

# HPLC 测定蛇胆川贝液中的防腐剂

李丽莉\*, 黄捷

(广西食品药品检验所, 南宁 530021)

**[摘要]** 目的: 建立蛇胆川贝液中 6 种防腐剂的含量测定方法, 评价当前该品种防腐剂的使用情况。方法: 采用 ODS Hypersil C<sub>18</sub> 反相高效液相色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 以甲醇-0.025 mol·L<sup>-1</sup> 磷酸二氢钠为流动相梯度洗脱, 检测波长苯甲酸为 228 nm, 山梨酸、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、对羟基苯甲酸丁酯为 258 nm。结果: 6 种防腐剂完全分离, 回收率为 99.2% ~ 102.0%。结论: 本方法准确易行, 可用于蛇胆川贝液的质量控制。

**[关键词]** 蛇胆川贝液; 防腐剂; 高效液相色谱

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)06-0113-03

## Determination of Preservatives in Shedan Chuanbei Mixture by HPLC

LI Li-li\*, HUANG Jie

(Guangxi Institute for Food and Drug Control, Nanning 530021, China)

**[Abstract]** **Objective:** To bring forward a method of determining 6 preservatives in Shedan chuanbei mixture and figure out the state of quality of preservative in this mixture. **Method:** A ODS Hypersil C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) column was used with menthol-0.025 mol·L<sup>-1</sup> sodium phosphate monobasic as the mobile phase under condition of gradient elution. The detection wavelength of benzoic acid was at 228 nm and the detection wavelength of sorbic acid and parahydroxybenzoate esters were at 258 nm. **Result:** All the 6 preservatives were completely separated, the average recovery was in the range of 99.2% -102.04%. **Conclusion:** The method can be used to control the quality of Shedan chuanbei mixture, which provides the advantage of quickness, simplicity and repeatability.

**[Key words]** Shedan chuanbei mixture; preservative; HPLC

随着人们安全意识的提高, 食品、药品及化妆品中添加剂的安全问题备受关注<sup>[1-5]</sup>。中药合剂、糖浆剂中由于生产工艺的因素及病人服用时可能造成污染, 通常加入防腐剂以防霉变。《中国药典》2005 年版一部规定, 中药合剂、糖浆剂中山梨酸和苯甲酸的用量不得超过 0.3% (其中钾盐、钠盐分别以酸计), 对羟基苯甲酸酯类不得超过 0.05%<sup>[6]</sup>。

蛇胆川贝液为糖浆剂, 具有祛风止咳、除痰散结的功效, 是日常生活中的常用药物。蛇胆川贝液现行标准的制法中有加入防腐剂适量的描述, 但并未明确是何种防腐剂及加入量, 为考察该制剂的质量,

本文建立了 HPLC 测定该制剂中苯甲酸、山梨酸、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、对羟基苯甲酸丁酯等 6 种防腐剂含量的方法。本方法采用程序波长扫描的方法, 较之以往采用双波长同时检测的方法在处理数据方面更直观、简便<sup>[7-8]</sup>。

### 1 材料

美国 Agilent 高效液相色谱仪、Chemstations 色谱工作站, Waters 高效液相色谱仪、Empower 色谱工作站, MILLI-PROA 纯水处理器。

苯甲酸钠 (批号 100433-200301)、对羟基苯甲酸甲酯 (批号 100278-200402)、对羟基苯甲酸乙酯 (批号 100847-200501)、对羟基苯甲酸丙酯 (批号 100444-200401)、对羟基苯甲酸丁酯 (批号 0792-9402) 对照品均为中国药品生物制品检定所提供, 供含量测定用。山梨酸钾为国药集团化学试剂有限

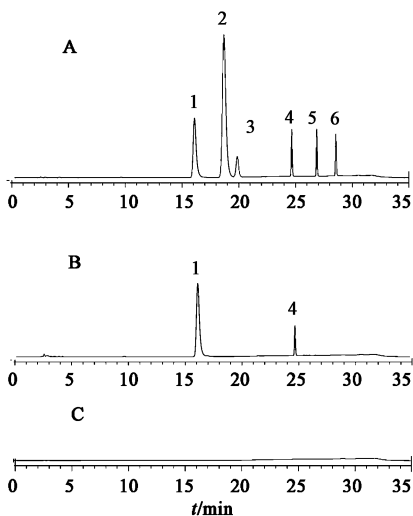
**[收稿日期]** 20110316(007)

**[通讯作者]** \* 李丽莉, 硕士研究生, 主管药师, 从事中药质量控制及安全性研究, Tel: 15977789644, E-mail: moli\_tl@21cn.com

公司,批号 T20080305,优级纯,经中和滴定及 HPLC 测定纯度为 99.76%。甲醇为色谱纯,水为高纯水。蛇胆川贝液为市售 36 个厂家,阴性样品为广西梧州制药集团有限公司提供。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** ODS HYPERSIL C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm),流动相以甲醇(A)-0.025 mol·L<sup>-1</sup>磷酸二氢钠(B)(磷酸调 pH 3.70),相梯度洗脱(0~28 min, 30%~85% A, 70%~15% B),流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 35 °C,检测波长采用程序波长扫描 0~17 min, 228 nm, 17~40 min, 258 nm,即苯甲酸为 228 nm,山梨酸、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、对羟基苯甲酸丁酯为 258 nm。对照品及样品色谱图见图 1。



A. 混合对照品溶液; B. 供试品溶液; C. 阴性样品;  
1. 苯甲酸; 2. 山梨酸; 3. 对羟基苯甲酸甲酯; 4. 对羟基苯甲酸乙酯; 5. 对羟基苯甲酸丙酯; 6. 对羟基苯甲酸丁酯

图 1 蛇胆川贝液液相色谱

**2.2 对照品溶液的制备** 取苯甲酸钠、山梨酸钾、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、对羟基苯甲酸丁酯对照品适量,精密称定,加 50% 甲醇制成每 1 mL 含苯甲酸 60 μg、山梨酸 60 μg、对羟基苯甲酸甲酯 10 μg、对羟基苯甲酸乙酯 10 μg、对羟基苯甲酸丙酯 10 μg、对羟基苯甲酸丁酯 10 μg 的混合溶液,即得。

**2.3 供试品溶液的制备** 精密吸取本品 0.5 mL,置 20 mL 量瓶中,加 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,即得。

**2.4 干扰实验** 取阴性样品,按供试品溶液的制备方法制备并测定,结果阴性样品在与对照品相同保留时间处未显色谱峰,故认为无干扰。

## 2.5 线性关系考察

**2.5.1 储备液的制备** 取苯甲酸钠 10.33 mg、山梨酸钾 13.55 mg,分别置 10 mL 量瓶,加 50% 甲醇溶解并稀释至刻度,得苯甲酸浓度为 0.875 2 g·L<sup>-1</sup>,山梨酸质量浓度为 1.009 4 g·L<sup>-1</sup>;取对羟基苯甲酸甲酯 10.66 mg、对羟基苯甲酸乙酯 10.52 mg、对羟基苯甲酸丙酯 10.42 mg、对羟基苯甲酸丁酯 10.06 mg,置 25 mL 量瓶中,加 50% 甲醇溶解并稀释至刻度,得质量浓度分别为 0.426 4, 0.420 6, 0.416 8, 0.402 4 g·L<sup>-1</sup> 的混合对羟基苯甲酸酯类对照品储备液,备用。

**2.5.2 系列浓度混合对照品溶液的制备** 精密量取苯甲酸钠、山梨酸钾对照品储备液各 0.1 mL、混合对羟基苯甲酸酯类储备液 0.05 mL 置 20 mL 量瓶,加 50% 甲醇至刻度,作为线性 1;精密量取苯甲酸钠、山梨酸钾对照品储备液各 0.5 mL、对羟基苯甲酸酯类储备液 0.1 mL 置 20 mL 量瓶,加 50% 甲醇至刻度,作为线性 2;精密量取苯甲酸钠、山梨酸钾对照品储备液各 1.5 mL、混合对羟基苯甲酸酯类储备液 0.5 mL 置 20 mL 量瓶,加 50% 甲醇至刻度,作为线性 3;精密量取苯甲酸钠、山梨酸钾对照品储备液各 2.0 mL、混合对羟基苯甲酸酯类储备液 1.0 mL 置 20 mL 量瓶,加 50% 甲醇至刻度,作为线性 4;精密量取苯甲酸钠、山梨酸钾对照品储备液各 5.0 mL、混合对羟基苯甲酸酯类储备液 2.0 mL 置 20 mL 量瓶,加 50% 甲醇至刻度,作为线性 5。

分别精密吸取上述 5 水平对照品混合溶液各 10 μL,注入液相色谱仪,测定,以对照品进样量为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)绘制标准曲线,得回归方程:

$$\begin{aligned} \text{苯甲酸: } Y &= 4\,622\,751.752\,1X - 14\,915.023\,4 (r = 0.999\,9) \\ \text{山梨酸: } Y &= 12\,278\,653.775\,1X - 92\,004.029\,0 (r = 0.999\,9) \\ \text{对羟基苯甲酸甲酯: } Y &= 5\,932\,888.807\,5X - 10\,358.682\,4 (r = 0.999\,9) \\ \text{对羟基苯甲酸乙酯: } Y &= 5\,549\,012.585\,0X - 7\,561.741\,0 (r = 0.999\,9) \\ \text{对羟基苯甲酸丙酯: } Y &= 5\,181\,723.779\,1X - 6\,910.802\,0 (r = 0.999\,9) \\ \text{对羟基苯甲酸丁酯: } Y &= 483\,817.813\,1X - 3\,959.104\,3 (r = 0.999\,9) \end{aligned}$$

结果表明苯甲酸在进样量 0.043 76~2.188 μg、山梨酸在 0.050 47~2.523 μg、对羟基苯甲酸甲酯在 0.010 66~0.426 4 μg、对羟基苯甲酸乙酯在 0.010 52~0.420 8 μg、对羟基苯甲酸丙酯在 0.010 42~0.416 8 μg、对羟基苯甲酸丁酯在 0.010 06~0.402 4 μg 线性关

系良好。

## 2.6 加样回收率试验

**2.6.1 加样用对照品溶液的制备** 取对羟基苯甲酸甲酯 18.11 mg、对羟基苯甲酸乙酯 17.45 mg、对羟基苯甲酸丙酯 17.76 mg、对羟基苯甲酸丁酯 16.39 mg,分别置 10 mL 量瓶中,加 50% 甲醇溶解并稀释至刻度,分别精密吸取 3.0 mL,置 20 mL 量瓶中,再加入苯甲酸钠 31.47 mg、山梨酸钾 30.25 mg,加 50% 甲醇溶解并稀释至刻度,混匀,即得。

**2.6.2 加样回收试验** 取阴性样品 0.5 mL,置 20 mL 量瓶中,1~3 份分别精密加入 2.6.1 项下对照品混合溶液 0.5 mL,4~6 份分别精密 1.0 mL,7~9 份分别精密加入 1.5 mL,加 50% 甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,即得。精密吸取 10  $\mu$ L 注入液相色谱仪,测定各组分含量,计算回收率。结果苯甲酸平均回收率为 100.4%,RSD 2.3%,山梨酸平均回收率为 99.6%,RSD 2.7%,对羟基苯甲酸甲酯平均回收率 100.3%,RSD 1.8%,对羟基苯甲酸乙酯平均回收率为 100.6%,RSD 2.8%,对羟基苯甲酸丙酯平均回收率 102.0%,RSD 2.4%,对羟基苯甲酸丁酯平均回收率 102.1%,RSD 2.9%。

**2.7 精密度试验** 取 2.6 项下同一供试液,在 2.1 项色谱条件下连续测定 5 次,记录各峰面积,计算 RSD,结果见表 1,表明精密度良好。

表 1 精密度及稳定性试验( $\bar{x} \pm s, n=5$ ) %

RSD	苯甲酸	山梨酸	对羟基苯甲酸甲酯	对羟基苯甲酸乙酯	对羟基苯甲酸丙酯	对羟基苯甲酸丁酯
精密度	0.5	0.6	0.7	0.5	0.5	0.5
稳定性	0.6	0.8	0.9	0.7	0.7	0.8

**2.8 稳定性试验** 取 2.6 项下同一供试液,按 2.1 项色谱条件分别在 0,2.5,8,12,18 h 测定,记录各峰面积,计算 RSD,结果见表,表明被测物在 18 h 内稳定。

**2.9 样品测定** 对 36 个不同的生产单位随机抽取 1 批样品进行了防腐剂的测试,结果发现 36 个生产厂家使用的防腐剂包括苯甲酸、山梨酸、对羟基苯甲酸乙酯 3 种,其余 3 种未见检出;除 1 家企业使用的防腐剂超出药典规定的限度外其余均在规定的范围内;有 2 家企业的产品说明书上并未标注使用有防腐剂,而实际使用 1~2 种防腐剂;有 6 家企业说明书中只标注使用 1 种防腐剂,而实际使用了 2 种防腐剂;有 1 家生产企业的产品说明书中标示使用的防腐剂品种与实际使用的不同,说明书中标示使用苯甲酸钠,而实际使用的是对羟基苯甲酸乙酯。

## 3 讨论

**3.1 流动相的选择**<sup>[9-10]</sup> 考察了以甲醇-0.025 mol·L<sup>-1</sup>磷酸二氢钠及甲醇-0.03 mol·L<sup>-1</sup>醋酸铵溶液(pH 6.6)两个系统为流动相梯度洗脱的效果,本实验发现前一个系统可将样品中杂质与被测成分良好分离,故选择甲醇-0.025 mol·L<sup>-1</sup>磷酸二氢钠为流动相。

**3.2 流动相 pH 考察** 因被测组分苯甲酸及山梨酸峰型易受 pH 影响,故需考察流动相的酸度。结果表明,用硫酸调 0.025 mol·L<sup>-1</sup>磷酸二氢钠溶液的酸度, pH 为 3.7 时被测组分峰型较好。

**3.3 样品测定结果分析** 测定 36 个厂家的样品,结果防腐剂的使用存在的企业间的差异,使用的品种、数量也不尽相同,甚至有超剂量使用的现象,说明书标示也存在不标或标注不真实的情况。36 个厂家使用的防腐剂包括苯甲酸、山梨酸、对羟基苯甲酸乙酯 3 种,提示我们使用这 3 种防腐剂就已经能达到防止腐败霉变的作用,因此在今后的标准提高工作中,可以在制法中规定防腐剂的品种。

## [参考文献]

- [1] 鞠福龙,李春娟,李东刚. 气相色谱-质谱联用法同时检测调味品中 7 种防腐剂[J]. 中国调味品,2009,10(34):79.
- [2] 王萍,柳玉红. 我国化妆品用防腐剂及分析方法的研究进展[J]. 环境与健康杂志,2007,24(7):557.
- [3] 王建辉,胡家庆,张欣荣,等. 反相高效液相色谱法测定化妆品中几种防腐剂[J]. 日用化学工业,2009,39(2):138.
- [4] 戴翔翎,凌亚,潘青华. 高效液相色谱法测定丁香中防腐剂苯甲酸钠含量[J]. 药物分析杂志,2005,25(12):1502.
- [5] 汪辉,曹小彦,陈利国,等. 高效液相色谱法同时测定蜜饯中五种常见食品添加剂[J]. 分析实验室,2007,26(11):119.
- [6] 中国药典. 一部[S]. 2005:附录 I H, I J.
- [7] 李秀婷. HPLC 法测定糖浆剂、合剂中的防腐剂[J]. 海峡药学,2004,16(4):68.
- [8] 刘青,万一千,吴宏中,等. 液相色谱法测定中药合剂、糖浆剂中苯甲酸、山梨酸和对羟基苯甲酸酯类防腐剂[J]. 中国卫生检验杂志,2002,12(3):288.
- [9] 武婷,王超,王星,等. 反相高效液相色谱法测定化妆品中 24 种防腐剂[J]. 分析化学研究报告,2007,35(10):1439.
- [10] 汪辉,曹小彦,李林,等. 反相高效液相色谱法对果蔬汁饮料中 14 种常见食品添加剂的快速测定[J]. 分析化学研究报告,2009,28(10):1194.

[责任编辑 蔡仲德]