

文章编号 1006-8147(2019)06-0659-04

论著

红景天注射液中5-羟甲基糠醛HPLC含量检测方法的建立及分析

刘雪涵¹,朱雯¹,秦楠¹,董林毅¹,段宏泉^{1,2}

(1.天津医科大学药学院,天津市临床药物关键技术重点实验室,天津300070;2.天津医科大学基础医学研究中心,天津300070)

摘要 目的:建立红景天注射液中5-羟甲基糠醛高效液相色谱(HPLC)含量检测方法,进一步分析多批次红景天注射液中5-羟甲基糠醛的含量,评价其安全性。方法:采用Agilent XDB-C₁₈(250×4.6 mm,5 μm)色谱柱,0.01%磷酸水溶液为流动相,流速为1.0 mL/min;检测波长为284 nm;柱温为30℃。结果:建立了HPLC检测红景天注射液中5-羟甲基糠醛含量的方法,经方法学考察,符合要求。进一步分析表明,34批次红景天注射液中5-羟甲基糠醛含量范围为1.321~6.927 μg/mL,均低于药典规定的葡萄糖注射液中的5-羟甲基糠醛限量标准。结论:多数批次的红景天注射液中均含有微量的5-羟甲基糠醛,但根据临床用量比较,远小于葡萄糖注射液中的5-羟甲基糠醛的限量标准,其安全性具有足够的保障。

关键词 红景天注射液;高效液相色谱;5-羟甲基糠醛

中图分类号 R927.2

文献标志码 A

Establishment and Analysis of HPLC Method for Determination of 5-Hydroxymethylfurfural in Hongjingtian Injection

LIU Xue-han¹, ZHU Wen¹, QIN Nan¹, DONG Lin-yi¹, DUAN Hong-quan^{1,2}

(1. School of Pharmacy, Tianjin Key Laboratory on Technologies Enabling Development of Clinical Therapeutics and Diagnostics (Theranostics), Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Research Center of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To establish a HPLC method for the determination of 5-hydroxymethylfurfural in Hongjingtian injection, further analyze the content of 5-hydroxymethylfurfural in multiple batches of Hongjingtian injection and evaluate its safety. **Methods:** The HPLC analysis was performed on Agilent XDB C₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) and the mobile phase consisted of 0.01% phosphoric acid aqueous solution at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The detective wavelength was set at 284 nm and the column temperature was maintained at 30℃. **Results:** The HPLC method for content determination of 5-hydroxymethylfurfural in Hongjingtian injection was established, which was tested by method and met the requirements. Further analysis shows that the content of 5-hydroxymethylfurfural in 34 batches of Hongjingtian injection was in the range of 1.321~6.927 μg/mL, which was lower than the standard of 5-hydroxymethylfurfural in glucose injection prescribed by pharmacopoeia. **Conclusion:** Most of the batches of Hongjingtian injection contain a small amount of 5-hydroxymethylfurfural, but according to the clinical dosage, it is much smaller than the limit of 5-hydroxymethylfurfural in glucose injection, and its safety is sufficient.

Key words Hongjingtian injection; HPLC; 5-hydroxymethylfurfural

红景天注射液可以活血化瘀,临床上主要用于治疗冠心病稳定型劳累性心绞痛引起的胸部刺痛、绞痛、胸闷、心悸不宁、脉细涩等^[1-2]。在中药注射液的质量控制研究中,一方面有效成分的分析,如色谱指纹图谱等,应用越来越普遍;另一方面,注射液中潜在的有毒物质的分析与控制,也越来越得到了重视。现有研究普遍认为,5-羟甲基糠醛是葡萄糖、果糖等单糖在高温、酸性条件或微生物的作用下发生麦拉德(Maillard)反应脱水生成的一个醛类化合

物^[3-4]。随着反应的进行,食品和中药材的色泽会逐渐变深^[5]。5-羟甲基糠醛对人体横纹肌及内脏有损害,具有神经毒性,能与人体蛋白质结合产生积蓄中毒^[6-8]。在中国药典(2015年版)二部^[9]、日本药局方(14版)、欧洲药典(7.0版)中葡萄糖注射液项下中均用UV法来控制其含量。

中药材原料常含有较多的糖类成分,因此,在中药注射液生产过程中,特别是高温灭菌过程中,很容易产生己糖的降解产物5-羟甲基糠醛。而中药注射液直接进入体内循环系统,需严格保障其质量,以免发生不良反应。为了控制注射液的安全性,

作者简介 刘雪涵(1994-),女,硕士在读,研究方向:中药现代质量控制与质量标准;通信作者:段宏泉,E-mail:duanhq@tjmu.edu.cn。

有必要对红景天注射液中的5-羟甲基糠醛进行分析检测。在之前的文献中,未见对红景天注射液中5-羟甲基糠醛含量测定的报道。本研究建立HPLC检测红景天注射液中5-羟甲基糠醛含量的方法,并进一步对34批次红景天注射液中5-羟甲基糠醛的含量进行分析,以考察5-羟甲基糠醛对注射液安全性的影响,为质量标准的提升提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 仪器 高效液相 Agilent 1200 series, 包括二元高压泵、柱温箱、自动进样器、紫外-可见光检测器, Agilent Chemstation 工作站。

1.1.2 试剂 色谱纯甲醇 (HPLC grade, Fisher Scientific); 超纯水 (Millipore Ultra-pure Water); 磷酸 (HPLC grade, 天津基准化学制品有限公司); 红景天注射液 (吉林通化玉圣制药公司提供); 标准品: 5-羟甲基糠醛, 纯度: 98%, 购于中国食品药品检定研究院, 批号 111626-201509。

1.2 方法

1.2.1 供试品溶液的配制 精密吸取红景天注射液 0.5 mL, 用超纯水稀释至 10.0 mL, 所得溶液经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液, 即得。

1.2.2 对照品溶液的配制 精密称取 5-羟甲基糠醛对照品适量, 加入超纯水配制成浓度为 1.25 mg/mL 的溶液, 再以超纯水稀释至 0.625 $\mu\text{g/mL}$, 即得。

1.2.3 色谱条件 色谱柱: Agilent XDB-C₁₈ (250 \times 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.01% 磷酸水溶液 (每次进样分析后, 以甲醇冲洗 10 min); 检测波长: 284 nm; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.2.4 方法学考察

1.2.4.1 标准曲线的制备: 分别精密吸取 5-羟甲基糠醛对照品溶液 2、4、8、16、32、64 μL , 进样分析, 记录色谱图, 以峰面积 (y) 为纵坐标, 进样浓度 (x) 为横坐标, 绘制标准曲线。

1.2.4.2 精密度试验: 选取红景天对照品溶液, 按“1.2.1 项”制备, 按“1.2.3 项”色谱条件, 连续进样 6 次。

1.2.4.3 重复性试验: 取同一批号样品 (批号: 50202-1), 按“1.2.1 项”平行制备 6 份。

1.2.4.4 稳定性试验: 取某一供试品溶液 (批号: 50402-1) 于 0、2、4、6、8、10、12、14、16 h 进样分析。

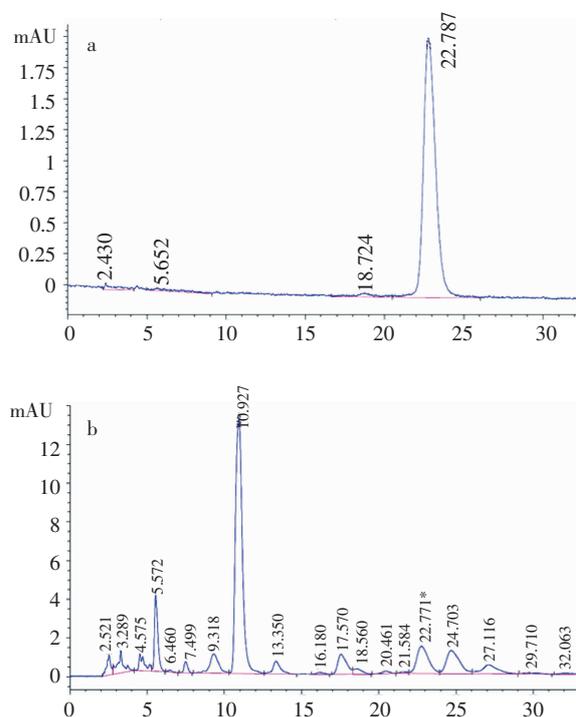
1.2.4.5 加样回收率试验: 取重现性试验下的红景天注射液样品 6 份, 每份 1 mL, 各精密加入 5-羟甲基糠醛对照品适量。

1.2.4.6 色谱适应性试验: 取 3 个不同厂家生产的碳十八烷基键合相色谱柱, 取对照品和供试品溶

液, 按照“1.2.3 项”色谱条件, 分别进样分析。

2 结果

2.1 红景天注射液中 5-羟甲基糠醛保留时间的确定 取供试品溶液和对照品溶液, 按照 1.2.3 的条件分别进样 20 μL 分析, 结果见图 1。



a. 5-羟甲基糠醛对照品; b. 红景天注射液(*5-羟甲基糠醛)

图1 5-羟甲基糠醛对照品及红景天注射液图谱

Fig 1 Map of 5-hydroxymethylfurfural reference substance and Hongjingtian injection

2.2 方法学考察结果

2.2.1 标准曲线的制备结果 按照 1.2.4.1 的方法, 计算回归方程为: $Y=0.079+183.587X$ ($r=0.9999$)。结果表明, 对照品溶液在 0.0625~2.000 $\mu\text{g/mL}$ 之间线性关系良好。

2.2.2 精密度试验结果 按照 1.2.4.2 的方法, 记录 5-羟甲基糠醛的峰面积, 计算峰面积的相对标准偏差 (RSD=0.26%), 可知该方法精密度良好。

2.2.3 重现性试验结果 按照 1.2.4.3 的方法, 记录 5-羟甲基糠醛的峰面积, 计算峰面积的相对标准偏差 (RSD=1.49%), 可知该方法重现性良好。

2.2.4 稳定性试验结果 按照 1.2.4.4 的方法, 记录 5-羟甲基糠醛的色谱峰面积, 计算峰面积的相对标准偏差 (RSD=0.89%), 可知该方法在 16 h 内稳定。

2.2.5 加样回收率试验结果 按照 1.2.4.5 的方法, 测定 5-羟甲基糠醛含量, 平均加样回收率为 98.6%, RSD=0.83%。

2.2.6 色谱适应性试验结果 按照 1.2.4.6 的方法,

分析结果表明,虽然 5-羟甲基糠醛的保留时间有所变化(由于色谱柱不同所致),但是 5-羟甲基糠醛色谱峰的对称性、分离度和塔板数符合分析方法的要求。表明本实验建立的分析方法色谱适应性良好。

表 1 34 批红景天注射液中 5-羟甲基糠醛的含量分析

Tab 1 Analysis of the content of 5-hydroxymethylfurfural in 34 batches of Hongjingtian injection

批号	稀释后测定 5-羟甲基糠醛含量/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	5-羟甲基糠醛含量/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	批号	稀释后测定 5-羟甲基糠醛含量/($\mu\text{g}/\text{mL}$)	5-羟甲基糠醛含量/($\mu\text{g}/\text{mL}$)
50105-1	0.105	2.110	50510-D	0.102	2.046
50106-1	0.120	2.408	50511	0.104	2.078
50107-1	0.182	3.645	50512	0.181	3.613
50108-1	0.208	4.167	50513	0.164	3.282
50109-1	0.159	3.176	50514	0.165	3.303
50110-1	0.250	4.998	50515-B	0.105	2.099
50201-1	0.346	6.927	50601-B	0.092	1.844
50202-1	0.159	3.176	50602	0.088	1.769
50204-1	0.073	1.460	50606-B	0.153	3.069
50505-B	0.070	1.396	50606-C	0.147	2.931
50505-C	0.098	1.950	50607-B	0.153	3.058
50506	0.077	1.535	50607-C	0.149	2.973
50507	0.076	1.513	50608	0.104	2.089
50508	0.086	1.716	41104-1	-	-
50509-C	0.103	2.067	41105-1	-	-
50509-D	0.107	2.142	41202-1	0.066	1.321
50510-C	0.108	2.163	41204-1	0.269	5.371

3 讨论

3.1 色谱分析条件的选择 参照文献方法,略加改动,进行了多种色谱条件的尝试,发现红景天注射液中 5-羟甲基糠醛的含量很低,有的没有检测到相应的色谱峰。另一方面,由于红景天注射液的总固体浓度很高(38~58 mg/mL),直接进样 10~20 μL 都没有达到较好的分离效果。后来改为稀释 10 倍、20 倍进样分析,稀释 20 倍后的分离效果相对较好。

同时,本研究还考察了流动相体系中磷酸浓度的影响,在 0.5%、0.1%、0.01% 3 个浓度下进样分析,发现在 0.01% 磷酸水溶液的洗脱条件相对较好。因此,最后确定了注射液稀释 20 倍,以 0.01% 磷酸水溶液进行洗脱。

3.2 红景天注射液中 5-羟甲基糠醛的含量分析及临床应用安全性 红景天注射液有 5 mL、10 mL 两个规格,临床最大一次使用 20 mL,而葡萄糖注射液常用规格一般为 5%(250 mL)。因此,本研究以药典中葡萄糖注射液中 5-羟甲基糠醛的含量浓度作为红景天注射液的限量浓度进行安全性评价。2015 版药典葡萄糖注射液【检查】中 5-羟甲基糠醛项下规定:“精密量取本品适量(约相当于葡萄糖 1.0 g),置 100 mL 量瓶中,用水稀释至刻度,摇匀,按照紫外可见分光光度法(通则 0401),在 284 nm 波长处

2.3 多批次红景天注射液中 5-羟甲基糠醛的含量分析 按 1.2.1 的方法制备供试液,按 1.2.3 的色谱条件测定,以峰面积代入回归方程中计算 5-羟甲基糠醛的含量,结果见表 1。

测定,吸光度不得大于 0.32”。以此推算,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。将 5-羟甲基糠醛对照品溶液在 284 nm 处测定其吸收度,以对照品溶液浓度作为横坐标,吸收度作为纵坐标,计算得回归方程为: $Y=2.84 \times 10^{-3} + 0.1283X$ ($r=0.9999$),对照品溶液在 0.508~2.540 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间呈良好的线性关系^[10]。根据工作曲线,计算吸收度为 0.32 时相当于 5-羟甲基糠醛浓度为 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。依据稀释 5 倍计算,5%葡萄糖注射液中 5-羟甲基糠醛浓度不超过 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

因此,将 5%葡萄糖注射液中 5-羟甲基糠醛的限量浓度 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 与本文分析的多批次红景天注射液进行比较,以评价注射液的安全性。“2.3.2”项下检查结果表明,34 批次红景天注射液中 5-羟甲基糠醛含量很低,均低于药典规定的葡萄糖注射液中的 5-羟甲基糠醛限量标准,有的注射液中未检出 5-羟甲基糠醛。结合两者临床使用剂量比较,红景天注射液使用体积量(最大 20 mL)至多为葡萄糖注射液的临床使用体积量(250 mL)的 8%,说明在临床使用剂量下,红景天注射液中 5-羟甲基糠醛的量远小于葡萄糖注射液,因此红景天注射液的安全性具有足够的保障。

(下转第 665 页)

- ubiquitylation involves the dynamic regulation of Cbl-Spry2 by intersectin 1 and the Shp2 tyrosine phosphatase[J]. *Mol Cell Biol*, 2014, 34(2):271
- [13] Zhang W, Shen Y, Xiong G, et al. Crystal structure of human Intersectin-2L C2 domain[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013, 431(1):76
- [14] Gu F, Zhang H, Qin F, et al. Intersectin1-S, a multidomain adapter protein, is essential for malignant glioma proliferation[J]. *Glia*, 2015, 63(9):1595
- [15] Russo A, O'Bryan J P. Intersectin 1 is required for neuroblastoma tumorigenesis[J]. *Oncogene*, 2012, 31(46):4828
- [16] Louis C U, Shohet J M. Neuroblastoma: molecular pathogenesis and therapy[J]. *Annu Rev Med*, 2015, 66(1):49
- [17] Pugh T J, Morozova O, Attiyeh E F, et al. The genetic landscape of high-risk neuroblastoma[J]. *Nat Genet*, 2013, 45(3):279
- [18] Hunter M P, Russo A, O'Bryan J P. Emerging roles for Intersectin (ITSN) in regulating signaling and disease pathways [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(4):7829
- [19] Ma Y, Wang B, Li W, et al. Intersectin1-s is involved in migration and invasion of human glioma cells[J]. *J Neurosci Res*, 2011, 89(7):1079
- [20] Jeganathan N, Predescu D, Zhang J. Rac1-mediated cytoskeleton rearrangements induced by intersectin-1s deficiency promotes lung cancer cell proliferation, migration and metastasis [J]. *Molecular Cancer*, 2016, 15(1):59
- [21] Pinon P, WehrleHaller B. Integrins: versatile receptors controlling melanocyte adhesion, migration and proliferation[J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2011, 24(2):282
- [22] Caswell P T, Vadrevu S, Norman J C. Integrins: Masters and slaves of endocytic transport[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2009, 10(12):843
- [23] De Franceschi N, Hamidi H, Alanko J, et al. Integrin traffic-The update[J]. *J Cell Sci*, 2015, 128(5):839
- [24] Henne W M, Boucrot E, Meinecke M, et al. FCHO proteins are nucleators of clathrin-mediated endocytosis[J]. *Science*, 2010, 328(5983):1281
- [25] Mayers J R, Wang L, Pramanik J, et al. Regulation of ubiquitin-dependent cargo sorting by multiple endocytic adaptors at the plasma membrane[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(29):11857
- [26] Sundborger A C, Hinshaw J E. Regulating dynamin dynamics during endocytosis[J]. *F1000 Prime Rep*, 2014, 6:85
- [27] Tsyba L, Nikolaienko O, Dergai O, et al. Intersectin multidomain adaptor proteins: regulation of functional diversity[J]. *Gene*, 2011, 473(2):67
- [28] Gubar O, Morderer D, Tsyba L, et al. Intersectin: the crossroad between vesicle exocytosis and endocytosis[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2013, 4:109
- [29] Koutros S, Schumacher F R, Hayes R B, et al. Pooled analysis of phosphatidylinositol 3-kinase pathway variants and risk of prostate cancer[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(6):2389
- [30] Boller D, Doepfner K T, de Laurentiis A, et al. Targeting PI3KC2beta impairs proliferation and survival in acute leukemia, brain tumours and neuroendocrine tumours[J]. *Anticancer Re*, 2012, 32(8):3015

(2018-12-18 收稿)

(上接第 661 页)

参考文献:

- [1] 国家药典委员会.中国药典(一部)[S].北京:中国医药科技出版社,2015:154
- [2] 孟甜.红景天总鞣质的提取纯化工艺和质量标准研究[D].成都:西华大学,2010:126
- [3] Liu Z L,Chao Z M,Liu Y Y,et al.Maillard reaction involved in the steaming process of the root of Polygonum multiflorum[J]. *Plant Med*, 2009, 75(1):84
- [4] 刘青,李志勇,张洋子,等.葡萄酒中 5-羟甲基糠醛含量的测定[J].*酿酒科技*,2016(11):107
- [5] Zirbes L, Nguyen B K, De Graaf D C, et al. Hydroxymethylfurfural: a possible emergent cause of honey bee mortality [J]. *J Agric Food Chem*, 2013, 61(49):11865
- [6] 温超,王紫梦,石星波,等.食品中丙烯酰胺与 5-羟甲基糠醛的研究进展[J].*食品科学*,2015,36(13):257
- [7] 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
- [8] 艾则孜·穆合买提,贺玖明,孙江浩,等.中药注射液中 5-羟甲基糠醛含量测定的 LC-MS/MS 分析方法研究[J].*药物分析杂志*,2010,30(7):1195
- [9] 国家药典委员会.中国药典(二部)[S].北京:中国医药科技出版社,2015:1270
- [10] 贾晓斌,王晓雷,蔡宝昌,等.含丹参的葡萄糖注射液中 5-羟甲基糠醛的检查方法研究[J].*中成药*,2003,3(25):191

(2019-02-27 收稿)