

## · 药物研究 ·

# HPLC 法测定注射用冷冻干燥用卤化丁基橡胶塞中抗氧化剂 1010 及硫化剂在药液中的迁移

李樾, 梁婷婷, 孙会敏\* (中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

**摘要** 目的: 建立HPLC方法, 考察药用卤化丁基橡胶塞中的抗氧化剂、硫化剂及其在药液中的迁移情况。方法: 采用Sunfire-C18 (4.6 mm×150 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相: 乙腈-四氢呋喃-水 (6:3:1); 流速: 1.5 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长: 280 nm; 柱温: 35 °C; 进样量: 20 μL。结果: 抗氧化剂1010及硫化剂硫磺在浓度0.004~0.5 mg·mL<sup>-1</sup>具有良好的线性关系 ( $r \geq 0.9996$ )。抗氧化剂1010及硫化剂硫磺提取试验回收率范围分别是102.05%~111.55%及91.75%~94.83%; 抗氧化剂1010及硫化剂硫磺迁移试验回收率范围分别为98.92%~110.70%及98.68%~106.63%; 各回收率试验RSD均不大于5% ( $n=9$ )。结论: 本方法灵敏、准确、可靠, 可用于药用卤化丁基橡胶塞中抗氧化剂及硫化剂的提取及迁移研究。

**关键词:** 高效液相色谱法; 抗氧化剂; 硫化剂

中图分类号: R917; R95 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2019)03-0283-07

doi:10.16153/j.1002-7777.2019.03.008

## Determination of Antioxidant 1010 and Curing Agent in Halogenated Butyl Rubber Plug for Freeze Drying Injection and Their Migration in Medicines by High Performance Liquid Chromatography

Li Yue, Liang Tingting, Sun Huimin\* (National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

**Abstract Objective:** To establish a HPLC method for determination of antioxidants and curing agents in halogenated butyl rubber plug and their migration in medicine. **Methods:** A Sunfire-C18 column (4.6 mm×150 mm, 5 μm) was used with acetonitrile-tetrahydrofuran-water (6:3:1) as mobile phase. The flow rate was 1.5 mL·min<sup>-1</sup> and the detection wavelength was 280 nm. The chromatography was conducted at 35°C and 20 μL were injected. **Results:** Antioxidant 1010 and curing agent sulfur had a good linear relationship ( $r \geq 0.9996$ ) in the range of 0.004-0.5 mg·mL<sup>-1</sup>. The recovery range of antioxidant 1010 extraction test was 102.05%-111.55%, the recovery range of curing agent sulfur extraction test was 91.75%-94.83%, the recovery range of antioxidant 1010 migration test was 98.92%-110.70%, and the recovery range of curing agent sulfur migration test was 98.68%-106.63%. The RSD of each recovery test was no more than 5% ( $n=9$ ). **Conclusion:** The method is sensitive, accurate and reliable, which is suitable for the extraction and migration studies of antioxidants and curing agents in halogenated butyl rubber plug for medicines.

**Keywords:** HPLC; antioxidant; curing agent

基金项目: 中国食品药品检定研究院中青年课题 (编号 2016C2)

作者简介: 李樾, 主管药师; 研究方向: 药品与包装材料的相容性

通信作者: 孙会敏, 研究员; 研究方向: 药用辅料及药品包装材料质量控制及安全性评价; Tel: (010) 67095721; E-mail: sunhm@nifdc.org.cn

药用丁基橡胶塞作为常见的药品包装材料之一,广泛应用于各类口服及注射剂产品。在橡胶制造过程中,会加入多种配合剂,以改善加工性能、提高生产效率、改善产品使用性能等。在诸多配合剂中,硫化剂及抗氧化剂是较为常见的两种。硫化剂,即可引起橡胶分子链发生交联反应的物质,可分为硫磺硫化体系及非硫磺硫化体系,溴化丁基硫化活性高,硫化体系的选择范围较广,通常选用硫磺硫化体系,以提高生产效率,降低成本。为抑制橡胶产品在使用过程被氧化,在生产过程中通常加入抗氧化剂,常见的抗氧化剂主要有胺类、酚类等;其中最为常见的酚类抗氧化剂为抗氧化剂264,近年来,也有企业采用抗氧化剂1010、抗氧化剂1076等添加至胶塞中。

在测定胶塞中硫化剂及抗氧化剂时,可采用多种方法,如气相色谱法及液相色谱法等,本研究参考了相关文献<sup>[1-5]</sup>,采用高效液相色谱法,对胶塞中的硫化剂及抗氧化剂同时进行测定,经方法学验证及样品检验,此方法简便、准确、可行,可用于同时测定胶塞中硫磺类硫化剂及酚类抗氧化剂1010。

## 1 仪器与试剂

Waters 2695液相色谱仪及2996二极管阵列检测器(美国沃特世公司),MARS微波萃取仪(美国CEM公司)。

甲苯(国药集团化学试剂有限公司),甲醇(国药集团化学试剂有限公司),纯水(Milli-Q纯水仪制),乙腈(默克公司),四氢呋喃(默克公司),升华硫(国药集团化学试剂有限公司),抗氧化剂1010(Aldrich公司)。

注射用冷冻干燥用溴化丁基橡胶塞(A公司,批号:B505124798),注射用重组抗HER2人源化单克隆抗体(B公司,批号:801、802、803,储存条件:避光,2~8℃保存)。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱:Sunfire-C18(4.6 mm×150 mm,5 μm),柱温:35℃,流动相:乙腈-四氢呋喃-水(6:3:1),流速:1.5 mL·min<sup>-1</sup>,PAD检测器检测波长:280 nm,进样量:20 μL。

### 2.2 对照品溶液的制备

精密称取升华硫及抗氧化剂1010各50 mg,置100 mL量瓶中,以甲苯-甲醇(2:3)溶液溶解并稀释

至刻线,摇匀,即得混合对照品溶液。

### 2.3 供试品溶液制备

#### 2.3.1 胶塞中硫化剂及抗氧化剂提取试验供试品溶液制备

取胶塞适量,剪碎,精密称取2 g,置微波萃取罐中,精密加入20 mL甲苯-甲醇(2:3)溶液,于105℃微波萃取30 min,萃取液经0.45 μm的滤膜过滤后,即得供试品溶液,同法制备空白溶液。

#### 2.3.2 胶塞中硫化剂及抗氧化剂迁移试验供试品溶液制备

将样品于温度25℃、湿度60%的条件下,倒置放置0、3、6个月后,分别取各批药品2瓶,分别注入10 mL去离子水复溶,将溶液以重力速度通过事先用甲醇4 mL及水4 mL活化的固相萃取柱后,以甲醇2 mL及甲苯-甲醇(1:1)溶液4 mL洗脱至10 mL量瓶中,然后以甲苯-甲醇(1:1)溶液定容至刻度,即得供试品溶液。

### 2.4 标准曲线的建立

精密吸取“2.2”节下制备的混合对照品溶液适量,以甲苯-甲醇(2:3)溶液依次稀释成硫化剂、抗氧化剂1010浓度分别为0.5、0.25、0.13、0.06、0.03、0.02、0.008、0.004 mg·mL<sup>-1</sup>的系列混合对照品溶液。分别注入液相色谱仪,记录色谱图,以浓度及峰面积进行线性回归,硫化剂回归方程: $y=17984095x+582$   $r=0.9996$  ( $n=8$ ),抗氧化剂1010回归方程: $y=4113103x+7320$   $r=0.9999$  ( $n=8$ ),表明二者在0.004~0.5 mg·mL<sup>-1</sup>的范围内线性良好。

### 2.5 精密度试验

分别吸取浓度为0.13、0.03 mg·mL<sup>-1</sup>的混合对照品溶液各20 μL,连续注入液相色谱仪5次;各浓度下峰面积RSD均小于2.0%,表明精密度良好。

### 2.6 稳定性试验

分别吸取浓度为0.13、0.03 mg·mL<sup>-1</sup>的混合对照品溶液各20 μL,在0 h和24 h分别注入液相色谱仪;各浓度下峰面积RSD均小于2.0%,表明硫化剂升华硫及抗氧化剂1010在24 h内测定结果稳定。

### 2.7 回收率试验

#### 2.7.1 胶塞中硫化剂抗氧化剂提取回收率试验

取胶塞适量,剪碎,精密称取2 g,置微波萃取罐中,精密加入含有不同浓度硫化剂及抗氧化剂的20 mL甲苯-甲醇(2:3)溶液,于105℃微波萃取

30 min, 萃取液经0.45  $\mu\text{m}$ 的滤膜过滤后, 即得。经计算, 硫化剂回收率范围为91.75%~94.83%, 平均回收率为92.9%, RSD为1.5%; 抗氧剂回收率范围为102.05%~111.55%, 平均回收率为108.3%, RSD为3.7%。见表1和表2。

表1 硫化剂提取回收率试验结果

序号	加入量/ $\mu\text{g}$	测得量/ $\mu\text{g}$	橡胶塞中含量/ $\mu\text{g}$	回收率/%	平均值/%	RSD/%
1	889.18	897.78	81.97	91.75		
2		898.81	81.91	91.87		
3		899.83	81.90	91.99		
4	1778.35	1768.24	81.85	94.83		
5		1765.04	81.85	94.65	92.9	1.5
6		1767.06	82.00	94.76		
7	2667.53	2536.03	81.89	92.00		
8		2539.05	81.82	92.12		
9		2541.27	81.88	92.20		

表2 抗氧剂1010提取回收率试验结果

序号	加入量/ $\mu\text{g}$	测得量/ $\mu\text{g}$	橡胶塞中含量/ $\mu\text{g}$	回收率/%	平均值/%	RSD/%
1	876.58	1074.12	179.57	102.05		
2		1080.10	179.42	102.75		
3		1095.34	179.40	104.49		
4	1753.15	2134.88	179.29	111.55		
5		2134.04	179.30	111.50	108.3	3.7
6		2133.92	179.63	111.47		
7	2629.73	3075.12	179.39	110.12		
8		3091.87	179.24	110.76		
9		3075.05	179.37	110.11		

### 2.7.2 药品中硫化剂抗氧剂迁移回收率试验

取各批药品2瓶, 分别注入10 mL去离子水复溶, 将复溶后的药液及含有不同浓度硫化剂及抗氧剂的甲苯-甲醇(2:3)溶液适量, 以重力速度通过事先用甲醇4 mL及水4 mL活化的固相萃取柱后, 以甲醇2 mL及甲苯-甲醇(1:1)溶液4 mL洗脱至10 mL量瓶中, 后以甲苯-甲醇(1:1)溶液定容至刻度, 即得。经计算, 硫化剂回收率范围为

98.68%~106.63%, 平均回收率为102.6%, RSD为2.3%; 抗氧剂回收率范围为98.92%~110.70%, 平均回收率为105.5%, RSD为3.3%。见表3和表4。

### 2.8 检出限与定量限

取不同浓度的硫化剂及抗氧剂标准溶液注入液相色谱仪, 记录色谱图, 当信噪比为3时为检出限, 信噪比为10时为定量限, 经计算, 升华硫检出限为2.7 ng, 定量限为7.9 ng; 抗氧剂1010检出限为

11.8 ng, 定量限为27.6 ng。

典型色谱图见图1、图2。

## 2.9 试验结果

胶塞中硫化剂及抗氧化剂提取试验结果见表5,

胶塞中硫化剂及抗氧化剂迁移试验结果见表6, 典型色谱图见图3~图5。

表3 硫化剂迁移回收率试验结果

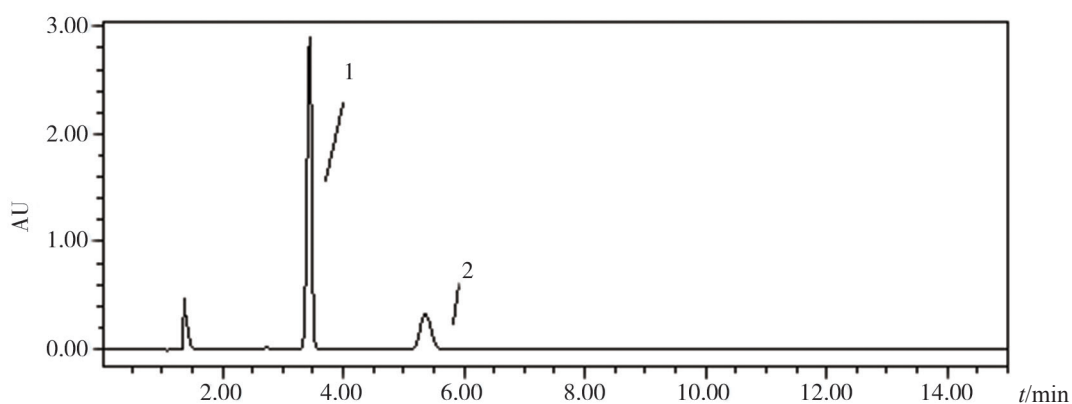
序号	加入量 / $\mu\text{g}$	测得量 / $\mu\text{g}$	药液中含量 / $\mu\text{g}$	回收率 /%	平均值 /%	RSD/%
1	10.10	10.60	0	104.95		
2		10.22	0	101.19		
3		10.77	0	106.63		
4	15.15	14.95	0	98.68		
5		15.76	0	104.03	102.6	2.3
6		15.58	0	102.84		
7	20.20	20.52	0	101.58		
8		20.63	0	102.13		
9		20.55	0	101.73		

表4 抗氧化剂 1010 迁移回收率试验结果

序号	加入量 / $\mu\text{g}$	测得量 / $\mu\text{g}$	药液中含量 / $\mu\text{g}$	回收率 /%	平均值 /%	RSD/%
1	19.82	20.79	0	104.89		
2		21.94	0	110.70		
3		21.40	0	107.97		
4	29.73	31.75	0	106.79		
5		30.09	0	101.21	105.0	3.3
6		29.41	0	98.92		
7	39.64	41.68	0	105.15		
8		41.50	0	104.69		
9		41.41	0	104.47		

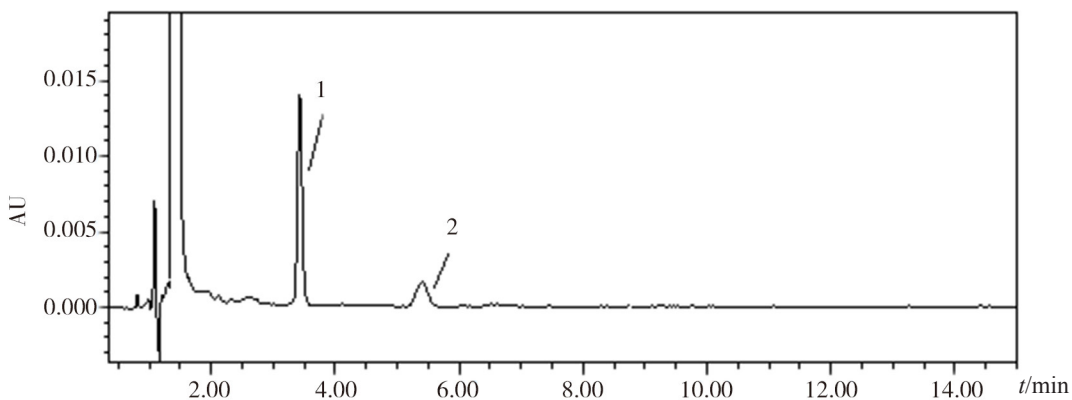
表5 胶塞中硫化剂及抗氧化剂含量

样品批号	硫化剂含量 /%	抗氧化剂 1010 含量 /%
B505124798	0.04	0.09



1. 硫化剂; 2. 抗氧化剂 1010。

图 1 硫化剂及抗氧化剂对照品液相色谱图



1. 硫化剂; 2. 抗氧化剂 1010。

图 2 注射用冷冻干燥用溴化丁基橡胶塞中提取的硫化剂及抗氧化剂液相色谱图

表 6 硫化剂及抗氧化剂迁移试验结果

药品批号	考察时间	硫化剂迁移量	抗氧化剂 1010 迁移量
801	加速放置 0、3、6 个月后	均未检出	均未检出
802	加速放置 0、3、6 个月后	均未检出	均未检出
803	加速放置 0、3、6 个月后	均未检出	均未检出

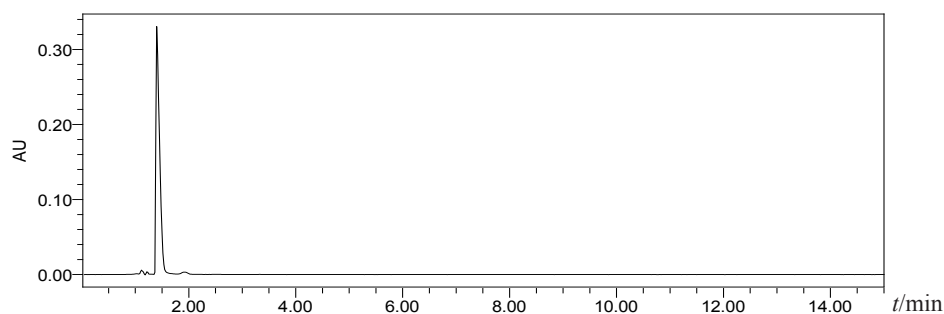


图3 加速放置0个月后的注射用重组抗HER2人源化单克隆抗体中迁移的硫化剂及抗氧化剂液相色谱图

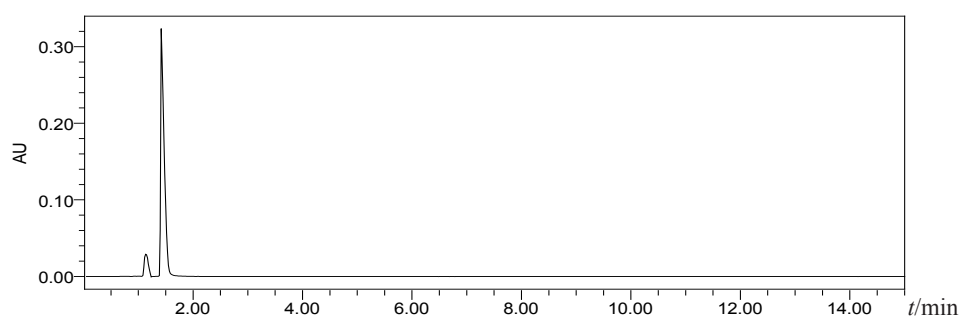


图4 加速放置3个月后的注射用重组抗HER2人源化单克隆抗体中迁移的硫化剂及抗氧化剂液相色谱图

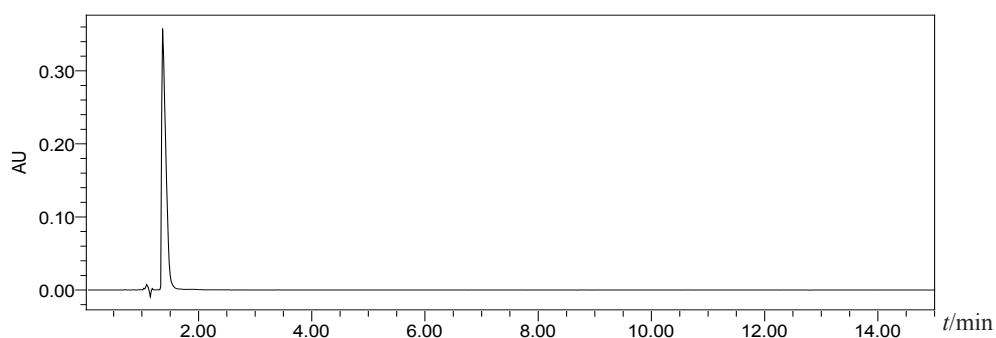
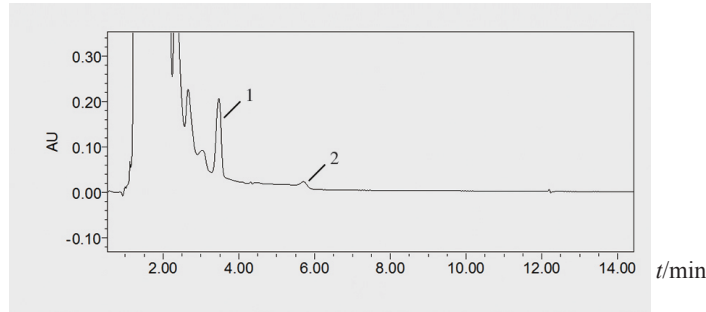


图5 加速放置6个月后的注射用重组抗HER2人源化单克隆抗体中迁移的硫化剂及抗氧化剂液相色谱图

### 3 讨论与小结

1) 药品基质干扰, 在对某些非极性药品进行考察时, 如丙泊酚注射液, 因药液极性与硫化剂较

为接近, 本色谱条件下检测硫化剂会受到样品干扰, 色谱图见图6所示, 此情况下, 可采用其他硫化剂检测方法<sup>[6]</sup>, 以避免干扰。



1. 硫化剂; 2. 抗氧化剂 1010。

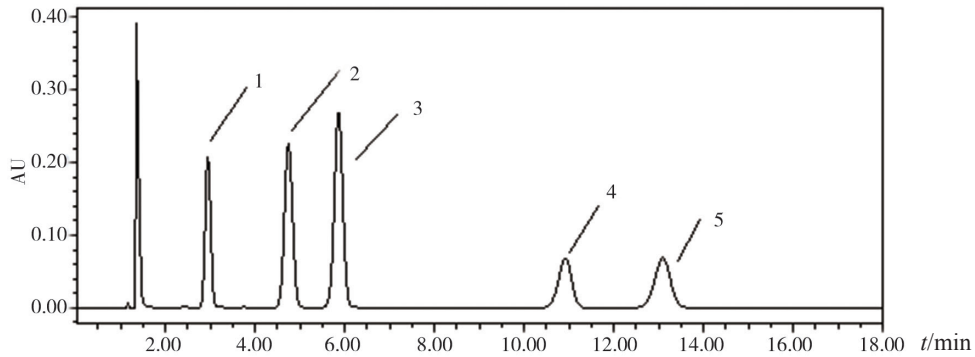
图6 丙泊酚注射液中迁移的硫化剂及抗氧化剂液相色谱图

2) 提取方法, 本文所用提取溶剂极性更小, 更易溶解硫化剂, 较原先研究<sup>[6]</sup>所用无水乙醇, 可有效提高溶解性。

3) 胶塞中较为常见且有一定风险的添加剂主要为硫化剂、抗氧化剂、硫化活性剂及残留溶剂等挥发性小分子成分, 当胶塞生产厂家未提供具体可提取物信息时, 需要在开展相容性研究时进行较为全面的可提取物试验, 以考察胶塞中可能含有的各种

性质的添加剂, 确定考察对象, 并选择适宜的方法开展相关研究。

4) 本文建立的方法, 不仅可用于测定硫磺硫化剂与抗氧化剂1010, 此方法及色谱条件下还可同时测定抗氧化剂1076、抗氧化剂330及抗氧化剂168, 典型色谱图见图7, 此方法可用于筛查胶塞中所用的硫化剂及抗氧化剂种类并对其进行测定, 方法准确、简便。



1. 硫化剂; 2. 抗氧化剂1010; 3. 抗氧化剂330; 4. 抗氧化剂1076; 5. 抗氧化剂168。

图7 硫化剂及4种抗氧化剂液相色谱图

参考文献:

[1] 姜源, 程福军. 注射液用氯化丁基胶塞中的抗氧化剂的测定和迁移测定[J]. 黑龙江医药, 2016, 29(3): 436-438, 439.  
 [2] 李茜, 刘英, 杨淑先, 等. 注射用硫酸卷曲霉素与包材的相容性考察[J]. 中国抗生素杂志, 2015, 40(8): 603-606, 616.  
 [3] 刘成红, 魏立平, 罗小茹, 等. 注射用盐酸头孢替安与胶塞相容性研究[J]. 药物评价研究, 2014, 37(5): 420-423  
 [4] 曲亚南, 徐苏华, 陈浩瀚, 等. 固相萃取-高效液相色谱法测定极性注射液中抗氧化剂BHT含量[J]. 中国医疗器械信息, 2015, (12): 52-56.

[5] 李立根, 吴莹, 张毅兰, 等. 药用胶塞硫化剂对叔辛基苯酚甲醛树脂中对叔辛基苯酚的测定[J]. 中国医药工业杂志, 2016, 47(5): 614-617.  
 [6] 李越, 杨会英, 王峰, 等. 药用卤化丁基橡胶塞中可提取硫的检测研究[J]. 中国药事, 2014, (11): 1257-1260.

(收稿日期 2018年5月19日 编辑 范玉明)