

HPLC法测定安神补脑液中防腐剂的含量[△]

陈灵君^{1*},王发英²,王伟影^{2#}(1.浙江中医药大学附属第三医院,杭州 310005;2.丽水市食品药品与质量技术监督检验院,浙江丽水 323000)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)33-4722-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.33.31

摘要 目的:建立测定安神补脑液中防腐剂含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Agilent Zorbax SB-C₁₈,流动相为乙腈-0.05%磷酸溶液(梯度洗脱),流速为1.0 mL/min,检测波长为236 nm,柱温为30 ℃,进样量为10 μL。结果:苯甲酸和羟苯乙酯检测质量浓度线性范围分别为12.85~128.54 μg/mL($r=0.999\ 9$)、4.05~40.48 μg/mL($r=0.999\ 8$);定量限分别为0.514、1.012 μg/mL,检测限分别为0.171、0.353 μg/mL;精密性、稳定性、重复性试验的RSD<1.0%;加样回收率分别为99.38%~100.21%(RSD=0.31%, $n=6$)、97.96%~100.72%(RSD=0.91%, $n=6$)。结论:该方法操作简单、结果准确,可用于安神补脑液中防腐剂的含量测定。

关键词 高效液相色谱法;安神补脑液;防腐剂;含量

Content Determination of Antiseptics in Anshen Bunao Oral Liquid by HPLC

CHEN Lingjun¹, WANG Faying², WANG Weiyong² (1.The Third Affiliated Hospital of Zhejiang University of TCM, Hangzhou 310005, China; 2.Lishui Inspection Institute of Food and Drug & Quality and Technology Inspection, Zhejiang Lishui 323000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determination of antiseptics in Anshen bunao oral liquid. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Agilent Zorbax SB-C₁₈ column with mobile phase consisted of acetonitrile-0.05% phosphoric acid solution (gradient elution) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 236 nm, and column temperature was 30 ℃. The injection volume was 10 μL. RESULTS: The linear range of benzoic acid and ethylparaben were 12.85-128.54 μg/mL($r=0.999\ 9$) and 4.05-40.48 μg/mL($r=0.999\ 8$), respectively. The limits of quantitation were 0.514, 1.012 μg/mL. The limits of detection were 0.171, 0.353 μg/mL. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 1.0%. The recoveries were 99.38%-100.21% (RSD=0.31%, $n=6$), 97.96%-100.72% (RSD=0.91%, $n=6$). CONCLUSIONS: The method is simple and accurate, and can be used for content determination of antiseptics in Anshen bunao oral liquid.

KEYWORDS HPLC; Anshen bunao oral liquid; Antiseptics; Content

安神补脑液是由鹿茸、制何首乌、淫羊藿提取物及维生素B₁等加入单糖浆/蔗糖溶液/果糖溶液及防腐剂制成的复方中药制剂,具有生精补髓、益气养血、强脑安神的功效;可用于肾精不足、气血两亏所致的头晕、乏力、健忘、失眠等症的治疗^[1]。该制剂收载于2015年版《中国药典》(一部),现行标准只对处方中部分药味进行了鉴别或含量的测定,但对其中的防腐剂尚未作出规定^[1]。安神补脑液中所用的防腐剂为常用化学防腐剂——苯甲酸和羟苯乙酯。过量使用苯甲酸不仅破坏维生素B₁、影响人体对钙的吸收、刺激胃肠道、损坏神经系统,而且还会对人体肝脏造成危害,具有致癌性、细胞毒性^[2-3];过量使用羟苯乙酯会产生变态反应以及类激素作用^[4]。为保证患者的用药安全,笔者参考相关文献^[5-7],采用高效液

相色谱法(HPLC)建立了测定该制剂中防腐剂含量的方法,以期完善该制剂的质量标准提供参考。

1 材料

1.1 仪器

1260型HPLC仪、包括G4212B二极管阵列检测器、G1329B自动进样器、Agilent色谱工作站(美国Agilent公司);XS105DU型电子分析天平(瑞士Mettler-Toledo公司);Milli-Q A10型超纯水仪(美国Millipore公司)

1.2 药品与试剂

安神补脑液(吉林敖东延边药业股份有限公司,批号:1512026、1604211、1604213、1606214、1609020,规格:10 mL/支);苯甲酸对照品(批号:100419-201202,纯度:100%)、羟苯乙酯对照品(批号:00847-201102,纯度:99.9%)均购自中国食品药品检定研究院;乙腈、甲醇和磷酸为色谱纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Zorbax SB-C₁₈(250 mm×4.6 mm,5

[△] 基金项目:浙江省公共科技条件平台项目(No.2012E60008)

* 中药师。研究方向:中药质量控制。电话:0571-87238002。

E-mail:chen3952991@163.com

通信作者:副主任中药师。研究方向:药物分析、药物质量控制。电话:0578-2661121。E-mail:onlyying0508@gmail.com

μm);流动相:乙腈(A)-0.05%磷酸溶液(B),梯度洗脱(0~5 min, 16%→20% A; 5~25 min, 20%→85% A);流速:1.0 mL/min;检测波长:236 nm;柱温:30 ℃;进样量:10 μL 。

2.2 溶液的制备

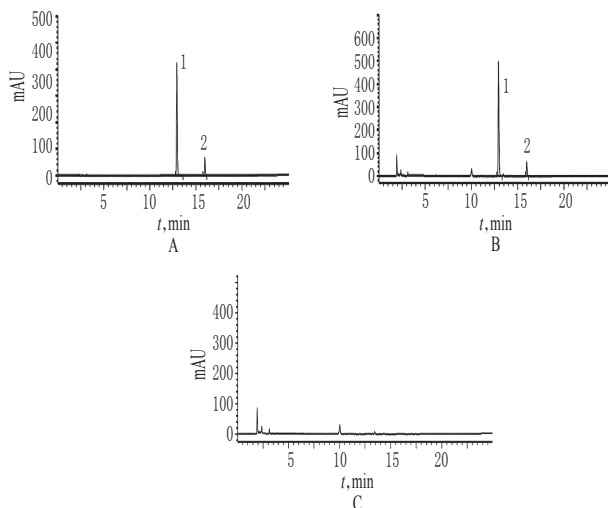
2.2.1 混合对照品溶液 精密称取苯甲酸对照品24.10 mg和羟苯乙酯对照品15.18 mg,分别加甲醇制成每1 mL含苯甲酸482.0 μg 、羟苯乙酯303.6 μg 的单一对照品贮备液。精密吸取上述两种单一对照品贮备液各适量,加甲醇制成每1 mL含苯甲酸64.27 μg 、羟苯乙酯20.24 μg 的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密量取样品2 mL,置于50 mL量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,经0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.2.3 阴性对照溶液 按样品的处方比例和制备工艺制备无防腐剂的样品,再按“2.2.2”项下方法制备阴性对照溶液。

2.3 系统适用性试验

取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液和阴性对照溶液各适量,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,各待测成分均能达到基线分离,分离度均 >1.5 ;理论板数以苯甲酸峰计为109 061,以羟苯乙酯峰计为192 418;保留时间分别为12.93、15.97 min。结果表明,其他成分对测定无干扰。



A.混合对照品;B.供试品;C.阴性对照;1.苯甲酸;2.羟苯乙酯
A.mixed control; B.test sample; C.negative control; 1.benzoic acid; 2.ethylparaben

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.4 线性关系考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液0.1、0.2、0.5、1、2

mL,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以苯甲酸和羟苯乙酯质量浓度(x , $\mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得苯甲酸回归方程为 $y=40.0584x-0.0456$ ($r=0.9999$)、羟苯乙酯回归方程为 $y=19.1965x+0.0363$ ($r=0.9998$)。结果表明,苯甲酸和羟苯乙酯检测质量浓度线性范围分别为12.85~128.54、4.05~40.48 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.5 定量限(LOQ)与检测限(LOD)考察

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,倍比稀释,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。当信噪比为10:1时,得LOQ;当信噪比为3:1时,得LOD。结果,苯甲酸和羟苯乙酯的LOQ分别为0.514、1.012 $\mu\text{g}/\text{mL}$,LOD分别为0.171、0.353 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.6 精密度试验

取“2.2.1”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,苯甲酸和羟苯乙酯峰面积的RSD分别为0.15%、0.17%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

取“2.2.2”项下供试品溶液(批号:1512026)适量,分别于室温下放置0、2、4、8、12、18、30 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,苯甲酸和羟苯乙酯峰面积的RSD分别为0.17%、0.47%($n=7$),表明供试品溶液在室温下放置30 h内稳定性良好。

2.8 重复性试验

取样品(批号:1512026)适量,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,记录峰面积并计算样品含量。结果,苯甲酸和羟苯乙酯含量的平均值分别为0.188%、0.046%,RSD分别为0.31%、0.98%($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

精密量取样品(批号:1512026)1 mL,共6份,分别置于50 mL量瓶中,各加入一定质量的苯甲酸和羟苯乙酯对照品,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,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表1。

2.10 样品中防腐剂含量测定

取5批样品各适量,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,记录峰面积并计算防腐剂含量,结果见表2。

3 讨论

表1 加样回收率试验结果(n=6)

Tab 1 Results of recovery tests(n=6)

待测成分	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,%
苯甲酸	1.882 0	1.928 0	3.805 0	99.74	99.80	0.31
	1.882 0	1.928 0	3.814 0	100.21		
	1.882 0	1.928 0	3.798 0	99.38		
	1.882 0	1.928 0	3.808 0	99.90		
	1.882 0	1.928 0	3.801 0	99.53		
	1.882 0	1.928 0	3.811 0	100.05		
羟苯乙酯	0.459 8	0.485 8	0.944 2	99.71	99.36	0.91
	0.459 8	0.485 8	0.941 7	99.20		
	0.459 8	0.485 8	0.941 0	99.05		
	0.459 8	0.485 8	0.935 7	97.96		
	0.459 8	0.485 8	0.943 3	99.52		
	0.459 8	0.485 8	0.949 1	100.72		

表2 样品防腐剂含量测定结果(n=3,%)

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

样品批号	苯甲酸	羟苯乙酯
1512026	0.188	0.046
1604211	0.178	0.045
1604213	0.176	0.044
1606214	0.178	0.045
1609020	0.181	0.043

3.1 流动相的选择

笔者参考相关文献^[8-9],考察了甲醇-水、乙腈-水、甲醇-0.02%乙酸铵溶液、乙腈-0.05%磷酸溶液作为流动相对色谱分离的影响。结果,甲醇-水、乙腈-水为流动相进行梯度洗脱时,苯甲酸和羟苯乙酯有拖尾现象;以甲醇-0.02%乙酸铵溶液为流动相进行梯度洗脱时,苯甲酸和羟苯乙酯的保留时间波动较大;以乙腈-0.05%磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱时,苯甲酸和羟苯乙酯分离效果理想、峰形佳、理论板数高。故本试验选择乙腈-0.05%磷酸溶液为流动相进行梯度洗脱。

3.2 检测波长的选择

查阅相关文献^[10-12],苯甲酸和羟苯乙酯的检测波长不同。但在预试验中,笔者在200~400 nm波长范围内进行全波长扫描,发现苯甲酸和羟苯乙酯在236 nm波长处响应值均较高,且在此波长处无其他成分干扰,因此选择236 nm作为检测波长。

3.3 样品测定结果分析

2015年《中国药典》(四部)对合剂中防腐剂的用量作了规定,其中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],本试验样品中苯甲酸的含量为0.176%~0.188%、羟苯乙酯的含量为0.043%~0.046%,均未超出限定用量;但相比苯甲酸,羟苯乙酯的用量则需注意控制。

综上所述,本方法操作简单、结果准确,可用于安神补脑中防腐剂的含量测定。

参考文献

- [1] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:一部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:884-885.
- [2] 谢兆辉,李学贵,许提森.防腐剂苯甲酸(钠)测定方法的研究进展[J].粮食与油脂,2015,28(3):6-10.
- [3] 王思文,巩江,高昂,等.防腐剂苯甲酸钠的药理及毒理学研究[J].安徽农业科学,2010,38(30):16724、16846.
- [4] 陈龙浩,王雪荣,孙春玲,等.HPLC法测定盐酸丁卡因滴眼液中羟苯乙酯的含量[J].西北药学杂志,2015,30(2):149-151.
- [5] 郭旭光.HPLC法同时测定水杨酸复合洗剂中苯甲酸和水杨酸的含量[J].中国药房,2014,25(28):2667-2669.
- [6] 胡卫南.HPLC法测定强力枇杷露中苯甲酸钠的含量[J].中国药房,2016,27(9):1257-1259.
- [7] 敬小丽,余蓉,李莉,等.高效液相色谱法测定饮料中苯甲酸、山梨酸钾[J].预防医学情报杂志,2017,33(3):212-215.
- [8] 谷亦平,杨园,李霜,等.HPLC法同时测定马来酸噻吗洛尔滴眼液中噻吗洛尔和羟苯乙酯的含量[J].药物分析杂志,2017,37(1):125-129.
- [9] 张留记,周志敏,屠万倩,等.反相高效液相色谱法测定牡丹皮中苯甲酸和苯甲酰基总苷[J].中南药学,2017,15(5):671-673.
- [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):150-156.
- [11] 刘彦,倪美萍,刘睿思,等.中药口服液中苯甲酸、山梨酸和糖精钠的中空纤维离心超滤-HPLC法测定[J].中国医药工业杂志,2017,48(5):726-729.
- [12] 王帆. HPLC法测定罗红霉素颗粒中3种对羟基苯甲酸酯类防腐剂[J].海峡药学,2013,25(8):80-82.
- [13] 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,2015:26.

(收稿日期:2017-07-02 修回日期:2017-08-10)

(编辑:刘柳)