

注射液中多种防腐剂的同时检测方法筛选

Study on detecting method of preservative in injecta

严 敏¹ 王立雄² 田仁奎² 柏义章¹

YAN Min¹ WANG Li-xiong² TIAN Ren-kui² BAI Yi-zhang¹

(1. 贵州民族大学化学与环境科学学院, 贵州 贵阳 550025; 2. 贵州省公安厅物证鉴定中心, 贵州 贵阳 550001)

(1. College of Chemistry and Environmental Science, Guizhou Minzu University, Guiyang, Guizhou 550025, China;

2. Forensic Science Laboratory Guizhou Police Force, Guiyang, Guizhou 550001, China)

摘要:研究同时测定注射液中多种防腐剂的两种常见方法(HPLC、GC—MC)。通过试验发现在采用 HPLC 法测定时,VWD 紫外检测器选取检测波长为 230 nm,流动相中甲醇与水的比例为 50 : 50 时,出峰和分离效果较差,色谱峰易出现拖尾现象;而采用 GC—MS 法测定,响应值和分离效果较好,易定性和定量。结果表明:GC—MS 法测定注射液中防腐剂出峰和分离效快捷方便,其检测防腐剂成分的峰面积与浓度的线性关系良好($r>0.994$),加样回收率为 85.06%~88.98%。GC—MS 法灵敏程度高,操作快捷,准确性重现性好,样品预处理简单,是注射液中各种成分防腐剂含量测定的理想检测方法。

关键词:高效液相色谱法;气质联用法;注射液;防腐剂

Abstract: HPLC and GC—MC methods determining several preservatives in injecta was studied. When HPLC method was conducted, with conditions of streaking under 230 nm wavelength for VWD UV detection and 50 : 50 proportion of methanol and water in the mobile phase, the peak with obvious trailing were undesirable. while, using GC—MS method, the response value and separation efficiency were better than that of HPLC and the preservatives were easy to be qualitatively and quantitatively determined. Results: It was quick and easy to determine peak occurrence and separation effects preservatives in injecta with the GC—MS method. The linearity of peak area and concentrations for preservative components was good ($r>0.994$). The recovery rate of sample loading was 85.06%~88.98%. Therefore, GC—MS method is an ideal method to determine contents of various preservatives components in injecta, which is more sensitive, easier to operate, more accuracy, more reproducible, and simpler to prepare samples than HPLC method.

Keywords: HPLC; GC—MS; injecta; preservative

防腐剂是指用于加入到食品、药品、颜料、生物标本等,以延迟微生物生长或化学变化引起的腐败的天然或合成的

化学成分。根据使用习惯,用于固体、半固体制剂中称为防腐剂的天然或合成的化学成分,在滴眼剂和注射剂中也称为“抑菌剂”,食品工业中称为“保存剂”^[1]。注射液中常见的防腐剂有苯甲酸、苯甲醛、苯甲酸钠、苯酚、山梨酸、山梨酸钾、对羟基苯甲酸酯等 32 种^[2]。

大量的临床观察和试验^[3-4]表明,防腐剂对人体存在一定的毒副作用,因此需对注射液中防腐剂的含量进行测定控制,确保临床用药的安全。

当前,国内外测定防腐剂的方法有很多,如光谱法、毛细管电泳法、离子色谱法、分光光度法等^[5-9],使用最多的是色谱法。中国国标对防腐剂的检测主要针对某一种防腐剂采用色谱法,不易实现对同一样品中多种防腐剂的同时检测。Bahrudin Saad 等^[10]采用高效液相色谱法同时测定食品中的苯甲酸、山梨酸、对羟基苯甲酸甲酯及对羟基苯甲酸丙酯 4 种防腐剂,目标组分在 25 min 之内得到了分离。

本研究拟分别以高效液相色谱法(HPLC)和气质联用法(GC—MS)两种方法同时测定注射液中常用的 4 种防腐剂苯甲酸、苯甲醛、苯酚、对羟基苯甲酸乙酯。通过两种方法在检测防腐剂的出峰、分离效果、分离时间以及试验结果的对比,比较两种研究方法针对注射液中防腐剂检测的工作效率,从而筛选出一种更适合于注射液中防腐剂的检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

供试样品:鸡矢藤注射液、地龙注射液、苯甲醇注射液、安钠咖注射液、盐酸罂粟碱注射液、复方庚酸炔诺酮注射液、螻变应原注射液、胰岛素注射液、苦参素注射液、心肌康注射液等 10 种注射液,市售;

苯甲酸、苯酚、苯甲醛、对羟基苯甲酸乙酯:优级纯,贵州迪大生物科技有限公司;

甲醇:色谱纯,国药集团化学试剂有限公司;

1.1.2 仪器

高效液相色谱仪:Agilent 1260 型,配 VWD 检测器,美国安捷伦公司;

作者简介:严敏(1973—),女,贵州民族大学高级实验师,硕士。

E-mail: 577977087@qq.com

收稿日期:2015-10-16

气质联用仪:Agilent 7890A/5975C 型,美国安捷伦公司;
电子天平:TP114 型,丹佛仪器有限公司;
超声波清洗机:SG8200HPT 型,上海冠特超声仪有限公司。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件

(1) 高效液相色谱法条件:ZORBAX Eclipse Plus-C₁₈ (4.6 mm×100 mm,3.5 μm)液相色谱柱,流动相为甲醇:水 (50:50,V:V);流速为 1 mL/min;测定波长为 230 nm;柱温为 28 ℃;进样体积为 10 μL。

(2) 气质联用法条件:HP-5ms 石英毛细管柱(30 mm×0.25 mm×0.25 μm),采用程序升温,柱温起始温度为 100 ℃,以 10 ℃的升温速率升至 250 ℃,维持 3 min;再以 5 ℃的升温速率升至 150 ℃,维持 2 min;质谱条件:离子源:EI(70 eV);离子源温度 230 ℃;四级杆温度 150 ℃;接口温度 200 ℃;溶剂延迟 3 min;采集模式:全扫描。

1.2.2 标准溶液的配制

(1) 各标准储备液(0.1 mg/mL)的制备:用电子天平准确称取苯甲酸、苯甲醛、苯酚、对羟基苯甲酸乙酯各 0.010 g,分别置于洁净的 50 mL 的烧杯中,加一定量 50% 甲醇搅拌至完全溶解后,玻璃棒引流转至 4 个 100 mL 洁净干燥的容量瓶中,用 50% 的甲醇溶液清洗烧杯 2~3 次并倒入容量瓶中,定容,振荡并贴上标签,备用。

(2) 混合标准储备液(1 mg/mL)的制备:用电子天平准确称取苯甲酸、苯甲醛、苯酚、对羟基苯甲酸乙酯各 0.100 g,置于洁净的 50 mL 的烧杯中,加一定量 50% 甲醇搅拌至完全溶解后,玻璃棒引流转至 100 mL 洁净干燥的容量瓶中,用 50% 的甲醇溶液清洗烧杯内壁 2~3 次并倒入容量瓶中,定容,振荡并贴上标签,备用。

(3) 混合标样系列溶液的配制:用移液枪分别准确量取不同体积的混合标准储备液(1 mg/mL)置于 10 mL 容量瓶中,用 50% 的甲醇溶液定容至刻度,即配制成混合标样系列溶液。

2 结果与讨论

2.1 HPLC 法测定标准溶液的色谱图

2.1.1 单个标准溶液的检测及色谱图的绘制 将已经制备好的苯甲酸、苯甲醛、苯酚、对羟基苯甲酸乙酯单个标准储备液(0.1 mg/mL)通过针头过滤器过滤后,按仪器条件进行测定,其色谱图见图 1~4。

2.1.2 混合标准溶液的检测色谱图 测定已经制备好的苯甲酸、苯甲醛、苯酚、对羟基苯甲酸乙酯混合标准储备液(1 mg/mL),其色谱图见图 5。

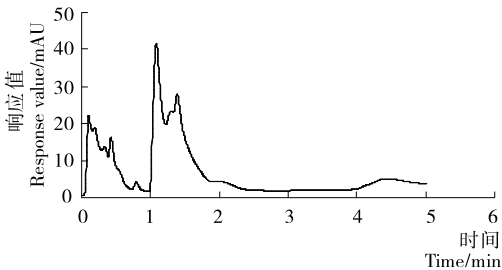


图 1 苯甲酸标准溶液的色谱图

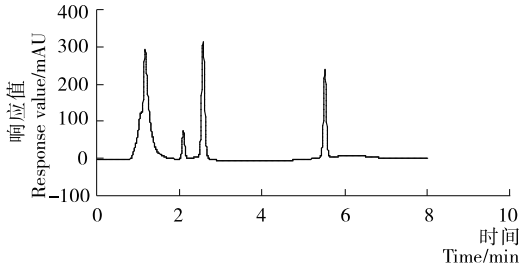


图 2 苯甲醛标准溶液的色谱图

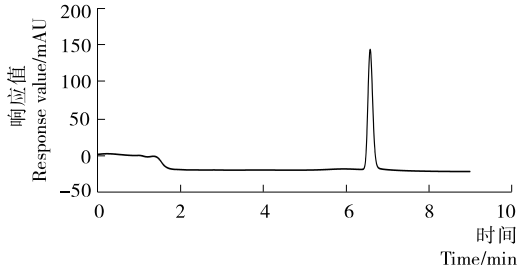


图 3 苯酚标准溶液的色谱图

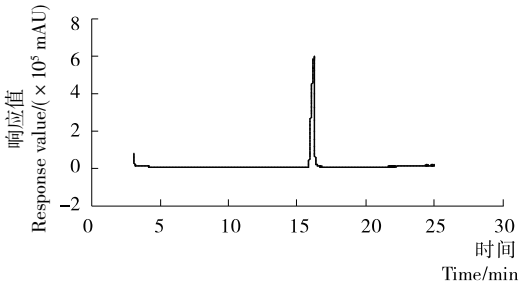


图 4 对羟基苯甲酸乙酯标准溶液的色谱图

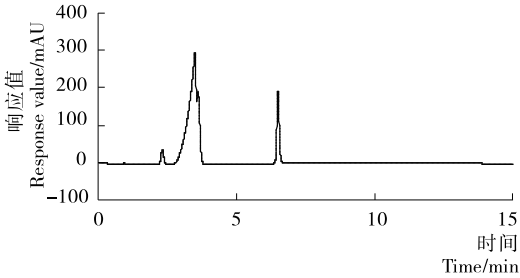


图 5 混合标准溶液的色谱图

Figure 5 Mixed standard solution chromatogram (HPLC)

由图 1~5 可知:① 混合标准溶液的分离效果不好,第 2 色谱峰和第 3 色谱峰未能分离开,即在 4 min 左右的色谱峰未分离,原因可能是流动相或流动相配比没有调整好;② 苯甲酸和苯甲醛的分离效果好,对羟基苯甲酸乙酯的分离效果最差,色谱峰脱轨,没有形成很好的色谱峰。综上,高效液相色谱法测定时流动相的调整过于复杂,难以优化。

2.2 气质联用法测定标准溶液的色谱图和质谱图

混合标样系列溶液通过针头过滤器过滤后,按仪器条件进行测定,结果表明:混合标准溶液的色谱图出峰较好,

Figure 1 Chromatogram of the standard solution of benzoic acid (HPLC)

分离效果好。混合标准溶液的 GC 色谱图和各标准溶液的质谱图见图 6~10。

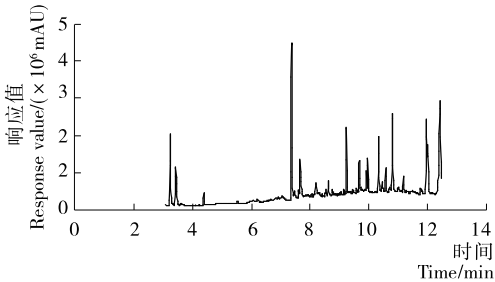


图 6 混合标准溶液的色谱图

Figure 6 Mixed standard solution chromatogram (GC)

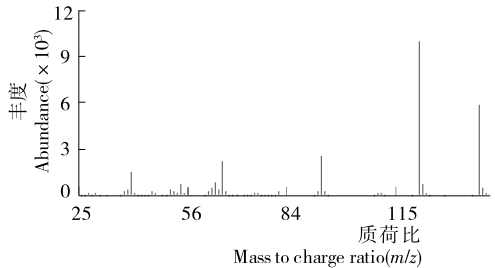


图 7 防腐剂苯甲醛标准溶液的质谱图

Figure 7 Preservatives benzaldehyde mass spectrum of the standard solution

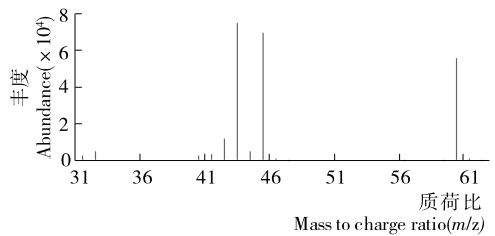


图 8 防腐剂苯酚标准溶液的质谱图

Figure 8 Preservatives mass spectrum of the standard solution of phenol

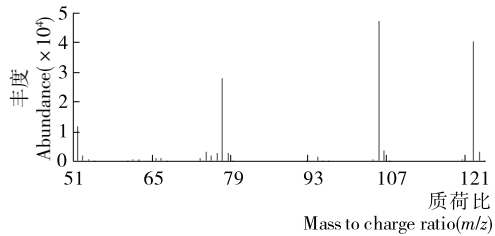


图 9 防腐剂苯甲酸标准溶液的质谱图

Figure 9 Preservatives mass spectrum of the benzoic acid

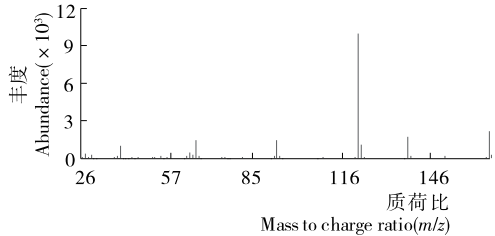


图 10 防腐剂对羟基苯甲酸乙酯标准溶液的质谱图

Figure 10 Preservatives benzoic acid,4-hydroxy-, ethyl ester mass spectrum of the standard solution

2.2.1 气质联用法测定标准溶液及标准曲线的绘制 混合标样系列溶液,通过针头过滤器过滤后,按仪器条件进样检测。结果(图 11~14)表明,当苯甲酸、苯甲醛、苯酚、对羟基苯甲酸乙酯的浓度在试验范围内,峰面积与标准溶液浓度线性关系良好,相关系数为 0.994 3~0.999 9。

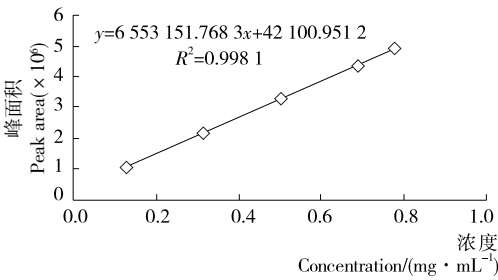


图 11 防腐剂苯甲醛标准液线性图

Figure 11 Preservatives standard solution of benzaldehyde linear graph

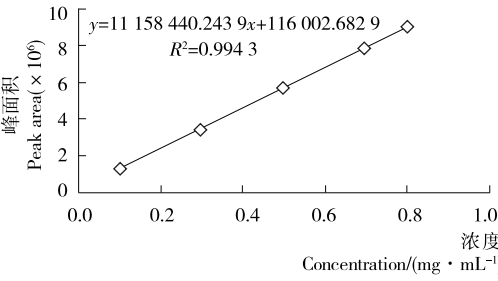


图 12 防腐剂苯酚标准液线性图

Figure 12 Standard solution of phenol preservative linear graph

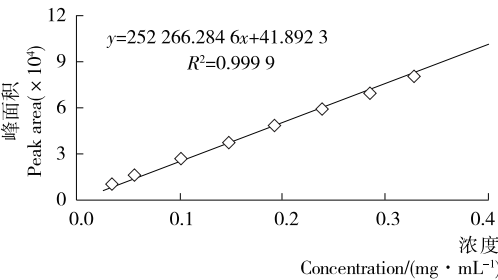


图 13 苯甲酸标准液线性图

Figure 13 The standard curve of benzoic acid

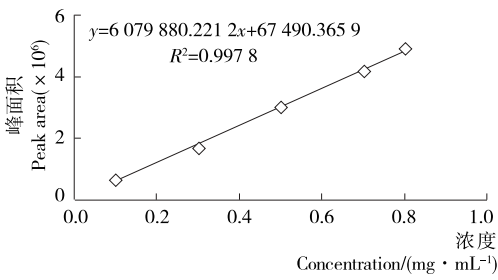


图 14 防腐剂对羟基苯甲酸乙酯标准液线性图

Figure 14 Preservatives benzoic acid,4-hydroxy-,ethyl ester standard solution linear graph

2.2.2 气质联用方法的回收率和精密度 采用在样品中加标的方法进行回收率和精密度的测定,对未检出防腐剂的注射液分别添加 0.10,0.03,0.01 mg/mL 的混合标准溶液,每

种浓度溶液测定 3 次,结果见表 1。由表 1 可知,3 个添加浓度水平下的 4 种防腐剂的回收率为 85.06%~88.98%,方法精密度为 0.54%~0.89%。表明方法的准确度和精密度高。

表 1 回收率和方法精密度试验结果

Table 1 Recovery and precision of the method results

名称	0.10 mg/mL		0.03 mg/mL		0.01 mg/mL	
	回收率/%	精密度/%	回收率/%	精密度/%	回收率/%	精密度/%
苯甲酸	88.65	0.54	87.52	0.62	86.75	0.64
苯甲醛	88.89	0.77	87.46	0.84	86.79	0.88
苯酚	86.76	0.82	85.47	0.85	85.06	0.89
对羟基苯甲酸乙酯	88.98	0.76	87.45	0.82	86.32	0.85

2.2.3 气质联用法在实际样品中的检测 取已采集的注射液样品 10 个,并顺序标注编号为注射液 1、注射液 2、注射液 3、注射液 4、注射液 5、注射液 6、注射液 7、注射液 8、注射液 9 和注射液 10。按气质联用法的进样条件进样,检测 10 个样品中的防腐剂种类及其含量,结果见 2。

表 2 实际样品检测结果

Table 2 Actual sample test results mg/mL

样品名称	苯酚	苯甲醛	苯甲酸	对羟基苯甲酸乙酯
注射液 1	未检出	0.020 2	未检出	未检出
注射液 2	0.018 9	未检出	未检出	未检出
注射液 3	未检出	0.036 5	未检出	未检出
注射液 4	未检出	未检出	0.024 7	未检出
注射液 5	未检出	未检出	未检出	0.034 2
注射液 6	未检出	0.022 0	未检出	未检出
注射液 7	0.024 4	未检出	未检出	未检出
注射液 8	未检出	未检出	0.036 5	未检出
注射液 9	0.036 8	未检出	未检出	未检出
注射液 10	未检出	未检出	未检出	0.025 6

由表 2 可知,注射液 1,3,6 中含有苯甲醛,注射液 2,7,9 中含有苯酚,注射液 4,8 含有苯甲酸,注射液 5,10 中含有对羟基苯甲酸乙酯。跟该产品说明书上标注的防腐剂类型一致。

3 结论

本研究采用了高效液相色谱法和气质联用法两种方法测定注射液中的防腐剂,试验结果显示,用气质联用法检测时,苯甲酸、苯甲醛、苯酚、对羟基苯甲酸乙酯在检出限内的线性范围内的相关系数为 0.994 3~0.999 9,加标回收率为 85.06%~88.98%,方法精密度为 0.54%~0.89%。而且通过比较两种方法在测定注射液中防腐剂的出峰和分离效果等因素时,得出液相色谱法测定注射液中的防腐剂时过程繁琐,而且出峰和分离效果差,未达到预期效果。而气质联用法,直接进混标即可得到质谱图,过程简便快捷;易定位,不用调整流动相和调整流动相配比;出峰和分离效果较好,可同时完成多种防腐剂的检测。该方法灵敏、快捷、准确,重复

性好,针对注射剂中防腐剂及有关杂质的快速筛查与含量分析,不失为一种良好的检测手段。

参考文献

- 1 陈曦,刘美欣. 眼用制剂中防腐剂的研究应用进展[J]. 天津药学, 2013, 25(5): 54~58.
- 2 杨秀丽,蒲道俊,余春梅,等. 高效液相色谱法测定多西他注射液的含量和有关物质[J]. 中国医药指南, 2012(18): 48~52.
- 3 李中东,张云轩,郭燕萍,等. 羟苯酯类防腐剂的不良反应[J]. 中国药物警戒, 2012, 9(5): 303~305.
- 4 左磊,周峰. 食品防腐剂 ADI 制定及正确使用对人体健康的理论探讨[J]. 中国卫生检验杂志, 2013, 23(8): 2 016~2 018.
- 5 许秀敏,吴西梅,梁春穗,等. 液相色谱-质谱联用检测食品中苯甲酸、山梨酸、糖精钠[J]. 中国卫生检验杂志, 2005, 9(15): 1 057~1 059.
- 6 康绍英,张继红,沈汇琴,等. 二极管阵列-高效液相色谱同时检测食品中的安赛蜜苯甲酸山梨酸糖精钠和脱氢乙酸[J]. 食品与机械, 2007, 23(5): 118~121.
- 7 王祖翔,周洪斌,蒋俊,等. 气相色谱-串联质谱法测定复合调味料中的微量苯甲酸[J]. 食品与机械, 2011, 27(3): 84~87.
- 8 桑宏庆,蔡华珍,王大勇. 紫外分光光度法同时测定饮料中山梨酸钾和苯甲酸钠[J]. 检测与分析, 2006, 8(9): 34~35.
- 9 谭平华,唐胜伟,刘长军,等. 气相色谱法同时测定苯甲醛、苯甲醇和苯甲酸[J]. 天然气化工, 2007(32): 64~66.
- 10 Bahrudin Saad, Md Fazlul Bari, Muhammad Idiris Saleh, et al. Simultaneous determination of preservatives (benzoic acid, sorbic acid, methylparaben and propylparaben) in foodstuffs using high-performance liquid chromatography[J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1 073(1~2): 393~397.