

HPLC 测定六味地黄浓缩丸中 5-HMF 的含量

蔡银燕, 石婷婷, 黄巧玲* (杭州市第三人民医院, 杭州 310009)

摘要: 目的 建立六味地黄浓缩丸中 5-羟甲基糠醛(5-HMF)的含量测定方法。方法 采用 Agilent Zorbax C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水(20:80); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 280 nm; 柱温: 30 °C。结果 5-HMF 在 0.026 2~2.62 mg·mL⁻¹ 内线性关系良好, 平均回收率为 99.7%, RSD 为 0.57%。结论 该方法简便、快速、准确度高, 可有效控制该制剂中 5-羟甲基糠醛含量。

关键词: 六味地黄浓缩丸; 5-羟甲基糠醛; 高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2012)04-0356-03

Determination of 5-Hydroxymethylfurfural in Liuweidihuang Pills by HPLC

CAI Yinyan, SHI Tingting, HUANG Qiaoling* (*Hangzhou No.3 People's Hospital, Hangzhou 310009, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for the determination of 5-hydroxymethylfurfural(5-HMF) in Liuweidihuang pills. **METHODS** The HPLC method was performed on an Agilent Zorbax C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm) with 284 nm as the detection wavelength, and methanol-water(20:80) was used as mobile phase. The column temperature was 30 °C, and the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. **RESULTS** The regression results which was based on weighted least square method showed a good linearity within the range of 0.026 2–2.62 mg·mL⁻¹, and the average recovery was 99.7% with RSD of 0.57%. **CONCLUSION** The HPLC method was accurate, sensitive and suitable for determining the content of 5-HMF in

作者简介: 蔡银燕, 女, 主管中药师 Tel: 18668118989 E-mail: 34932344@qq.com

*通信作者: 黄巧玲, 女, 副主任药师 Tel: 13600529925 E-mail: HQL6512@163.com

六味地黄浓缩丸是一种常用中成药，由熟地黄、山茱萸(制)、牡丹皮、山药、茯苓、泽泻六味药材组成，该方源于宋代医学家钱乙的《小儿药证直诀》，是滋补肾阴的基础方剂^[1]。现代医学研究表明，六味地黄丸还具有增强免疫、抗衰老、抗疲劳、抗低温、耐缺氧、降血脂、降血压、降血糖、改善肾功能、促进新陈代谢及较好的强壮作用^[2]。

5-羟甲基糠醛(5-HMF)为六味地黄浓缩丸中的主要杂质成分，主要由己糖加热降解产生，在含糖药品的炮制、生产及储存过程中均可能生成^[3]。方中熟地黄、山茱萸(制)中均含有5-HMF^[4]，此外，牡丹皮、山药和泽泻中也含有少量的5-HMF。文献曾报道^[5-6]5-HMF对人体横纹肌及内脏有损害，具有神经毒性。

文献中未见有关该方中5-HMF含量控制的报道。本实验以HPLC测定3个不同厂家生产的六味地黄丸中5-HMF的含量，为进一步控制该药的质量提供依据。

1 仪器与试剂

Agilent 1200型高效液相色谱仪(美国Agilent公司)，包括G1312A四元梯度泵、G1313A自动进样器、G1316A柱温箱、G1315A二极管阵列检测器，Chemstation 6.01色谱工作站；KQ-250B超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)；AL204电子天平、XS105分析天平[梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司]。

5-HMF对照品(US ALDRICH chemistry，批号：H40807-250MG，纯度>98%)。3批六味地黄浓缩丸(九芝堂，批号：201101078；童涵春堂，批号：100909；河南宛西制药，批号：110208)；乙腈、甲醇(色谱纯)；水(重蒸水)；其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 供试品溶液的制备

取六味地黄浓缩丸粉末约0.8 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，精密加入50%甲醇50 mL密塞，称定质量，超声处理(功率100 W，频率40 kHz)15 min，放冷，再称定质量，用50%甲醇补足减失的质量，摇匀，滤过，取续滤液，即得。

2.2 对照品贮备液的制备

精密称取5-HMF对照品13.1 mg置10 mL量瓶中，用甲醇溶解并稀释至刻度，摇匀，作为对照品贮备液。

2.3 阴性供试液的制备

按处方称取除熟地黄、山茱萸、山药、牡丹皮和泽泻外的组分。按“2.1”项下方法制备，作阴性样品供试液。

2.4 色谱条件

Agilent Zorbax C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm，5 μm)，流动相为甲醇-水(20:80)，等度洗脱；检测波长为284 nm，柱温为30℃，流速为1.0 mL·min⁻¹，进样量为10 μL，阴性样品供试液无干扰，结果见图1。

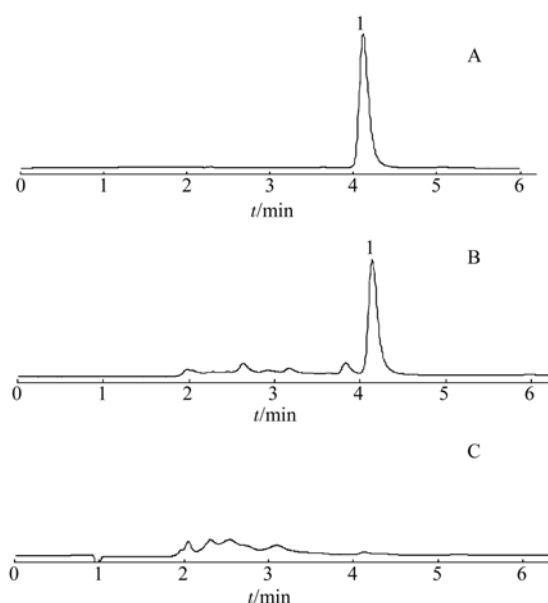


图1 高效液相色谱图

A-5-HMF对照品；B-供试品；C-阴性对照；1-5-羟甲基糠醛

Fig 1 HPLC chromatograms

A-control of 5-HMF; B-sample; C-blank solution; 1-5-HMF

2.4 标准曲线的绘制

精密吸取对照品贮备液1 mL至10 mL容量瓶中，用50%甲醇定容至刻度，制成含5-HMF 0.131 mg·mL⁻¹标准液。取上述对照品溶液，分别进样2，4，6，10，16，20 μL，按“2.4”项下条件测定，以峰面积积分为纵坐标，进样量(μg)为横坐标作标准曲线，得5-HMF回归方程为 $Y=0.000\ 012X+$

0.006 8($r=0.999 6$)。结果表明, 5-HMF 在 0.026 2~2.62 mg·mL⁻¹ 内线性关系良好。

2.5 仪器精密性试验

分别取 0.131 mg·mL⁻¹ 5-HMF 对照品溶液, 连续进样 5 次, 每次进样 10 μ L, 分别测定峰面积值, 计算 5-HMF 峰面积的 RSD 为 0.12%。

2.6 稳定性试验

取六味地黄浓缩丸供试品溶液, 于 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 分别进样 1 次, 记录峰面积, 计算 RSD, 结果 5-HMF 峰面积的 RSD 为 0.82%, 表明供试品溶液在 24 h 内基本稳定。

2.7 重复性试验

按“2.1”项下方法制备供试品溶液 5 份, 每份样品进样 10 μ L, 回归方程求得 5-HMF 的平均含量为 2.03 mg·g⁻¹, 其 RSD 为 1.10%, 表明此法重复性较好。

2.8 回收率试验

取已知含量的六味地黄浓缩丸(批号: 201101078)样品 9 份, 每份约 0.8 g, 精密称定, 分别按样品中含量加入 80%, 100%, 120% 的 5-HMF 对照品, 按“2.1”项下方法, 每个浓度平行制备 3 份。按“2.4”项下条件测定 5-HMF 峰面积, 计算平均回收率为 99.7%, RSD 为 0.57%。结果见表 1。

表 1 回收率试验结果

Tab 1 Results of recovery test

原有量	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
1.655 6	1.310 0	2.966 9	100.1		
1.636 6	1.310 0	2.937 4	99.3		
1.646 8	1.310 0	2.951 6	99.6		
1.657 4	1.572 0	3.210 5	98.8		
1.658 1	1.572 0	3.228 5	99.9	99.7	0.57
1.624 8	1.572 0	3.209 4	100.8		
1.652 9	1.834 0	3.475 9	99.4		
1.633 8	1.834 0	3.460 5	99.6		
1.642 9	1.834 0	3.464 1	99.3		

2.9 样品含量测定

取 3 批六味地黄浓缩丸, 按“2.1”项下方法

平行制备样品 3 份, 步测定 5-HMF 的含量, 结果见表 2。

表 2 不同厂家六味地黄浓缩丸中 5-HMF 的含量($n=3$)

Tab 2 Results of 5-HMF determination in samples($n=3$)

厂家	批号	5-HMF 含量/%
九芝堂	201101078	0.2030 \pm 0.04
童涵春堂	100909	0.4038 \pm 0.07
河南宛西制药	110208	0.5256 \pm 0.09

3 讨论

考察甲醇、70%甲醇溶液、50%甲醇溶液 3 种提取溶剂和甲醇-水(20:80)、乙腈-0.01%磷酸溶液(3:97)2 种流动相, 以 50%甲醇溶液为提取溶剂, 甲醇-水(20:80)为流动相的效果较好, 色谱分离、线性关系、重复性及回收率均符合要求, 可用于六味地黄浓缩丸中 5-HMF 的质量控制。

本实验在参照文献[7]的基础上, 首次建立了六味地黄浓缩丸中 5-HMF 的含量测定方法。实验结果表明, 本制剂在炮制过程中, 5-HMF 的含量显著增加, 分析可能由山茱萸和熟地黄中的其他成分因加热分解转化生成。

REFERENCES

- [1] Ch.P(2010)Vol I (中国药典 2010 年版. 一部) [S]. 2010: 598-599.
- [2] JIANG J P, Liu Wei Di Huang Wan progress determination [J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm(中医药导报), 2010, 16(6): 136-138.
- [3] LI Y H, LU, X Y. Investigation on the origin of 5-HMF in Shengmai Yin decoction by RP-HPLC method [J]. J Zhejiang Univ Sci B(浙江大学学报 B: 英文版), 2005, 6(10): 1015-1021.
- [4] DU W F, CAI H, WANG M Y, et al. Simultaneous determination of six active components in crude and processed Fructus Corni by high performance liquid chromatography [J]. J Pharm Biomed Anal, 2008, 48(1): 194-197.
- [5] XU Q, LI Y H, LU X Y. Investigation on influencing factors of 5-HMF content in Schisandra [J]. J Zhejiang Univ Sci B(浙江大学学报 B: 英文版), 2007, 8(6): 439-445.
- [6] CAO L, ZHAO F, ZHOU Y, XIANG B. Determination of 5-hydroxymethylfurfural in Ribavirin and Glucose injection by HPLC [J]. Chin J Modern Appl Pharm(中国现代应用药学), 2010, 27(4): 348-350.
- [7] BRUSTUGUN J, TONNESEN H H, EDGE R, et al. Formation and reactivity of free radicals in 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde—the effect on isoprenaline photostability [J]. J Photochem Photobiol B, 2005, 79(2): 109-119.

收稿日期: 2011-07-13