

高效液相色谱法测定五味子糖浆中 6种抑菌剂的含量

王延华¹, 殷兰兰¹, 范荣波^{1,2*}

(1. 青岛农业大学海都学院, 烟台 265200; 2. 青岛农业大学食品学院, 青岛 266109)

摘要: 目的 建立高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)同时测定五味子糖浆中6种抑菌剂苯甲酸、山梨酸、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸丙酯、对羟基苯甲酸丁酯含量的分析方法。**方法** 采用Kromasil C₁₈柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 0.02 mol/L 乙酸铵和0.08%冰醋酸混合溶液为流动相A, 以甲醇为流动相B进行梯度洗脱, 用紫外检测器检测, 外标法峰面积定量。**结果** 6种抑菌剂线性良好, 相关系数均大于0.99, 检出限为0.068~0.396 μg/mL, 加标回收率平均回收率为82.4%~99.7%, 相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为0.869%~6.956%。**结论** 该方法操作简单, 灵敏度高, 重现性好, 可用于五味子糖浆中6种抑菌剂的检测。

关键词: 高效液相色谱法; 五味子糖浆; 抑菌剂

Determination of 6 kinds of antibacterial agents in schisandra syrup by high performance liquid chromatography

WANG Yan-Hua¹, YIN Lan-Lan¹, FAN Rong-Bo^{1,2*}

(1. Haidu College of Qingdao Agricultural University, Yantai 265200, China;
2. Food College, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

ABSTRACT: Objective To establish a method for the determination of 6 kinds of antibacterial agents (benzoic acid, sorbic acid, methyl hydroxybenzoate, ethyl hydroxybenzoate, propyl hydroxybenzoate and butyl hydroxybenzoate) in schisandra syrup by high performance liquid chromatography(HPLC) simultaneously. **Methods** The Kromasil C₁₈ column(4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used, and 0.02 mol/L ammonium acetate mixed solution and 0.08% glacial acetic acid were used as the flow phase A, methanol was used as the flow phase B for gradient elution. The sample was detected by the UV detector, and quantified by external peak area. **Results** Six kinds of antibacterial agents had good linearity, the correlation coefficient was greater than 0.99, the detection limit was 0.068–0.396 μg/mL, the average recovery rate was 82.4%–99.7%, and the relative standard deviation (RSD) was 0.869%–6.956%. **Conclusion** The method is simple and sensitive, good reproducibility. It can be used for the detection of 6 kinds of antibacterial agents in schisandra syrup.

KEY WORDS: high performance liquid chromatography; schisandra syrup; antibacterial agents

基金项目: 基于应用型人才培养的食品营养学课程的教学改革项目(JY201916)

Fund: Supported by the Teaching Reform Project of Food Nutrition Course Based on Applied Talents Training (JY201916)

*通信作者: 范荣波, 副教授, 主要研究方向为食品科学与工程。E-mail: 15590011@qq.com

*Corresponding author: FAN Rong-Bo, Associate Professor, Department of Food, Haidu College, Qingdao Agricultural University, Qingdao 265200, China. E-mail: 15590011@qq.com

0 引言

五味子糖浆作为补益剂由一味五味子组成。具有敛肺滋肾,生津敛汗,涩精止泻,宁心安神等传统功效。抑菌剂是药品生产中最常用的添加剂之一^[1-3],若抑菌剂的用量较少达不到抑制微生物生产,从而影响药品疗效及其质量甚至危害生命安全,若用量超标或超范围使用,也会危害人体消化系统等。五味子糖浆所执行的标准为《中国药典》2015年版^[4-5],该标准的检验项目下未涉及对此6种抑菌剂的定量研究,因此,本研究选择该品种对其抑菌剂的成分及用量进行研究,评估一下市场上该制剂的质量状况。高效液相色谱法是应用广泛、技术成熟的分析物质分离手段^[6-8]。本研究首次采用高效液相色谱法同时测定五味子糖浆中苯甲酸钠、山梨酸、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含量,以期为糖浆中抑菌剂的含量测定提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

甲醇(色谱纯,国药集团/默克公司);乙酸铵、冰醋酸(分析纯,国药集团化学试剂有限公司);苯甲酸、山梨酸(分析纯,中国食品药品研究检定院);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(分析纯,美国Sigma公司)。五味子糖浆:自购于药店。

1.2 仪器与设备

BP211D 电子分析天(德国赛多利斯公司);LC-20AD 高效液相色谱仪(Empower 色谱工作站,日本岛津公司);KQ0500-DE 型数控超声波清洗器(杭州法兰特超声波科技有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 色谱条件

以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,色谱柱:Kromasil C₁₈柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);以含 0.02 mol/L 乙酸铵的 0.08%冰醋酸溶液为流动相 A,以甲醇为流动相 B,按表 1 中的规定进行梯度洗脱。

1.3.2 样品溶液制备

精密量取样品 5 mL 至 25 mL 量瓶中,加甲醇 15 mL,振荡 15 min,0.22 μm 滤膜过滤,滤液作为供试品溶液。

1.3.3 标准曲线绘制

精密称取标准品苯甲酸 9.89 mg、山梨酸 8.50 mg、对羟基苯甲酸甲酯 9.01 mg、对羟基苯甲酸乙酯 9.06 mg、对羟基苯甲酸丙酯 10.41 mg、对羟基苯甲酸丁酯 10.26 mg 置于 50 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容至刻度,作为储备溶液,将储备溶液稀释成浓度分别为 0.1978、0.034、0.03604、0.03624、0.04164、0.04104 mg/mL 的混合标准溶液,分别

精密吸取 2、6、10、15、20、25 μL 注入高效液相色谱仪,按上述色谱条件分析,测定其峰面积,以进样量(X , μg/mL)与峰面积(Y)作标准曲线,计算回归方程。

表 1 梯度洗脱条件
Table 1 Gradient elution conditions

时间/min	流动性 A/%	流动性 B/%
0	80	20
5	70	30
15	65	35
30	30	70
45	30	70
50	80	20
55	80	20

2 结果与分析

2.1 检测波长的选择

取 6 种标准品混合溶液,以甲醇为空白,在 190~400 nm 范围内进行光谱扫描。光谱图显示混合对照溶液在 200、255 nm 处分别有最大吸收,200 nm 为末端吸收,故以 255 nm 做为检测波长。

2.2 流动相体系的选择

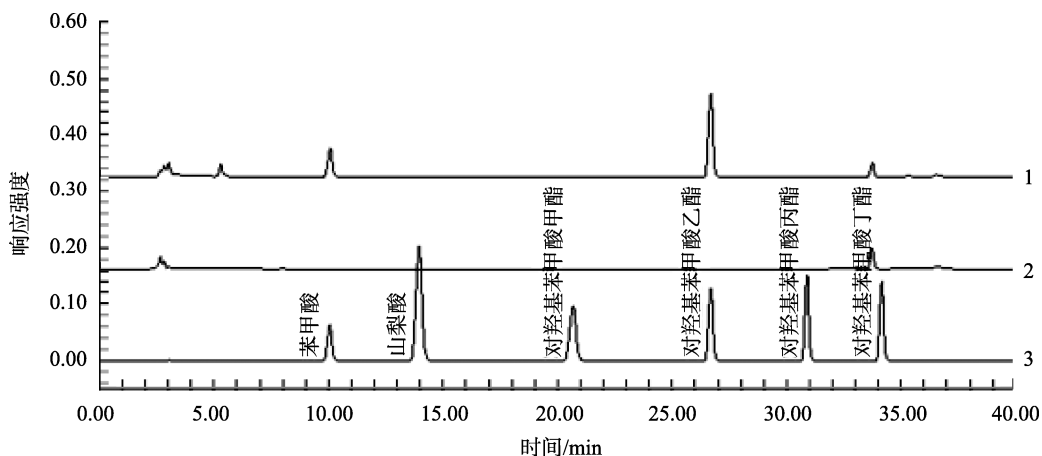
对比了 3 种流动相体系:(1)0.03 mol/L 乙酸铵和 0.06% 冰醋酸混合溶液为流动相 A,以乙腈流动相 B;(2)1% 三乙胺溶液(用磷酸调节 pH 值至 30)为流动相 A,以甲醇为流动相 B;(3)0.02 mol/L 乙酸铵和 0.08% 冰醋酸混合溶液为流动相 A,以甲醇 B。在此条件下检测所得 6 种抑菌剂的色谱图见图 1 所示。结果表明选择 0.02 mol/L 乙酸铵和 0.08% 冰醋酸混合溶液为流动相 A,以甲醇 B 流动相效果最佳。

2.3 标准曲线和检出限

配制 6 个不同浓度的抑菌剂混合标准液,测定其峰面积,以浓度(X , μg/mL)为横坐标,以对应的峰面积 Y 为纵坐标进行线性回归,线性回归方程、相关系数和方法的检出限见表 2。线性关系均大于 0.99,线性关系良好,检出限在 0.068~0.396 μg/mL 范围内,满足检测要求。

2.4 加标回收率

方法的回收率和精密度见表 3。从表 3 可以看出,6 种抑菌剂的回收率为 82.4%~99.7%,相对标准偏差(relative standard deviation, RSD)为 0.869%~6.956%,由此可以看出方法回收率、精密度良好。本方法适合大部分的五味子糖浆样品,为糖浆中这 6 种抑菌剂含量的检测方法提供了可靠的依据。



注: 1 为 0.03 mol/L 乙酸铵和 0.06%冰醋酸; 2 为 1%三乙胺溶液(用磷酸调节 pH 值至 30); 0.02 mol/L 乙酸铵和 0.08%冰醋酸。

图 1 标准曲线色谱图

Fig.1 Standard curve chromatography

表 2 6 种抑菌剂的标准曲线、相关系数和检出限

Table 2 Linear regression equations, correlation coefficients and detection limits of fungicides

名称	标准曲线	线性相关系数 r^2	检出限/($\mu\text{g/mL}$)
苯甲酸	$Y=437838.2X-1282$	0.9968	0.396
山梨酸	$Y=10889020X-1668$	0.9995	0.068
对羟基苯甲酸甲酯	$Y=5201898X-2345$	0.9983	0.072
对羟基苯甲酸乙酯	$Y=4837995X+1446$	0.9999	0.073
对羟基苯甲酸丙酯	$Y=4414243X-2399$	0.9976	0.083
对羟基苯甲酸丁酯	$Y=4129725X-1346$	0.9948	0.082

表 3 方法的回收率和精密度实验($n=6$)

Table 3 Recovery and relative standard deviation in sample ($n=6$)

农药名称	测定值/ (mg/L)	回收率/ %	相对标准 偏差/%
苯甲酸	0.206	82.4	6.956
	2.42	96.8	2.473
	23.6	94.4	4.770
山梨酸	0.384	98.5	3.819
	3.880	97.0	2.397
	36.40	91.0	5.216
对羟基苯甲酸甲酯	0.162	90.0	3.485
	1.651	91.7	0.975
	16.152	89.7	2.556
对羟基苯甲酸乙酯	0.138	92.0	2.752

表 3(续)

农药名称	测定值/ (mg/L)	回收率/ %	相对标准 偏差/%
对羟基苯甲酸丙酯	1.36	90.7	1.721
	13.68	91.2	3.928
	0.127	90.7	2.507
对羟基苯甲酸丁酯	1.28	91.4	1.648
	13.52	96.6	4.261
	0.149	99.3	0.869
	1.496	99.7	2.361
	14.36	95.7	1.489

2.5 实际样品测定

对 10 种市售不同批次的五味子糖浆样品进行抑菌剂的检测。样品测定结果见表 4, 按照《中国药典》2015 年版四部糖浆剂规定羟苯酯类的用量不得过 0.05%, 苯甲酸的用量不得过 0.3%的要求, 10 种样品皆符合国标要求^[9-15]。方法操作简便, 灵敏度高, 重现性好可用于糖浆中抑菌剂的检测。

表 4 样品中 6 种抑菌剂的测定结果
Table 4 Determination of 6 kinds of fungicides in samples

样品	苯甲酸/(mg/L)	山梨酸/(mg/L)	对羟基苯甲酸 甲酯/(mg/L)	对羟基苯甲酸 乙酯/(mg/L)	对羟基苯甲酸 丙酯/(mg/L)	对羟基苯甲酸 丁酯/(mg/L)
样品 1	3.00	2.75	-	-	-	-
样品 2	1.23	-	-	-	9.67	-
样品 3	2.36	-	7.96	-	2.18	-
样品 4	3.06	-	6.85	-	-	-
样品 5	1.23	-	-	-	-	9.76
样品 6	5.69	-	-	4.96	3.58	2.65
样品 7	3.66	7.93	-	-	-	-
样品 8	9.53	11.86	-	7.24	-	-
样品 9	2.03	7.77	-	-	-	-
样品 10	1.89	-	-	2.32	-	-

注：“-”表示未检出。

3 结论与讨论

本研究建立了高效液相色谱法同时测定五味子糖浆中 6 种常用抑菌剂的检测方法, 6 种抑菌剂线性良好, 相关系数均大于 0.99, 加标回收率平均回收率为 82.4%~99.7%, RSD 为 0.869%~6.956%。实验结果表明该方法检出限低、重复性好、精密度高, 为糖浆中的质量控制提供一定的科学依据。本方法简单、快速、准确, 适用于糖浆中抑菌剂的检测, 很大程度上提高了工作效率, 降低了实验成本, 为糖浆的安全监管提供了有力支持和有效保障。

参考文献

- 钱木水, 叶兴法, 倪赤杭. 液体剂中防腐剂选用的体会[J]. 海峡药学, 2009, 21(3): 32-34.
QIAN MS, YE XF, NI CH. Experience in the selection of preservatives in liquid preparations [J]. Taiwan Pharm J, 2009, 21(3): 32-34.
- 兰金苹, 宁丽峰, 张益文, 等. 高效液相色谱法测定口服液类药品中苯甲酸的含量[J]. 中国卫生检验杂志, 2009, (1): 22-25.
LAN JP, NING LF, ZHANG YW, et al. Determination of benzoic acid in oral liquid drugs by HPLC [J]. Chin J Health Insp, 2009, (1): 22-25.
- 孙蒙, 闫小玉, 毕开顺, 等. HPLC 测定 11 种中药口服液中 6 种防腐剂的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(3): 76-79
SUN M, YAN XY, BI KS, et al. Determination of 6 preservatives in 11 kinds of traditional Chinese medicine oral liquid by HPLC [J]. Chin J Experi Prescri, 2012, 18(3): 76-79.
- 马晓璇, 李汶. 防腐剂的定量测定方法概况[J]. 今日药学, 2008, 18(2): 24-26, 28
MA XX, LI W. Overview of quantitative determination of preservatives [J]. Pharm Today, 2008, 18(2): 24-26, 28.
- 周六军, 曹赵云, 周蓉, 等. 高效液相色谱法同时测定 5 种食品中的 12 种添加剂[J]. 农产品质量与安全, 2018, (5): 69, 73, 79.
ZHOU LJ, CAO ZY, ZHOU R, et al. Simultaneous determination of 12 additives in 5 foods by high performance liquid chromatography [J]. Qual Saf Agro-Prod, 2018, (5): 69, 73, 79.
- 刘泰然, 赵海燕, 罗仁才. 超高效液相色谱法同时测定饮料中的 17 种食品添加剂[J]. 中国食品卫生杂志, 2013, 25(1): 44-48.
LIU TR, ZHAO HY, LUO RC. Simultaneous determination of 17 food additives in drinks by ultra high performance liquid chromatography [J]. Chin J Food Hyg, 2013, 25(1): 44-48.
- 王震, 石丽珠. 超高效液相色谱-串联质谱测定饮料和酒中防腐剂与甜味剂[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(4): 1179-1184.
WANG Z, SHI LZ. Determination of preservative and sweetener in drink and wine by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. J Food Saf Qual, 2014, 5(4): 1179-1184.
- 朱万燕, 郭晓艳, 陈伟. 饮料中 35 种添加剂的超高效液相色谱/四级杆-飞行时间质谱筛查法[J]. 中国食品添加剂, 2017, (11): 160-168.
ZHU WY, GUO XY, CHEN W. Screening of 35 kinds of additives in beverages by ultra high performance liquid chromatography coupled with quadrupole-time-of-flight [J]. China Food Addit, 2017, (11): 160-168.
- GB 5009.28—2016 食品安全国家标准 食品中苯甲酸、山梨酸和糖精钠的测定[S].
GB 5009.28—2016 National food safety standard-Determination of benzoic acid, sorbic acid and sodium saccharin in food [S].
- GB 5009.120—2016 食品安全国家标准 食品中丙酸钠、丙酸钙的测定[S].

- GB 5009.120—2016 National food safety standard-Determination of sodium propionate and calcium propionate in food [S].
- [11] GB 5009.31—2016 食品安全国家标准 食品中对羟基苯甲酸酯类的测定[S].
- GB 5009.31—2016 National food safety standard-Determination of phydroxybenzoic acid esters in food [S].
- [12] 袁蒲, 杨丽, 付鹏钰. 我国食品防腐剂应用状况及未来发展趋势[J]. 科技创新导报, 2017, (29): 85-88.
- YUAN P, YANG L, FU PY. Application situation and development trend of food preservative in China [J]. Sci Technol Innov Herald, 2017, (29): 85-88.
- [13] 侯辉. 我国主要食品防腐剂安全性分析[J]. 品牌与标准化, 2018, (4): 86-88.
- HOU H. Analysis on the safety of main food preservatives in China [J]. Brand Stand, 2018, (4): 86-88.
- [14] 任美燕. 食品防腐剂的应用及发展趋势[J]. 现代食品, 2015, 21(15): 39-41.
- REN MY. Application and development of food preservations [J]. Mod Food, 2015, 21(15): 39-41.
- [15] 刘亚男, 岳艳霞. 食品防腐剂应用研究[J]. 现代食品, 2018, (19): 78-80.
- LIU YN, YUE YX. Application of food preservatives [J]. Mod Food, 2018, (19): 78-80.

(责任编辑: 于梦娇)

作者简介

王延华, 讲师, 主要研究方向为食品营养与检测。

E-mail: 120222149@qq.com

范荣波, 副教授, 主要研究方向为食品科学与工程。

E-mail: 15590011@qq.com