

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.08.013

# 高效液相色谱法测定脑心舒口服液中杂质 5-羟甲基糠醛含量

李玲, 吴琦, 王婷婷

(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 建立测定脑心舒口服液中杂质 5-羟甲基糠醛(5-HMF)含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Phenomenex Luna C<sub>18</sub> 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.1% 磷酸溶液(梯度洗脱), 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 0.204~76.65 μg/mL( $r=0.9997$ ,  $n=7$ )范围内与峰面积线性关系良好;精密度、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 2.0%( $n=6$ ), 平均加样回收率为 99.18%, RSD 为 1.61%( $n=9$ )。结论 该方法操作简便、结果准确, 精密度、稳定性、重复性、耐用性均好, 可用于脑心舒口服液中杂质 5-HMF 含量的测定。

**关键词:** 高效液相色谱法; 脑心舒口服液; 5-羟甲基糠醛; 含量测定

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2021)08-0046-03

## Content Determination of 5-Hydroxymethylfurfural in Naixinshu Oral Liquid by HPLC

Li Ling, Wu Qi, Wang Tingting

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

**Abstract: Objective** To establish a high-performance liquid chromatography(HPLC) method for the content determination of 5-hydroxymethylfurfural(5-HMF) in Naixinshu Oral Liquid. **Methods** The chromatographic column was Phenomenex Luna C<sub>18</sub> column(250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol-0.1% phosphoric acid solution(gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 284 nm, the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 20 μL. **Results** The linear range of 5-HMF was 0.204-76.65 μg/mL( $r=0.9997$ ,  $n=7$ ), the RSDs of precision, stability and repeatability tests were less than 2.0%( $n=6$ ), the average recovery of 5-HMF was 99.18% with RSD of 1.61%( $n=9$ ). **Conclusion** The method is simple, accurate, precise, stable, reproducible and durable, which can be used for the content determination of 5-HMF in Naixinshu Oral Liquid.

**Key words:** HPLC; Naixinshu Oral Liquid; 5-hydroxymethylfurfural; content determination

脑心舒口服液主要成分为蜜环菌浓缩液、蜂王浆, 辅料为蜂蜜、香精、苯甲酸钠, 具有滋补强壮、镇静安神功效<sup>[1]</sup>。其质量标准收载于《卫生部药品标准·中药成方制剂(第二十册)》<sup>[1]</sup>, 标准中无杂质 5-羟甲基糠醛(5-HMF)的检查项。蜂蜜作为矫味剂(用量为 45%)添加到制剂中, 蜂蜜中果糖和葡萄糖的总量不少于 60%<sup>[2]</sup>。5-HMF 是由葡萄糖等单糖化合物在高温或弱酸等条件下脱水生成的醛类化合物, 脑心舒口服液在制备过程

包括将蜂蜜在 90~100 ℃下加热炼制环节<sup>[1]</sup>, 故极易降解出杂质 5-HMF。5-HMF 为第 2 类基因毒性杂质<sup>[3]</sup>, 对人体有致敏性、致癌性、神经毒性、基因毒性等副作用<sup>[3-6]</sup>。杂质尤其是基因毒性杂质作为影响药品安全性的关键因素, 目前已成为药品评价和研究的重点<sup>[7]</sup>。本试验中建立了测定脑心舒口服液中 5-HMF 含量的高效液相色谱法, 旨在为制剂的质量控制和质量标准提高提供参考。现报道如下。

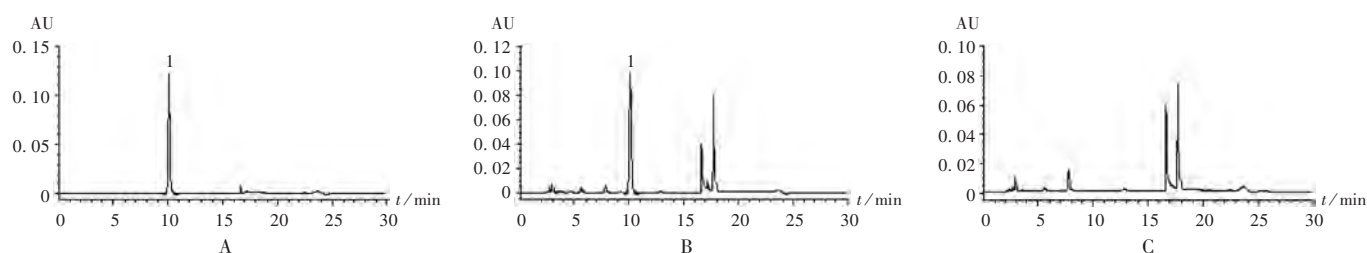
第一作者: 李玲, 女, 硕士, 副主任药师, 研究方向药品检验, (电子信箱)lilinghappy@163.com。

- [12] PANDEY V, SINGH A, SINGH A, et al. Role of oxidative stress and low-grade inflammation in letrozole-induced polycystic ovary syndrome in the rat[J]. Reprod Biol, 2016, 16(1): 70-77.
- [13] 刘冬. 来曲唑联合 Hp-HMG 对多囊卵巢综合征所致不孕症患者治疗效果研究[J]. 中国妇幼保健, 2019, 34(16): 3766-3768.
- [14] 邓思. 来曲唑与氯米芬治疗多囊卵巢综合征不孕效果对比分析[J]. 青岛医药卫生, 2019, 51(1): 47-49.
- [15] 李楠, 陈梅, 王海静. 克罗米芬和来曲唑对小鼠子宫内膜生长发育及血管生成、妊娠率的比较[J]. 广西医学, 2018, 40(15): 1698-1701.
- [16] 张婷, 李颖, 王佩红, 等. 来曲唑联合 HMG 治疗不同体

质量指数 PCOS 不孕患者的促排卵效果及妊娠结局分析[J]. 海南医学, 2019, 30(15): 1950-1953.

- [17] 白淑芳, 柏璐, 白雅维, 等. 曲唑分别联合氯米芬与尿促性腺激素治疗对多囊卵巢综合征患者血清性激素及 COR 水平的影响[J]. 解放军医药杂志, 2019, 31(8): 95-99.
- [18] 页相冰, 郝娟, 胡萌萌, 等. 不同促排卵方案对多囊卵巢综合征不孕症患者治疗效果的临床研究[J]. 医学研究杂志, 2018, 47(4): 106-109.
- [19] 徐晓航, 张翠莲, 张少娣, 等. 来曲唑联合克罗米芬促排卵在卵巢低反应患者中的应用[J]. 中国计划生育和妇产科, 2018, 10(11): 84-87.

(收稿日期: 2020-04-11; 修回日期: 2020-07-23)



1. 5-羟甲基糠醛

A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图1 高效液相色谱图

1. 5-hydroxymethylfurfural

A. Reference solution B. Test solution C. Negative reference solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

## 1 仪器与试药

### 1.1 仪器

Waters 2695 型高效液相色谱仪,包括 Empower 软件(美国 Waters 公司);KH-700DE 型数控超声波清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司);BP211D 型十万分之一电子天平(德国 Sartorius 公司)。

### 1.2 试药

5-HMF 对照品(中国食品药品检定研究院,批号为 111626-201912,含量为 99.2%);脑心舒口服液(市售中药制剂);甲醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Phenomenex Luna C<sub>18</sub> 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇(A)-0.1% 磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~13 min 时 10% A, 13~14 min 时 10% A→80% A, 14~20 min 时 80% A, 20~21 min 时 80% A→10% A, 21~30 min 时 10% A);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

对照品溶液:取 5-HMF 对照品适量,精密称定,加甲醇-水(1:1, V/V)制成每 1 mL 含 5-HMF 102.2 μg 的对照品贮备液;精密吸取 2 mL,置 20 mL 容量瓶中,用甲醇-水(1:1, V/V)定容,摇匀,制成每 1 mL 含 5-HMF 10.22 μg 的对照品溶液。

供试品溶液:精密量取样品 1 mL,置 20 mL 容量瓶中,加甲醇-水(1:1, V/V)超声(功率 200 W,频率 40 kHz)处理,并定容,摇匀,滤过,即得。

阴性对照品溶液:按脑心舒口服液处方和工艺制备不含蜂蜜的阴性样品,并按供试品溶液制备方法制备阴性对照品溶液。

### 2.3 方法学考察

专属性试验:取对照品溶液、供试品溶液及阴性对

照品溶液各适量,按 2.1 项下色谱条件进样测定。结果理论板数按 5-HMF 峰计应不低于 3 000,阴性对照品溶液色谱中,在与 5-HMF 对照品溶液色谱相应保留时间处无干扰峰,表明专属性良好。详见图 1。

线性关系考察:分别精密量取 2.2 项下 5-HMF 对照品贮备液 0.04, 0.20, 1.00, 2.00, 4.00, 10.00, 15.00 mL,分别置 20 mL 容量瓶中,加甲醇-水(1:1, V/V)定容,摇匀,制成系列对照品溶液。精密量取 20 μL,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以 5-HMF 质量浓度(μg/mL)为横坐标、峰面积为纵坐标进行线性回归,得回归方程  $Y = 142\,764X - 32\,163$ ,  $r = 0.999\,7$  ( $n = 7$ )。结果表明,5-HMF 质量浓度在 0.204~76.65 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好。

定量限、检测限考察:将对照品溶液逐级稀释,按 2.1 项下色谱条件进样测定,以信噪比(S/N)10:1,3:1 分别计算定量限和检测限。结果定量限和检测限分别为 0.21, 0.07 μg/mL。

精密度试验:取 2.2 项下对照品溶液,按 2.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次,记录峰面积。结果 5-HMF 峰面积的 RSD 为 0.37% ( $n = 6$ ),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取样品(批号为 200208)适量,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,分别于室温下放置 0, 2, 4, 6, 12, 24 h 时按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果 5-HMF 峰面积的 RSD 为 1.16% ( $n = 6$ ),表明供试品溶液在室温下 24 h 内稳定。

重复性试验:取样品(批号为 200208)适量,平行 6 份,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.1 项下色谱条件进样分析,记录峰面积,并计算含量。结果 5-HMF 峰面积的 RSD 为 1.75% ( $n = 6$ ),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量样品(批号为 200208)0.5 mL,共 9 份,分别加入低、中、高质量浓度对照品溶液,按 2.2 项下方法制备供试品溶液,再按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,计算回收率。结果见表 1。

表 1 加样回收试验结果 ( $n=9$ )

Tab. 1 Results of the recovery tests ( $n=9$ )

| 样品含量<br>(mg) | 加入量<br>(mg) | 测得量<br>(mg) | 回收率<br>(%) | $\bar{X}$<br>(%) | RSD<br>(%) |
|--------------|-------------|-------------|------------|------------------|------------|
| 0.101 3      | 0.081 1     | 0.182 3     | 99.88      | 99.18            | 1.61       |
| 0.101 3      | 0.081 1     | 0.180 4     | 97.53      |                  |            |
| 0.101 3      | 0.081 1     | 0.181 4     | 98.77      |                  |            |
| 0.101 3      | 0.101 4     | 0.203 5     | 100.79     |                  |            |
| 0.101 3      | 0.101 4     | 0.202 1     | 99.41      |                  |            |
| 0.101 3      | 0.101 4     | 0.201 5     | 98.82      |                  |            |
| 0.101 3      | 0.121 7     | 0.222 5     | 99.59      |                  |            |
| 0.101 3      | 0.121 7     | 0.223 3     | 100.25     |                  |            |
| 0.101 3      | 0.121 7     | 0.220 1     | 97.62      |                  |            |

## 2.4 样品含量测定

取 12 批样品各适量,分别按 2.2 项下方法制备供试品溶液,再按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算样品中 5-HMF 的含量。结果见表 2。

表 2 样品信息及 5-HMF 含量测定结果 (mg/mL,  $n=12$ )

Tab. 2 The information of the samples and the results of content determination of 5-HMF in the samples (mg/mL,  $n=12$ )

| 生产企业           | 批号       | 含量      |
|----------------|----------|---------|
| 湖北金龙药业有限公司     | 20200109 | 0.006 1 |
| 湖北东信药业有限公司     | 200311   | 0.028 9 |
| 湖北东信药业有限公司     | 200304   | 0.029 8 |
| 湖北福广制药有限公司     | 20191205 | 0.062 2 |
| 吉林敖东药业集团股份有限公司 | 191115   | 0.128 3 |
| 江苏神华药业有限公司     | 20191231 | 0.147 2 |
| 吉林天强制药有限公司     | 200208   | 0.202 6 |
| 湖北太子药业有限公司     | 20200102 | 0.213 4 |
| 江西汇仁药业股份有限公司   | 1911023  | 0.240 3 |
| 吉林省利华制药有限公司    | 20200204 | 0.337 8 |
| 湖北济安堂药业股份有限公司  | 191204   | 0.743 4 |
| 湖北济安堂药业股份有限公司  | 190803A  | 1.247 4 |

## 3 讨论

预试验中,对甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.01%磷酸溶液、甲醇-0.05%磷酸溶液、甲醇-0.1%磷酸溶液、乙腈-0.1%磷酸溶液等流动相体系进行对比考察,并对不同梯度洗脱比例进行摸索,最终确定采用甲醇-0.1%磷酸溶液为流动相,进行梯度洗脱。在此色谱条件下,5-HMF 峰形对称,理论板数最佳,并能与相邻成分峰达到完全分离。

耐用性试验中适当改变色谱条件,如流动相中磷酸溶液体积分数(0.08%,0.10%,0.12%)、流速(0.9,1.0,1.1 mL/min)、柱温(25,30,35℃),结果各考察因素在耐用性范围内变动时,供试品中 5-HMF 含量测定结果基本一致,表明流动相、流速和柱温在一定限度内

变化时,本方法能满足试验要求,耐用性较好。

试验中收集了 12 批市售脑心舒口服液(10 个不同生产企业),含量测定结果表明,12 批样品中均检出 5-HMF,且各批次样品间差异较大,最高质量浓度与最低质量浓度相差约 200 倍,可见市售脑心舒口服液质量参差不齐。2015 年版《中国药典(一部)》规定蜂蜜中 5-HMF 含量不得过 0.004%<sup>[2]</sup>,按脑心舒口服液的处方工艺(蜂蜜占 45%),理论计算制剂中 5-HMF 含量最高为 0.018 mg/mL,所检测样品中仅 1 批的 5-HMF 含量低于 0.018 mg/mL。可见,脑心舒口服液中 5-HMF 的来源很可能是制剂在处方制备过程中蜂蜜加热炼制(90~100℃)<sup>[1]</sup>降解产生,有的厂家的 5-HMF 含量尤其高,也可能为使用了劣质蜂蜜作为辅料或蜂蜜加热炼制时间过长导致。

脑心舒口服液的用量为 1 次 10 mL,1 日 2 次,而脑心舒口服液中 5-HMF 的质量浓度范围为 0.006 1~1.247 mg/mL,则最大日暴露量为 24.94 mg,远超 5-HMF 作为第 2 类基因毒性杂质限度的要求<sup>[3]</sup>。因毒性杂质在低浓度时即可造成人体遗传物质的损伤,进而导致基因突变,甚至促使肿瘤发生<sup>[7]</sup>。蜂蜜虽是脑心舒口服液中的辅料,但辅料也是影响药品安全性的重要因素,国内外越来越重视辅料的研究,辅料中降解杂质的毒副作用也应引起足够重视。因此建议,生产厂家优化处方制备工艺,改善样品存储温度或选用更优质的辅料,以降低样品中 5-HMF 的含量。同时,对 5-HMF 进行质量控制,并纳入脑心舒口服液的质量标准中,以提高产品的质量和用药安全。

## 参考文献

- [1] WS<sub>3</sub>-B-3975-98. 卫生部药品标准·中药成方制剂(第二十册)[S].
- [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,2015:360.
- [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] 赵颖,张璐欣,李越. 5-羟甲基糠醛的研究概况[J]. 医学综述,2016,22(17):3431-3434.
- [5] 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):372-377.
- [6] 朱小红,陈蓓,林芳,等. 保健食品中 5-羟甲基糠醛快速筛查定性定量分析方法研究[J]. 药物分析杂志,2014,34(2):306-309.
- [7] 刘晓丹,陆峰,何伍. 浅析遗传毒性杂质在医药工业中的来源与控制[J]. 药学服务与研究,2017,17(3):235-237.

(收稿日期:2020-06-24;修回日期:2020-10-24)