8 次时， $S/N$  值达到较大，继续增加洗涤次数后改善效果不明显。因此，确定 HRP-SA 结合后的最优洗涤次数为 8 次。

(4) 磁珠用量的优化：考察不同磁珠用量 (0.20、0.10、0.05、0.03 mg/mL) 对检测信号强度及背景  $A$  值的影响，结果见表 4。可见，随着磁珠质量浓度由

表 3 不同清洗次数条件下 IMS-ELISA 体系  $A$  值的测定结果 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 3 Absorbance of IMS-ELISA system under different washing times ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

| 清洗次数 | $A_{450}$   | 清洗次数 | $A_{450}$   |
|------|-------------|------|-------------|
| 2    | 1.85 ± 0.44 | 8    | 0.23 ± 0.04 |
| 4    | 0.57 ± 0.03 | 10   | 0.21 ± 0.02 |
| 6    | 0.41 ± 0.18 |      |             |

表 4 不同磁珠质量浓度条件下 IMS-ELISA 体系  $A$  值的测定结果 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 4 Absorbance of IMS-ELISA system under different magnetic bead concentrations ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

| 磁珠质量浓度/(mg·mL <sup>-1</sup> ) | $A_{450}$     | 磁珠质量浓度/(mg·mL <sup>-1</sup> ) | $A_{450}$     |
|-------------------------------|---------------|-------------------------------|---------------|
| 0.20                          | 0.270 ± 0.008 | 0.05                          | 0.120 ± 0.005 |
| 0.10                          | 0.170 ± 0.002 | 0.03                          | 0.110 ± 0.011 |

0.20 mg/mL 降低至 0.05 mg/mL, 体系背景  $A$  值显著下降, 同时检测信号保持稳定; 当磁珠质量浓度进一步降低至 0.03 mg/mL 时, 信号变化不明显。综合考虑检测灵敏度与体系稳定性, 确定最优磁珠质量浓度为 0.05 mg/mL。

综合以上结果, 确定 IMS-ELISA 检测体系的最优条件为 200 mg/mL BSA 封闭、PBS 洗涤缓冲液、洗涤 8 次及磁珠质量浓度 0.05 mg/mL。

**2.1.5 IMS-ELISA 的检测方法** 在上述参数优化条件下, 建立最终 IMS-ELISA 检测流程如下: 以经 200 mg/mL BSA 封闭的抗体偶联磁珠为固相载体。取 100  $\mu$ L 磁珠悬液 (0.05 mg/mL) 于 1.5 mL 离心管中, 分别加入 50  $\mu$ L 不同质量浓度的 5-HMF 对照品溶液 (0.4~200.0 ng/mL) 与 50  $\mu$ L 5-HMF-BSA 溶液 (1  $\mu$ g/mL), 混匀后于 37  $^{\circ}$ C 旋转孵育 30 min。磁分离弃上清后, 加入 400  $\mu$ L HRP-SA 溶液 (2  $\mu$ g/mL), 于 37  $^{\circ}$ C 继续孵育 30 min。以 PBS 洗涤 8 次 (每次 2 min), 加入 100  $\mu$ L TMB 底物液反应 10 min, 加 50  $\mu$ L 2 mol/L  $H_2SO_4$  终止反应, 于 450 nm 处测定吸光度 ( $A_{450}$ )。

## 2.2 IMS-ELISA 检测方法学验证

**2.2.1 线性关系考察** 在“2.1.5”项条件下, 对不同质量浓度 (0.4、0.6、1.0、10.0、20.0、60.0、100.0、140.0、180.0、200.0 ng/mL) 的 5-HMF 对照品溶液进行测定, 以对照品溶液质量浓度为横坐标 ( $X$ )、 $A_{450}$  值为纵坐标 ( $Y$ ) 绘制标准曲线, 进行线性回归, 得回归方程为  $Y = -4.312 \times 10^{-4} X + 0.2056$ ,  $R^2 = 0.9973$ 。结果显示 5-HMF 在 0.4~200.0 ng/mL, 5-HMF 质量浓度与  $A$  值呈良好的负线性关系。

**2.2.2 检测限考察** 检测限依据 3 倍空白噪声法计算。以空白孔  $A$  值均值  $y_{\text{空白}}$  与标准差  $s_{\text{空白}}$  确定临界信号  $y_{\text{检测限}} = y_{\text{空白}} - 3s_{\text{空白}}$ , 并将该信号代入回归方程计算质量浓度, 得检测限为 0.32 ng/mL; 最低校准点为 0.40 ng/mL; 综合拟合残差分布及高质量浓度区响应特征进行评估, 当质量浓度高于 160.0 ng/mL 时, 体系信号逐渐接近竞争反应的响应下限, 线性响应开始减弱, 因此将 0.4~160.0 ng/mL 确定为方法的有效定量范围。

**2.2.3 准确度考察** 准确度验证参照《中国药典》2025 年版通则 9101《分析方法学验证原则》进行。根据该通则规定, 准确度可通过将所建立方法的测定结果与标准参考方法或已验证方法进行比较来评价。本研究采用 HPLC 参比对照法, 对 IMS-ELISA

方法的准确度进行评价。HPLC 测定条件: 色谱柱为 Agilent Zorbax Eclipse XDB-C<sub>18</sub> (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5  $\mu$ m) 柱; 流动相为水-甲醇, 梯度洗脱: 0~15 min, 6% 甲醇; 检测波长 280 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30  $^{\circ}$ C; 进样体积 10  $\mu$ L。该方法经系统适用性与线性验证, 具备良好的分离度与定量性能, 可作为 IMS-ELISA 结果评价的参照方法。选取 3 批独立炼蜜样品, 分别采用 IMS-ELISA 与 HPLC 测定 5-HMF 含量, 测定结果见表 5。采用配对  $t$  检验 (双侧) 对 2 种方法测定结果进行统计学比较, 在 95% 置信水平下, 2 种方法间差异均无统计学意义, 表明 2 种方法测定结果具有良好的一致性。

表 5 HPLC 法与 IMS-ELISA 法测定炼蜜样品中 5-HMF 含量结果对比 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 5 Comparison of 5-HMF contents in laboratory-refined honey samples determined by HPLC and IMS-ELISA methods ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

| 批次 | 5-HMF/(mg $\cdot$ kg $^{-1}$ ) |                   | $P$ 值      |
|----|--------------------------------|-------------------|------------|
|    | HPLC 法测量                       | IMS-ELISA 方法测量    |            |
| 1  | 105.30 $\pm$ 2.64              | 111.01 $\pm$ 5.35 | $P > 0.05$ |
| 2  | 165.50 $\pm$ 0.96              | 168.21 $\pm$ 7.09 | $P > 0.05$ |
| 3  | 126.97 $\pm$ 0.38              | 121.83 $\pm$ 5.36 | $P > 0.05$ |

置信区间取 95%; 2 种方法配对差异采用配对  $t$  检验,  $P > 0.05$  为不显著。

The confidence interval is 95%; The paired difference between the two methods was tested by paired  $t$  test, and  $P > 0.05$  was not significant.

**2.2.4 精密度考察** 精密度验证依据《中国药典》2025 年版分析方法学要求进行, 从重复性、日间精密度及供试品溶液稳定性 3 个方面对方法的精密度进行评价。

(1) 重复性考察: 重复性验证中, 取实验室自制炼蜜样品, 在同一仪器与相同条件下连续平行测定 6 次, 计算所得 5-HMF 含量的 RSD, 用于评价方法的重复性。结果表明, 6 次平行测定所得 5-HMF 质量分数分别为 132.65、133.28、128.01、137.29、137.29、128.01 mg/kg, 平均值为 (131.11 $\pm$ 5.62) mg/kg, RSD 为 4.29%, 符合《中国药典》2025 年版对分析方法精密度的要求, 说明该方法具有良好的重复性 (表 6)。

(2) 日间精密度考察: 日间精密度考察中, 选取同一炼蜜样品在不同检测时间 (不同实验日) 下, 按上述 IMS-ELISA 方法进行测定, 并计算各时间点测定结果的 RSD。结果显示, 不同检测日测得的 5-HMF 含量结果一致性良好, 其 RSD 为 2.05%, 结

果表明,该方法在不同实验日之间具有良好的日间精密度(表7)。

表6 重复性验证中IMS-ELISA法与HPLC法测定结果  
( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Table 6 Results of repeatability validation for 5-HMF determination by IMS-ELISA and HPLC methods ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

| 测定次数  | 质量分数/(mg·kg <sup>-1</sup> ) |             |
|-------|-----------------------------|-------------|
|       | IMS-ELISA                   | HPLC        |
| 1     | 132.65                      | 132.50      |
| 2     | 133.28                      | 133.10      |
| 3     | 128.01                      | 132.45      |
| 4     | 137.29                      | 133.05      |
| 5     | 137.29                      | 132.80      |
| 6     | 128.01                      | 132.78      |
| 平均值   | 131.11±5.62                 | 132.78±0.39 |
| RSD/% | 4.29                        | 0.29        |

表7 同一炼蜜样品在不同检测日期测定的日间精密度结果  
( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 7 Inter-day precision evaluated by measuring same refined honey sample on three different detection days  
( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

| 日期    | 5-HMF/(mg·kg <sup>-1</sup> ) |
|-------|------------------------------|
| Day 1 | 104.93±2.11                  |
| Day 2 | 106.12±1.09                  |
| Day 3 | 109.17±2.10                  |

(3) 稳定性考察:供试品溶液稳定性考察中,将同一炼蜜供试品溶液在规定条件下放置,分别于0、2、4 h进行检测,以测定结果的RSD评价其短期稳定性。结果表明,在0~4 h测得的5-HMF含量变化较小,其RSD为1.05%,表明供试品溶液及IMS-ELISA检测体系在检测时间范围内保持稳定,能够满足近线检测过程中样品处理与测定的实际需求(表8)。

2.2.5 专属性考察 专属性验证参照《中国药典》2025年版分析方法学验证原则进行。选取5-HMF为

表8 供试品溶液在不同放置时间条件下的稳定性考察结果  
( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 8 Stability assessment of sample solution measured at different time points ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

| 放置时间/h | 5-HMF/(mg·kg <sup>-1</sup> ) |
|--------|------------------------------|
| 0      | 164.08±1.52                  |
| 2      | 165.70±2.99                  |
| 4      | 167.55±1.55                  |

目标分析物,以结构相似的呋喃类化合物糠醛(furfural, F)和5-甲基糠醛(5-methylfurfural, 5-MF)作为潜在干扰对照。同时设置空白对照(PBS)及阴性对照(仅加入5-HMF-BSA偶联物,不加入5-HMF)。各组样品按优化后的IMS-ELISA检测条件进行测定,每组平行3次,通过比较不同组间A值差异评价方法的专属性。

F和5-MF均为糖类在热加工或储存过程中可能生成的典型副产物,在炼蜜体系中具有实际存在背景,且与5-HMF具有相同的呋喃环骨架但侧链取代基不同,适合作为专属性验证的代表性干扰物。专属性验证结果如表9所示,可见5-HMF的A值(0.13±0.01)明显低于5-MF(0.19±0.01)、F(0.20±0.01)及空白对照组(0.21±0.01),显示该体系可有效区分结构类似物,未观察到明显交叉反应;阴性对照组A值为0.11±0.01,表明体系背景极低。上述结果表明,IMS-ELISA法对5-HMF具有良好的专属性和特异识别能力。

表9 IMS-ELISA法检测5-HMF的专属性分析结果  
( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 9 Specificity analysis of 5-HMF detection by IMS-ELISA method ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

| 试剂    | A值          | 试剂   | A值          |
|-------|-------------|------|-------------|
| 5-HMF | 0.130±0.008 | PBS  | 0.210±0.002 |
| 5-MF  | 0.190±0.005 | 阴性对照 | 0.113±0.006 |
| F     | 0.200±0.005 |      |             |

### 2.3 IMS-ELISA方法在炼蜜和合坨工艺参数优化中的应用

为验证所建IMS-ELISA方法,在炼蜜成品质量评价中的适用性,并研究炼蜜和合坨工艺参数对5-HMF含量的影响,开展以下实验。

2.3.1 炼蜜样品处理与5-HMF含量计算 取炼蜜样品约0.5 g,置于烧杯中,加入适量蒸馏水,于水浴条件下温和加热并搅拌,使样品充分溶解。将溶液定量转移至50 mL量瓶中,采用少量多次洗涤烧杯并合并洗液的方式,必要时借助玻璃棒引流,以蒸馏水定容至刻度线,摇匀,作为炼蜜供试品母液。精密吸取上述母液100 μL,置于10 mL量瓶中,以蒸馏水定容至刻度线,摇匀,作为炼蜜供试品溶液。炼蜜样品经加热处理后呈均一半流体状态,在所用溶剂体系中具有良好的溶解性,经充分混匀可获得均一供试品溶液,满足后续检测要求。

样品中5-HMF含量的计算,基于检测溶液中

测得的质量浓度，并结合样品取样量、提取体积及稀释倍数进行换算。简要过程如下：称取样品  $m$  (g)，加入  $V_0$  (mL) 提取溶剂进行提取，离心取上清液作为样品提取液；根据检测需要，对提取液进行  $D$  倍稀释后，采用 IMS-ELISA 法或 HPLC 法测定得到溶液中 5-HMF 的质量浓度  $C$  (ng/mL)。样品中 5-HMF 含量  $W$  (mg/kg) 按下式计算。

$$W = CV_0D/m \times 10^{-3}$$

$C$  为检测溶液中 5-HMF 质量浓度 (ng/mL)， $V_0$  为样品提取体积 (mL)， $D$  为稀释倍数， $m$  为样品质量 (g)， $10^{-3}$  为单位换算系数

IMS-ELISA 法与 HPLC 法结果，均按照相同的样品前处理与换算方式进行计算，从而保证不同检测方法所得结果的可比性。

**2.3.2 炼蜜工艺参数对 5-HMF 生成的影响** 为考察炼蜜过程中关键工艺参数对 5-HMF 生成的影响，采用课题组自建炼蜜装置，在控温控压条件下分别考察炼蜜温度、真空度（压力）及加热时间对样品中 5-HMF 含量的影响。各实验条件下炼蜜结束后取样冷却，按前文所述 IMS-ELISA 方法测定 5-HMF 含量，每组实验平行测定 3 次。

(1) 炼蜜温度对 5-HMF 生成的影响：在加热时间和真空度保持不变的条件下，分别设定炼蜜温度为 60、70、80、90 °C，考察温度变化对 5-HMF 生成的影响。检测结果见表 10。结果显示，随着炼蜜温度由 70 °C 升高至 90 °C，样品中 5-HMF 含量呈逐步上升趋势；当温度进一步升高时，5-HMF 生成水平明显增加，表明较高温条件可显著促进 5-HMF 的形成。综合 5-HMF 生成控制与工艺可行性考虑，推荐的炼蜜温度控制范围为 75~85 °C。

表 10 炼蜜温度对 5-HMF 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Table 10 Effect of refining temperature on 5-HMF content ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

| 炼蜜温度/<br>°C | 5-HMF/<br>(mg·kg <sup>-1</sup> ) | 炼蜜温度/<br>°C | 5-HMF/<br>(mg·kg <sup>-1</sup> ) |
|-------------|----------------------------------|-------------|----------------------------------|
| 60          | 21.49 ± 2.24                     | 80          | 25.66 ± 1.09                     |
| 70          | 24.48 ± 2.31                     | 90          | 28.02 ± 2.42                     |

(2) 炼蜜压强（真空度）对 5-HMF 生成的影响：在炼蜜温度和加热时间保持一致的条件下，分别设定压强为 20.0、40.0、60.0、80.0 kPa，考察不同压强条件对 5-HMF 生成的影响，结果见表 11。结果表明，随着压强由 80.0 kPa 降低至 20.0 kPa，样品中 5-HMF 含量略有升高。考虑到 5-HMF 生成水

表 11 炼蜜压强对 5-HMF 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Table 11 Effect of refining pressure on 5-HMF content ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

| 压强/kPa | 5-HMF/(mg·kg <sup>-1</sup> ) | 压强/kPa | 5-HMF/(mg·kg <sup>-1</sup> ) |
|--------|------------------------------|--------|------------------------------|
| 20.0   | 24.24 ± 3.60                 | 60.0   | 21.88 ± 1.36                 |
| 40.0   | 24.24 ± 3.62                 | 80.0   | 22.63 ± 1.32                 |

平与生产可操作性，推荐炼蜜压强控制在 (20.0 ± 5.0) kPa。

(3) 炼蜜时间对 5-HMF 生成的影响：在炼蜜温度和压强保持不变的条件下，分别设定加热时间为 5、10、15、20、30、40 min，考察加热时间对 5-HMF 生成的影响，检测结果见表 12。结果显示，随着加热时间由 5 min 延长至 40 min，样品中 5-HMF 含量持续升高；当加热时间 ≥ 15 min 后，5-HMF 含量增幅明显加快。为兼顾 5-HMF 生成控制与工艺效率，推荐炼蜜加热时间控制在 10~15 min。

表 12 炼蜜时间对 5-HMF 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
Table 12 Effect of refining time on 5-HMF content ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

| 炼蜜时间/<br>min | 5-HMF/<br>(mg·kg <sup>-1</sup> ) | 炼蜜时间/<br>min | 5-HMF/<br>(mg·kg <sup>-1</sup> ) |
|--------------|----------------------------------|--------------|----------------------------------|
| 5            | 20.90 ± 1.98                     | 20           | 25.87 ± 2.23                     |
| 10           | 19.76 ± 3.65                     | 30           | 25.03 ± 4.73                     |
| 15           | 21.38 ± 4.07                     | 40           | 25.29 ± 4.13                     |

**2.3.3 炼蜜储存稳定性考察** 按照“2.1.4”项下所确定的优化炼蜜工艺条件制备炼蜜样品，并置于 60 °C 恒温水浴中进行贮存稳定性考察。分别于 0、10、16、20、28、36、42、48、54、60、66、72、78、84、90、96、102 h 取样。按照“2.2”项所述 IMS-ELISA 方法测定 5-HMF 含量，每组实验平行测定 3 次。检测结果表明，在 60 °C 条件下贮存过程中，炼蜜样品中 5-HMF 含量随贮存时间持续升高（图 4）。当贮存时间达到 48 h 后，样品中 5-HMF 含量超过《中国药典》2025 年版所规定的限度值 (40 mg/kg)，提示长期高温贮存可能引发潜在的质量风险。因此，在实际生产过程中，应尽量避免炼蜜在高温条件下的长时间贮存。

**2.3.4 合坨用蜜复热温度对 5-HMF 含量的影响** 选取经优化炼蜜工艺制备的炼蜜样品，每组精密称取约 20 g，分别置于恒温水浴中，在 80、90、100、110、120 °C 复热 5 min，各温度条件下实验重复 3 次。加热结束后迅速冷却样品，并按照“2.2”项所述 IMS-ELISA 方法测定样品中 5-HMF 含量。结果

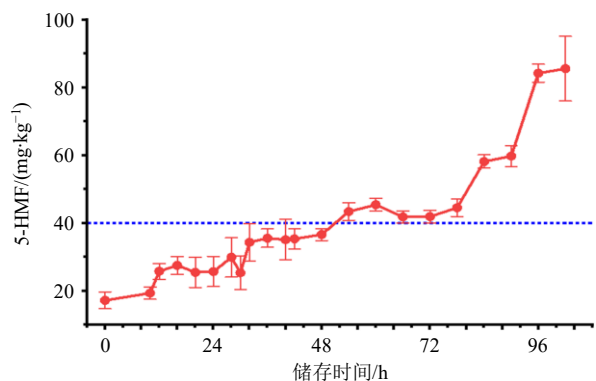


图4 IMS-ELISA 检测炼蜜贮存时间对 5-HMF 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 4 Effect of storage time on 5-HMF content in refined honey determined by IMS-ELISA ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

显示,随着复热温度的升高,样品中 5-HMF 含量明显增加(表 13)。在本实验考察的温度范围内(80~120 °C),各复热温度组样品中 5-HMF 含量均超出《中国药典》2025 年版限度要求(40 mg/kg),提示合坨用蜜复热温度不宜超过 80 °C。上述结果表明,

表 13 IMS-ELISA 检测炼蜜复热温度对 5-HMF 含量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 13 Effect of reheating temperature on 5-HMF content in refined honey determined by IMS-ELISA ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

| 复热温度/<br>°C | 5-HMF/<br>(mg·kg <sup>-1</sup> ) | 复热温度/<br>°C | 5-HMF/<br>(mg·kg <sup>-1</sup> ) |
|-------------|----------------------------------|-------------|----------------------------------|
| 未加热         | 36.75 ± 3.57                     | 100         | 42.20 ± 2.05                     |
| 80          | 40.52 ± 2.44                     | 110         | 44.59 ± 1.33                     |
| 90          | 41.29 ± 2.83                     | 120         | 44.14 ± 3.02                     |

表 14 IMS-ELISA 单次检测同仁牛黄清心丸中 5-HMF 费用

Table 14 Cost of single IMS-ELISA determination of 5-HMF in Tongren Niu Huang Qingxin Pills

| 方法        | 仪器与设备                      | 品牌/厂家                          | 使用量    | 价格/元 | 费用/元 |
|-----------|----------------------------|--------------------------------|--------|------|------|
| IMS-ELISA | 磁珠                         | Beaver Beads                   | 20 μL  | 0.72 | 7.35 |
|           | 5-HMF Ab                   | Green Spring                   | 40 μL  | 2.00 |      |
|           | BSA                        | 河北百灵威超精细材料有限公司                 | 0.1 g  | 1.25 |      |
|           | HRP-SA                     | 北京索莱宝科技有限公司                    | 1 μL   | 1.50 |      |
|           | 5-HMF-BSA-Sulfo-NHS-Biotin | Green Spring/Thermo Scientific | 3 μL   | 1.50 |      |
|           | PBS                        | 北京索莱宝科技有限公司                    | 10 mL  | 0.15 |      |
|           | TMB                        | 上海碧云天生物技术股份有限公司                | 100 μL | 0.23 |      |

在流程适配性方面,IMS-ELISA 检测步骤具有较强的模块化特征,可按“取样与提取-免疫竞争-磁分离洗涤-显色读数-结果判定”顺序组织,并在人工操作基础上引入移液与磁分离等半自动模块。近线应用中的关键控制点包括:样品取样量与提取体积

IMS-ELISA 方法能够有效区分不同复热强度条件下样品中 5-HMF 的差异,适用于合坨用蜜复热工序的过程监控与质量预警。

#### 2.4 近线部署可行性分析

从炼蜜生产过程质量监控的角度看,检测方法在近线应用中的可行性主要取决于检测耗时、单样本检测成本及操作流程的可控性。IMS-ELISA 检测流程主要包括样品制备、免疫竞争反应、磁分离洗涤以及显色与读数等步骤。以单批次样品并行检测为例,样品制备与上板约需 2 min,免疫竞争反应约需 15 min,磁分离与洗涤约需 5 min,显色与读数约需 3 min,总体检测耗时约为 25 min,可满足炼蜜生产过程中阶段性取样的近线检测需求。

在检测成本方面,IMS-ELISA 单次检测成本为 7.35 元/样。该成本估算基于实验过程中单次检测所实际消耗的主要试剂与一次性耗材,按照各试剂单价与对应使用量进行逐项核算并汇总得到(表 14)。与 HPLC 方法相比,IMS-ELISA 法的检测过程不依赖专用色谱系统及其配套设施,对实验场地和运行条件要求较低,检测成本主要来源于少量免疫试剂和常规实验耗材。相比之下,HPLC 方法通常需要配置专用实验场地,并配套稳定的供电、通风及仪器维护条件,其应用成本不仅体现在单次检测耗材上,还包括仪器购置与长期运行维护投入。因此,在炼蜜生产过程中需要进行多批次、频繁取样监测的近线应用场景中,IMS-ELISA 具有单样本检测费用低、对场地依赖性小的优势,更适合作为过程质量监控的补充检测手段。

的一致性、稀释倍数控制以保证检测信号处于有效定量范围内、免疫竞争反应时间与温度控制、磁分离洗涤条件的稳定性以及每批次设置空白与质控样用于监控检测漂移。上述分析表明,该方法在近线质量监控场景中具有一定的应用潜力。

### 3 讨论

中药蜜丸传统制剂中炼蜜过程伴随复杂的热化学转化, 5-HMF 为其中典型的反应产物, 其含量既反映炼蜜后蜜的质量变化, 也关系到中药蜜丸制剂的用药安全性<sup>[5,20]</sup>。本研究建立 IMS-ELISA 体系, 实现了复杂基质中 5-HMF 的高灵敏检测, 并将其用于炼蜜工艺及制剂质量监测。结果显示, IMS-ELISA 以特异性抗体识别结合磁分离富集, 显著减弱高糖基质干扰, 具有良好的灵敏度与重复性, 其线性范围宽、检出限低至 0.32 ng/mL、5-HMF 含量测定结果与 HPLC 法间差异无统计学意义, 表明该体系兼具定量准确性与操作简便性。

在准确度验证中, IMS-ELISA 测得结果的标准偏差略高于 HPLC。该差异主要源于 2 种方法检测原理与操作流程的不同: HPLC 属于高度自动化的理化分析方法, 信号来源稳定且重复性高; 而 IMS-ELISA 基于抗原-抗体特异识别, 并涉及磁珠重悬、洗涤及免疫竞争平衡等多步操作, 随机误差更易累积。此外, 竞争型免疫分析在中高浓度区对微小结合差异较为敏感, 可能放大  $A$  值波动。尽管如此, IMS-ELISA 的 RSD 均控制在分析方法学可接受范围内, 且测定均值与 HPLC 结果一致, 满足近线检测对准确性与稳定性的要求。

在不同炼蜜工艺条件下的 5-HMF 变化分析表明, 5-HMF 的生成随加热温度和加热时间延长而显著增加; 在适度减压条件下, 其升幅有所减缓, 提示“中温-低压-控时”的工艺组合更有利于抑制 5-HMF 的过度累积。该结果与 5-HMF 作为美拉德反应与糖类脱水反应产物的形成机制一致。此外, 在贮存及复热阶段, 5-HMF 含量呈持续升高趋势, 说明应避免长时间高温贮存及反复加热操作。

上述结果为炼蜜工艺参数优化及生产过程质量控制提供了实验依据, 也进一步体现了近线检测在过程监控中的应用价值。与传统色谱方法相比, IMS-ELISA 具有无需有机溶剂、可并行处理多样本等优势, 适合在中药蜜丸制剂炼蜜生产现场或质量控制实验室开展近线检测。在实验周期内的多批次检测过程中, IMS-ELISA 未出现明显信号漂移, 表明其在近线应用场景下具有良好的短期稳定性。同时, 该方法在实际应用中仍存在一定局限性。

作为免疫分析方法, 其检测性能在一定程度上依赖于抗体的活性与稳定性; 抗体长期储存或反复冻融可能影响结合效率。本研究中抗体偶联磁珠为

一次性使用, 尚未对其重复使用及长期储存条件下的性能变化进行系统评估。此外, 磁珠批次差异及免疫竞争反应条件(时间、温度、洗涤强度)亦可能对检测结果产生影响。针对上述问题, 后续工作可通过筛选高稳定性抗体、优化磁珠固定与封闭策略, 并系统评估储存与重复使用条件, 以进一步提升方法的稳定性与经济性。

### 4 结论

本研究建立了一种基于 IMS-ELISA 的 5-HMF 检测方法, 并将其应用于中药蜜丸制剂炼蜜过程的质量监测。该方法具有良好的特异性、灵敏度和定量准确性, 检测结果与 HPLC 法具有良好的可比性。结合过程分析技术(process analysis technology, PAT)理念, IMS-ELISA 可作为炼蜜单元关键质量属性的近线检测手段, 用于监控 5-HMF 含量变化、识别异常批次及工艺偏移, 从而为炼蜜工艺参数优化和质量风险控制提供数据支持。未来可在不同蜜源、处方及生产线条件下开展多中心验证, 并结合自动化取样与数据采集技术, 进一步推进该方法在中药蜜丸制剂炼蜜单元中的标准化与常规化应用。

致谢: 北京同仁堂股份有限公司提供真实世界生产用原蜜样品。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参考文献

- [1] 郭玉凤, 王恺怡, 李楠, 等. 面向智能制造的炼蜜工艺质量属性数字化测量与质量传递模型研究 [J]. 药学学报, 2026, 61(2): 614-623.
- [2] 李玲, 肖芳红, 方慧琼, 等. 壮腰健肾丸中辅料炼蜜的掺伪研究 [J]. 实验室检测, 2025, 3(4): 85-88.
- [3] Yan S, Zhang M, Yuan Y Z, et al. Chaste honey in long term-storage: Occurrence and accumulation of Maillard reaction products, and safety assessment [J]. *Food Chem*, 2023, 424: 136457.
- [4] Martins F C O L, Alcantara G M R N, Silva A F S, et al. The role of 5-hydroxymethylfurfural in food and recent advances in analytical methods [J]. *Food Chem*, 2022, 395: 133539.
- [5] Greilberger J, Herwig R, Greilberger M, et al. Alpha-ketoglutarate and 5-HMF: A potential anti-tumoral combination against leukemia cells [J]. *Antioxidants*, 2021, 10(11): 1804.
- [6] Cao G, Cai H, Cai B C, et al. Effect of 5-hydroxymethylfurfural derived from processed *Cornus officinalis* on the prevention of high glucose-induced oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells

- and its mechanism [J]. *Food Chem*, 2013, 140(1/2): 273-279.
- [7] Qiu Y T, Lin X R, Chen Z Z, *et al.* 5-hydroxymethylfurfural exerts negative effects on gastric mucosal epithelial cells by inducing oxidative stress, apoptosis, and tight junction disruption [J]. *J Agric Food Chem*, 2022, 70(12): 3852-3861.
- [8] 李恩灿, 范潇予, 林琳, 等. 5-羟甲基糠醛及其二聚体 OMBF 引发 I 型超敏反应毒性评价与机制初探 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(2): 1-8.
- [9] 中国药典 [S]. 一部. 2025: 386-387.
- [10] 顾臣贤, 周坚, 张华锋. 大黄廑虫丸中 5-羟甲基糠醛限量检查研究 [J]. 中国处方药, 2021, 19(1): 34-36.
- [11] Vazquez L, Celeiro M, Sergazina M, *et al.* Optimization of a miniaturized solid-phase microextraction method followed by gas chromatography mass spectrometry for the determination of twenty four volatile and semivolatiles compounds in honey from Galicia (NW Spain) and foreign countries [J]. *Sustain Chem Pharm*, 2021, 21: 100451.
- [12] 谢洽桐, 李海洋, 赵小军, 等. 基于 QbD 理念的小儿消食颗粒成型工艺优化及质量一致性评价方法研究 [J]. 中草药, 2026, 57(1): 53-63.
- [13] 吴志生, 乔延江, 肖伟, 等. 论中药制造测量学之 4 个关键工程技术难题 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48(11): 2841-2855.
- [14] 龙佳, 李楠, 田晋茹, 等. 大蜜丸炼蜜单元 5-HMF 的中药制造测量技术进展 [J]. 中国中药杂志, 2025, 50(21): 5987-5998.
- [15] 刘自平, 李静, 吴春霞, 等. 胶体金免疫层析技术快速检测蜂蜜中 5-羟甲基糠醛 [J]. 食品与发酵工业, 2013, 39(7): 200-203.
- [16] Ya B L, Li H F, Wang H Y, *et al.* 5-HMF attenuates striatum oxidative damage via Nrf2/ARE signaling pathway following transient global cerebral ischemia [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2017, 22(1): 55-65.
- [17] 孙萱翡, 赵金凯. 传统炼蜜对蜜丸制备的比较研究 [J]. 国际临床医学, 2024, 6(8): 77.
- [18] 宋雅婷, 梅青, 马磊, 等. 基于荧光侧流免疫层析技术同时快速检测鱼组织中喹烯酮及其主要代谢产物 3-甲基-喹啉-2-甲酸 [J]. 分析试验室, 2025, 44(10): 1469-1476.
- [19] 于慧梅, 陈大舟, 汤桦, 等. 同位素稀释质谱法测定蜂蜜中 4 种硝基咪唑代谢物 [J]. 分析试验室, 2008, 27(12): 38-42.
- [20] Pagare P P, McGinn M, Ghatge M S, *et al.* The antisickling agent, 5-hydroxymethyl-2-furfural: Other potential pharmacological applications [J]. *Med Res Rev*, 2024, 44(6): 2707-2729.

[责任编辑 郑礼胜]