

## 注射用益气复脉（冻干）与氯化丁基胶塞相容性研究中抗氧化剂和硫化剂的含量测定

张艳惠<sup>1,2</sup>, 李海燕<sup>1,2</sup>, 岳洪水<sup>1,2</sup>, 鞠爱春<sup>1,2\*</sup>

1. 天津天士力之骄药业有限公司, 天津 300410

2. 天津市中药注射剂新技术企业重点实验室, 天津 300410

**摘要:** 目的 建立注射用益气复脉（冻干）药品中氯化丁基橡胶塞用抗氧化剂2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚（BHT）和硫化剂对-特辛基苯酚的含量测定方法, 并对其稳定性进行考察。方法 采用 ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> 柱, 以乙腈-0.2%甲酸水为流动相梯度洗脱, 体积流量 0.3 mL/min, 柱温 35℃, 检测波长 280 nm。结果 BHT 和对特-辛基苯酚质量浓度在 0.4~20 μg/mL 线性关系良好 ( $r > 0.999$ ); 准确度试验平均回收率分别为 99.3%、101.9%, 精密度及耐用性结果均符合要求; 注射用益气复脉（冻干）稳定性考察样品中 BHT 和对-特辛基苯酚含量均小于限度值。结论 所建立的方法准确可靠, 可用于注射用益气复脉（冻干）中 BHT 和对-特辛基苯酚的含量测定。

**关键词:** 注射用益气复脉（冻干）; 氯化丁基胶塞; 对-特辛基苯酚; 2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚（BHT）; 含量测定; 稳定性考察  
中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2018) 03- 0496 - 05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2018.03.026

## Determination of antioxidant and vulcanizing agent on study compatibility of Chlorinated butyl rubber plug and Yiqi Fumai Lyophilized Injection

ZHANG Yanhui<sup>1,2</sup>, LI Haiyan<sup>1,2</sup>, YUE Hongshui<sup>1,2</sup>, JU Aichun<sup>1,2</sup>

1. Tianjin Tasly Pride Pharmaceutical Co., Ltd., Tianjin 300410, China

2. Tianjin Key Laboratory of Advanced Technology Enterprise of TCM Injections, Tianjin 300410, China

**Abstract:** **Objective** To establish a method for the content determination of antioxidant BHT and vulcanizing agent 4-tert-octylphenol in butyl rubber plug of Yiqi Fumai Lyophilized Injection and to investigate the stability of samples. **Methods** The chromatographic separation was achieved on the ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> column using acetonitrile-0.2% formic acid water as mobile phase gradient elution, the flow rate was 0.3 mL/min, column temperature was 35 °C, and the detection wavelength was 280 nm. **Results** Good linearity ( $r > 0.999$ ) was observed in the standard curves of BHT and 4-tert-octylphenol in the range of 0.4~20 μg/mL. The average recovery of BHT and 4-tert-octylphenol was 99.3% and 101.9%, respectively. The precision and durability results are in line with the requirements; the content of BHT and 4-tert-octylphenol in the study on the stability of Yiqi Fumai Lyophilized Injection sample was below the limit. **Conclusion** The established method was accurate and reliable and can be used for the determination of BHT and 4-tert-octylphenol in Yiqi Fumai Lyophilized injection.

**Key words:** Yiqi Fumai Lyophilized Injection; chlorinated butyl rubber plug; 4-tert-octylphenol; BHT; content determination; stability investigation

注射用益气复脉（冻干）是源于生脉散的冻干粉针制剂, 具有益气生津、敛阴止汗的功效, 在临床主要用于冠心病、心绞痛等疾病的治疗<sup>[1-2]</sup>。由于

注射剂给药后直接接触人体组织或进入血液系统, 被认为是风险最高的品种之一<sup>[3]</sup>。药品与包装材料的相容性研究涉及产品安全, 一直为药品监管部门

收稿日期: 2017-12-21

基金项目: 天津市中药注射剂关键技术校企协同创新实验室建设项目 (17PTSJYC00090); 天津市中药注射剂新技术企业重点实验室

第一作者: 张艳惠 (1988—), 女, 标准支持工程师, 研究方向为药物制剂与中药注射剂质量标准研究。Tel: (022)86342042 E-mail: tsl-zhangyanhui2015@tasly.com

\*通信作者: 鞠爱春 (1973—), 男, 高级工程师, 研究方向为中药注射剂工艺及质量控制。Tel: (022)86342096 E-mail: juach@tasly.com

高度关注,药品的包装材料选择不当,尤其是直接接触药品的包材,将影响产品的质量。根据注射剂安全性再评价及国家对药品注册管理等对药包材的技术要求,需要对药品与包材的相容性进行研究。本课题组前期采用电感耦合等离子体发射光谱-质谱(ICP-MS)法测定了该产品注射剂瓶中的金属元素<sup>[4]</sup>。

注射用冷冻干燥无菌粉末用氯化丁基橡胶塞在使用过程中与药品直接接触,虽然丁基橡胶塞具有良好的气密性和化学惰性,但在药品的使用和贮存过程中,仍存在与药物的相互作用,胶塞可能会吸收药品中的有效成分或者胶塞的成分可能会浸出至药品中,从而影响药品的质量。因此,胶塞与药品的相容性研究可以评价胶塞对药物的稳定性影响,是否有迁移、吸附甚至发生化学反应,从而影响药物的安全有效性<sup>[5]</sup>。抗氧化剂 2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(BHT)和对-特辛基苯酚是存在于胶塞中的两个可挥发性成分,BHT 广泛用于橡胶塞的生产中,有抑制人体呼吸酶活性、增加肝脏微体酶活性等作用<sup>[6]</sup>。对-特辛基苯酚常用作橡胶塞生产的硫化剂,实际生产过程中,硫化剂中可能有未反应的对特辛基苯酚残留,胶塞与药品接触时,可能会迁移出来从而影响药品的安全性;而且对特辛基苯酚为有毒化学品,对皮肤、眼睛、和黏膜有腐蚀性<sup>[7]</sup>。

本文以注射用益气复脉(冻干)为研究对象,建立氯化丁基橡胶塞中抗氧化剂 BHT 和硫化剂对-特辛基苯酚的测定方法,选择药品加速条件对药品进行迁移实验考察,对加速条件下 6 批样品中 BHT 和对特辛基苯酚进行含量测定,为注射用益气复脉(冻干)的质量控制和安全性评价提供依据。

## 1 仪器与试剂

### 1.1 主要仪器

Waters ACQUITY UPLC 超高效液相色谱仪(Waters 公司);梅特勒-MS204S 电子天平,梅特勒-XS105DU 型电子分析天平(美国 Mettler Toledo 公司);Milli-Q 型纯水仪(美国 Millipore 公司);L550 台式低速离心机(长沙湘仪离心机仪器有限公司);岛津 TQ8030 气质联用仪。

### 1.2 试剂与材料

BHT 对照品(质量分数 99.5%,批号 119389),对-特辛基苯酚对照品(质量分数 98.5%,批号 100068),均为德国 Dr. Ehrenstorfer 公司产品;二氯甲烷(色谱纯,4 L/瓶,批号 160726),天津市康

科德科技有限公司产品;甲醇(色谱纯,4 L/瓶,批号 I8447630),乙腈(色谱纯,4 L/瓶,批号 JA039430),Merck 公司产品;甲酸(色谱纯,500 mL,批号 2016-9-2),上海市试剂一厂产品。

分别使用 2 个厂家提供的氯化丁基橡胶塞灌封的 6 批注射用益气复脉(冻干)样品,由天津天士力之骄药业有限公司提供(批号分别为 S1、S2、S3、S4、S5、S6);其中 S1~S3 批产品使用 I 厂的胶塞(批号为 50001231-1703001),S4~S6 批产品使用 II 厂的胶塞(批号为 50001231-1705001)。

## 2 方法

### 2.1 色谱条件

色谱柱(1)为 ACQUITY UPLC BEH C<sub>18</sub> 柱(100 mm×2.7 mm, 1.7 μm);柱温:35℃;体积流量 0.3 mL/min;检测波长 280 nm;进样体积 3 μL;有机相为乙腈,水相为 0.2%甲酸水,洗脱梯度见表 1。

表 1 洗脱梯度

Table 1 Gradient of elution

时间/min	乙腈/%	0.2%甲酸水/%
0	60	40
3.5	70	30
10	90	10
17	95	5
20	60	40
24	60	40

### 2.2 对照品溶液的制备

BHT 对照品储备液 I:取 BHT 对照品约 20 mg,精密称定,置于 100 mL 容量瓶中,加二氯甲烷与甲醇混合溶剂(1:4)溶解并稀释至刻度,摇匀,配成浓度约为 200 μg/mL 的对照品储备液。

对特辛基苯酚对照品储备液 I:取对-特辛基苯酚对照品约 20 mg,精密称定,置于 100 mL 容量瓶中,加二氯甲烷与甲醇混合溶剂(1:4)溶解并稀释至刻度,摇匀,配成浓度约为 200 μg/mL 的对照品储备液。

BHT、对-特辛基苯酚混合对照品:分别精密吸取 BHT 对照品和对特辛基苯酚对照品储备液各 1 mL,置于 100 mL 容量瓶中,加二氯甲烷与甲醇混合溶剂(1:4)稀释定容至刻度,摇匀,配成质量浓度均为 2 μg/mL 的混合对照品溶液。

### 2.3 供试品溶液的制备

取注射用益气复脉(冻干)制剂 1.0 g,精密称

定, 至 20 mL 顶空瓶中, 用 10 mL 超纯水溶解, 加入二氯甲烷 2 mL, 加入饱和氯化钠溶液 0.4 mL, 激烈振摇 1~2 min, 3 000 r/min 离心 5 min, 分层, 去除上层样品溶液, 下层萃取液全部转移至 10 mL 容量瓶中, 加适量甲醇清洗顶空瓶转移至容量瓶, 用甲醇定容至刻度, 混匀, 即得。

#### 2.4 专属性实验

取空白溶剂二氯甲烷-甲醇(1:4)、BHT、对-特辛基苯酚单标对照品溶液(2 μg/mL)和供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 色谱图见图 1。可见空白溶剂对两种成分的测定无干扰。

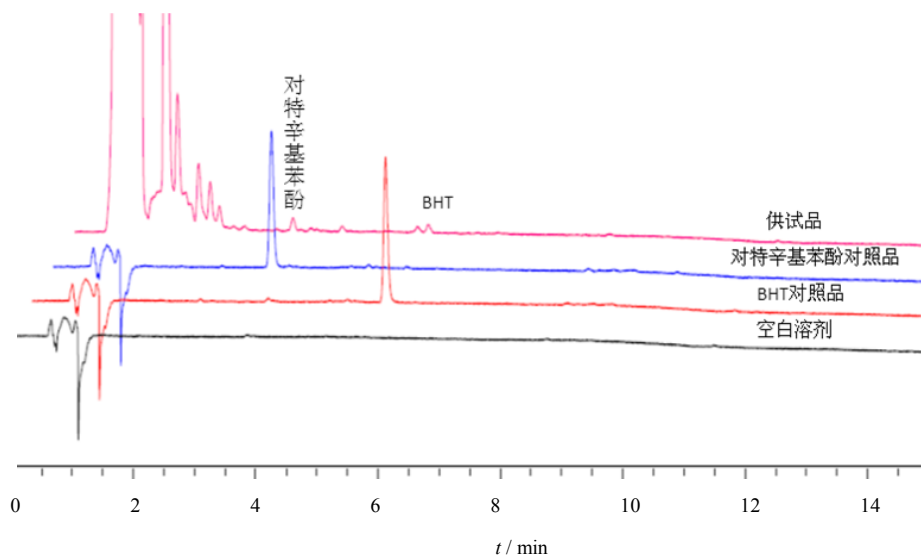


图 1 空白溶剂、BHT 对照品、对特辛基苯酚对照品、供试品的色谱图

Fig. 1 Chromatogram of blank solvent, BHT reference substance, 4-tert-octylphenol reference substance and sample

#### 2.5 检测限和定量限

取对照品, 把已知浓度试样测出的信号与空白样品测出的信号进行比较, 计算出能被可靠地检测出被测物质最低浓度或质量, 以信噪比为 3:1 时的相应浓度或注入仪器的量确定检测限; 以信噪比为 10:1 时相应浓度或注入仪器的量确定定量限, 按“2.1”项下的色谱条件进行测定, BHT 和对-特辛基苯酚的检测限和定量限分别为 0.1 μg/mL 和 0.4 μg/mL。

#### 2.6 线性关系和线性范围

取 BHT 和对特辛基苯酚对照品储备液适量, 加二氯甲烷与甲醇混合溶剂(1:4)稀释, 配制成 BHT 和对-特辛基苯酚质量浓度分别为 20、10、4、2、1、0.4 μg/mL 的混合对照品溶液。按照“2.1”项下的色谱条件进样分析, 进样体积 3 μL, 记录峰

经液相色谱-质谱(GC-MS)法(色谱条件: GC 进样口温度 200 °C, 体积流量 1.0 mL/min, 分流比 5:1; 柱温升温程序: 50 °C 保持 5 min, 5 °C/min 升至 250 °C 保持 5 min, 运行 50 min; MS 离子源 230 °C, 接口温度 200 °C, 采集方式 Q3 Scan, 扫描范围  $m/z$  50~600)对供试品溶液中的 AHT、对-特辛基苯酚进行结构鉴定。

结果供试品 MS 图谱中的目标物与对照品总离子流一致; 液相的 PDA 检测器确认目标物的峰纯度小于阈值, 证明为单一峰。说明该方法的专属性符合要求。

面积值( $Y$ ), 以峰面积对质量浓度( $X$ , μg/mL)进行线性回归, 绘制标准曲线, 得到各成分的回归方程及线性范围。BHT 线性方程为  $Y=4\ 914 X+455.06$ ,  $r=0.999\ 8$ , 对-特辛基苯酚的线性方程为  $Y=4\ 531.4 X+454.42$ ,  $r=0.999\ 8$ , 说明 BHT 和对-特辛基苯酚这两个成分质量浓度在 0.4~20 μg/mL 范围内线性关系良好。

#### 2.7 准确度实验

取批号 S1 的注射用益气复脉(冻干)制剂样品, 按照“2.3”项下供试品溶液的制备方法, 分别加入 BHT、对-特辛基苯酚混合对照品(二氯甲烷作溶媒溶解, 质量浓度分别为 2、10、20 μg/mL) 2 mL 萃取, 每个浓度平行制备 3 份(其中准确度 100% 浓度样品制备 6 份, 可作为重复性考察样品), 每份样品进 2 针, 按相关公式计算回收率和 RSD 值。

回收率=准确度项下测得的样品量/对照品加入量

BHT 和对特辛基苯酚的平均回收率分别为 99.3%、101.9%，在 85.0%~120.0% 范围内，RSD 值为 1.3%、2.1%，符合要求。

## 2.8 精密度实验

**2.8.1 重复性实验** 取准确度项下 100% 浓度样品 6 份，按照“2.1”项下色谱条件进行测定，考察分析重复性。并将第 1 份供试品溶液连续进样 6 次，记录峰面积，计算样品进样重复性。同一供试品溶液连续进 6 次，BHT 和对-特辛基苯酚峰面积的 RSD 值分别为 1.0%、1.5%，进样重复性符合要求，准确度项下 6 份 100% 浓度样品 BHT 和对-特辛基苯酚含量测定结果 RSD 值分别为 0.8%、1.3%，方法的重复性符合有关标准<sup>[8]</sup>要求。

**2.8.2 中间精密度** 取批号 S1 的注射用益气复脉（冻干）制剂样品，按照“2.3”项下供试品溶液的制备方法制备供试品溶液，按照“2.1”项下的色谱条件，分别由 2 名不同的工作人员在同一台仪器进样测定，计算不同人员测定成分含量的 RSD 值。不同人员测定的 BHT 和对-特辛基苯酚含量均小于定量限，结果一致。

## 2.9 稳定性实验

取准确度项下 100% 准确度样品溶液及 BHT、对-特辛基苯酚混合对照品溶液，分别在 0、4、8、16、24 h 按“2.1”项下色谱条件进行检测，分别计算对 BHT、对-特辛基苯酚的 RSD 值，考察供试品及对照品溶液的稳定性。24 h 内对照品溶液 BHT 和对-特辛基苯酚峰面积 RSD 值分别为 1.8%、1.6%，供试品 BHT 和对-特辛基苯酚峰面积 RSD 值为 1.7%、2.0%，稳定性良好。

## 2.10 耐用性考察

取 100% 浓度的准确度测定下的样品 2 份，通过调整色谱柱[使用两根型号不同的色谱柱，除了色谱柱 (1)，增加色谱柱 (2)：ACQUITY UPLC HSS T<sub>3</sub> 色谱柱 (100 mm×2.7 mm, 1.7 μm)]，体积流量±10% (0.27、0.3、0.33 mL/min)，柱温±10% (32℃、35℃、38℃)，调整水相甲酸的加入比例 (0.1%、0.2%、0.3%) 考察耐用性，每份样品进 2 针。不同色谱条件下 BHT 和对特辛基苯酚含量 RSD 值的结果均小于 4.0%，说明方法耐用性良好。

## 3 胶塞的稳定性考察

为考察氯化丁基橡胶塞直接接触注射用益气

复脉（冻干）的注射用冷冻干燥无菌粉末时，胶塞的成分向药品中的迁移情况，选取 6 批制剂（对应两个厂家的胶塞，S1~S3 批产品对应 I 厂的胶塞，S4~S6 批对应 II 厂的），样品倒立放置于下述环境进行加速实验：温度 (40±2)℃、相对湿度 75%±5%。分别对 0 时、加速 1、2、3、6 个月各 6 批制剂中 BHT 和对特辛基苯酚含量进行测定，根据对照品检出限和定量限测定结果折算出药品中两个成分的检出限 (LOD) 和定量限 (LOQ) 分别为 1 μg/g 和 4 μg/g，两个成分含量的测定结果见表 4、5。

表 4 对特辛基苯酚含量测定结果

Table 4 Determination results of 4-tert-octylphenol

批号	对特辛基苯酚的量/(μg·g <sup>-1</sup> )				
	0 时	加速 1 个月	加速 2 个月	加速 3 个月	加速 6 个月
S1	<LOQ	<LOQ	4.091 2	4.865 7	5.743 7
S2	<LOQ	<LOQ	4.475 6	5.343 6	6.176 7
S3	<LOQ	<LOQ	4.162 9	4.918 7	5.736 8
S4	<LOQ	<LOQ	4.453 8	4.954 2	6.052 3
S5	<LOQ	<LOQ	4.855 7	4.638 0	5.783 9
S6	<LOQ	<LOQ	4.528 5	5.030 5	6.067 2

表 5 BHT 含量测定结果

Table 5 Determination results of BHT

批号	BHT 的量/(μg·g <sup>-1</sup> )				
	0 时	加速 1 个月	加速 2 个月	加速 3 个月	加速 6 个月
S1	N.D	N.D	N.D	<LOQ	N.D
S2	N.D	N.D	N.D	<LOQ	N.D
S3	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
S4	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
S5	N.D	N.D	<LOQ	N.D	N.D
S6	N.D	N.D	N.D	<LOQ	N.D

N.D-未检出

N.D- no detection

加速实验的结果显示：随着加速时间的延长，6 批注射用益气复脉（冻干）中对-特辛基苯酚含量有逐渐增加的趋势，加速 2、3、6 个月样品中对-特辛基苯酚的量大于定量限；BHT 的量随着时间延长也有增加趋势，但增量较低，基本小于检出限。

## 4 讨论

### 4.1 分析方法的确认

本文建立了注射用益气复脉(冻干)药品中 BHT 和对-特辛基苯酚的含量测定方法,实验过程中,由于样品中 BHT 和对-特辛基苯酚的含量较低,测定方法由 HPLC 转化为 UPLC 进行测定,灵敏度更高。方法建立过程中对流动相-水相(水、水中添加不同浓度的甲酸和磷酸)进行了考察,根据目标峰的对称性、分离度等综合因素最终选择 0.2% 甲酸作为水相。此外,在样品的制备过程中发现使用塑料离心管作为萃取装置,在对-特辛基苯酚测定过程中有杂质峰干扰,可能是二氯甲烷萃取出塑料中的其他物质,因此实验过程中应避免使用与塑料相关材质,尽可能使用玻璃及惰性材料。

基于优化后的测定方法,参考《中国药典》2015 年版四部“通则 9101”项下内容,对药液中两个成分的测定方法进行方法学验证,各评价指标符合现行标准要求,证明药品中 BHT 和对-特辛基苯酚的测定方法可行,检测数据准确可靠。

#### 4.2 安全性评价

根据提取试验及迁移试验获得的可提取物、浸出物信息,分析汇总浸出物和可提取物的种类及含量,进行结构鉴定,通过安全性研究分析其安全性风险程度,结合吸附试验结果,分析判断包装系统是否与药品具有相容性。根据文献或试验获得浸出物或可提取物的人每日允许最大暴露量(PDE),确定合适的安全性阈值(SCT),基于 PDE 或 SCT 数值、每日最大用药剂量以及制剂包装情况(提取试验中使用容器的数量;与提取溶剂直接接触的表面积;制剂生产、运输、贮藏和使用过程中与药液直接接触部分的表面积等)计算每个包装容器中,各浸出物或可提取物的最大允许的实际浓度,计算得到分析评价限度(AET)。目前欧洲药品局(European Medicines Agency, EMA)推荐的遗传毒性致癌物的安全性阈值(SCT)为 1.5  $\mu\text{g}/\text{d}$ ,国际药用气雾剂联盟(International Pharmaceutical Aerosol Consortium, IPAC)推荐的吸入制剂的安全性阈值(SCT)为 0.15  $\mu\text{g}/\text{d}$ ,对于注射剂,尚未有正式的 SCT 发布<sup>[9]</sup>。

胶塞中对-特辛基苯酚和 BHT 的 PDE 值尚未有文献报道,美国食品药品监督管理局(FDA)“药物非活性成分数据库”对静脉注射用抗氧化剂 BHT 规定最大用量为 0.002%,“化学物质毒性数据库”中小

鼠静脉注射 BHT 的半数致死量(LD<sub>50</sub>)为 180 mg/kg,口服给药 LD<sub>50</sub>为 890 mg/kg,对-特辛基苯酚小鼠口服给药的 LD<sub>50</sub>为 3 210 mg/kg,没有相应的注射给药 LD<sub>50</sub>值,但口服 LD<sub>50</sub>是 BHT 的 3.6 倍,参考 BHT 用量限度,规定对-特辛基苯酚用量限度与 BHT 一致。因此,根据 BHT 最大用量为 0.002% 以及注射用益气复脉(冻干)临床用药剂量,BHT 及对-特辛基苯酚限度暂时定为 20  $\mu\text{g}/\text{g}$ 。

综上所述用 UPLC 法测定注射用益气复脉(冻干)药品中 BHT 和对-特辛基苯酚的含量,灵敏度较高,药品中 BHT 和对-特辛基苯酚检出限为 1  $\mu\text{g}/\text{g}$ ,定量限为 4  $\mu\text{g}/\text{g}$ ,根据加速试验测定结果,6 批注射用益气复脉(冻干)制剂中 BHT 和对-特辛基苯酚含量远低于限度值 20  $\mu\text{g}/\text{g}$ ,氯化丁基胶塞中 BHT 和对-特辛基苯酚迁移至药品的量很少,不会对该产品安全造成影响。

#### 参考文献

- [1] 褚延斌,苏小琴,李德坤,等.基于一测多评法对注射用益气复脉(冻干)中 9 种成分的质量控制研究[J].中草药,2017,48(17):3537-3544.
- [2] 刘晓光,胡金芳,宋美珍,等.注射用益气复脉(冻干)对环磷酰胺诱导小鼠免疫低下的改善作用[J].药物评价研究,2016,39(6):962-965.
- [3] 蒋煜,马玉楠,霍秀敏,等.《化学药品注射剂与塑料包装材料相容性研究技术指导原则》解读——提取迁移试验方法设计[J].中国新药杂志,2014,23(15):1738-1740.
- [4] 鞠爱春,潘超,李海燕,等.电感耦合等离子体发射光谱-质谱法测定硼硅玻璃管制注射剂瓶中的金属元素[J].药物评价研究,2017,40(11):1569-1575.
- [5] 张宇.药用丁基胶塞与药物相容性研究现状与展望[J].天津药学,2010,22(1):51-52.
- [6] 冯靖,蔡心怡,刘言.药用丁基胶塞中抗氧化剂 BHT 和硫化剂可提取硫的测定[J].药物分析杂志,2017,37(4):702-703.
- [7] 李立根,吴莹,张毅兰.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):614-615.
- [8] 中国药典[S].四部.2015:374-377.
- [9] 国家食品药品监督管理局.化学药品注射剂与塑料包装材料相容性研究技术指导原则(试行)[S].2012.