

中图分类号: R917; R927 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)18-0071-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.18.016



高效液相色谱法同时测定生脉饮中9种抑菌剂含量

刘欢欢, 徐丹洋, 王舒, 姚奕然, 黄赛燕[△]

(江苏省南通市食品药品监督管理局, 江苏 南通 226014)

摘要:目的 建立同时测定生脉饮中9种抑菌剂含量的高效液相色谱法,并考察该制剂抑菌剂添加情况。方法 色谱柱为Shiseido Capcell Pak MG II C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为0.02 mol/L乙酸铵溶液-甲醇(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,检测波长为230 nm(苯甲酸)、254 nm(山梨酸钾、羟苯甲酯、羟苯乙酯、羟苯丙酯、羟苯丁酯、4-羟基苯甲酸异丁酯、4-羟基苯甲酸戊酯、4-羟基苯甲酸苯酯),柱温为30 °C,进样量为20 μL。选取16家生产企业38批次样品(均为2022年江苏省评价性抽验样品),按不同倍数稀释后检测9种抑菌剂含量。结果 9个待测成分进样量分别在0.011~1.062 μg, 0.010~1.001 μg, 0.010~0.971 μg, 0.011~1.047 μg, 0.010~0.956 μg, 0.010~1.039 μg, 0.010~0.958 μg, 0.011~1.108 μg, 0.010~1.032 μg范围内与峰面积线性关系良好($r \geq 0.9983$);精密度、稳定性、重复性试验结果的RSD均小于2.0%;平均加样回收率为91.47%~97.16%, RSD为0.15%~1.24% ($n=6$)。16家生产企业38批次产品中个别存在添加处方外抑菌剂、超标准限量添加抑菌剂的情况。结论 该方法准确性、专属性良好,可用于生脉饮中抑菌剂的测定。

关键词:生脉饮;抑菌剂;高效液相色谱法;质量控制

Simultaneous Determination of Nine Bacteriostatic Agents in Shengmai Drink by HPLC

LIU Huanhuan, XU Danyang, WANG Shu, YAO Yiran, HUANG Saiyan

(Nantong Food and Drug Control Center, Nantong, Jiangsu, China 226014)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for simultaneously determining the contents of nine bacteriostatic agents in Shengmai Drink, and to investigate the addition of bacteriostatic agents in the formulation. **Methods** The chromatographic column was the Shiseido Capcell Pak MG II C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was 0.02 mol/L ammonium acetate solution-methanol (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, and the detection wavelengths were 230 nm (benzoic acid) and 254 nm (potassium sorbate, methylparaben, ethylparaben, propylparaben, butylparaben, isobutyl 4-hydroxybenzoate, pentyl 4-hydroxybenzoate, phenyl 4-hydroxybenzoate), the column temperature was 30 °C, and the injection volume was 20 μL. Thirty-eight batches of samples from 16 manufacturing enterprises (all of which were evaluative samples in Jiangsu in 2022) were selected and diluted at different proportions, and the contents of nine bacteriostatic agents were determined. **Results** The linear ranges of the nine components to be tested were 0.011-1.062 μg, 0.010-1.001 μg, 0.010-0.971 μg, 0.011-1.047 μg, 0.010-0.956 μg, 0.010-1.039 μg, 0.010-0.958 μg, 0.011-1.108 μg, 0.010-1.032 μg ($r \geq 0.9983$), respectively. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were all lower than 2.0%. The average recovery rates of the above nine components were in the range of 91.47%-97.16%, with RSDs in the range of 0.15%-1.24% ($n=6$). Among the 38 batches of samples from 16 manufacturing enterprises, there were few cases of adding bacteriostatic agents not included in the prescription or over the standard limit. **Conclusion** This method is accurate and specific, which can be used for the determination of bacteriostatic agents in Shengmai Drink.

Key words: Shengmai Drink; bacteriostatic agent; HPLC; quality control

生脉饮始载于金元时期张元素《医学启源》,又名生脉散^[1],可用于治疗心律不齐、神经衰弱、冠状动脉粥样硬化性心脏病、支气管炎、肺结核等心肺系统疾病^[2-6]。现代生脉饮是由红参、麦冬、五味子经渗漉、浓缩、加适量辅料并调pH制成的合剂,因其含糖及水分较多,贮藏过程中易受微生物污染,为了延长保存时间,防止制剂腐败变质,企业多会添加适量抑菌剂,但抑菌剂本身有一定毒性,过量应用时会对机体造成危

害^[7-11],从药品安全性角度出发,亟须对国内市场上该制剂中抑菌剂添加情况进行考察。该制剂现行质量标准为2020年版《中国药典(一部)》,仅规定了性状、鉴别、检查、含量测定项^[12]。2020年版《中国药典(四部)》合剂项下规定了部分抑菌剂的种类和限量。目前合剂中抑菌剂规定限量为“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%”^[13],但未列出有关含量测定方

第一作者:刘欢欢,女,硕士,主管药师,研究方向为药品质量分析,(电子信箱)740741400@qq.com。

[△]通信作者:黄赛燕,女,硕士,主管药师,研究方向为药物质量分析及评价,(电子信箱)hsy0907sjy@163.com。

法。为了考察生脉饮中抑菌剂的添加情况,本研究中参考相关文献^[14-16],建立了同时测定生脉饮中9种抑菌剂含量的高效液相色谱(HPLC)法,旨为该制剂的质量控制和监管提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

U3000型HPLC仪(赛默飞世尔科技<上海>有限公司);Milli-Q超纯水机(美国Millipore公司);Sartorius CPA225D型电子分析天平(赛多利斯贸易有限公司,精度为0.01 mg)。

1.2 试剂

苯甲酸对照品(批号为100419-201703,含量99.9%),山梨酸钾对照品(批号为101075-202203,含量99.7%),羟苯甲酯对照品(批号为100278-201906,含量99.9%),羟苯乙酯对照品(批号为100847-202105,含量100.0%),羟苯丙酯对照品(批号为100444-202005,含量99.9%),羟苯丁酯对照品(批号为110792-200503,含量100.0%),4-羟基苯甲酸异丁酯对照品(批号800133-202001,含量96.5%),4-羟基苯甲酸戊酯对照品(批号为800130-202001,含量97.4%),4-羟基苯甲酸苯酯对照品(批号为800128-202001,含量99.2%),均购自中国食品药品检定研究院;甲醇为色谱纯,乙酸铵为分析纯,水为超纯水。16家生产企业38批次样品,均来自2022年江苏省评价性抽验样品。样品信息见表1。

表1 样品信息

Tab. 1 Information of samples

企业	产地	批号	企业	产地	批号	企业	产地	批号
A	黑龙江	21052601	G	江西	2109005			21260210
B	河南	47210601			2204001			21260211
		47211001	H	江西	220101			21260871
C	黑龙江	B22210302			220302			21261041
D	吉林	2111301			220601			21261043
		2205301			220602			21261075
		2206301	I	安徽	211204			21261679
E	吉林	20210704			220204	O	浙江	2203001
F	吉林	211077	J	河南	21122431			2203002
		211083	K	四川	20030004	P	河南	211103
		220312	L	重庆	22040004			220505
		220420	M	天津	220503			220608
		220425	N	北京	20260494			

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Shiseido Capcell Pak MG II C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:0.02 mol/L乙酸铵溶液(A) -

甲醇(B),梯度洗脱(0~8 min时13%A,8.1~32 min时60%A,32.1~40.0 min时80%A,40.1~45 min时13%A);流速:1.0 mL/min;检测波长:230 nm(苯甲酸)和254 nm(山梨酸钾、羟苯甲酯、羟苯乙酯、羟苯丙酯、羟苯丁酯、4-羟基苯甲酸异丁酯、4-羟基苯甲酸戊酯、4-羟基苯甲酸苯酯);柱温:30℃;进样量:20 μL。

2.2 溶液制备

取对照品各适量,用甲醇溶解制成苯甲酸、山梨酸钾、羟苯甲酯、羟苯乙酯、羟苯丙酯、羟苯丁酯、4-羟基苯甲酸异丁酯、4-羟基苯甲酸戊酯、4-羟基苯甲酸苯酯质量浓度分别为1.064,1.004,0.972,1.047,0.957,1.039,0.993,1.138,1.041 mg/mL的混合对照品贮备液;用50%甲醇稀释20倍,即得混合对照品溶液(质量浓度分别为53.20,50.20,48.60,52.35,47.85,51.95,49.65,56.90,52.05 μg/mL)。精密量取样品2 mL,置50 mL容量瓶中,加50%甲醇定容,摇匀,即得供试品溶液I,分别取批号为2111301(检出苯甲酸与羟苯乙酯)及220101(检出山梨酸钾与羟苯乙酯)样品2 mL,同法分别稀释2倍、4倍,制成供试品溶液II及III。以50%甲醇为空白溶液。

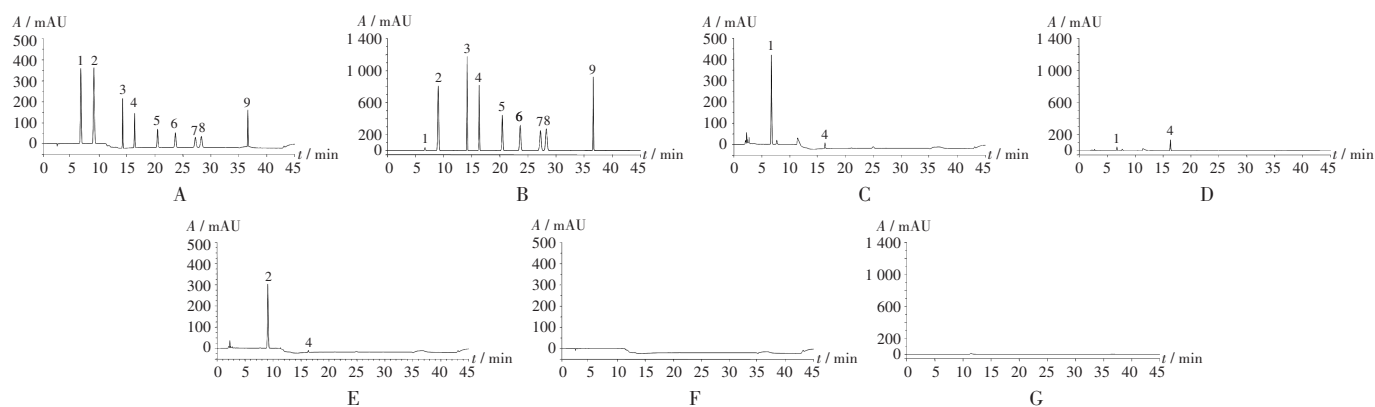
2.3 方法学考察

专属性试验与系统适用性试验:取2.2项下混合对照品溶液、空白溶液、供试品溶液II及III,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果理论板数按苯甲酸峰计应不低于3 000,分离度均大于1.5,基线分离良好。空白溶液色谱中与混合对照品溶液色谱保留时间相同处无干扰峰。表明专属性良好。详见图1。

线性关系考察:精密量取2.2项下混合对照品溶液0.1,1.0,2.0,3.0,5.0,10.0 mL,分别置10 mL容量瓶中,加50%甲醇定容,摇匀,制成混合对照品溶液1-6。各取20 μL,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以各待测成分峰面积(Y)为纵坐标、进样量(X, μg)为横坐标进行线性回归。结果见表2。

定量限与检测限考察:分别精密量取2.2项下混合对照品溶液适量,逐级稀释,并按2.1项下色谱条件进样测定,以信噪比约为10:1、3:1的含量分别作为定量限、检测限。结果见表2。

精密度试验:取2.2项下混合对照品溶液适量,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,苯甲酸、山梨酸钾、羟苯甲酯、羟苯乙酯、羟苯丙酯、羟苯丁酯、4-羟基苯甲酸异丁酯、4-羟基苯甲酸戊酯、4-羟基苯甲酸苯酯峰面积的RSD分别为0.10%,0.02%,0.04%,0.02%,0.04%,0.06%,0.02%,0.04%,



1. 苯甲酸 2. 山梨酸钾 3. 羟苯甲酯 4. 羟苯乙酯 5. 羟苯丙酯 6. 羟苯丁酯 7. 4-羟基苯甲酸异丁酯 8. 4-羟基苯甲酸戊酯
9. 4-羟基苯甲酸苯酯

A, B. 混合对照品溶液(230,254 nm) C, D. 供试品溶液 II (230,254 nm) E. 供试品溶液 III (254 nm) F, G. 空白溶液(230,254 nm)

图1 高效液相色谱图

1. Benzoic acid 2. Potassium sorbate 3. Methylparaben 4. Ethylparaben 5. Propylparaben 6. Butylparaben 7. Isobutyl 4-hydroxybenzoate
8. Pentyl 4-hydroxybenzoate 9. Phenyl 4-hydroxybenzoate

A, B. Mixed reference solution (230,254 nm) C, D. Test solution II (230,254 nm) E. Test solution III (254 nm) F, G. Blank solution (230,254 nm)

Fig. 1 HPLC chromatograms

表2 线性关系、定量限、检测限考察结果

Tab. 2 Results of the linear relation test, limit of quantitation and limit of detection investigation

待测成分	回归方程	r	线性范围 (μg)	定量限 (ng)	检测限 (ng)
苯甲酸	$Y_1 = 3809.78X_1 + 10.85$	1.0000	0.011~1.062	3.541	0.708
山梨酸钾	$Y_2 = 10360.77X_2 + 23.80$	1.0000	0.010~1.001	0.334	0.133
羟苯甲酯	$Y_3 = 5793.82X_3 + 20.07$	1.0000	0.010~0.971	0.324	0.129
羟苯乙酯	$Y_4 = 5793.82X_4 + 20.07$	1.0000	0.011~1.047	0.349	0.140
羟苯丙酯	$Y_5 = 5394.69X_5 + 11.84$	1.0000	0.010~0.956	0.637	0.319
羟苯丁酯	$Y_6 = 5189.14X_6 + 9.98$	1.0000	0.010~1.039	0.692	0.346
4-羟基苯甲酸异丁酯	$Y_7 = 4909.23X_7 + 12.61$	1.0000	0.010~0.958	0.639	0.128
4-羟基苯甲酸戊酯	$Y_8 = 4241.12X_8 + 110.05$	0.9983	0.011~1.108	0.369	0.148
4-羟基苯甲酸苯酯	$Y_9 = 4702.06X_9 + 11.31$	1.0000	0.010~1.032	0.688	0.344

0.04% ($n = 6$), 表明仪器精密度良好。

稳定性试验: 取2.3项下混合对照品溶液5及2.2项下供试品溶液 II 及 III, 分别于室温下放置0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h时按2.1项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果混合对照品溶液中9个成分峰面积的RSD均小于2.0% ($n = 7$), 供试品溶液中苯甲酸、山梨酸钾、羟苯乙酯峰面积的RSD均小于1.0% ($n = 7$), 表明混合对照品溶液及供试品溶液室温放置24 h内基本稳定。

重复性试验: 取批号为2111301及220101的样品各适量, 按2.2项下方法分别平行制备供试品溶液6份, 按2.1项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果苯甲酸峰面积的RSD为0.82%、羟苯乙酯的分别为0.76%和1.60%, 山梨酸钾的为1.40% ($n = 6$), 表明方法重复性良好。

加样回收试验: 取样品(批号为220505)6份, 每份1.0 mL, 分别精密加入一定量的单一对照品溶液, 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, 记录峰面积, 计算加样回收率。结果见表3。

表3 加样回收试验结果(%, $n = 6$)

Tab. 3 Results of the recovery test (%, $n = 6$)

待测成分	加样回收率						\bar{X}	RSD
	1	2	3	4	5	6		
苯甲酸	92.26	92.56	92.33	92.33	92.38	92.59	92.41	0.15
山梨酸钾	92.16	92.46	94.81	94.01	93.56	94.16	93.52	1.10
羟苯甲酯	91.09	91.34	92.99	92.74	92.38	92.79	92.22	0.88
羟苯乙酯	91.74	91.02	92.29	91.06	91.67	91.05	91.47	0.56
羟苯丙酯	92.10	92.26	93.62	93.41	92.99	93.41	92.97	0.69
羟苯丁酯	91.00	91.29	92.49	92.15	91.72	92.20	91.81	0.63
4-羟基苯甲酸异丁酯	91.81	92.12	94.42	93.84	93.48	93.95	93.27	1.14
4-羟基苯甲酸戊酯	96.03	96.30	98.47	97.47	97.02	97.65	97.16	0.93
4-羟基苯甲酸苯酯	90.94	91.23	93.27	93.46	93.12	93.31	92.55	1.24

2.4 样品含量测定

取38批样品, 按2.2项下供试品溶液 I 制备方法制成供试品溶液, 再分别按表3所列倍数稀释, 按2.1项下色谱条件进样测定, 记录及峰面积, 以外标法计算样品中抑菌剂含量。结果见表4。结果表明, 全部样品测得抑菌剂的种类与企业生产处方一致(仅P企业产品检出未标明的山梨酸钾), 苯甲酸钠、羟苯乙酯含量分别在0.21%~0.25%及0.031%~0.040%的批数最多, 山梨酸钾含量跨度较大; 且P企业产品添加了未标明的抑菌剂(批号为220608), D企业产品存在抑菌剂使用超限的情况(批号为2205301)。

表4 样品稀释过程及测定结果(n=3)

Tab. 4 Dilution proportions of samples and content determination of bacteriostatic agents (n=3)

编号	企业	稀释倍数	检出成分	含量(%)
1	A	4	苯甲酸钠	0.151
2	B	4	苯甲酸钠	0.217;0.230
3	C	4	苯甲酸钠	0.222
4	D	2	苯甲酸钠 羟苯乙酯	0.223;0.290;0.224 0.043;0.056;0.043
5	E	4	苯甲酸钠	0.234
6	F	2	山梨酸钾	0.116;0.107;0.115;0.111;0.102
7	G	4	苯甲酸钠	0.229;0.221
8	H	4	山梨酸钾 羟苯乙酯	0.248;0.243;0.226;0.229 0.034;0.032;0.030;0.033
9	I	1	羟苯乙酯	0.025;0.025
10	J	1	苯甲酸钠	0.070
11	K	1	羟苯乙酯	0.022
12	L	4	苯甲酸钠	0.251
13	M	2	山梨酸钾	0.099
14	N	1	羟苯乙酯	0.032;0.034;0.034;0.031;0.032; 0.032;0.032;0.027
15	O	4	苯甲酸钠	0.175;0.186
16	P	2	山梨酸钾	0.045

3 讨论

3.1 流动相选择

预试验中,流动相分别考察了甲醇-水、甲醇-0.05%磷酸溶液及甲醇-0.02 mol/L乙酸铵溶液,结果以前两组为流动相时,部分目标分析物的分离度和峰形无法满足试验要求,以甲醇-0.02 mol/L乙酸铵溶液为流动相时,色谱峰峰形较好,调整梯度洗脱条件,各成分均能洗脱,且分离效果好。

3.2 检测波长选择

采用二极管阵列检测器在200~400 nm波长范围内对9种抑菌剂进行扫描。结果显示,苯甲酸最大吸收波长为230 nm,其余8种抑菌剂在254 nm波长处均有较大吸收,且待测成分响应较高,无杂质峰干扰,故最终选用230 nm和254 nm作为测定波长。

3.3 结果分析

当前生脉饮的现行质量标准中尚未要求定量检测抑菌剂,易导致抑菌剂的不合理使用,从而可能引发产品中微生物污染超标或抑菌剂添加过量的安全隐患。本研究中通过考察江苏省评价性抽检样品生脉饮中抑菌剂的使用情况,发现不同厂家生产的制剂中抑菌剂含量总体相当,但存在检出未标明的抑菌剂和个别抑菌剂超限的情况,建议企业加强产品中抑菌剂的使用监测,进一步优化生产工艺。

3.4 方法评价

本研究中建立的HPLC法可同时对生脉饮中9种抑菌剂进行测定,可用于监测生产企业是否存在抑菌剂违规使用的情况,从而为生产企业和监管部门提供强有力的技术支撑,为产品质量提升和市场监管提供有力依据。

参考文献

- [1] 李仁述. 生脉饮出处小考[J]. 成都中医学院学报,1988,11(3):45-46.
- [2] 赵星雨,李圆松. 生脉饮联合顺铂对气阴两虚型肺癌荷瘤小鼠抗肿瘤作用的研究[J]. 中医肿瘤学杂志,2021,3(3):47-51.
- [3] 柴玲彦,赵红,刘彦霞,等. 生脉饮联合磷酸肌酸治疗支原体肺炎合并心肌损害50例[J]. 中国药业,2015,24(18):104-106.
- [4] 陈敏. 生脉饮临床应用举隅[J]. 福建中医药,2006,37(6):43.
- [5] 章权,石仕元,韩贵和,等. 生脉饮在骨关节结核抗痨致白细胞减少症中的应用[J]. 中国中西医结合杂志,2020,40(9):1135-1137.
- [6] WANG S, GAN J, LI J, et al. Shengmai Yin formula exerts cardioprotective effects on rats with chronic heart failure via regulating linoleic acid metabolism[J]. Prostaglandins & Other Lipid Mediators,2022,158:106608.
- [7] 成海平. 药品研发中抑菌剂的应用及质控[J]. 中国新药杂志,2005,14(8):954-956.
- [8] 唐溱,赵晓霞,关宏峰,等. 关于药物中抑菌剂使用相关问题的思考[J]. 中国新药杂志,2021,30(21):1944-1948.
- [9] ALHASSON H, SALAMA A, ALWEIS R. The dangers of ingesting antiseptics: hydrogen peroxide-induced chemical colitis[J]. American Journal of Medicine,2021,134(2):206-208.
- [10] 吕娜,沈明浩. 食品抑菌剂苯甲酸钠的蓄积毒性及精子毒性研究[J]. 毒理学杂志,2011,25(3):241-242.
- [11] WANG SW, GONG J, GAO X, et al. Pharmacotoxicological study of preservative sodium benzoate[J]. J Anhui Agric Sci,2010,38(30):16724-16846.
- [12] 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,2020:835-836.
- [13] 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,2020:26,114-115.
- [14] 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.
- [15] 刘东博,杨园,李苗. HPLC法测定盐酸西替利嗪口服溶液中主成分及三种抑菌剂的含量[J]. 中国药师,2020,23(4):782-785.
- [16] 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.

(收稿日期:2023-08-16;修回日期:2024-03-15)