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[1]，王洪明[1△]，李守信[2]，王　辉[2]，赫成杰[2]，孙　辉[2]

（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_{18}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 ℃，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($r \geqslant 0.999\ 8$，$n=6$)；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[1], *WANG Hongming*[1], *LI Shouxin*[2], *WANG Hui*[2], *HE Chengjie*[2], *SUN Hui*[2]

(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_{18} 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 ℃, 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 ($r \geqslant 0.999\ 8$, $n=6$) 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 *RSD*s 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 *RSD*s 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[1]，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%[2]。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)yjscjf@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 μg/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 C_{18}柱(250 mm × 4.6 mm,5 μm);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 → 45%A,25~60 min时45%A → 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 ℃;进样量:10 μL。

2.2 溶液制备

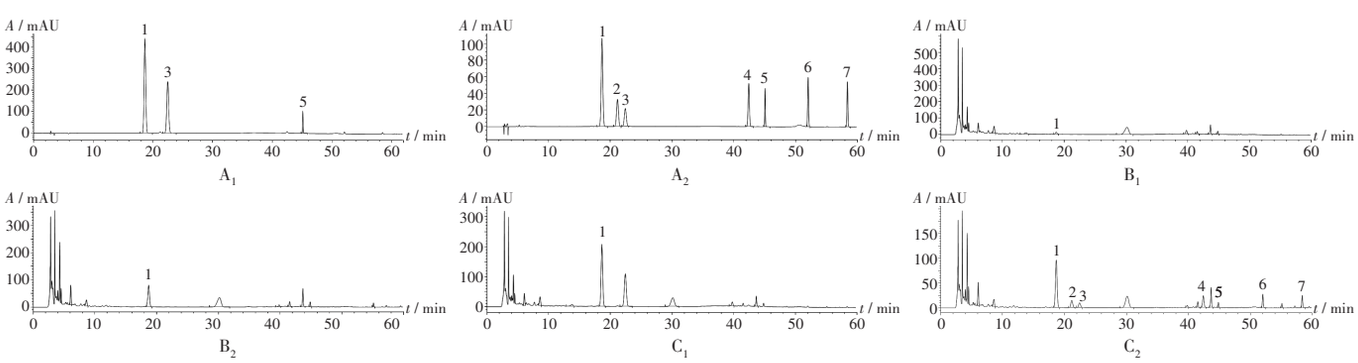
混合对照品溶液:分别取上述7种对照品适量,精密称定,置同一50 mL容量瓶中,加40%甲醇适量,超声(功率100 W,频率45 kHz)10 min,放冷,加40%甲醇定容,摇匀,即得混合对照品贮备液(苯甲酸、山梨酸、脱氢乙酸、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、对羟基苯甲酸丁酯质量浓度分别为1.168,0.584,0.500,0.274,0.152,0.136,0.142 mg/mL)。精密量取0.1,0.5,1.0,2.0,5.0,10.0 mL置100 mL容量瓶中,加40%甲醇定容,摇匀,即得系列混合对照溶液Ⅰ - Ⅵ。

供试品溶液:精密量取样品1.0 mL,置100mL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 μm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溶液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_1,A_2. 混合对照品溶液Ⅳ(227,256 nm) B_1,B_2. 供试品溶液(227,256 nm) C_1,C_2. 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_1,A_2. Mixed reference solution Ⅳ (227,256 nm) B_1,B_2. Test solution (227,256 nm) C_1,C_2. 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，μg/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[3-6]，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）[7-16]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