

HPLC 测定 11 种中药口服液中 6 种防腐剂的含量

孙蒙*, 闫小玉, 毕开顺, 陈晓辉
(沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016)

[摘要] 目的:建立 HPLC 同时测定中药口服液体制剂中防腐剂含量的方法。方法:Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈-0.02 mol·L⁻¹ 乙酸铵溶液梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长 240 nm, 柱温 30 °C。结果:苯甲酸、山梨酸、对羟基苯甲酸酯类在 1.0 ~ 181.1 mg·L⁻¹ 线性关系良好($r > 0.999$); 平均回收率 95.5% ~ 100.8% (RSD 0.7% ~ 1.5%)。结论:方法简单、可靠, 精确, 可用于中药口服液体制剂中防腐剂含量的测定。

[关键词] 口服液体制剂; 苯甲酸; 山梨酸; 对羟基苯甲酸酯; 测定

[中图分类号] R284.1 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2012)03-0076-04

Simultaneous Determination of Preservatives in Traditional Chinese Oral Liquid Preparation by HPLC

SUN Meng*, YAN Xiao-yu, BI Kai-shun, CHEN Xiao-hui

(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a HPLC method for simultaneous determination of preservatives in traditional chinese oral liquid preparation. **Method:** The chromatographic separation was achieved on a Kromasil C₁₈ (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) column with acetonitrile-0.02 mol·L⁻¹ ammonium acetate solution as mobile phase (gradient elution). The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the detective wavelength was set at 240 nm, and the column temperature was maintained at 30 °C. **Result:** Benzoic acid, sorbic acid and parahydroxybenzoate ester have a good resolution and linear correlation in certain range, respectively ($r > 0.999$). The average recoveries were 95.5% - 100.8% (RSD 1.5% - 1.8%). **Conclusions:** The method is simple, reliable and accurate for determination of preservatives in traditional chinese oral liquid preparation.

[Key words] oral liquid preparation; benzoic acid; sorbic acid; parahydroxybenzoate ester; determination

防腐剂能抑制微生物的生长和繁殖, 延长药品的保存期限。但过量摄入防腐剂会对人体产生危害。口服液体制剂通常选用苯甲酸、山梨酸和对羟基苯甲酸酯类防腐剂, 在浓度上要求很高, 多了对咽喉刺激性大, 少了达不到防腐效果。苯甲酸对胃、皮肤和黏膜均有一定的刺激性^[1], 山梨酸的不良反应是刺激性和接触性皮炎, 对羟基苯甲酸酯类口服产生延迟型接触性皮炎也有报道^[2]。为保证用药安全, 有必要控制防腐剂的使用和用量。本文建立 HPLC 同时测定苯甲酸、山梨酸和对羟基苯甲酸酯类防腐

剂的含量。

1 仪器与试剂

Hitachi L-2300 高效液相色谱仪及 L-2130 紫外检测器, 旗美 QT-330 柱温箱, BP210S 电子分析天平(德国 Sartorius 公司)。苯甲酸、山梨酸和对羟基苯甲酸甲、乙、丙、丁酯对照品, 纯度 > 98%。乙腈为色谱纯, 乙酸铵为分析纯, 水为娃哈哈水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验 Kromasil C₁₈ 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm, 大连中汇达公司), 流动相乙腈(A)-20 mmol·L⁻¹ 的乙酸铵溶液(B), 梯度洗脱[0 min, A-B(8:92); 9 min, A-B(8:92); 25 min, A-B(85:15)]; 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 240 nm, 柱温 30 °C, 进样量 20 μL。在此色谱条件

[收稿日期] 20110627(010)

[通讯作者] * 孙蒙, 从事药物分析, Tel: 024-23986259, E-mail: 424734643@qq.com

下,对对照品溶液进行分析。苯甲酸、山梨酸和对羟基苯甲酸甲、乙、丙、丁酯的色谱峰与相邻色谱峰的分度度均 >1.5 ,理论塔板数 $>5\ 000$,拖尾因子均在 $0.95\sim 1.05$ 。

2.2 溶液配制

2.2.1 混合对照品溶液 分别取苯甲酸、山梨酸及对羟基苯甲酸甲、乙、丙、丁酯适量,精密称定,分别置于 50 mL 的量瓶中,用流动相溶解稀释至刻度。分别精密量取上述溶液 5 mL 于 50 mL 量瓶中,用流动相稀释至刻度,制成质量浓度分别 $240.6, 241.4, 40.2, 41.6, 41.2, 41.8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 从药店随机购买11种中药口服液。见表1。精密吸取 0.2 mL 于不同 10 mL 量瓶中,以流动相稀释至刻度,摇匀。

表1 中药口服液名称及批号

名称	批号
安神补脑液	1011065
小儿止咳糖浆①	20100146
生脉饮	101205
小儿清热止咳口服液	00274282
双黄连口服液	100917
小儿止咳糖浆②	100903
川贝清肺糖浆	100802
脑心舒口服液	110109
小儿清热止咳糖浆	101208
清开灵口服液	110317
藿香正气水	194017

注:①②为不同生产厂家。

2.3 标准曲线的绘制 精密量取混合对照品溶液 $0.25, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5\text{ mL}$ 分别置于6个 10 mL 量瓶中,以流动相稀释至刻度,摇匀。取上述溶液在上述色谱条件下分别分析,以各对照品溶液的浓度(X)为横坐标,其对应的峰面积(Y)为纵坐标

进行线性回归,各对照品系列浓度在一定范围内与峰面积均呈良好的线性关系,结果见表2。

表2 线性回归方程及相关系数

成分	回归方程	r	线性范围 $/\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
苯甲酸	$Y=6E-7X-0.019\ 5$	0.999 9	$6.0\sim 180.4$
山梨酸	$Y=1E-7X-0.028\ 2$	0.999 8	$6.0\sim 181.1$
对羟基苯甲酸甲酯	$Y=2E-6X-0.028\ 5$	0.999 9	$1.0\sim 30.2$
对羟基苯甲酸乙酯	$Y=2E-6X-0.033\ 5$	0.999 9	$1.0\sim 31.2$
对羟基苯甲酸丙酯	$Y=2E-6X-0.035\ 3$	1	$1.0\sim 30.9$
对羟基苯甲酸丁酯	$Y=2E-6X-0.036\ 3$	0.999 9	$1.0\sim 31.4$

2.4 检测限 取对照品溶液,逐级稀释至各对照品色谱峰峰高分别达到3倍信噪比。得到苯甲酸、山梨酸及对羟基苯甲酸甲、乙、丙、丁酯的检测限分别为 $24.4, 4.1, 9.0, 8.3, 8.7, 9.4\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.5 精密度考察 精密量取混合对照品溶液 2.5 mL 置于 10 mL 量瓶中,以流动相稀释并定容至刻度。分别连续进样5次,测得苯甲酸、山梨酸及对羟基苯甲酸甲、乙、丙、丁酯峰面积RSD分别为 $1.1\%, 1.0\%, 1.1\%, 1.4\%, 1.6\%, 1.6\%$,表明仪器精密度良好。

2.6 重复性与稳定性 精密量取供试品溶液(安神补脑液) 0.2 mL 共6份,分别置于 10 mL 量瓶中,以流动相稀释至刻度。以 $0.22\ \mu\text{m}$ 滤膜过滤后进样分析,测得苯甲酸的RSD为 1.8% ,对羟基苯甲酸乙酯的RSD为 1.1% 。取同一供试品溶液,室温下放置 $0, 2, 4, 8, 12, 24\text{ h}$ 在上述色谱条件下进样分析,测定苯甲酸与对羟基苯甲酸乙酯峰面积RSD分别为 $1.2\%, 1.1\%$ 。

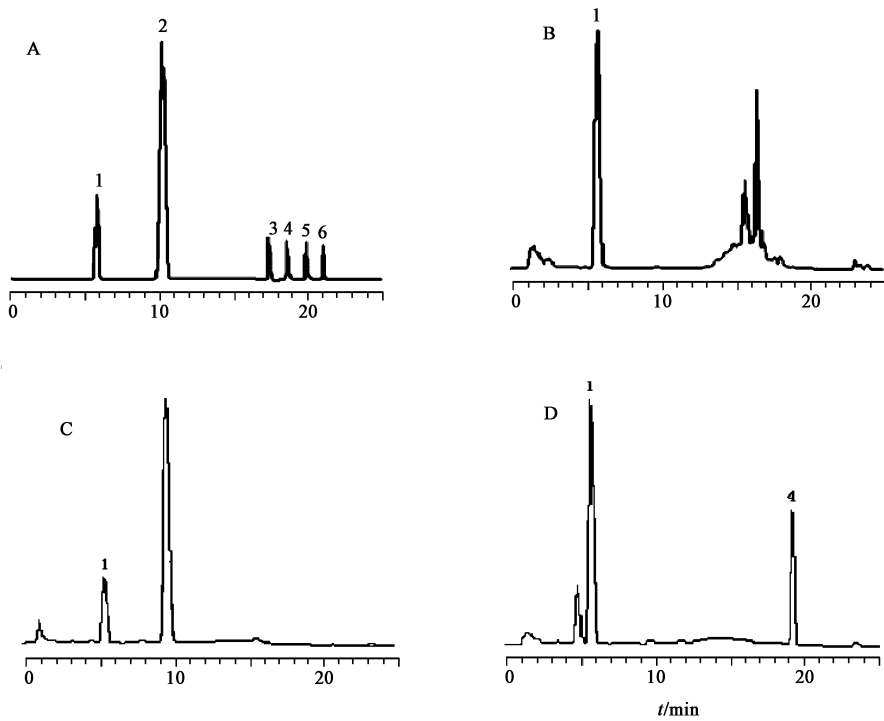
2.7 加样回收率试验 精密量取供试品溶液(安神补脑液) 0.2 mL 共9份,分别置于 10 mL 量瓶中。按低、中、高浓度分别精密加入混合对照品溶液 $1.25, 2.5, 3.75\text{ mL}$,每一浓度3份。以流动相稀释至刻度。在上述色谱条件下进行测定,结果见表3。

表3 安神补脑液中加样回收率试验

分组	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
低浓度	98.7	100.0	100.0	99.4	97.9	97.4
中浓度	96.7	99.9	98.5	98.1	98.1	96.0
高浓度	96.5	98.8	98.7	97.7	98.1	97.2
RSD	1.5	0.8	0.9	1.1	0.7	1.3

2.8 样品测定 对市售的11种中药口服液和糖浆剂按照上述色谱条件进行苯甲酸、山梨酸和对羟基

苯甲酯类防腐剂含量的测定,典型样品色谱图见图1。结果见表4。



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;
A. 对照品; B. 小儿止咳糖浆①; C. 脑心舒口服液; D. 安神补脑液

图 1 对照品及典型样品色谱

表 4 安神补脑液中不同成分测定 (n=3)

中药	%					
	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
安神补脑液	0.21	-	-	0.039	-	-
小儿止咳糖浆①	0.37 ↑	-	-	-	-	-
脑心舒口服液	0.10	0.12	-	-	-	-
小儿清热止咳口服液	0.31 ↑	-	-	-	-	-
藿香正气水	-	-	-	-	-	-
小儿清热止咳糖浆	0.34 ↑	-	-	-	-	-
小儿止咳糖浆②	0.38 ↑	-	-	-	-	-
双黄连口服液	-	-	-	-	-	-
生脉饮	0.20	-	-	0.041	-	-
清开灵口服液	-	-	-	-	-	-
川贝清肺糖浆	0.24	-	-	0.05	-	-

注: ↑表示该成分含量超过《中国药典》(2010)的限度要求。

3 讨论

苯甲酸和山梨酸的最大吸收波长为 230 nm, 对羟基苯甲酸酯类的最大吸收波长为 254 nm。经考察, 当波长 240 nm 时各色谱峰面积大小合适, 选择 240 nm 为检测波长。对流动相系统进行考察, 考察甲醇-20 mmol·L⁻¹乙酸铵溶液、乙腈-10 mmol·L⁻¹乙酸铵溶液和乙腈-20 mmol·L⁻¹乙酸铵溶液的流动相系统, 结果显示乙腈-20 mmol·L⁻¹乙酸铵溶液为流动相系统时基线平稳, 峰型较好且分离时间适

宜, 故选择乙腈-20 mmol·L⁻¹乙酸铵溶液为流动相系统。

对于口服液体剂, 《中国药典》(2010 年版) 第一部附录明确规苯甲酸、山梨酸的含量不得超过 0.3%, 对羟基苯甲酸酯类不得超过 0.05%^[3]。WHO 对该类物质的日允许总摄入量也做了详细规定, 苯甲酸限量为 5 mg·kg⁻¹ 体重; 山梨酸为 25 mg·kg⁻¹ 体重; 对羟基苯甲酸酯类为 10 mg·kg⁻¹ 体重^[4]。由于苯甲酸毒性较大, 世界上许多发达国家已经禁

36种油性中药不皂化物的薄层色谱鉴别研究

巢志茂^{1*}, 张楠², 唐春风³, 王淳¹

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700; 2. 首都医科大学 中医药学院, 北京 100069; 3. 广西药用植物园, 南宁 530023)

[摘要] 目的:对油性中药的不皂化物进行薄层色谱的研究,建立统一的鉴别方法。方法:36种油性中药,以5%氢氧化钾甲醇溶液进行皂化反应,以1 mL含有1 g药材浓度的不皂化物样品溶液薄层点样,以 α -菠菜甾醇、 β -谷甾醇、齐墩果酸和栝楼仁二醇为对照品进行对照,以薄层色谱的显色斑点进行鉴别。结果:各油性中药的不皂化物质在同一条件下均能显示明显的薄层色谱斑点。急性子、牛蒡子、芫蔚子、肉豆蔻、蛇床子、瓜蒌子、女贞子均显示 α -菠菜甾醇的斑点,除急性子、木鳖子、栝楼种子外的所有供试品均显示 β -谷甾醇的斑点,肉豆蔻、瓜蒌子、女贞子均显示齐墩果酸的斑点,栝楼种子、双边栝楼种子均显示栝楼仁二醇的斑点。结论:牛蒡子、芫蔚子、肉豆蔻、蛇床子、女贞子含有 α -菠菜甾醇,肉豆蔻、瓜蒌子含有齐墩果酸,郁李仁含有 β -谷甾醇等,均系首次报道。油性中药的不皂化物质可以在同一条件下进行薄层色谱的比对。

[关键词] 油性中药;薄层色谱;不皂化物; α -菠菜甾醇; β -谷甾醇;齐墩果酸

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2012)03-0079-05

Thin-layer Chromatography of Unsaponifiable Matter from 36 Oily Chinese Materia Medica

CHAO Zhi-mao^{1*}, ZHANG Nan², TANG Chun-feng³, WANG Chun¹

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
2. Capital Medical University School of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100069, China;
3. Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants, Nanning 530023, China)

[Abstract] **Objective:** To establish an identification of the oily Chinese materia medica by thin-layer chromatography (TLC). **Method:** Thirtysix samples of oily Chinese materia medica were collected, saponified with

[收稿日期] 20110615(002)

[基金项目] 留学人员科技活动择优项目(国人厅发[2006]164号,国中医药研2006LHR06号);国家质检总局2012年公益性行业科研专项(201210209)

[通讯作者] *巢志茂,研究员,博士生导师,从事中药化学和分析研究, Tel:010-64014411-2869, E-mail: chaozhimao@yahoo.com.cn

止使用。但从检测结果来看,我国大多数企业仍然以使用苯甲酸为主,且部分口服液中的苯甲酸含量超过标准。在防腐剂含量超标的口服液中,针对儿童的药物占很大比重。可能由于儿童口服药物中糖类成分较高,需加入较大的防腐剂才能保证药物在有效期内的质量。但对于免疫及排毒代谢能力均较弱的儿童,过量的防腐剂会对其健康产生更严重的威胁。使用低毒、高效的对羟基苯甲酸酯类或联合应用防腐剂是解决防腐剂使用过量的途径之一。同时也需要生产企业和国家检验部门对药物质量的严格把关才能从根本上保证消费者的健康。

[参考文献]

- [1] 兰金苹,宁丽峰,张益文,等. 高效液相色谱法测定口服液类药品中苯甲酸的含量[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, 19(1):4.
- [2] 钱水木,叶兴法,倪赤杭. 液体制剂中防腐剂选用的体会[J]. 海峡药学, 2009, 21(3):32.
- [3] 中国药典. 一部[S]. 2010:附录 I H-I J.
- [4] 凌关庭. FAO/WHO 食品添加剂国际编号系统 (INS No) 和截止 1994 年对 ADI 的更新、汇总[J]. 中国食品添加剂, 1996(1):37.

[责任编辑 蔡仲德]