

# HPLC法测定并比较药用级与非药用级苯甲酸钠的含量

粟 贵\*,刘雁鸣#,龙海燕,李 颖,廖 彬(湖南药用辅料检验检测中心,长沙 410014)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)18-2566-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.18.40

**摘要** 目的:建立测定并比较药用级(药用辅料和原料药)与非药用级(化学试剂和食品添加剂)苯甲酸钠含量的方法。方法:采用高效液相色谱法测定含量,并采用SPSS 18.0软件对含量测定结果进行统计和比较。色谱柱为Purospher STAR LP RP-18 endcapped,流动相为乙腈-0.02%甲酸(用氨水调pH至4.0)(30:70, V/V),流速为1.0 ml/min,检测波长为230 nm,柱温为35 ℃,进样量为20 μl。结果:苯甲酸钠检测质量浓度线性范围为10.5~525.3 μg/ml( $r=0.999\ 9$ );精密性、稳定性、重复性、耐用性试验的RSD<0.5%;加样回收率为99.38%~101.26%(RSD=0.56%, $n=9$ )。药用级与非药用级样品含量均值在99.400%~99.875%之间,非药用级样品含量均值低于药用级。结论:该方法准确、简便、专属性强、重复性好,可用于药用级与非药用级苯甲酸钠的含量测定和比较。

**关键词** 高效液相色谱法;苯甲酸钠;药用级;非药用级;含量;比较

## Determination and Comparison of the Content of Sodium Benzoate in Medicinal and Non-medicinal Grade by HPLC

SU Gui, LIU Yanming, LONG Haiyan, LI Ying, LIAO Bin (Hunan Pharmaceutical Excipients Testing and Inspection Center, Changsha 410014, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish a method to determine and compare the contents of sodium benzoate in medicinal (pharmaceutical excipients and active pharmaceutical ingredients) and non-medicinal (chemical reagents and food additives) grade. METHODS: HPLC was conducted for content determination, SPSS 18.0 software was adopted to compare the results. The column was Purospher STAR LP RP-18 endcapped with mobile phase of acetonitrile-0.02% formic acid (adjusted pH to 4.0 with aqua ammonia) (30:70, V/V) at a flow rate was 1.0 ml/min, the detection wavelength was 230 nm, column temperature was 35 ℃, and volume injection was 20 μl. RESULTS: The linear range of sodium benzoate was 10.5-525.3 μg/ml ( $r=0.999\ 9$ ); RSDs of precision, stability, reproducibility and durability tests were lower than 0.5%; recovery was 99.38%-101.26% (RSD=0.56%, $n=9$ ). The average contents of sodium benzoate in medicinal and non-medicinal grade were between 99.400%-99.875%, but the average content of non-medicinal grade is lower than the medical grade. CONCLUSIONS: The method is accurate and simple with high specificity and good reproducibility, and can be used to determine and compare the content of sodium benzoate in medicinal and non-medicinal grade.

**KEYWORDS** HPLC; Sodium benzoate; Medicinal; Non-medicinal; Content; Comparison

苯甲酸钠具有杀菌、抑菌作用,在食品、医药、化妆品等行业中应用广泛。在食品工业中,其是使用时间最长、使用量最大的防腐剂,主要用于酱油、醋、酱菜、饮料等产品的防腐防腐。在医药工业中,其一般在中性或微酸性的制剂中作为药用辅料使用,国内生产的口服液、混悬剂、糖浆剂、滴眼剂、注射剂等剂型中均有应用,尤其在外用、口服的液体制剂和半固体制剂中应用较广泛<sup>[1-3]</sup>。苯甲酸钠收载于《中国药典》2015年版(四部)<sup>[4]</sup>,相关标准收录了采用高氯酸非水滴定法测定其含量的方法,该法为测定样品中的总碱量;而根据其合成工艺<sup>[5-6]</sup>推断,样品中可能存在合成所用碳酸钠或碳酸氢钠的残留,这些弱碱性物质的残留可能对测定结果产生干扰,影响结果的准确性。故本试验建立了高效液相色谱(HPLC)法测定药用级(药用辅料和原料药)与非药用级(化学试剂和食品添加剂)苯甲酸钠的含量,并对不同级别苯甲酸钠的含量测定结果进

行了比较。本法与现行标准方法比较,具有准确、简便、专属性强、重复性好的特点,可为苯甲酸钠质量标准的提高提供参考。

### 1 材料

#### 1.1 仪器

LC-20A型HPLC仪,包括SPD-M20A二极管阵列检测器、LC-solution色谱数据工作站(日本岛津公司);ML204型电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司)。

#### 1.2 药品与试剂

苯甲酸钠对照品(美国阿拉丁工业公司,批号:K1306039,纯度:99.0%);苯甲酸钠样品[分药用级(原料药和药用辅料)与非药用级(化学试剂和食品添加剂),共63批,生产企业和批号等信息见表1];乙腈(色谱纯,德国默克公司);其余所需化学试剂均为分析纯(国药集团化学试剂有限公司),水为自制超纯水。

### 2 方法与结果

#### 2.1 色谱条件

色谱柱:Purospher STAR LP RP-18 endcapped(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.02%甲酸(用氨水调pH至4.0)

\* 主管药师,硕士。研究方向:药用辅料检验。E-mail: 273340484@qq.com

# 通信作者:主任药师,教授,硕士。研究方向:化学药、药用辅料检验与质量标准。电话:0731-82275838。E-mail: ymliu0608@163.com

(30:70, V/V); 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 230 nm; 柱温: 35 °C; 进样量: 20 μl。

表1 样品相关信息

Tab 1 Related information of samples				
生产企业	批号	级别	样品编号	
A	20131206	国产化学试剂	1	
	B	O55283	进口化学试剂	2
		C57098	进口化学试剂	3
	C	101320130602	药用辅料	4
		101320130601	药用辅料	5
		101320140204	药用辅料	6
		101320131001	药用辅料	7
		101320130801	药用辅料	8
		101320131104	药用辅料	9
		20120301	药用辅料	10
		101320140306	药用辅料	11
		101320130101	药用辅料	12
		101320140402	药用辅料	13
		101320140501	药用辅料	14
		101320140502	药用辅料	15
		101320140309	药用辅料	16
		101320140206	药用辅料	17
		101320140307	药用辅料	18
		101320130302	药用辅料	19
		101320140312	药用辅料	20
		101320130202	药用辅料	21
		101320131110	药用辅料	22
		101320140302	药用辅料	23
		101320131202	药用辅料	24
		101320121001	药用辅料	25
D		201304008	原料药	26
		201312003	原料药	27
		201304014	原料药	28
	201302253	食品添加剂	29	
	201304016	原料药	30	
	201312002	原料药	31	
	201312010	原料药	32	
	201401003	原料药	33	
	201311002	原料药	34	
	201401013	原料药	35	
	201403006	原料药	36	
	201406007	原料药	37	
	201311004	原料药	38	
	201401010	原料药	39	
	201401009	原料药	40	
	E	20130703	药用辅料	41
		20140303	药用辅料	42
		20130701	药用辅料	43
		20130103	药用辅料	44
		20131201	药用辅料	45
20131207		药用辅料	46	
20131204		药用辅料	47	
20130104		药用辅料	48	
20131205		药用辅料	49	
20140403		药用辅料	50	
20140302		药用辅料	51	
20140301		药用辅料	52	
20140604		药用辅料	53	
20140603		药用辅料	54	
20140201		药用辅料	55	
F	130705	原料药	56	
	140306	原料药	57	

续表1

Continued Tab 1

生产企业	批号	级别	样品编号
F	131101	原料药	58
	140304	原料药	59
	140416	原料药	60
G	131206	原料药	61
	140403	药用辅料	62
	140301	药用辅料	63

## 2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 取苯甲酸钠对照品适量,用流动相溶解并稀释制成每1 ml中含0.1 mg的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取样品25 mg,精密称定,置于250 ml量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,即得供试品溶液。

## 2.3 系统适用性试验

分别取空白溶剂(流动相)和“2.2”项下对照品溶液、供试品溶液各20 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。由图1可知,以苯甲酸钠峰计理论板数均>10 000,基线平滑,峰形对称性良好,并且空白溶剂色谱中未出现色谱峰,表明其对测定结果无干扰。

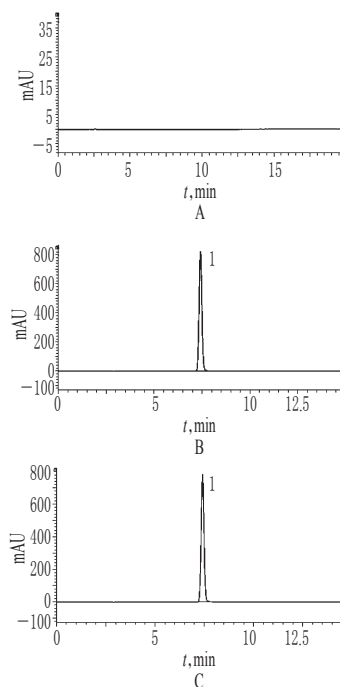


图1 高效液相色谱图

A. 空白溶剂; B. 对照品溶液; C. 供试品溶液; 1. 苯甲酸钠

Fig 1 HPLC chromatograms

A. blank solvent; B. reference substances solution; C. test sample solution; 1. sodium benzoate

## 2.4 线性关系考察

精密称取苯甲酸钠对照品53.07 mg,置于50 ml量瓶中,用流动相溶解并稀释至刻度,分别精密量取适量,用流动相定量稀释,制成质量浓度约为10、50、100、200、500 μg/ml的系列对照品溶液,作为系列线性工作溶液。分别精密量取上述系列线性工作溶液各20 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定。以苯甲酸钠质量浓度(x, μg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程为 $y=44\ 535\ 306x-14\ 144$ ( $r=0.999\ 9$ )。结果表明,苯甲酸钠检测质量浓度线性范围为10.5~

525.3 μg/ml。

## 2.5 精密度试验

精密量取“2.2.1”项下对照品溶液 20 μl,按“2.1”项下色谱条件进样,连续测定6次,记录峰面积。结果,苯甲酸钠峰面积的RSD=0.02% (n=6),说明仪器精密度良好。

## 2.6 稳定性试验

精密称取样品(批号:101320140307)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,在室温(25℃)下放置0、2、4、8、16、24 h时分别取样20 μl,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,苯甲酸钠峰面积的RSD=0.46% (n=6),说明供试品溶液在24 h内稳定性良好。

## 2.7 重复性试验

精密称取样品(批号:101320140307)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,共6份,再按“2.1”项下色谱条件进样测定并计算含量。结果,苯甲酸钠的平均含量为0.994 0 mg/mg, RSD=0.23% (n=6),表明本方法重复性良好。

## 2.8 加样回收率试验

称取已知含量样品(批号:101320140307,苯甲酸钠含量为0.994 0 mg/mg)各适量(约12.5 mg),共9份,精密称定,置于不同的250 ml量瓶中,分别精密加入高、中、低不同量(各3份)的苯甲酸钠对照品适量,用流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,按“2.1”项下色谱条件进样测定并计算加样回收率,结果见表2。

表2 加样回收率试验结果(n=9)

Tab 2 Results of the recovery test (n=9)

样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	加样回收率,%	平均加样回收率,%	RSD,%
12.50	15.81	28.30	100.56		
13.12	15.59	28.66	100.44		
12.43	15.80	28.30	101.26		
12.81	12.90	25.61	100.07		
12.70	12.88	25.45	99.76	100.24	0.56
12.72	12.92	25.44	99.38		
12.11	10.59	22.59	100.00		
12.00	10.42	22.39	100.67		
12.32	10.19	22.39	100.00		

## 2.9 耐用性试验

精密称取样品(批号:101320140307)适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,另选用Acclaim™ 120 C<sub>18</sub>(250 mm×4.6 mm, 5 μm)和Boston Green ODS-AQ(250 mm×4.6 mm, 5 μm)两种品牌色谱柱,分别考察柱温变化±5℃、流速变化±20%时对测定结果的影响。结果,所得苯甲酸钠含量的RSD=0.26% (n=3),说明本方法在不同流速、柱温、色谱柱下的耐用性较好。

## 2.10 样品含量测定

分别取各编号样品25 mg,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,并以外标法计算样品中苯甲酸钠的含量,同时将采用《中国药典》2015年版(四部)中滴定法测定结果也列于表中作比较,详见表3。

表3 样品含量测定结果(n=2,%)

Tab 3 Results of contents determination of samples (n=2,%)

样品编号	HPLC法	《中国药典》滴定法
1	99.4	100.0
2	99.3	100.8
3	99.5	100.9

续表3  
Continued Tab 3

样品编号	HPLC法	《中国药典》滴定法
4	100.0	100.5
5	99.6	100.3
6	100.0	100.4
7	99.5	100.6
8	100.0	100.4
9	99.4	99.4
10	100.0	99.8
11	99.6	100.5
12	99.3	100.7
13	99.7	100.4
14	99.9	100.6
15	100.2	100.3
16	99.6	100.6
17	99.5	100.2
18	100.3	100.6
19	99.7	100.5
20	100.2	100.4
21	100.8	100.6
22	100.1	100.6
23	99.8	100.7
24	100.2	100.6
25	99.2	99.8
26	99.1	100.0
27	99.9	100.6
28	99.4	100.2
29	99.5	100.6
30	99.4	100.6
31	99.1	100.5
32	100	99.9
33	100.3	99.7
34	100.5	100.3
35	99.6	100.2
36	100.4	99.8
37	99.5	99.4
38	100.1	99.7
39	100.8	100.7
40	100.6	100.5
41	99.5	100.1
42	99.6	100.4
43	99.5	99.4
44	100.2	100.2
45	99.3	99.9
46	99.9	100.4
47	100	100.5
48	99.9	100.4
49	99.8	99.7
50	100.4	100.7
51	99.5	100.0
52	100.6	100.6
53	100.5	99.9
54	99.8	99.6
55	99.5	99.5
56	100	100.3
57	99.5	99.6
58	99.7	99.8
59	99.6	100.6
60	100.3	99.6
61	99.7	99.6

续表3  
Continued Tab 3

样品编号	HPLC法	《中国药典》滴定法
62	100.1	100.0
63	100.3	100.0

### 2.11 药用级与非药用级苯甲酸钠样品含量比较

采用SPSS 18.0软件,将药用级与非药用级苯甲酸钠样品所测得的含量进行统计学分析,结果见表4、图2。

表4 药用级与非药用级苯甲酸钠样品所测得含量的统计学分析结果(%)

Tab 4 The statistical analysis summary about content determination between sodium benzoate samples in medicinal and non-medicinal grade(%)

级别	批次	均值	标准偏差
药用级			
药用辅料	39	99.871	0.383
原料药	20	99.875	0.494
非药用级			
化学试剂	3	99.400	0.100
食品添加剂	1	99.500	
合计	63	99.844	0.421

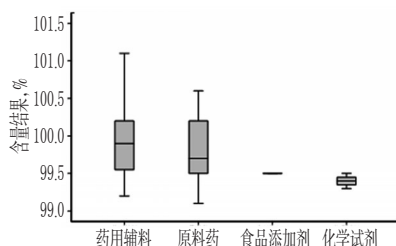


图2 药用级与非药用级苯甲酸钠样品所测得含量的箱式图  
Fig 2 The box figure about content determination of sodium benzoate samples in medical and non-medical grade

以上统计结果显示:(1)药用级与非药用级苯甲酸钠样品的含量均值在99.400%~99.875%之间,但非药用级(化学试剂和食品添加剂)样品含量均值低于全部抽样样品含量均值,从箱式图分析亦可知,非药用级样品处于偏低水平。(2)两种药用级(药用辅料和原料药)苯甲酸钠样品含量从均值和标准偏差上分析,处于相当的水平。

## 3 讨论

### 3.1 流动相的选择

本试验曾考察了乙腈-乙酸铵溶液(0.02 mol/L)<sup>[7]</sup>、甲醇-磷酸二氢钾溶液(0.05 mol/L)流动相系统<sup>[8]</sup>,结果发现苯甲酸钠均有明显的拖尾现象,基线噪声较大,分离效果不佳。而在考察乙腈-0.02%甲酸(30:70, V/V)流动相系统时发现基线平整,分离度远大于1.5,故确定选用该流动相<sup>[9-10]</sup>。

同时,进一步考察0.02%甲酸用氨水分别调pH至3.0、3.5、4.0、4.5时对苯甲酸钠分析的影响。结果显示,当pH为4.5时,出现峰前延现象,拖尾因子0.577;当pH为3.5时,峰拖尾明显,拖尾因子为1.20,峰形不对称;而当pH为4.0时,拖尾因子理想,峰形对称性好。故最终选择乙腈-0.02%甲酸(用氨水调pH至4.0)(30:70, V/V)为本试验的流动相系统。

### 3.2 结果分析

采用本方法测定时,A、B企业生产的化学试剂样品和D企业生产的食品添加剂样品含量结果明显低于采用滴定法测定结果,分析可能为滴定法测定时,样品中存在的碳酸氢钠、碳酸钠残留影响了结果的准确性。

药用级(药用辅料和原料药)样品HPLC法测定结果均值高于非药用级(化学试剂和食品添加剂),说明药用级样品纯度高于非药用级,药用级样品中碳酸氢钠、碳酸钠残留整体水平低于非药用级样品。

### 参考文献

- [1] 罗明生,高天惠,侯世祥,等.药剂辅料大全[M].2版.成都:四川科学技术出版社,2006:1 086-1 087.
- [2] 庄家俊.我国苯甲酸钠生产应用及市场趋势[J].上海化工,2000(13):30.
- [3] 姚静.药用辅料应用指南[M].北京:中国医药科技出版社,2011:146-147.
- [4] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:518-519.
- [5] 王晓君,刘吉平.苯甲酸的合成工艺[J].化工进展,2011,30(S1):603.
- [6] 吴鑫干,陈舒伐.苯甲酸的合成和精制[J].现代化工,2000,20(8):10.
- [7] 国家质量监督检验检疫总局,国家标准化委员会.国家标准GB/T 23495-2009:食品中苯甲酸、山梨酸和糖精钠的测定高效液相色谱法[S].2009年版.北京:中国标准出版社,2009:1-6.
- [8] 杨海涛,姚兰,蒋文强.高效液相色谱法测定饮料中的苯甲酸钠[J].中国酿造,2007(12):64.
- [9] 粟贵,刘雁鸣,李兰,等.高效液相色谱法测定药用辅料苯甲醇中苯甲酸和苯甲醛含量[J].中南药学,2014,12(12):1 239.
- [10] 李菊,刘淑君,黄雪琳.苯甲酸和苯甲酸钠安全性与检测方法研究进展[J].粮食与油脂,2012(9):49.

(收稿日期:2015-07-12 修回日期:2016-05-04)

(编辑:周 箐)

《中国药房》杂志——《乌利希期刊指南》(UPD)收录期刊,欢迎投稿、订阅