

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.22.018

高效液相色谱法测定药品胶塞中硫磺和 7 种抗氧化剂含量及迁移

李 莎¹, 韩海燕¹, 吴红洋¹, 唐韵熙¹, 王 巍², 范能全^{1△}

(1. 重庆市食品药品检验检测研究院, 重庆 401121; 2. 重庆市涪陵食品药品检验所, 重庆 408000)

摘要:目的 建立同时测定药品胶塞中硫化剂(硫磺)和 7 种抗氧化剂含量的高效液相色谱(HPLC)法,并评价胰岛素注射液成品的安全性。方法 胶塞样品经剪碎后用二氯甲烷超声提取,以胰岛素注射液模拟注射用液。色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-0.1% 乙酸溶液(梯度洗脱),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 230 nm,柱温为 35 ℃,进样量为 20 μL。结合每日允许暴露量(PDE 值)来评价胰岛素注射液成品的安全性。结果 抗氧化剂 1310, 242, BHT, 1010, 330, 1076, 168 和硫磺在胶塞和药液中的检测限均低于其 50% 表观效应阈值(AET);精密性、重复性试验结果的 RSD 均低于 2.0% (n = 6);平均回收率分别为 103.60%, 107.02%, 101.76%, 100.86%, 102.18%, 105.61%, 103.25%, 99.56%, RSD 分别为 1.89%, 1.80%, 0.71%, 0.37%, 0.32%, 0.65%, 0.38%, 0.39% (n = 9);胶塞提取液中可检测出抗氧化剂 1310, 1010, 1076, 168 和硫磺,模拟注射用液中可检测到抗氧化剂 1010 和硫磺。检测出的胶塞中各成分含量和药品迁移值远低于注射途径的 PDE 值。结论 该方法操作简便,灵敏度高,耐用性、重复性、准确度高,可用于同时筛查胰岛素注射液胶塞中 7 种抗氧化剂和硫磺的残留。迁移的抗氧化剂和硫化剂基本不影响药品的安全性。

关键词: 高效液相色谱法;胶塞;抗氧化剂;硫化剂

中图分类号:R917;R927

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)22-0071-04

Content Determination and Migration of Sulphur and Seven Antioxidants in Medicinal Rubber Stoppers by HPLC

LI Sha¹, HAN Haiyan¹, WU Hongyang¹, TANG Yunxi¹, WANG Wei², FAN Nengquan¹

(1. Chongqing Institute for Food and Drug Control, Chongqing, China 401121; 2. Chongqing Fuling Institute for Food and Drug Control, Chongqing, China 408000)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the simultaneous determination of vulcanizing agent (sulphur) and seven antioxidants in medicinal rubber stoppers, and to evaluate the safety of Insulin Injection products. **Methods** The rubber stopper samples were cut up and ultrasonically extracted by dichloromethane. Insulin injection was used to simulate the injection solution. The chromatographic column was Agilent ZORBAX SB-C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol-0.1% acetic acid solution with gradient elution, the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 230 nm, the column temperature was 35 ℃, and the injection volume was 20 μL. The safety of Insulin Injection products was evaluated based on the permitted daily exposure (PDE) value. **Results** The limits of detection of antioxidants 1310, 242, BHT, 1010, 330, 1076, 168 and sulphur in rubber stoppers and liquid medicine were lower than their 50% apparent effect threshold (AET). The RSDs of precision and repeatability tests were lower than 2.0% (n = 6). The average recoveries of those components were 103.60%, 107.02%, 101.76%, 100.86%, 102.18%, 105.61%, 103.25%, 99.56% with RSDs of 1.89%, 1.80%, 0.71%, 0.37%, 0.32%, 0.65%, 0.38% and 0.39% (n = 9), respectively. Antioxidant 1310, 1010, 1076, 168 and sulphur could be detected in rubber stopper extract solution, and antioxidant 1010 and sulphur could be detected in simulated injection solution. The detected content of each component in the rubber stoppers and the drug migration value were significantly lower than the PDE value of the injection route. **Conclusion** The method is simple, sensitive, durable, repeatable and accurate, which can be used for simultaneous determination of seven kinds of antioxidants and sulphur residues in the rubber stopper of insulin injection. The migrated antioxidant and vulcanizing agent do not affect the safety of drugs.

Key words: HPLC; rubber stopper; antioxidants; vulcanizing agent

第一作者:李莎,女,硕士研究生,高级工程师,研究方向为药包材相容性,(电子信箱)Lisha@cqifdc.org.cn。

△通信作者:范能全,男,硕士研究生,高级工程师,研究方向为药包材相容性,(电子信箱)fannqcq@163.com。

- [11] 李 玲, 丁 野, 孙 辉, 等. 三组易混淆中药材鉴别技术研究进展[J]. 中国药师, 2015, 18(11): 1959-1962.
- [12] 欧金梅, 储晓琴, 张 虹. 高效液相色谱法测定安徽产木通药材中 3 种有效成分含量[J]. 安徽中医药大学学报, 2015, 34(1): 70-73.
- [13] 陈道阳, 孙平川, 黄健玲, 等. 不同产地甘木通药材多谱图鉴定及质量控制[J]. 中国药房, 2012, 23(7): 629-632.
- [14] 张 桐, 王玥玥, 王康宇, 等. 基于化学模式识别法不同品种木通药材指纹图谱研究[J]. 药物分析杂志, 2021, 41(9): 1590-1597.
- [15] 谢思敏, 刘主洁, 侯惠婵, 等. 高效液相色谱-二极管阵列检测器法检查复方罗布麻片 I 中掺伪大花罗布麻叶方法研究[J]. 中国药业, 2020, 29(15): 87-90.
- [16] 王立伟, 徐 达, 安丽娜, 等. 金银花及其制剂中掺伪山银花的快速鉴别研究[J]. 中国药业, 2019, 28(1): 39-44.

(收稿日期: 2022-02-09; 修回日期: 2022-05-29)

药用胶塞弹性和稳定性良好,广泛用于注射剂的密封^[1]。但在药品的贮存过程中,胶塞因与药品长期、直接接触,易产生与药物的相容性问题,从而影响药品质量,甚至对人体产生毒副作用^[2]。目前,许多医药类胶塞中可检测到其生产所用主要硫化剂硫磺的存在^[3]。硫化剂会改变繁殖周期,影响新生儿发育,还可能增强致癌基因的表达^[4-7]。因此,有必要对硫磺等硫化剂含量进行考察及控制,以保障用药安全。胶塞配方中常用的抗氧化剂按结构分类主要有受阻酚类及亚磷酸酯类等,受阻酚类主要包括2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(BHT)、抗氧化剂1076、抗氧化剂1010、1,3,5-三甲基-2,4,6-(3,5-二叔丁基-4-羟基苯基)苯(抗氧化剂1330)等,亚磷酸酯类主要包括抗氧化剂168等^[8]。抗氧化剂超出一定限量,会损伤人体肝、脾、肺等器官^[9],且部分易降解,其降解产物毒性也较大^[10]。近年来,已有研究涉及抗氧化剂和药品包装材料的相容性^[11-16],高效液相色谱(HPLC)法虽可检测抗氧化剂但已有研究涉及的种类较少,液相质谱联用法可检种类较多,但检测成本较高。为此,本研究中以胰岛素注射液模拟注射用液,建立了同时测定药用胶塞中上述7种抗氧化剂和硫磺含量的HPLC法,并结合每日允许暴露量(PDE)评估结果的安全性。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1260型高效液相色谱仪(美国Agilent公司);XPE205型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司,精度为0.01 mg);HH-21-8型水浴锅(上海博讯实业有限公司医疗设备厂);VX-95型高压灭菌器(德国Systec公司);Milli-Q Advantage A10型超纯水机(法国Merck Millipore公司)。

1.2 试剂

抗氧化剂1310对照品(CAS号20170-32-5,批号为P1437031)、242对照品(CAS号96-76-4,批号为P1226121),均购自Adamas Reagent Co., Ltd,纯度均大于98%;BHT对照品(阿拉丁试剂公司,CAS号128-37-0,批号为B1926023,纯度>99.7%);硫磺对照品(Dr. Ehrenstorfer GmbH公司,CAS号7704-34-9,批号为106536,纯度>99.0%);抗氧化剂1010对照品(CAS号6683-19-8,批号为007WX5)、330对照品(CAS号1709-70-2,批号为006C27)、1076对照品(CAS号2082-79-3,批号为003V02)、168对照品(CAS号31570-04-4,批号为002CTK),均为欧洲药典标准品,纯度均为100%;注射器用溴化丁基橡胶塞活塞(简称胶塞,Datwyler Pharma Packaging Belgium公司,编号为B013);胰岛素注射液(重庆宸安生物制药有限公司,编号为

A003,A004,A005,每日最大用量1 mg);甲醇、乙酸均为色谱纯,二氯甲烷为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent ZORBAX SB-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇(A)-0.1%乙酸溶液(B),梯度洗脱(0~5 min时40%A→80%A,5~15 min时80%A→95%A,15~16 min时95%A→100%A,16~40 min时100%A,40~41 min时100%A→40%A,41~55 min时40%A);流速:1.0 mL/min;检测波长:230 nm;柱温:35℃,进样量:20 μL。

2.2 溶液制备

混合对照品溶液:分别称取抗氧化剂1310,242,1010,330,1076,168,BHT及硫磺对照品0.010 93,0.011 05,0.010 70,0.010 82,0.010 47,0.010 58,0.010 40,0.010 91 g,精密称定,置100 mL容量瓶中,加无水乙醇定容,制得质量浓度约为100 μg/mL的混合对照品溶液。

供试品溶液:以0.2 g/mL的比例在胶塞中加入胰岛素注射液,121℃下高压灭菌1 h,提取胶塞,得提取液;取15 mL置分液漏斗中,加二氯甲烷15 mL振摇提取30 min,取二氯甲烷层挥干,加入无水乙醇定容至15 mL,经0.45 μm滤膜滤过,取续滤液,即得。

加标供试品溶液:取前述提取液5 mL,置分液漏斗中,加混合对照品溶液1 mL,加二氯甲烷5 mL振摇提取30 min,取二氯甲烷层挥干,加入无水乙醇定容至5 mL,经0.45 μm滤膜滤过,取续滤液,即得。

阴性对照品溶液、空白溶剂:取剪碎后的胶塞2.005 4 g,精密称定,加二氯甲烷10 mL超声[功率为500 W,频率为40 kHz,温度为(25±2)℃]处理30 min,取二氯甲烷层挥干,加入无水乙醇定容至10 mL,经0.45 μm滤膜滤过,取续滤液,即得。同法(不加胶塞)制得空白溶剂。

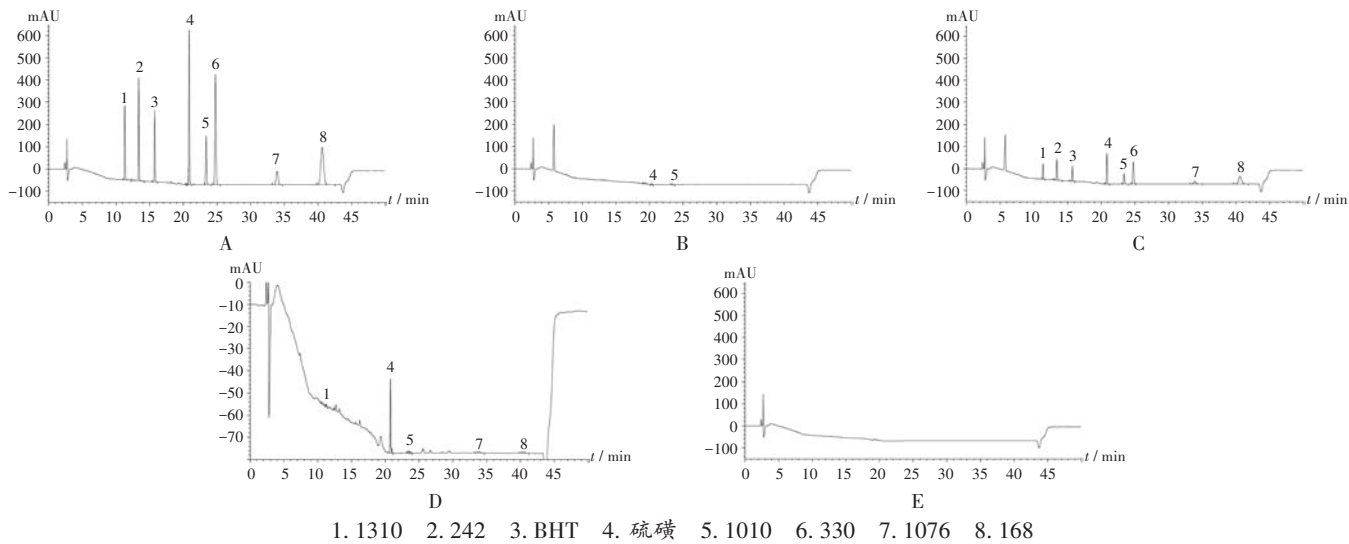
2.3 方法学考察

专属性试验:精密吸取2.2项下5种溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果供试品溶液色谱中,在与混合对照品溶液色谱相应位置有吸收峰,阴性对照无干扰。详见图1。

精密度试验:取2.2项下加标供试品溶液适量,按2.1项下色谱条件,连续进样测定6次,记录峰面积。结果的RSD均小于2.0%(n=6),表明方法精密度良好。

重复性试验:取2.2项下提取液适量,按2.2项下方法制备加标供试品溶液溶液,共6份,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果的RSD均小于2.0%(n=6),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取2.2项下加标供试品溶液适量,



1. 1310 2. 242 3. BHT 4. 硫磺 5. 1010 6. 330 7. 1076 8. 168
A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 加标供试品溶液 D. 阴性对照品溶液 E. 空白溶剂

图1 高效液相色谱图

1. 1310 2. 242 3. BHT 4. Sulphur 5. 1010 6. 330 7. 1076 8. 168
A. Mixed reference solution B. Test solution C. Spiked test solution D. Negative reference solution E. Blank solvent

Fig. 1 HPLC chromatograms

表1 加样回收试验结果(n = 6)

Tab. 1 Results of the recovery test (n = 6)

待测成分	样品含量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	加入量 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	测得量($\mu\text{g}/\text{mL}$)						$\bar{X}$ (%)	RSD (%)
			1	2	3	4	5	6		
抗氧化剂 1310	-	21.42	21.91	22.36	21.78	21.78	22.69	22.62	103.60	1.89
抗氧化剂 242	-	21.66	23.20	22.66	23.09	23.30	22.94	23.90	107.02	1.80
抗氧化剂 BHT	-	21.34	21.91	21.57	21.56	21.78	21.61	21.86	101.76	0.71
硫磺	0.23	21.60	21.78	21.85	21.72	21.61	21.77	21.68	99.56	0.39
抗氧化剂 1010	1.26	21.64	23.08	23.18	23.07	23.01	23.18	22.99	100.86	0.37
抗氧化剂 330	-	20.94	21.43	21.46	21.42	21.31	21.45	21.31	102.18	0.32
抗氧化剂 1076	-	21.16	22.54	22.48	22.36	22.15	22.30	22.25	105.61	0.65
抗氧化剂 168	-	20.80	21.48	21.63	21.48	21.43	21.45	21.39	103.25	0.38

注：- 为未检出。表 2 同。

Note:- means no antioxidants or sulphur are detected (for Tab. 1-2).

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 耐用性考察

将流速从 1.00 mL/min 分别调至 0.95 mL/min 和 1.05 mL/min;柱温从 35℃ 分别调至 33℃ 和 37℃,其他色谱条件均保持不变,进样测定,记录色谱图。结果表明,小幅度改变色谱条件能满足试验要求,耐用性良好。

2.5 样品含量测定

取 2.2 项下阴性对照品溶液与供试品溶液各适量,按 2.1 项下色谱条件进样测定,外标法计算各抗氧化剂及硫磺含量。结果胶塞中检出抗氧化剂 1310,1 010,1 076,168 和硫磺,样品药物中检出抗氧化剂 1010 和硫磺。详见表 2。

表2 样品及胶塞中抗氧化剂和硫磺含量测定

Tab. 2 Content determination of antioxidant and sulphur in samples and rubber stoppers

待测成分	样品($\mu\text{g}/\text{mL}$)			胶塞	
	A003	A004	A005	质量浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$)	含量(%)
抗氧化剂 1310	-	-	-	0.51	0.000 3
抗氧化剂 242	-	-	-	-	-
抗氧化剂 BHT	-	-	-	-	-
硫磺	0.23	0.25	0.22	5.28	0.003
抗氧化剂 1010	1.26	1.21	1.22	0.42	0.000 2
抗氧化剂 330	-	-	-	-	-
抗氧化剂 1076	-	-	-	1.60	0.000 8
抗氧化剂 168	-	-	-	0.42	0.000 2

2.6 安全性评价

计算分析表观效应阈值(AET)。AET = PDE / MDI, 式中,PDE为关注物质每日允许最大摄入量($\mu\text{g}/\text{d}$), MDI为每日最大摄入量(瓶)。

对于已知有致突变性、致癌性的化学物质,国际人用药品注册技术协调会(ICH)指导原则M7,从半数中毒剂量(TD_{50})线性外推的方法设立可接受摄入量。通过将 TD_{50} 值除以50 000以线性外推至十万分之一的发生率(即终生风险水平)。在化学结构上相似的化合物,可按类别制订可接受摄入量。

以抗氧化剂1310为例,查阅毒理学关注阈值(TTC)得知,其对于大鼠的 TD_{50} 为540 mg / (kg·d),成人平均体质量按50 kg计,计算得到抗氧化剂1310人体可接受摄入量为540 $\mu\text{g}/\text{d}$ 。根据各抗氧化剂和硫磺的PDE值及样品每日最大使用量计算得到最大允许含量,由此计算出提取/迁移试验中AET,结果见表3(ECHA为欧盟化学品管理局)。

表3 抗氧化剂和硫磺非肠道给药途径的PDE值及来源

Tab.3 PDE value and source of antioxidant and sulphur by parenteral administration route

目标物质	PDE($\mu\text{g}/\text{d}$)	AET($\mu\text{g}/\text{瓶}$)	检测限($\mu\text{g}/\text{mL}$)	数据来源
抗氧化剂1310	540	2 160	720	TTC
抗氧化剂242	18 750	75 000	25 000	ECHA
抗氧化剂BHT	1 250	5 001	1 667	ECHA
硫磺	10 000	39 999	13 333	ECHA
抗氧化剂1010	23 000	92 001	30 667	ECHA
抗氧化剂330	17 850	71 400	23 800	ECHA
抗氧化剂1076	3 200	12 801	4 267	ECHA
抗氧化剂168	3 000	12 000	4 000	ECHA

3 讨论

预试验中,取混合对照品溶液进行稀释,选择质量浓度低于360 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [以硫磺、抗氧化剂及降解产物中最小的50%仪器AET计算,抗氧化剂1310限度 = 540 ($\mu\text{g}/\text{d}$) $\div$ 3 (mL) $\times$ 4 (mg) $\times$ 1 (mg / d) $\times$ 50% = 360 $\mu\text{g}/\text{mL}$]的混合对照品溶液(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)进样,结果其信噪比(S/N)值均大于10,能满足试验对检测灵敏度的要求。并考察了胰岛素注射液中抗氧化剂和硫磺迁移情况及胶塞中提取抗氧化剂和硫磺的检测限,结果试验中8种待测成分对于迁移样品或胶塞提取的方法检测限均小于108.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$,低于各自50%AET。

综上所述,本研究中建立了同时测定胰岛素注射液成品的溴化丁基胶塞及其提取物中硫磺及7种抗氧化剂含量的HPLC法,该方法专属性好、灵敏度高,重复性、精密度好,结果准确、可靠,同时发现,检测出的胶塞中各成分含量和药品迁移值远低于注射途径的PDE值,迁移的抗氧化剂和硫化剂基本不影响药品安全性。

参考文献

[1] 蒲小聪,陈蕊,游延军. HPLC法测定胶塞中抗氧化剂1076向米卡芬净钠注射液中的迁移[J]. 药物分析杂志,2017,37(7): 1298 - 1303.

[2] 刘莉,李婷婷,童伟,等. 药用丁基胶塞化学助剂检测及与药物相容性研究进展[J]. 江西化工,2017(1):11 - 14.

[3] 辜倩,朱碧君. 药用橡胶中常用硫化体系及应用研究[J]. 药品评价,2021,18(15):905 - 908.

[4] PISAPIA L, POZZO GD, BARBA P, et al. Effects of some endocrine disruptors on cell cycle progression and murine dendritic cell differentiation[J]. Gen Comp Endocrinol, 2012, 178(1): 54 - 63.

[5] LAWS SC, CAREY SA, FERRELL JM, et al. Estrogenic activity of octylphenol, nonylphenol, bisphenol A and methoxychlor in rats[J]. Toxicol Sci, 2000, 54(1):154 - 167.

[6] MYLLYMAKI SA, KARJALAINEN M, HAAVISTO TE, et al. Infanfile 4 - tert - octylphenol exposure transiently inhibits rat ovarian steroidogenesis and steroidogenic acuteregulatory protein (StAR) expression[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2005, 207(1): 59 - 68.

[7] BIAN Q, QIAN J, XU L, et al. The toxic effects of 4 - tert - octylphenol on the reproductive system of male rats[J]. Food Chem Toxicol, 2006, 44(8):1355 - 1361.

[8] 李春焕,薛维丽,刑晟,等. 高效液相色谱法检测溴化丁基胶塞中11种抗氧化剂及游离硫的浸出量及迁移量[J]. 分析试验室,2020,39(1):91 - 96.

[9] JENKE D. Extractables Screening of Polypropylene Resins Used in Pharmaceutical Packaging for Safety Hazards[J]. PDA J Pharm Sci Technol, 2017, 71(5):346 - 367.

[10] 朱碧君,李婷婷,孙会敏,等. HPLC法同时测定药用卤化丁基胶塞中5种抗氧化剂和游离硫的含量[J]. 中国药房, 2018,29(18):2475 - 2479.

[11] 蔡翔宇,陈璐,吴玉杰,等. 高效液相色谱法 - 串联质谱法同时测定聚对苯二甲酸乙二醇酯/聚乙烯复合食品接触材料中16种抗氧化剂特定迁移量[J]. 食品安全质量检测学报, 2021,12(15):5974 - 5982.

[12] 程畅,卢立新,潘嘹,等. 液相色谱 - 串联质谱法测定食品接触橡胶密封垫圈中7种抗氧化剂[J]. 分析测试学报, 2021,40(7):1074 - 1079.

[13] 黄萍,刘兴兰. SPE - HPLC法测定三层共挤输液袋中抗氧化剂在氧氟沙星氯化钠注射液中的迁移量[J]. 中国药师, 2016,19(12):2267 - 2269.

[14] 浦雨伟,崔萍,吴娟,等. 药用丁基胶塞中抗氧化剂264、1010、5057迁移研究[J]. 药物分析杂志, 2016,36(12): 2231 - 2240.

[15] 饶艳春,左军凤,熊马建,等. 胶塞中抗氧化剂测定及其在药品中的迁移研究[J]. 中国药物评价,2020,37(5):380 - 383.

[16] 李槌,梁婷婷,孙会敏. 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[J]. 中国药事,2019,33(3):283 - 289.

(收稿日期:2022 - 01 - 20;修回日期:2022 - 05 - 17)