

中图分类号: R932; R286.0 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)21-0094-04  
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.21.021



## 基于色谱法筛查及验证杞菊地黄口服液抑菌剂\*

吴芳, 王梦琪, 罗定强, 杨燕子, 戴涌<sup>△</sup>

(陕西省食品药品监督检验研究院, 陕西 西安 710065)

**摘要:**目的 筛查并验证杞菊地黄口服液中的抑菌剂。方法 采用高效液相色谱(HPLC)法测定苯甲酸、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含量, 色谱柱为 Welch Ultimate Plus C<sub>18</sub> 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.02 mol/L 乙酸铵溶液(梯度洗脱), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 255 nm, 柱温为 35 °C, 进样量为 20 μL; 采用液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)法验证制剂中的对羟基苯甲酸乙酯。结果 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进样量分别在 0.065 97~3.298 5 μg、0.051 71~2.585 5 μg、0.034 36~1.718 0 μg、0.015 18~0.759 0 μg、0.031 67~1.583 5 μg、0.035 48~1.774 0 μg 范围内与峰面积响应值线性关系良好( $r \geq 0.999 9, n = 7$ ); 精密度、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 2.0%; 加样回收率分别为 102.61%, 103.00%, 99.53%, 95.95%, 100.10%, 100.45%, RSD 分别为 0.90%, 0.50%, 0.57%, 0.14%, 0.39%, 0.43% ( $n = 6$ )。12 批样品违规使用对羟基苯甲酸乙酯, 5 批样品未检出药品说明书中规定的抑菌剂。结论 所建立的方法科学、简便、专属性较强, 可用于口服液中常见 6 种抑菌剂的快速筛查。杞菊地黄口服液中抑菌剂的使用种类及用量存在与标示不符的情况。

**关键词:** 杞菊地黄口服液; 抑菌剂; 对羟基苯甲酸乙酯; 高效液相色谱法; 液相色谱串联质谱法

### Screening and Verification of Bacteriostatic Agents in Qiju Dihuang Oral Liquid by Chromatography

WU Fang, WANG Mengqi, LUO Dingqiang, YANG Yanzi, DAI Yong

(Shaanxi Institute for Food and Drug Control, Xi'an, Shaanxi, China 710065)

**Abstract: Objective** To screen and verify the antibacterial agents in Qiju Dihuang Oral Liquid. **Methods** High-performance liquid chromatography (HPLC) method was used to determine the contents of benzoic acid, sorbic acid, methyl 4-hydroxybenzoate, ethyl 4-hydroxybenzoate, propyl 4-hydroxybenzoate, butyl 4-hydroxybenzoate, the chromatographic column was Welch Ultimate Plus C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-0.02 mol/L ammonium acetate solution (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 255 nm, the column temperature was 35 °C, and the injection volume was 20 μL. The liquid chromatography tandem-mass spectrometry (LC-MS/MS) was used to verify the ethylparaben in the preparation. **Results** The linear ranges of benzoic acid, sorbic acid, methyl 4-hydroxybenzoate, ethyl 4-hydroxybenzoate, propyl 4-hydroxybenzoate, butyl 4-hydroxybenzoate were 0.065 97-3.298 5 μg, 0.051 71-2.585 5 μg, 0.034 36-1.718 0 μg, 0.015 18-0.759 0 μg, 0.031 67-1.583 5 μg, 0.035 48-1.774 0 μg ( $r \geq 0.999 9, n = 7$ ). The RSDs of precision, stability, and repeatability test results were all lower than 2.0%. The recovery rates of benzoic acid, sorbic acid, methyl 4-hydroxybenzoate, ethyl 4-hydroxybenzoate, propyl 4-hydroxybenzoate, butyl 4-hydroxybenzoate were 102.61%, 103.00%, 99.53%, 95.95%, 100.10%, and 100.45%, with RSDs of 0.90%, 0.50%, 0.57%, 0.14%, 0.39%, and 0.43% ( $n = 6$ ), respectively. Illegal use of ethylparaben in the samples was confirmed in 12 batches of samples. No bacteriostatic agents labelled in the drug manual were detected in five batches of samples. **Conclusion** The established method is scientific, simple, and highly specific, which can be used for rapid screening of six common bacteriostatic agents in oral fluid. There is a discrepancy between the varieties and amounts of bacteriostatic agents used in Qiju Dihuang Oral Liquid and the labeling.

**Key words:** Qiju Dihuang Oral Liquid; bacteriostatic agents; ethylparaben; HPLC; LC-MS/MS

中药口服液制剂的生产过程中,常用苯甲酸、山梨酸、对羟基苯甲酸酯类等作为抑菌剂<sup>[1-2]</sup>,以抑制微生物的生长和繁殖,在有效期内保证药品的质量。但部分抑菌剂对人体可产生一定毒副作用,如苯甲酸钠对肝肾有一定损害,长时间大量摄入可能引起哮喘、荨麻疹

等不良反应;对羟基苯甲酸酯类有弱雌激素活性。2020年版《中国药典》及药品说明书、药品标准中均对允许使用的抑菌剂品种和使用量有明确规定,生产时不可随意更改。杞菊地黄口服液由枸杞子、菊花、熟地等8味中药材组方,具有滋肾养肝功效。现行质量标准收载于

\*基金项目:陕西省重点研发计划项目[2023-YBSF-472];陕西省药品科学监管和监管科学研究项目[SXYJ202209]。

第一作者:吴芳,女,硕士研究生,副主任药师,研究方向为中药质量与标准,(电话)029-62288444(电子信箱)8681070@qq.com。

<sup>△</sup>通信作者:戴涌,女,大学本科,主任药师,研究方向为药品质量控制,(电话)029-62288406(电子信箱)daiyong\_1031@show.com。

《卫生部部颁标准·中药成方制剂第十一册》WS<sub>3</sub>-B-2146-96,对抑菌剂的描述为“加入抑菌剂适量”,规定不明确,但其药品说明书和外包装中均明确标示了品种和用量。为防止部分企业增添、更改抑菌剂的用量及品种,本研究中建立了常用抑菌剂的筛查及验证方法,并对市场上的杞菊地黄口服液进行了筛查。现报道如下。

## 1 仪器与试药

### 1.1 仪器

LC2030-3D型高效液相色谱(HPLC)仪(日本Shimadzu公司);BP211D型电子分析天平(德国Sartorius公司,精度为0.01 mg);Qtrap5500型液相色谱串联质谱(LC-MS/MS)仪(美国AB公司)。

### 1.2 试药

苯甲酸对照品(批号为100419-201703,纯度为99.9%),山梨酸对照品(批号为190126-201501,纯度为99.6%),对羟基苯甲酸甲酯对照品(批号为100278-201705,纯度为100%),对羟基苯甲酸丙酯对照品(批号为100444-201403,纯度为99.6%),对羟基苯甲酸丁酯对照品(批号为110792-200503,纯度为100%),均购自中国食品药品检定研究院;对羟基苯甲酸乙酯对照品(德国Dr. Ehrenstorfer Quality公司,批号为G128088,纯度为99.0%);乙酸铵(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);乙腈(色谱纯);杞菊地黄口服液(7家生产企业,共65批,其中批号为170901的用于含量测定)。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Welch Ultimate Plus C<sub>18</sub>柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈(A)-0.02 mol/L乙酸铵溶液(B),梯度洗脱(0~9 min时3%A,9~45 min时3%A→85%A);流速:1.0 mL/min;检测波长:255 nm;柱温:35℃;进样量:20 μL。

### 2.2 溶液制备

供试品溶液:精密量取样品1 mL,置50 mL容量瓶中,加乙腈-0.02 mol/L乙酸铵溶液(6:94, V/V)溶解并定容,摇匀,滤过,即得。

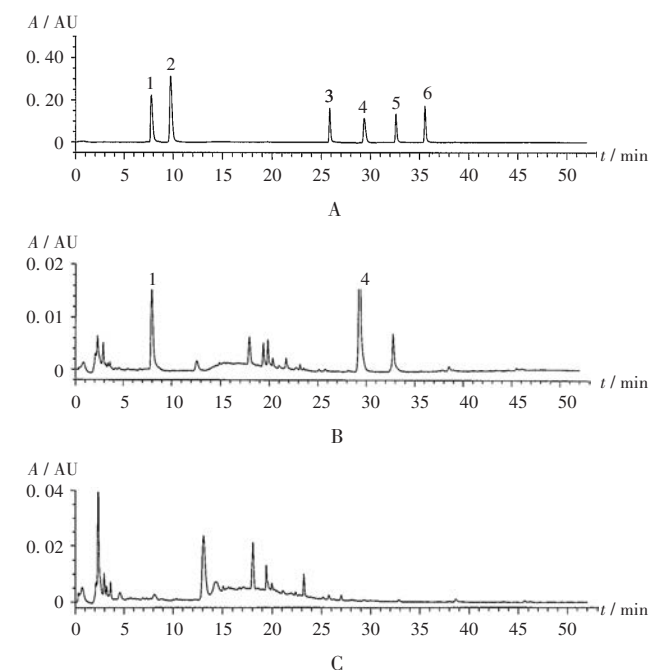
对照品溶液:分别取苯甲酸对照品16.51 mg、山梨酸对照品12.98 mg、对羟基苯甲酸乙酯对照品19.16 mg,精密称定,分别置50 mL容量瓶中,加乙腈-0.02 mol/L乙酸铵溶液(6:94, V/V)适量使溶解,定容,摇匀,制成质量浓度分别为329.870, 258.562, 379.368 μg/mL的对照品贮备液;取对羟基苯甲酸甲酯对照品8.59 mg、对羟基苯甲酸丙酯对照品7.95 mg、对羟基苯甲酸丁酯对照品8.87 mg,精密称定,置同一50 mL容量瓶中,加乙腈-0.02 mol/L乙酸铵溶液(6:94, V/V)适量使溶

解,定容,摇匀,制成质量浓度分别为171.800, 158.364, 177.400 μg/mL的混合对照品贮备液。精密量取苯甲酸对照品贮备液、山梨酸对照品贮备液各5 mL,对羟基苯甲酸乙酯对照品贮备液1 mL,对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、对羟基苯甲酸丁酯混合对照品贮备液5 mL,置同一25 mL容量瓶中,加乙腈-0.02 mol/L乙酸铵溶液(6:94, V/V)稀释并定容,摇匀,制成质量浓度分别为65.97, 51.71, 15.18, 34.36, 31.67, 35.48 μg/mL的混合对照品溶液。

阴性对照品溶液:按处方工艺制备不含抑菌剂的阴性样品,精密量取阴性样品1 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项下供试品溶液、混合对照品溶液、阴性对照品溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样测定。结果对照品溶液和供试品溶液中各色谱峰的分度良好,供试品溶液(批号为170901)中检出苯甲酸和对羟基苯甲酸乙酯,且阴性对照无干扰。色谱图见图1。



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. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液(批号为170901) C. 阴性对照品溶液

图1 高效液相色谱图

1. Benzoic acid 2. Sorbic acid 3. Methyl 4-hydroxybenzoate 4. Ethyl 4-hydroxybenzoate 5. Propyl 4-hydroxybenzoate 6. Butyl 4-hydroxybenzoate

A. Mixed reference solution B. Test solution (batch number:170901)  
C. Negative reference solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

线性关系考察与检测限确定:精密量取2.2项下混合对照品溶液1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 15.0, 25.0, 50.0  $\mu\text{L}$ , 按2.1项下色谱条件分别进样测定,以各抑菌剂的进样量( $X, \mu\text{g}$ )为横坐标、峰面积响应值( $Y$ )为纵坐标进行线性回归;以各抑菌剂响应值信噪比( $S/N$ )为3:1时的含量为检测限。结果见表1。

表1 6种抑菌剂线性关系考察与检测限确定结果( $n=7$ )

Tab.1 Results of the linear relation test and the limit of detection of six bacteriostatic agents( $n=7$ )

抑菌剂	回归方程	$r$	线性范围( $\mu\text{g}$ )	检测限( $\mu\text{g}$ )
苯甲酸	$Y=3.62 \times 10^3 X - 24.2$	1.000 0	0.065 97~3.298 5	0.010
山梨酸	$Y=1.32 \times 10^3 X - 9.94 \times 10^3$	1.000 0	0.051 71~2.585 5	0.010
对羟基苯甲酸甲酯	$Y=5.87 \times 10^4 X + 4.56 \times 10^4$	0.999 9	0.034 36~1.718 0	0.002
对羟基苯甲酸乙酯	$Y=5.68 \times 10^4 X + 5.09 \times 10^4$	0.999 9	0.015 18~0.759 0	0.002
对羟基苯甲酸丙酯	$Y=5.18 \times 10^4 X + 2.27 \times 10^4$	0.999 9	0.031 67~1.583 5	0.002
对羟基苯甲酸丁酯	$Y=4.83 \times 10^4 X + 2.31 \times 10^4$	0.999 9	0.035 48~1.774 0	0.002

精密度试验:分别精密量取2.2项下苯甲酸对照品溶液、山梨酸对照品贮备液各5 mL,对羟基苯甲酸乙酯对照品贮备液1 mL,对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、对羟基苯甲酸丁酯混合对照品贮备液5 mL,置同一50 mL容量瓶中,加乙腈-0.02 mol/L乙酸铵溶液(6:94, V/V)稀释并定容,摇匀,制成质量浓度分别为32.987, 25.856, 7.587, 17.180, 15.836, 17.740  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合对照品溶液,精密量取上述对照品溶液各适量,按2.1项下色谱条件重复进样测定6次,记录峰面积。结果苯甲酸、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、对羟基苯甲酸丁酯色谱峰面积的RSD分别为0.61%, 0.13%, 0.12%, 0.22%, 0.40%, 0.31%( $n=6$ ),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:精密量取样品(批号为170901)1 mL,按2.2项下方法制备供试品溶液,分别于制备后0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 h时按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果苯甲酸、对羟基苯甲酸乙酯峰面积的RSD分别为0.41%和0.44%( $n=7$ ),表明供试品溶液在常温下24 h内稳定性良好。

重复性试验:精密量取样品(批号为170901)1 mL,按2.2项下方法制备供试品溶液,平行6份,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果苯甲酸和对羟基苯甲酸乙酯含量的RSD分别为0.81%和0.34%( $n=6$ ),表明方法重复性良好。

加样回收试验:精密量取样品(批号为170901)0.5 mL,置50 mL容量瓶中,精密量取苯甲酸、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溶液(质量浓度分别为329.870, 258.562, 171.800, 37.937, 158.364, 177.400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

各3 mL,置同一50 mL容量瓶中,加乙腈-0.02 mol/L乙酸铵溶液(6:94, V/V)稀释并定容,摇匀,平行制备6份,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果见表2。

表2 加样回收试验结果( $n=6$ )

Tab.2 Results of the recovery test( $n=6$ )

抑菌剂	样品含量( $\mu\text{g}$ )	加入量( $\mu\text{g}$ )	测得量( $\mu\text{g}$ )	回收率(%)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
苯甲酸	1210.504	989.610	2228.100	102.83	102.61	0.90
	1210.504	989.610	2231.450	103.17		
	1210.504	989.610	2207.800	100.78		
	1210.504	989.610	2232.250	103.25		
	1210.504	989.610	2226.550	102.67		
	1210.504	989.610	2229.400	102.96		
山梨酸	0	775.686	800.064	103.14	103.00	0.50
	0	775.686	800.906	103.25		
	0	775.686	790.921	101.96		
	0	775.686	800.518	103.20		
	0	775.686	800.573	103.21		
	0	775.686	800.906	103.25		
对羟基苯甲酸甲酯	0	515.400	516.002	100.12	99.53	0.57
	0	515.400	511.504	99.24		
	0	515.400	507.836	98.53		
	0	515.400	514.761	99.88		
	0	515.400	513.463	99.62		
	0	515.400	514.320	99.79		
对羟基苯甲酸乙酯	128.467	113.810	237.627	95.91	95.95	0.14
	128.467	113.810	237.692	95.97		
	128.467	113.810	237.748	96.02		
	128.467	113.810	237.787	96.05		
	128.467	113.810	237.764	96.03		
	128.467	113.810	237.387	95.70		
对羟基苯甲酸丙酯	0	475.092	477.592	100.53	100.10	0.39
	0	475.092	476.194	100.23		
	0	475.092	472.119	99.37		
	0	475.092	475.723	100.13		
	0	475.092	475.598	100.11		
	0	475.092	476.282	100.25		
对羟基苯甲酸丁酯	0	532.200	537.785	101.05	100.45	0.43
	0	532.200	533.689	100.28		
	0	532.200	530.796	99.74		
	0	532.200	535.026	100.53		
	0	532.200	535.599	100.64		
	0	532.200	534.808	100.49		

## 2.4 LC-MS/MS 法验证

采用LC法对全部样品进行初步筛查,有12批样品的色谱图中除检出标示的抑菌剂苯甲酸的色谱峰外,还检出疑似对羟基苯甲酸乙酯色谱峰。故采用LC-MS/MS法对可疑色谱峰进行确证,检测模式为多反应监测

(MRM)模式;离子源为电喷雾电离(ESI);碰撞气为氮气;扫描方式为负离子扫描;母离子质荷比( $m/z$ )为165.000;子离子 $m/z$ 为137.100,91.900,去簇电压(DP)均为-80.000 V,碰撞电压(CE)为-18.000 V和-28.000 V。结果对羟基苯甲酸乙酯对照品溶液和2批供试品溶液离子对色谱峰的相对保留时间均为4.26;离子比率分别为64.60%,63.86%,65.23%,偏差均小于±10%。故确认该色谱峰为对羟基苯甲酸乙酯。

### 2.5 样品中抑菌剂含量测定

取65批样品,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定。样品中抑菌剂含量测定异常(含量不足或品种不符)结果见表3,其余结果均符合规定。

表3 样品中抑菌剂含量测定异常(含量不足或品种不符)结果

Tab. 3 Results of abnormal content determination (insufficient content or different varieties) of bacteriostatic agents in samples

批次	标示的抑菌剂品种(含量)	测定结果
1	山梨酸钾(0.2%)	山梨酸钾(0.11%)
47	苯甲酸钠(0.3%)	苯甲酸钠(0.15%~0.30%)
12	苯甲酸钠(0.3%)	苯甲酸钠(0.16%~0.23%),对羟基苯甲酸乙酯(0.021%~0.028%)
5	苯甲酸钠(0.2%)	未检出

### 3 讨论

目前,抑菌剂含量测定方法多采用HPLC法<sup>[3-8]</sup>、超高效液相色谱串联质谱法<sup>[9]</sup>和气相色谱法<sup>[10-12]</sup>。本研究中采用HPLC法进行筛查,采用LC-MS/MS法对筛查出的可疑样品进行验证,杜绝了误判的可能,达到了快速、准确、可靠的检测目的。流动相体系考察了乙腈-三乙胺溶液、甲醇-乙酸铵溶液、乙腈-0.02 mol/L乙酸铵溶液等,结果以乙腈-0.02 mol/L乙酸铵溶液梯度洗脱时,基线平稳,色谱峰分离度良好,故选择此溶液为流动相。根据测定结果,65批样品中6种抑菌剂的含量均未超过2020年版《中国药典(二部)》规定量的上限。但其中5批样品未检出药品说明书中规定的抑菌剂,12批样品实际使用的抑菌剂品种与药品说明书或处方规定不符。

个别药品生产企业扩大范围使用抑菌剂对羟基苯甲酸乙酯,中药口服液通常呈酸性,杞菊地黄口服液的pH值为3~4。目前广泛使用的抑菌剂主要有苯甲酸钠(钠)和山梨酸(钾),对羟基苯甲酸酯类抑菌剂更适用于中性溶液,未批准用于杞菊地黄口服液,不仅达不到防腐、抑菌作用,还会危害患者的健康<sup>[13-15]</sup>。故建议新

增相应检验方法,以加强监管,规范生产。选择抑菌剂时,除考虑制剂pH值的影响外,还应考虑制剂的长期稳定性,以及与辅料和包装材料的相容性,最佳使用量应为保证产品的抑菌体系有效的最低使用量,同时浓度应低于对人体的有害浓度。

### 参考文献

- [1] 孙蒙,闫小玉,毕开顺,等. HPLC法测定11种中药口服液中6种抑菌剂的含量[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(3):76-79.
- [2] 王宏亮,陈盼盼,何计龙,等. HPLC测定口服液体剂中抑菌剂和甜味剂的含量[J]. 中国现代应用药学,2015,32(7):844-847.
- [3] 黄佳,杜艳琼,吴沛佳,等. HPLC法测定硫糖铝凝胶中3种抑菌剂的含量[J]. 西北药学杂志,2017,32(5):585-587.
- [4] 陈再洁,陈艳芝,吴小梅,等. 高效液相色谱法同时测定复方硫酸新霉素滴眼液中7种抑菌剂[J]. 中国药业,2022,31(7):82-85.
- [5] 肖引,王皎,陈江. 五味子糖浆中6种抑菌剂筛查与分析[J]. 中国药业,2020,29(15):84-86.
- [6] 陈蓉. 珍珠明目滴眼液中抑菌剂尼泊金乙酯的含量测定[J]. 中国药事,2014,28(8):884-887.
- [7] 符传武,覃子龙. RP-HPLC法测定食用动物油脂中苯甲酸与山梨酸的含量[J]. 中国酿造,2014,33(1):143-146.
- [8] 刘佟,王浩,苗雨田,等. 高效液相色谱法同时测定食品中7种抑菌剂[J]. 食品安全质量检测学报,2015,6(4):1148-1153.
- [9] 吴刚,赵珊红,吴俭俭,等. 基于超高效液相色谱-串联质谱法的纺织品中7种尼泊金酯类抑菌剂测定[J]. 纺织学报,2012,33(1):96-101.
- [10] 赵培莉,吴静明,张毅,等. 气相色谱法同时测定中药糖浆剂中3种抑菌剂含量[J]. 天津中医药大学学报,2013,32(1):40-42.
- [11] 周家萍,李典,李治东,等. 气相色谱法同时测定食品中8种抑菌剂[J]. 食品研究与开发,2017,38(14):161-163.
- [12] 迪丽努尔·马力克,庞楠楠,刘虎威,等. 快速气相色谱法测定中药合剂和糖浆中的常见防腐剂[J]. 食品科技,2008,33(4):201-203.
- [13] 李锦玉,李荣欣,李京路,等. 苯甲酸钠多次给药对大鼠肝肾功能的影响[J]. 郑州大学学报(医学版),2015,50(1):134-138.
- [14] 钱和,韩婵,刘利兵. 食品中化学添加剂的功能与风险控制[J]. 化学进展,2009,21(11):2424-2434.
- [15] 张礼春,曾凯,高舫. 高效毛细管电泳法同时测定饮料中七种抑菌剂[J]. 分析实验室,2015,34(1):77-80.

(收稿日期:2022-12-17;修回日期:2023-07-08)

稿件查询专线 (023)86592565 外联发行 (023)86592257(传真)