

中图分类号: R917; R927 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)22-0084-04  
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.22.018



# 高效液相色谱法同时测定小儿热速清口服液中多种防腐剂含量\*

崔俊凤<sup>1</sup>, 王洪明<sup>1△</sup>, 李守信<sup>2</sup>, 王 辉<sup>2</sup>, 郝成杰<sup>2</sup>, 孙 辉<sup>2</sup>

(1. 山东省滨州市检验检测中心, 山东 滨州 256600; 2. 山东凤凰制药股份有限公司, 山东 东营 257400)

**摘要:**目的 建立同时测定小儿热速清口服液中多种防腐剂含量的高效液相色谱(HPLC)法。方法 色谱柱为 Venusil MP C<sub>18</sub>柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.2% 磷酸二氢钾溶液(含 0.02 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠, 用磷酸调 pH 至 3.8), 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 227 nm(苯甲酸、山梨酸)和 256 nm(脱氢乙酸、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), 柱温为 30 °C, 进样量为 10 μL。结果 7 种成分质量浓度分别在 1.168~116.8 μg/mL、0.584~58.4 μg/mL、0.500~50.0 μg/mL、0.274~27.4 μg/mL、0.152~15.2 μg/mL、0.136~13.6 μg/mL、0.142~14.2 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好( $r \geq 0.9998$ ,  $n=6$ ); 检测限为 0.18, 0.01, 0.02, 0.07, 0.02, 0.02, 0.03 μg/mL, 定量限为 0.53, 0.04, 0.05, 0.21, 0.06, 0.06, 0.09 μg/mL; 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 95.75%, 95.21%, 95.67%, 94.04%, 92.11%, 93.38%, 92.49%, RSD 为 2.11%, 1.98%, 1.82%, 1.80%, 2.56%, 2.95%, 2.49% ( $n=6$ )。结论 所建立的方法操作简便, 重复性好, 结果准确, 可用于测定小儿热速清口服液中多种防腐剂的含量。

**关键词:** 小儿热速清口服液; 防腐剂; 高效液相色谱; 含量测定

## Simultaneous Determination of Multiple Preservatives in Xiaoer Resuqing Oral Liquid by HPLC

CUI Junfeng<sup>1</sup>, WANG Hongming<sup>1</sup>, LI Shouxin<sup>2</sup>, WANG Hui<sup>2</sup>, HAO Chengjie<sup>2</sup>, SUN Hui<sup>2</sup>

(1. Binzhou Testing Center, Binzhou, Shandong, China 256600; 2. Shandong Fenghuang Pharmaceutical Co., Ltd., Dongying, Shandong, China 257400)

**Abstract: Objective** To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for simultaneously determining the contents of multiple preservatives in Xiaoer Resuqing Oral Liquid. **Methods** The chromatographic column was the Venusil MP C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile - 0.2% potassium dihydrogen phosphate solution (containing 0.02 mmol/L ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt, adjusted to pH 3.8 by phosphoric acid) with gradient elution, the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelengths were 227 nm (benzoic acid, sorbic acid) and 256 nm (dehydroacetic acid, methyl *p*-hydroxybenzoate, ethyl *p*-hydroxybenzoate, propyl *p*-hydroxybenzoate, butyl *p*-hydroxybenzoate), the column temperature was 30 °C, and the injection volume was 10 μL. **Results** The linear ranges of the above seven components were 1.168 - 116.8 μg/mL, 0.584 - 58.4 μg/mL, 0.500 - 50.0 μg/mL, 0.274 - 27.4 μg/mL, 0.152 - 15.2 μg/mL, 0.136 - 13.6 μg/mL, 0.142 - 14.2 μg/mL ( $r \geq 0.9998$ ,  $n=6$ ) respectively. The limits of detection (LOD) of the above seven components were 0.18, 0.01, 0.02, 0.07, 0.02, 0.02, 0.03 μg/mL, and the limits of quantification (LOQ) were 0.53, 0.04, 0.05, 0.21, 0.06, 0.06, 0.09 μg/mL respectively. The RSDs of precision, stability and repeatability tests were all lower than 2.0%. The average recovery rates of the above seven components were 95.75%, 95.21%, 95.67%, 94.04%, 92.11%, 93.38%, 92.49%, with the RSDs of 2.11%, 1.98%, 1.82%, 1.80%, 2.56%, 2.95%, 2.49% ( $n=6$ ) respectively. **Conclusion** The established method is easy, repeatable and accurate, which can be used to determine the content of various preservatives in Xiaoer Resuqing Oral Liquid.

**Key words:** Xiaoer Resuqing Oral Liquid; preservative; HPLC; content determination

小儿热速清口服液是由柴胡、板蓝根、金银花、连翘、黄芩、葛根、大黄、水牛角 8 味药材制成的红棕色澄清液体, 具有清热解毒、泻火利咽功效, 临床用于治疗小儿外感风热所致的感冒。现代研究表明, 本品具有抗病毒、解热、抗炎、镇咳、祛痰、增强免疫等作用<sup>[1]</sup>, 是儿科常用药物。防腐剂在防止药品被微生物污染、确保药品质量等方面起着重要作用, 但由于其具有一定毒性, 若超标易造成儿童神经系统、肌肉、骨骼等损伤, 故

2020 年版《中国药典(四部)》通则对防腐剂的品种及用量作了具体规定, 如山梨酸和苯甲酸的用量不得过 0.3% (其钾盐、钠盐的用量分别按酸计), 羟苯酯类的用量不得过 0.05%<sup>[2]</sup>。关于小儿热速清口服液防腐剂含量测定的相关报道较少, 且国内相关生产企业使用防腐剂的种类与用量不同, 为筛查小儿热速清口服液中防腐剂是否符合 2020 年版《中国药典(四部)》的限量要求, 本研究中建立了同时测定小儿热速清口服液中苯

\* 基金项目: 山东省滨州市农社领域科技创新政策引导计划项目[2022SHFZ044]。

第一作者: 崔俊凤, 女, 大学本科, 副主任中药师, 研究方向为药品检验与标准制订, (电子信箱)yjscj@163.com。

△通信作者: 王洪明, 男, 大学本科, 副主任药师, 研究方向为药品检验与标准制订, (电子信箱)525508788@163.com。

甲酸、山梨酸、脱氢乙酸、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯和对羟基苯甲酸丁酯7种防腐剂含量的高效液相色谱(HPLC)法。现报道如下。

## 1 仪器与试药

### 1.1 仪器

Agilent - 1260型高效液相色谱仪(美国Agilent Technologies公司,配有DAD);XSE205DU型电子分析天平(瑞士Mettler Toledo公司,精度为0.01 mg);Arium comfort II型超纯水仪(德国Sartorius公司);KQ - 500DE智能多功能数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

### 1.2 试药

小儿热速清口服液(吉林一正药业集团有限公司,批号分别为221205,221058,220120);脱氢乙酸对照品(坛墨质检标准物质中心,批号为A22070001,含量2 000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ );苯甲酸对照品(批号为100419 - 201703,含量99.9%),山梨酸对照品(批号为190126 - 202102,含量99.7%),对羟基苯甲酸甲酯对照品(批号为100278 - 201906,含量99.9%),对羟基苯甲酸乙酯对照品(批号为100847 - 202105,含量100.0%),对羟基苯甲酸丙酯对照品(批号为100444 - 202005,含量99.9%),对羟基苯甲酸丁酯对照品(批号为110792 - 202204,含量99.8%),均购自中国食品药品检定研究院;甲醇、乙腈均为色谱纯,乙醚、磷酸二氢钾为分析纯,水为超纯水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱: Venusil MP  $\text{C}_{18}$  柱(250 mm  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ );流动相:乙腈(A) - 0.2%磷酸二氢钾溶液[含0.02 mmol/L乙二胺四乙酸二钠(EDTA - 2Na),用磷

酸调pH至3.8,B),梯度洗脱(0~18 min时18%A,18~25 min时18%A  $\rightarrow$  45%A,25~60 min时45%A  $\rightarrow$  60%A);流速:1.0 mL/min;检测波长:227 nm(苯甲酸、山梨酸)和256 nm(脱氢乙酸、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);柱温:30  $^{\circ}\text{C}$ ;进样量:10  $\mu\text{L}$ 。

### 2.2 溶液制备

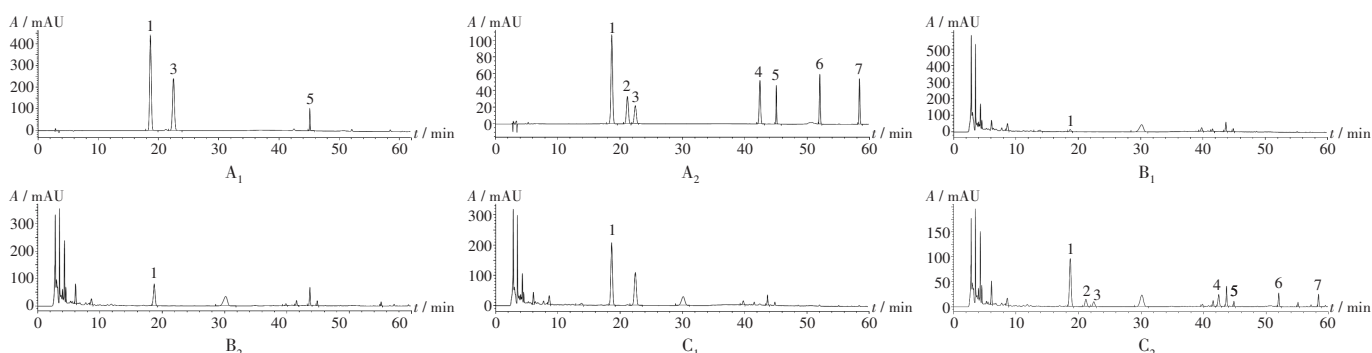
混合对照品溶液:分别取上述7种对照品适量,精密称定,置同一50 mL容量瓶中,加40%甲醇适量,超声(功率100 W,频率45 kHz)10 min,放冷,加40%甲醇定容,摇匀,即得混合对照品贮备液(苯甲酸、山梨酸、脱氢乙酸、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、对羟基苯甲酸丁酯质量浓度分别为1.168,0.584,0.500,0.274,0.152,0.136,0.142 mg/mL)。精密量取0.1,0.5,1.0,2.0,5.0,10.0 mL置100 mL容量瓶中,加40%甲醇定容,摇匀,即得系列混合对照溶液I - VI。

供试品溶液:精密量取样品1.0 mL,置100 mL分液漏斗中,用乙醚振摇提取2次,每次10 mL,弃去乙醚液,水液置100 mL容量瓶中,加40%甲醇溶解并定容,摇匀,经0.45  $\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,即得。

加标供试品溶液:取防腐剂含量已知的样品(批号为221058,苯甲酸含量1.062 mg/mL)1.0 mL,各6份,分别精密加入混合对照品贮备液0.5 mL,按供试品溶液制备方法制备,即得。

### 2.3 方法学考察

系统适用性试验、专属性试验及峰纯度检测:取混合对照品溶液IV、供试品溶液和加标供试品溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图(见图1)。结果在与对照品溶液相应色谱图中,供试品溶液色谱



1. 苯甲酸 2. 脱氢乙酸 3. 山梨酸 4. 对羟基苯甲酸甲酯 5. 对羟基苯甲酸乙酯 6. 对羟基苯甲酸丙酯 7. 对羟基苯甲酸丁酯

A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, 混合对照品溶液IV(227,256 nm) B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, 供试品溶液(227,256 nm) C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, 加标供试品溶液(227,256 nm)

图1 高效液相色谱图

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

A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, Mixed reference solution IV (227,256 nm) B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, Test solution (227,256 nm) C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, Test solution spiked with reference solution (227,256 nm)

Fig. 1 HPLC chromatograms

表1 线性关系与LOD、LOQ考察及加样回收试验结果(n=6)

Tab.1 Results of the linear relation test, LOD and LOQ investigation and recovery test (n=6)

待测成分	回归方程	r	线性范围(μg/mL)	LOD(μg/mL)	LOQ(μg/mL)	平均回收率(%)	RSD(%)
苯甲酸	$Y_1 = 38.265X_1 + 1.957$	0.999 9	1.168~116.8	0.18	0.53	95.75	2.11
山梨酸	$Y_2 = 46.326X_2 + 2.246$	0.999 8	0.584~58.4	0.01	0.04	95.21	1.98
脱氢乙酸	$Y_3 = 57.438X_3 - 3.127$	0.999 8	0.500~50.0	0.02	0.05	95.67	1.82
对羟基苯甲酸甲酯	$Y_4 = 154.369X_4 + 5.581$	0.999 9	0.274~27.4	0.07	0.21	94.04	1.80
对羟基苯甲酸乙酯	$Y_5 = 162.462X_5 - 7.523$	0.999 9	0.152~15.2	0.02	0.06	92.11	2.56
对羟基苯甲酸丙酯	$Y_6 = 148.418X_6 + 6.283$	0.999 8	0.136~13.6	0.02	0.06	93.38	2.95
对羟基苯甲酸丁酯	$Y_7 = 157.515X_7 - 4.547$	0.999 9	0.142~14.2	0.03	0.09	92.49	2.49

图中仅苯甲酸位置有相同保留时间的色谱峰;加标供试品溶液在与混合对照品溶液Ⅳ相应色谱图中均有相同保留时间的色谱峰。各成分峰分离度均大于1.5,理论板数以各成分峰计均不低于6 500。采用DAD对各成分色谱峰进行紫外光谱(227, 256 nm)扫描和峰纯度检测,结果7种成分的紫外吸收光谱与相应的对照品基本一致,且峰纯度因子均大于1 000。

线性关系考察:取2.2项下系列混合对照品溶液Ⅰ-Ⅵ各适量,按2.1项下色谱条件进样测定,以各待测成分的质量浓度( $X, \mu\text{g/mL}$ )为横坐标、峰面积( $Y$ )为纵坐标进行线性回归。结果见表1。

检测限(LOD)与定量限(LOQ)考察:精密量取2.2项下混合对照品溶液Ⅰ适量,用40%甲醇逐级稀释,按2.1项下色谱条件进样测定,以比信噪比分别为3:1、10:1各待测成分的质量浓度为LOD和LOQ。结果见表1。

精密度试验:取2.2项下混合对照品溶液Ⅲ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、脱氢乙酸、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、对羟基苯甲酸丁酯峰面积的RSD分别为0.29%, 0.41%, 0.44%, 0.36%, 0.32%, 0.35%, 0.39%,表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取2.2项下加标供试品溶液适量,分别于室温下放置0, 4, 8, 12, 24, 48 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、山梨酸、脱氢乙酸、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峰面积RSD分别为0.67%, 0.75%, 1.03%, 0.67%, 0.74%, 0.63%, 0.77%,表明加标供试品溶液室温放置48 h内基本稳定。

重复性试验:取样品(批号为221058)适量,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,采用标准曲线法计算防腐剂的含量。结果苯甲酸平均含量为1.062 mg/mL, RSD为1.03%,其余防腐剂均未检出,表明方法重复性良好。

加样回收试验:取样品(批号为221058,苯甲酸含量1.062 mg/mL)0.5 mL,各6份,分别精密加入混合对

照品贮备液0.5 mL,按2.2项下方法制备加标供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算加样回收率。结果见表1。

#### 2.4 含量测定

取3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,采用标准曲线法计算含量。结果苯甲酸含量分别为1.067, 1.124, 1.003 mg/mL,其余防腐剂均未检出。

### 3 讨论

#### 3.1 检测波长选择

采用DAD对7种防腐剂在200~400 nm波长范围内扫描<sup>[3-6]</sup>,结果显示,苯甲酸和山梨酸在227 nm波长处有最大吸收,脱氢乙酸、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、对羟基苯甲酸丁酯在256 nm波长处有最大吸收,故选择该2种波长同时测定,即能保证各成分的最大吸收,也提高了检测灵敏度,减小了干扰因素。

#### 3.2 流动相选择

考察了甲醇-0.1%磷酸溶液(22:78, V/V)、乙腈-0.2%磷酸溶液(18:72, V/V)、乙腈-0.02%磷酸二氢钾溶液(含0.02 mmol/L EDTA-2Na,用磷酸调pH至3.8, 18:72, V/V)<sup>[7-16]</sup>为流动相进行等度洗脱,由于样品中含有多种成分,检测的7种成分的极性差距较大,分离度不达标。采用乙腈-0.02%磷酸二氢钾溶液(含0.02 mmol/L EDTA-2Na,用磷酸调pH至3.8)为流动相进行梯度洗脱,色谱图基线平稳,7种成分的峰形良好,分离度、对称因子和理论板数均符合要求。

#### 3.3 提取方法考察

根据该药物的处方、制备工艺和7种防腐剂的溶解性,本研究中分别以甲醇、70%甲醇、40%甲醇超声溶解,以及经乙醚萃取后直接以40%甲醇稀释进样考察,结果采用最后1种方法色谱图基线平稳、杂质少、各成分无干扰,且7种成分回收率达到含量测定要求。

#### 3.4 方法评价

建立的方法结果准确,重复性、稳定性好,可用于

中图分类号: R917; R927 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)22-0087-08  
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.22.019



# UPLC-MS/MS法同时测定阿胶中20种氨基酸含量及其化学模式识别分析\*

蒲健<sup>1,2</sup>, 杨帅<sup>3,4</sup>, 祝扬帆<sup>3,4</sup>, 谭丹<sup>1,2</sup>, 郑林<sup>2,3</sup>, 迟明艳<sup>3,4</sup>, 黄勇<sup>2,3Δ</sup>

(1. 贵州益佰制药股份有限公司, 贵州 贵阳 550008; 2. 国家苗药工程技术研究中心, 贵州 贵阳 550004;  
3. 贵州医科大学省部共建药用植物功效与利用国家重点实验室·贵州省药物制剂重点实验室, 贵州 贵阳 550004; 4. 贵州医科大学药学院, 贵州 贵阳 550004)

**摘要:**目的 建立阿胶中20种氨基酸的含量测定方法及不同产地阿胶的化学模式识别分析法。方法 采用超高效液相色谱串联质谱(UPLC-MS/MS)法测定阿胶中氨基酸含量,分析柱为Waters BEH C<sub>18</sub>柱(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm),流动相为0.1%甲酸乙腈-0.1%甲酸水溶液(5:95, V/V),流速为0.35 mL/min,柱温为45℃,进样体积为5 μL;采用电喷雾离子源(ESI),正离子模式下多反应监测(MRM)。采用层次聚类分析(HCA)法、主成分分析(PCA)法和正交偏最小二乘-判别分析(OPLS-DA)法分析测定结果。结果 20种成分在相应质量浓度范围内与峰面积线性关系良好,检测限为0.002~0.075 μg/mL,定量限为0.004~0.134 μg/mL;精密度、稳定性、重复性试验的RSD均不超过4.70%,平均加样回收率为93.20%~107.80%,RSD为0.80%~3.90%。HCA法及PCA法均可将18个产地的药材样品分为2类;OPLS-DA法筛选出指标性成分异亮氨酸、丙氨酸、谷氨酰胺、天冬氨酸、谷氨酸、脯氨酸、精氨酸。结论 所建方法可用于阿胶中氨基酸类成分的含量测定,筛选的7种成分可作为区分不同厂家阿胶的潜在指标。

**关键词:**超高效液相色谱串联质谱法;阿胶;氨基酸;质量控制;指标性成分;化学模式识别

\*基金项目:贵州省科技计划项目[黔科合支撑[2021]一般419,黔科合平台人才-GCC[2022]031-1,黔科合平台人才-CXTD[2023]019,黔科合中引地[2023]006]。

第一作者:蒲健,女,苗族,大学本科,中级工程师,研究方向为中药质量控制及新药研发,(电子信箱)1037930332@qq.com。

Δ通信作者:黄勇,男,汉族,博士,教授,研究方向为中药药效物质基础及质量控制,(电子信箱)HUANGY2020@126.com。

同时测定小儿热速清口服液中多种防腐剂含量。

## 参考文献

- [1] 苗明三,李中心,朱志军,等. 小儿热速清口服液解热抗炎作用的研究[J]. 河南中医,1991,11(6):11-12.
- [2] 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.
- [3] 魏一婷,吴媛,丁琳,等. 高效液相色谱-串联质谱法测定调味品中7种对羟基苯甲酸酯类防腐剂及其水平调查[J]. 分析科学学报,2023,39(5):612-617.
- [4] 许有诚,赵庄,李丹凤. MEKC法同时测定中药口服液体制剂中10种防腐剂和甜味剂含量[J]. 中国现代应用药学,2023,40(6):798-802.
- [5] 孟蕾蕾. 罗汉果止咳糖浆抑菌剂含量测定和抑菌效力的研究[J]. 中国药品标准,2023,24(3):319-323.
- [6] 唐川,沈学彬,桂凌. 高效液相色谱法同时测定肺力咳合剂中苯甲酸钠等6种防腐剂含量[J]. 儿科药理学杂志,2022,28(9):26-29.
- [7] 张筱,隋海山,李现菊,等. HPLC-DAD法同时测定复方甘草片中3种有效成分和5种防腐剂[J]. 中成药,2022,44(2):376-380.
- [8] 黄慧,孙煜,何虹,等. HPLC法同时测定复方黄藤洗液中3个有效成分及2种防腐剂的含量[J]. 药学研究,2021,40(12):790-793.
- [9] 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.
- [10] 魏文芝,王天学,张敏娟. HPLC法同时测定复方磷酸可待因口服液中3种有效成分及2种防腐剂的含量[J]. 中国药房,2018,29(18):2501-2504.
- [11] 任菲菲,魏静,李晶平. 高效液相色谱法测定化妆品中5种防腐剂[J]. 化学分析计量,2023,32(5):51-55.
- [12] 陈婧,王文强,孙姗姗,等. 高效液相色谱法测定湿巾中7种防腐剂[J]. 轻工标准与质量,2023(4):64-67.
- [13] 马永青,杜高锋,李小盼. 高效液相色谱法双波长测定川贝枇杷糖浆中8种防腐剂含量[J]. 沈阳药科大学学报,2022,39(12):1439-1446.
- [14] 时佩,冯有龙,鲁寅生,等. HPLC法测定不同厂家小儿止咳糖浆中防腐剂的含量[J]. 药学与临床研究,2022,30(4):323-326.
- [15] 钱保勇,朱琼,吴珺. HPLC法测定滴眼液中5种常用抑菌剂的含量[J]. 中国药品标准,2023,24(1):90-95.
- [16] 许有诚,赵庄,李丹凤. MEKC法同时测定中药口服液体制剂中10种防腐剂和甜味剂含量[J]. 中国现代应用药学,2023,40(6):798-802.

(收稿日期:2023-11-30;修回日期:2024-06-09)