

药用丁基胶塞中抗氧化剂—BHT 和硫化剂—可提取硫的测定

冯靖, 蔡心怡, 刘言*

(天津市药品检验所, 天津 300070)

摘要 目的: 建立药用丁基橡胶塞中添加剂[抗氧化剂 264(2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚,简称 BHT)和硫化剂可提取硫]的含量测定方法。方法: 以二氯甲烷-无水乙醇为提取溶剂,利用高效液相色谱法对药用丁基橡胶塞的 BHT 和可提取硫含量进行测定,以含 0.1% 三氟乙酸的乙腈-含 0.1% 三氟乙酸的水(90:10)为流动相,流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$,检测波长 280 nm。结果: 抗氧化剂 BHT 的线性检测范围 $0.41 \sim 103.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r^2=1.000$),可提取硫的线性检测范围 $0.10 \sim 103.50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r^2=0.9999$),BHT 和可提取硫的平均回收率分别为 95.2% 和 86.8%。测定 7 批药用胶塞中 BHT 与可提取硫含量范围分别为 $4 \sim 206 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 和 $1 \sim 143 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。结论: 本文建立的检测方法经方法学验证,可用于考察药用丁基橡胶塞中 BHT 和可提取硫的含量及质量控制。

关键词: 药品包装容器;丁基胶塞;抗氧化剂;硫化剂;2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(BHT);可提取硫;高效液相色谱;安全监测

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2017)04-0702-05

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.04.22

Determination of antioxidant—BHT and vulcanizing agent—extractable sulphur in medicinal butyl rubber

FENG Jing, CAI Xin-yi, LIU Yan*

(Tianjin Institute for Drug Control, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To establish a method for determination of the additives [antioxidant 264 (2,6-di-tert-butyl-4-methylphenol, hereinafter referred to as BHT) and vulcanizing agent (extractable sulphur)] in medicinal butyl rubber. **Methods:** Dichloromethane-ethanol was adopted as the extraction solvent, and the HPLC was used for determination of BHT and extractable sulphur in medicinal butyl rubber. The mobile phase consisted of acetonitrile-water (90:10, containing 0.1% TFA). The flow rate was $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. The detection wavelength was 280 nm. **Results:** The linearity ranges were from 0.41 to $103.00 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r^2=1.000$) and 0.10 to $103.50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($r^2=0.9999$) for BHT and extractable sulphur. The average recoveries of BHT and extractable sulphur were 95.2% and 86.8%, respectively. The determination results of BHT and extractable sulphur in seven batch rubbers were $4 \sim 206 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ and $1 \sim 143 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ respectively. **Conclusion:** The validated method established in this

* 通信作者 Tel:(022)2340117; E-mail: adamluayan@126.com

第一作者 Tel:(022)2345380; E-mail: hbdxfj2005@sina.com

article can be used for the assay of BHT and extractable sulphur content and for its quality control in medicinal butyl rubber.

Keywords: pharmaceutical packaging container; butyl rubber; antioxidant; vulcanizing agent; 2, 6-di-tert-butyl-4-methylphenol (BHT); extractable sulphur; HPLC; safety monitoring

在肠外药品包装容器 / 密闭系统中,弹性体瓶塞(例如橡胶塞)一直是一种重要组件^[1]。至关重要,要对不同配方的胶塞与药物产品稳定性的效果进行全面评估。胶塞的配方是极其复杂的,包括生胶、抗氧化剂、增塑剂、硫化剂、促进剂、防老剂、活性剂和着色剂等^[2]。普通橡胶塞或者覆膜胶塞内含有的一些添加成分给生产的胶塞带来一定的理想效果的同时,也极有可能与药物发生相互作用从而改变药物的物理性能甚至化学和生物学性能,污染药物,构成潜在的健康危害^[3]。为延长胶塞材料的寿命,抑制或延缓材料的氧化降解,通常添加抗氧化剂。但是食用过量的抗氧化剂,对人体的心、肺、肾、肝等器官有很大的危害,甚至导致突变和致癌^[4]。美国联邦法规(CFR)规定“药品容器和密封件不应与药物发生反应,发生吸附或者迁移,从而改变药物的安全、质量及纯度”^[5]。

抗氧化剂 264(2, 6-二叔丁基-4-甲基苯酚, 2, 6-di-tert-butyl-4-methylphenol, 简称 BHT), 是一种优良的通用型酚类抗氧化剂^[6], 广泛用于橡胶塞的生产中。美国 FDA 批准药物非活性成分数据库对静脉注射类抗氧化剂 BHT 规定最大用量为 0.002%^[7]。欧洲药典^[8]也对抗氧化剂在药品包装中的最大用量做出了规定为 0.3%。BHT 有抑制人体呼吸酶活性、增加肝脏微体酶活性等作用, 美国 FDA 癌症评估委员会也在考虑 BHT 的致癌性^[9]。鉴于包装材料对食品药品安全的重要影响, 各国对抗氧化剂有着严格的限量规定。硫磺可与异戊二丁烯形成交联的二硫键, 起到一定的硫化作用, 是一种最早应用的硫化剂^[10], 能更好地提升丁基胶塞的物理化学性能。硫在丁基胶塞中的溶解性很低, 当硫使用过量时, 其溶解度达到饱和, 硫会从胶料内部析到表面上, 从而产生喷霜的现象^[11]。胶塞喷霜, 一方面会破坏硫在胶料中分散的均匀性, 降低胶料表面的粘着性, 给加工带来困难; 另一方面也会影响被包装药物的质量^[12-13]。因此有必要控制可提取硫的含量。

基于上述抗氧化剂和硫化剂这 2 种添加剂控制的必要性, 本文建立了有机溶剂回流萃取的方法对 2 种

添加剂进行抽提, 并以高效液相色谱法进行测定, 可方便准确的同时测定药用丁基胶塞中 2 种添加剂的含量。

1 仪器与试剂

Agilent 1260 高效液相色谱仪, VWD 检测器, OpenLAB 色谱数据工作站(安捷伦公司)。Diamonsil C₁₈ 色谱柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm; 填料: 十八烷基硅烷键合硅胶; 迪马科技有限公司)。

对照品硫(批号 13803)纯度 99.5%~100.5%, 西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司; 对照品 BHT(批号 BCBL8167V)纯度 99%, ALDRICH 试剂; 水为超纯水, 乙腈为色谱纯, 无水乙醇和二氯甲烷等均为分析纯。7 个批次的药用丁基橡胶塞均由国内 A~E 共 5 个生产企业提供。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Diamonsil C₁₈(150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 含 0.1% 三氟乙酸的乙腈 - 含 0.1% 三氟乙酸的水(90:10); 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 柱温: 35 °C; 紫外检测波长: 280 nm; 进样量: 20 μL。

2.2 供试品溶液的制备 将药用胶塞剪碎, 精密称取 4.0 g, 置 100 mL 磨口硼硅玻璃烧瓶中, 精密加入二氯甲烷 - 无水乙醇(1:1)10 mL, 精密称定, 煮沸回流 4 h, 冷却至室温, 用二氯甲烷 - 无水乙醇(1:1)补充减失的量, 经 0.45 μm 微孔滤膜滤过, 取续滤液即得。

2.3 系列混合对照品溶液的制备 分别精密称取 BHT 和硫的对照品适量, 置同一量瓶中, 加二氯甲烷 - 无水乙醇(1:1)配成每 1 mL 含 BHT 和硫均为 100 μg 的混合对照品储备液; 精密吸取上述储备液适量, 用二氯甲烷 - 无水乙醇(1:1)依次稀释成每 1 mL 含 BHT 和硫均分别为 60、40、20、1.6、0.8、0.4、0.2、0.1 μg 的混合溶液, 即得。

2.4 线性关系考察 精密吸取“2.3”项下系列混合对照溶液 20 μL, 在“2.1”项下色谱条件下, 分别注入色谱仪中, 测定色谱峰面积, 以对照品质量浓度为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线。结果显示:

BHT 质量浓度在 0.41~103.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好,硫质量浓度在 0.10~103.50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好;BHT 和硫回归方程:

$$A=9.636C+1.421 \quad r^2=1.000$$

$$A=26.980C-1.334 \quad r^2=0.9999$$

2.5 精密度试验 取“2.3”项下质量浓度为 0.8、20、40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液,连续进样 6 次,测定色谱峰面积;结果表明 BHT 峰面积的 RSD 分别为 1.07%、0.69%、0.20%,硫峰面积的 RSD 分别为 0.79%、0.95%、0.17%。精密度良好。

2.6 稳定性试验 取“2.3”项下质量浓度为 0.8、20、40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液,分别在室温放置 0、12、24 h 时进样 20 μL ,测定色谱峰面积;结果 BHT 峰面积的 RSD 分别为 0.93%、1.1%、1.3%,硫峰面积的 RSD 分别为 1.2%、1.8%、1.2%。表明混合对

照品溶液室温放置 24 h 基本稳定。

2.7 重复性试验 精密称取同一批胶塞样品(批号 F141100701)6 份,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,进样 20 μL ,测定峰面积;结果样品中 BHT 的含量为 0.020 6%,RSD 为 0.70%;可提取硫的含量为 0.001 6%,RSD 为 1.0%。

2.8 回收率试验 取已知含量的胶塞样品(批号 F141100701)4 g,精密称定,置圆底烧瓶中,3 个一组,分别精密加入混合对照品高浓度溶液(含 BHT: 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;硫: 60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、中浓度溶液(含 BHT: 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;硫: 30 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)、低浓度溶液(含 BHT: 125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$;硫: 15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)1 mL,按“2.2”项下方法制备供试溶液,进样 20 μL ,测定峰面积。结果本方法的 BHT 和硫平均回收率分别为 95.24% 和 86.78%。结果见表 1。

表 1 回收率试验结果(%)

Tab. 1 Results of recovery test

待测物 (analytes)	高浓度 (high concentration)		中浓度 (medium concentration)		低浓度 (low concentration)		平均回收率 (average recovery)
	回收率 (recovery)	RSD	回收率 (recovery)	RSD	回收率 (recovery)	RSD	
BHT	92.9	1.6	97.2	1.5	95.6	1.8	95.2
S	86.3	1.3	88.9	1.7	85.2	1.1	86.8

2.9 最低检出限 取“2.3”项下混合对照品溶液适量,以二氯甲烷-无水乙醇(1:1)逐级稀释测定,记录色谱图,当信噪比 S/N 为 3:1 时,BHT、硫的最低检出限分别为 102、21 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.10 样品的测定 取药用丁基胶塞 7 批,按“2.2”项下方法制备供试品溶液,测定,以标准曲线法计算样品中 BHT 和可提取硫的含量。测定结果见表 2,典型色谱图见图 1。

表 2 药用丁基胶塞中 BHT 和可提取硫的测定结果($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)

Tab. 2 Determination results of BHT and extractable sulphur in medicinal butyl rubber

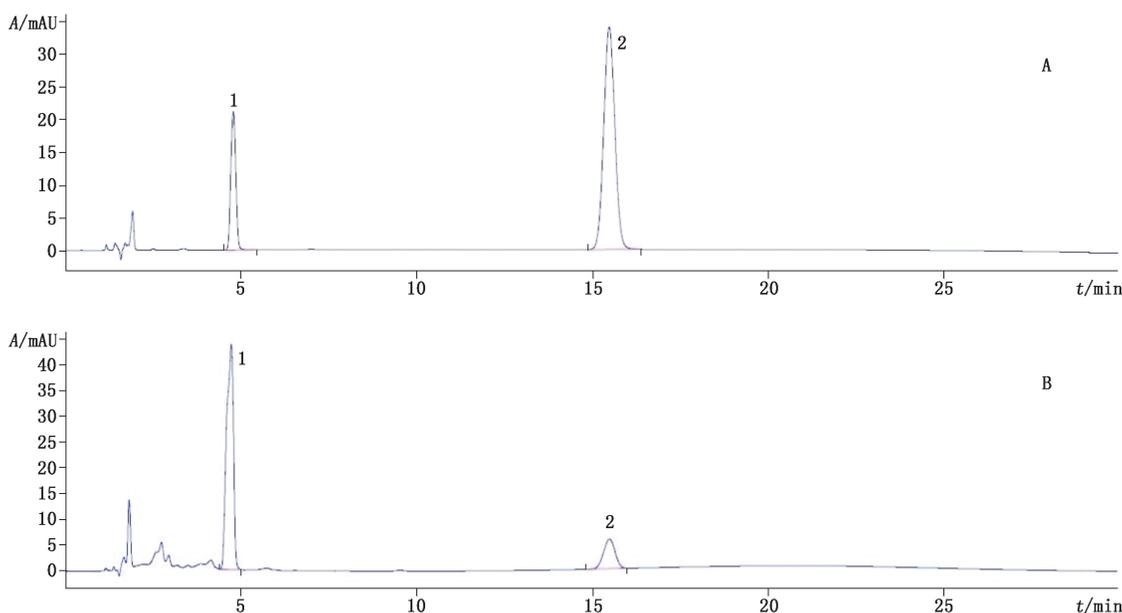
厂家 (manufactory)	批号 (lot No.)	BHT	可提取硫 (extractable sulphur)
A	F141100701	206	17
B	13100904	140	1
C	20140219	4	58
D	W1T13-A2-S	54	3
E	Y-20150305-01	12	143
E	Y-20150305-02	12	143
E	Y-20150305-03	12	141

3 讨论

3.1 样品处理方法 试验所用溶剂为二氯甲烷-乙醇(1:1),通过对比无水乙醇、乙腈作为提取溶剂,本文采用的提取溶剂对 BHT 和可提取硫 2 种待测物质提取更较为完全。另外通过对比同种产品回流提取 2、3、4、5 h 的测定结果,提取 5 h 与 4 h 相比无显著差异,因此确定提取时间为 4 h。测定结果见表 3。

3.2 流动相的选择 分别以欧洲药典收录的三相系统乙腈-四氢呋喃-水(62:30:8)、乙腈-水(90:10)、乙腈(0.1% 三氟乙酸)-水(0.1% 三氟乙酸)(90:10)作为流动相进行考察,结果以乙腈(0.1% 三氟乙酸)-水(0.1% 三氟乙酸)(90:10)系统对待测物的分离效果好,色谱峰峰形更加对称,故选择乙腈(0.1% 三氟乙酸)-水(0.1% 三氟乙酸)(90:10)作为测定的流动相。

3.3 测定结果分析 国家药包材标准 YBB00142002-2015 药品包装材料与药物相容性试验指导原则中指出鉴于橡胶配方的复杂性,应重点考察其中各种添加物的溶出对药物的作用,橡胶对药物的吸附以及填充材料在溶液中的脱落^[14]。欧洲药典 7.0 对聚丙烯



1.BHT 2.可提取硫 (extractable sulphur)

图1 对照品 (A) 及药用丁基胶塞样品 (B) HPLC 色谱图

Fig.1 HPLC chromatograms of reference substance (A) and medicinal butyl rubber sample (B)

表3 不同提取时间样品提取结果 ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)

Tab.3 Results of different extraction time

待测物 (analyte)	2 h	3 h	4 h	5 h
BHT	101.8	184.1	205.9	204.7
可提取硫 (extractable sulphur)	9.3	15.2	16.6	16.8

材料中抗氧化剂的含量有明确规定,要求不得过 0.3%。本文参考该标准要求,对 7 批胶塞产品中的抗氧化剂进行测定,抗氧化剂总量均小于 0.3%。7 批药用胶塞中可提取硫含量为 1~143 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。由于各国标准暂未收载药用胶塞中可提取硫含量的控制标准,因此对于测定结果不做进一步评价。不同厂家的 BHT 和硫含量差异较大,主要是由于各厂家胶塞在原材料、配方等方面差异较大造成的,没有统一的配方标准,因此也更需要对胶塞中的 BHT 和硫进行检测监控。

本研究提供的方法可以简单快速的测定药用丁基橡胶塞中抗氧化剂 BHT 和可提取硫的含量,为进行胶塞与药物相容性试验,进一步评价药用丁基胶塞的稳定性、安全性提供了可以借鉴的方法。

参考文献

[1] XIAO BM, GOZO SK, HERZ L. Development and validation of HPLC methods for the determination of potential extractables from elastomeric stoppers in the presence of a complex surfactant vehicle

used in the preparation of parenteral drug products [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 43 (2): 558

[2] CORREDOR CC, HABY TA. Comprehensive determination of extractables from five different brands of stoppers used for injectable products [J]. *PDA J Pharm Sci Technol*, 2009, 63 (6): 527

[3] LACHMAN L, URBANYI T, WEINSTEIN S. Stability of antibacterial preservatives in parenteral solutions IV: contribution of rubber closure composition on preservative loss [J]. *J Pharm Sci*, 1963, 52 (3): 244

[4] 李涛,赵声兰,余旭亚,等. 抗氧化剂的研究与应用现状 [J]. *食品研究与开发*, 2003, 24 (2): 23

LI T, ZHAO SL, XU XY, *et al.* The status of research and application of antioxidant [J]. *Food Res Dev*, 2003, 24 (2): 23

[5] 21 CFR, Part 210&211, Subpart E (211.94), Drug Product Containers and Closures [S]. 1997: 11

[6] 王华英,张隐峰,应俊扬. 萃取-气相色谱法测定顺丁橡胶中抗氧化剂 264 含量 [J]. *橡胶科技*, 2013, 11 (3): 42

WANG HY, ZHANG YF, YING JY. Detection of antioxidant 264 content in butadiene rubber by extraction-gas chromatography [J]. *Rubber Sci Technol*, 2013, 11 (3): 42

[7] FDA. Inactive Ingredients Database [DB/OL]. 2016 [2016-3-26]. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cder/iig/index.cfm>

[8] EP 7.0 [S]. 2011: 342

[9] 苏立伟,曲蕊蕊,吴笛,等. 酚类化合物对不同组织细胞 DNA 损伤的研究 [J]. *环境化学*, 2003, 22 (4): 390

SU LW, QU MM, WU D, *et al.* Study on DNA damage of several different biomaterials induced by hydroxybenzene compounds [J]. *Environ Chem*, 2003, 22 (4): 390

- [10] 姚世杰,樊云峰. 橡胶硫化剂进展[J]. 中国橡胶, 2003, 21(19): 23
YAO SJ, FAN YF. Development on rubber curing ingredients [J].
China Rubber, 2003, 21(19): 23
- [11] 李樾,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, 28(11): 1257
LI Y, YANG HY, WANG F, *et al.* Study on detection of extractable
sulphur from medicinal halogenated butyl rubber [J]. Chin Pharm
Aff, 2014, 28(11): 1257
- [12] 王飞,司俊杰. 丁基橡胶药用瓶塞配方硫化体系对头孢唑啉钠相
容性的影响研究[J]. 机电信息, 2005(1): 27
WANG F, SI JJ. Study on influence of compatibility between butyl
medicinal rubber vulcanizing system and cefazolin sodium [J].
Mech Electr Inf, 2005(1): 27
- [13] 郭舜华. 硫化体系及工艺对丁基瓶塞与生理盐水相容性的影响
[J]. 中国橡胶, 2006, 22(3): 26
GUO SH. The influence on the compatibility between butyl bottle
cork and physiological saline from vulcanizing system and technology
[J]. China Rubber, 2006, 22(3): 26
- [14] YBB00142002-2015 药品包装材料与药物相容性试验指导原则
[S]// 国家药包材标准. 2015: 381
YBB00142002-2015 Guidelines of evaluating compatibility between
pharmaceutical packaging and pharmaceuticals [S]//Quality
Standards for Drug Packaging Materials. 2015: 381

(本文于 2016 年 4 月 25 日收到)

《药物分析杂志》编辑部声明

本刊采用在线投稿系统,作者稿件一经本刊审核通过,确定录用,可优先数字出版,同时被中国学术期刊网络出版总库等数据库收录,进入因特网提供信息服务,并通过本刊在线系统等实现全文查询。本刊所付稿酬包含刊物内容上网服务报酬,不再另付。

本刊未委托其他任何机构或个人代理征收稿件,所有稿件须登录本刊网站(<http://www.ywfxzz.cn>)在线投稿,并须提交加盖公章的单位介绍信。

本刊未委托其他任何机构或个人代收任何费用,所有收费按本刊缴费通知办理。