

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.15.023

五味子糖浆中6种抑菌剂筛查与分析

肖引¹, 王皎², 陈江^{1△}

(1. 武警陕西省总队医院临床药理学室, 陕西 西安 710054; 2. 西安国际医学中心, 陕西 西安 710077)

摘要:目的 分析五味子糖浆中抑菌剂种类, 结合制剂的 pH 探讨添加的合理性。方法 收集不同企业样品 10 批, 采用高效液相色谱 (HPLC) 法筛查苯甲酸、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、对羟基苯甲酸丁酯共 6 种抑菌剂。结果 10 批五味子糖浆均检出制法中规定的苯甲酸, 1 家企业除苯甲酸外, 还检出了对羟基苯甲酸乙酯。结论 五味子糖浆 pH 呈酸性, 个别企业添加了不必要的抑菌剂对羟基苯甲酸乙酯。

关键词:五味子糖浆; 抑菌剂; 苯甲酸; 对羟基苯甲酸乙酯; 高效液相色谱法

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2020)15-0084-03

Screening and Analysis of Six Bacteriostatic Agents in Wuweizi Syrup

XIAO Yin¹, WANG Jiao², CHEN Jiang¹

(1. Department of Clinical Pharmaceutics Room, Shaanxi Provincial Armed Police Corps Hospital, Xi'an, Shaanxi, China 710054; 2. Xi'an International Medical Center, Xi'an Shaanxi, China 710077)

Abstract: **Objective** To analyze the kinds of bacteriostatic agents in Wuweizi Syrup and to explore the rationality of adding them in combination with the pH value of the preparation. **Methods** Ten batches of samples from different enterprises were collected. Six kinds of bacteriostatic agents, benzoic acid, sorbic acid, methyl p-hydroxybenzoate, ethyl p-hydroxybenzoate, propyl p-hydroxybenzoate and butyl p-hydroxybenzoate, were screened and analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC). **Results** Benzoic acid that was specified in the manufacturing method was detected in 10 batches of Wuweizi Syrup, and ethyl p-hydroxybenzoate was also detected in one enterprise besides benzoic acid. **Conclusion** The pH value of Wuweizi Syrup is acidic, and some enterprises add unnecessary bacteriostatic ethyl p-hydroxybenzoate.

Key words: Wuweizi Syrup; bacteriostatic agent; benzoic acid; ethyl p-hydroxybenzoate; high performance liquid chromatography

五味子糖浆收载于 2015 年版《中国药典(一部)》, 具有益气生津、补肾宁心功效。其制法为取五味子粉碎成粗粉, 取 100 g, 用 30% 乙醇浸渍 72 h 后, 缓缓渗漉, 收集渗漉液至相当于原药材的 2 倍, 滤过; 另取蔗糖 600 g, 制成糖浆, 加入上述滤液中, 再加入苯甲酸钠及桔子香精适量, 混匀, 加水调至 1 000 mL^[1]。制法显示, 五味子糖浆仅使用苯甲酸钠作为抑菌剂。参考文献[2-3]报道

的高效液相色谱 (HPLC) 法, 本研究中筛查了 3 家不同企业 10 批样品中抑菌剂的使用情况。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

BS224S 型电子分析天平 (德国塞多利斯公司, 精度为 0.1 mg); BP211D 型电子分析天平 (德国塞多利斯公司, 精度为 0.1 mg); AE 240 型电子分析天平 (瑞士梅特

第一作者: 肖引, 女, 大学本科, 副主任药师, 研究方向为药学管理, (电子信箱) 13991358983@139.com。

△通信作者: 陈江, 女, 大学本科, 主管药师, 研究方向为药学管理, (电子信箱) 13991259777@139.com。

俄昔含量测定结果基本一致, 方法耐用性良好。

参考文献:

- [1] 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: 117, 809.
- [2] 刘莉, 袁强华, 宋英. HPLC 波长切换测定小儿鼻敏口服液中 9 个成分的含量[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(11): 1981.
- [3] 王海丽, 蒙蒙. HPLC 法测定儿童回春颗粒中哈巴昔和哈巴俄昔的含量[J]. 西北药学杂志, 2016, 31(6): 584.
- [4] 周婧, 黄维洁, 杨苏蓓, 等. HPLC 法测定双参消痰颗粒中哈巴俄昔和二苯乙炔昔的含量[J]. 中国药房, 2015, 26(30): 4255.
- [5] 李一圣, 李文周, 卫平, 等. HPLC 法测定咽喉清口含片中哈巴俄昔及肉桂酸的含量[J]. 药学研究, 2016, 35(9): 523.
- [6] 宋岚, 邝明, 陈菊. HPLC 法同时测定脉络宁注射液中的

巴昔和哈巴俄昔的含量[J]. 中国生化药物杂志, 2015(8): 173.

- [7] 邵晓鹏, 臧恒昌. HPLC 法测定乳痛安口服液中哈巴俄昔的含量[J]. 药学研究, 2015, 34(12): 703.
- [8] 卜洪鹏, 李凌军, 孙京海, 等. 高效液相色谱波长切换法同时测定四妙勇安颗粒中 6 个主要成分的含量[J]. 中南药学, 2016, 14(1): 69.
- [9] 尹亚梅. HPLC 法同时测定芩翘口服液中的黄芩苷、哈巴俄昔的含量[J]. 中国药师, 2014, 17(11): 1973.
- [10] 吕卓红, 梁欣格, 丁荣徐, 等. HPLC 法同时测定连翘中芦丁、连翘酯苷 A 和哈巴俄昔含量[J]. 亚太传统医药, 2016, 12(6): 42.
- [11] 杨兆丽, 何家靖, 周娟, 等. HPLC 法同时测定银翘清感片中牛蒡苷和哈巴俄昔[J]. 中成药, 2013, 35(7): 1472.

(收稿日期: 2019-11-19; 二次修回日期: 2020-02-15)

勒-托利多公司,精度为0.1 mg);Shimadzu LC 2030 3D型高效液相色谱仪(日本岛津公司);Empower 色谱工作站(美国 Waters 公司);KQ0500-DE 型数控超声波清洗器(昆山舒美超声仪器有限公司,功率为200 W,频率为40 kHz)。

1.2 试药

苯甲酸对照品(批号为100419-201703,含量为99.9%),山梨酸对照品(批号为190126-201501,含量为99.6%),对羟基苯甲酸甲酯对照品(批号为100278-201705,含量为100%),对羟基苯甲酸丙酯对照品(批号为100444-201403,含量为99.6%),对羟基苯甲酸丁酯对照品(批号为110792-200503,含量为100%),均由中国食品药品检定研究院提供;对羟基苯甲酸乙酯对照品(德国 Ehrenstorfer Quality,批号为G128088,含量为99.0%);10批五味子糖浆(市售品,编号为S1~S10)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Phenomenex C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:含0.02 mol/L 乙酸铵的0.08%冰醋酸溶液(A)-甲醇(B),梯度洗脱程度见表1;检测波长:255 nm。理论板数按对羟基苯甲酸乙酯峰计应不低于4 000。

表1 流动相梯度洗脱程序

时间(min)	流动相 A(%)	流动相 B(%)
0	80	20
5	70	30
15	65	35
30	30	70
45	30	70

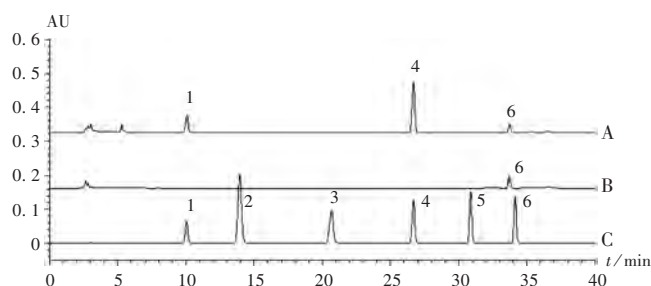
2.2 溶液制备

精密量取样品5 mL,置25 mL容量瓶中,加甲醇适量,超声处理15 min,滤过,滤液作为供试品溶液。取苯甲酸、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、对羟基苯甲酸丁酯对照品,加甲醇制成每1 mL含0.05 mg的混合溶液,作为对照品溶液。精密量取自制苯甲酸阴性五味子糖浆5 mL,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2.2项下3种溶液,按拟订色谱条件各进样5 μL,记录色谱图。阴性对照品溶液色谱中,在与苯甲酸、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、对羟基苯甲酸丁酯混合对照品溶液色谱相应位置上无相应色谱峰。色谱图见图1。

线性关系考察:取苯甲酸9.89 mg、山梨酸8.50 mg、对羟基苯甲酸甲酯9.01 mg、对羟基苯甲酸乙酯9.06 mg、



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. 供试品溶液 B. 阴性对照品溶液 C. 对照品溶液

图1 高效液相色谱图

对羟基苯甲酸丙酯10.41 mg、对羟基苯甲酸丁酯10.26 mg,精密称定,分别置50 mL容量瓶中,加甲醇溶解并定容,作为贮备溶液,将贮备溶液稀释成质量浓度分别为0.197 80, 0.034 00, 0.036 04, 0.036 24, 0.041 64, 0.041 04 mg/mL的混合标准溶液,分别精密吸取2, 6, 10, 15, 20, 25 μL注入高效液相色谱仪,按拟订色谱条件进样分析,记录其峰面积,以进样量(X)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得苯甲酸、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、对羟基苯甲酸丁酯的回归方程分别为 $Y_{\text{苯}} = 437\ 838.2 X_{\text{苯}} (r = 0.999\ 9)$, $Y_{\text{山}} = 10\ 889\ 020 X_{\text{山}} (r = 0.999\ 8)$, $Y_{\text{甲酯}} = 5\ 201\ 898 X_{\text{甲酯}} (r = 0.999\ 9)$, $Y_{\text{乙酯}} = 4\ 837\ 995 X_{\text{乙酯}} (r = 0.999\ 8)$, $Y_{\text{丙酯}} = 4\ 414\ 243 X_{\text{丙酯}} (r = 0.999\ 8)$, $Y_{\text{丁酯}} = 4\ 129\ 725 X_{\text{丁酯}} (r = 0.999\ 8)$ 。结果表明,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、对羟基苯甲酸丁酯进样量分别在0.396~4.945 μg, 0.068~8.50 μg, 0.0721~0.901 μg, 0.0725~0.906 μg, 0.083 28~1.041 μg, 0.082 08~1.026 μg范围内与各峰面积线性关系良好。

精密度试验:精密吸取同一对照品溶液5 μL,重复进样6次,记录各组分的峰面积。结果的RSD在0.28%~0.36%(n=6)范围内,表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取同一供试品溶液,分别于0, 2, 4, 8, 12, 24 h时按拟订色谱条件进样测定,记录苯甲酸和对羟基苯甲酸乙酯的峰面积。结果的RSD分别为0.23%和0.26%(n=6),表明供试品溶液在24 h内稳定。

重复性试验:取同一批(批号为170201)样品,平行量取6份,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件测定。结果样品中苯甲酸的平均含量为1.475 mg/mL、RSD为1.80%(n=6),对羟基苯甲酸乙酯的含量为0.425 mg/mL、RSD为1.79%(n=6),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取同一批(批号为170201)样品,精密量取6份,每份2.5 mL,分别置容量瓶中,再各精密加入混合对照品溶液5 mL(苯甲酸质量浓度为0.739 6 mg/mL,

表2 加样回收试验结果($n=6$)

样品含量(mg)		加入量(mg)		测得量(mg)		回收率(%)		$\bar{X}$ (%)		RSD(%)	
A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
3.687 5	1.062 5	3.698	1.001	7.266 6	2.032 1	96.78	96.86				
3.687 5	1.062 5	3.698	1.001	7.246 6	2.018 3	96.24	95.48				
3.687 5	1.062 5	3.698	1.001	7.267 8	2.029 4	96.82	96.59	97.68	97.53	1.47	1.83
3.687 5	1.062 5	3.698	1.001	7.331 9	2.045 9	98.55	98.24				
3.687 5	1.062 5	3.698	1.001	7.389 9	2.070 1	100.12	100.66				
3.687 5	1.062 5	3.698	1.001	7.297 2	2.037 1	97.61	97.36				

注:A为苯甲酸,B为对羟基苯甲酸乙酯。

表3 10批样品抑菌剂含量测定结果(mg/mL)

样品编号	苯甲酸	对羟基苯甲酸乙酯	样品编号	苯甲酸	对羟基苯甲酸乙酯
S1	1.485	0.410	S6	0.13	未检出
S2	1.510	0.415	S7	0.23	未检出
S3	1.505	0.425	S8	0.13	未检出
S4	0.19	未检出	S9	0.09	未检出
S5	0.09	未检出	S10	0.14	未检出

山梨酸质量浓度为1.244 mg/mL、对羟基苯甲酸甲酯质量浓度为0.463 6 mg/mL、对羟基苯甲酸乙酯质量浓度为0.200 2 mg/mL、对羟基苯甲酸丙酯质量浓度为0.474 mg/mL、对羟基苯甲酸丁酯质量浓度为0.418 4 mg/mL,依法制备供试品溶液,精密吸取5 μ L,按拟订色谱条件进样测定,并计算回收率。结果见表2。

2.4 样品含量测定

取10批五味子糖浆,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定,记录峰面积,计算苯甲酸及对羟基苯甲酸乙酯的含量。结果见表3。

3 讨论

防腐剂有苯甲酸、山梨酸、尼泊金类、苯扎氯铵类等,在多数情况下是安全的,但选择不当或超剂量使用会产生不良反应,危害人体健康^[4-5]。2015年版《中国药典(四部)》规定了糖浆剂中添加防腐剂含量:山梨酸和苯甲酸的用量不得超过0.3%(其钾盐、钠盐的用量分别按酸计),羟苯酯类的用量不得超过0.05%^[6]。苯甲酸抑菌剂对细菌的最适pH为2.5~4.0。分子态苯甲酸的抑菌活性较离子态高,在pH<4时,完全抑制的最低浓度为0.05%~0.1%;当pH>6时,抑菌活性显著降低。对羟基苯甲酸酯即尼泊金酯是国际公认的广谱性高效安全的食品防腐剂,广泛用于食品、化妆品及医药等行业^[7-9]。

结合文献[10-15],本研究中建立了五味子糖浆抑菌剂的筛查方法。10批样品的苯甲酸含量差异不同,较低含量可能原因为糖浆剂长期放置过程中部分抑菌剂存在降解,试验结果为企业添加防腐剂限量提供了参考意义。

尼泊金酯类(对羟基苯甲酸乙酯)防腐剂对霉菌、酵母菌和细菌有广泛的抗菌作用,该防腐剂的作用在于未电离分子发挥抗菌活性,抑制微生物细胞的呼吸酶系与

电子传递酶系的活性,以及破坏微生物的细胞膜结构;且随着烷链的增加抗菌效力增强,适用于中性溶液的防腐。但通过检测10批样品的pH,测定结果均在2.58~3.79之间,表明五味子糖浆使用苯甲酸抑菌剂具有合理性。但没有必要再使用对羟基苯甲酸乙酯防腐剂,且存在擅自改变工艺添加抑菌剂的风险。

参考文献:

- [1] 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,2015:616.
- [2] 龙朝阳,许秀敏. 食品中4种常用尼泊金酯的高效液相色谱法测定[J]. 中国卫生检验杂志,2005,15(1):66-67.
- [3] 程春梅,董刘敏,师邱毅,等. 超高效液相色谱法检测饮料中安赛蜜、糖精钠、苯甲酸、山梨酸含量[J]. 江苏农业科学,2012,40(5):282-283.
- [4] 郑策,梅丹,王兰,等. 关注制剂中辅料的不良反应[J]. 中国医学杂志,2005,39(9):644-649.
- [5] 梁莹,庞振国,崔炳群. 无糖食品甜味剂的应用及其安全性[J]. 现代食品科技,2009,25(8):964-966.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:20.
- [7] 万素英,李琳,王慧君. 食品防腐和食品防腐剂[M]. 北京:中国轻工业出版社,1998:3-8.
- [8] 陈效贵. 食品防腐剂的技术发展趋势[J]. 江苏调味品,2001(1):79.
- [9] 段杉,彭喜春,彭志英. 新型食品添加剂[J]. 中国食品添加剂,2002(4):62-65.
- [10] 田海燕,李智慧. HPLC法同时测定吡诺克辛钠滴眼液中不同抑菌剂的含量[J]. 中国药事,2017,31(2):150-155.
- [11] 田洁,彭博,吴世杰,等. HPLC法同时测定市售滴眼液中4种抑菌剂的含量[J]. 中国药房,2017,28(15):2134-2137.
- [12] 夏方亮,王玉林,李奕婧,等. UPLC法定20种滴眼液中的9种常用抑菌剂[J]. 中国医药工业杂志,2018,49(2):234-238.
- [13] 肖瑶,杨梅,陈红. 超高效液相色谱串联质谱法测定滴眼液中6种抑菌剂含量[J]. 中国抗生素杂志,2019,44(6):701-705.
- [14] 戴丽娜,毛睿,陈泳君. 高效液相色谱法测定消旋山莨菪碱滴眼液中抑菌剂含量[J]. 中国药业,2018,27(23):31-34.
- [15] 林文鑫,孙逸威,管章委,等. 硝酸咪康唑乳膏中9种抑菌剂的HPLC法测定[J]. 中国医药工业杂志,2018,49(1):103-106.

(收稿日期:2019-03-04)