

# HPLC 考察妥布霉素滴眼液中 11 种抗氧化剂

张冬梅, 于明艳, 刘文坤, 凌霄(山东省食品药品检验研究院, 济南 250101)

**摘要:**目的 建立妥布霉素滴眼液中 11 种抗氧化剂含量的 HPLC 测定方法, 考察包材中抗氧化剂向药液的迁移情况。方法 采用以聚合物基质吸附剂为填料的固相萃取小柱, 对样品中的抗氧化剂进行富集。利用高效液相色谱建立妥布霉素滴眼液包材中抗氧化剂 BHA、抗氧化剂 XH-245、BHT、抗氧化剂 1790、抗氧化剂 LK-1081、抗氧化剂 702、抗氧化剂 3114、抗氧化剂 1010、抗氧化剂 330、抗氧化剂 1076、抗氧化剂 168 含量的方法, 进行方法学验证。50 °C 放置 0, 5, 10 d 考察抗氧化剂在滴眼液中的迁移情况。**结果** 11 种抗氧化剂峰均分离良好, 专属性、线性范围、准确度、精密性、耐用性均符合要求。50 °C 放置 5, 10 d 后, 药液中抗氧化剂含量有不同程度的提高, 其中 BHA、XH-245、BHT、3114、1010、1076 更明显。**结论** 所建立的方法灵敏、快速、准确、重复性好, 可用于包材中 11 种抗氧化剂向妥布霉素滴眼液中迁移量的监测。

**关键词:** 高效液相色谱法; 妥布霉素滴眼液; 抗氧化剂; 包材相容性

中图分类号: R917.101 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2020)15-1862-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2020.15.011

引用本文: 张冬梅, 于明艳, 刘文坤, 等. HPLC 考察妥布霉素滴眼液中 11 种抗氧化剂[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(15): 1862-1866.

## Study of 11 Antioxidants in Tobramycin Eye Drops by HPLC

ZHANG Dongmei, YU Mingyan, LIU Wenkun, LING Xiao(Institute for Food and Drug Control of Shandong Province, Jinan 250101, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish an HPLC method for determining the content of 11 antioxidants in tobramycin eye drops, and study the migration of antioxidants from plastic packaging materials to eye drops. **METHODS** The solid phase extraction column packing with diethenylbenzene polymer was used to concentrate the antioxidants, the HPLC method was set up to determine the contents of antioxidant BHA, XH-245, BHT, 1790, LK-1081, 702, 3114, 1010, 330, 1076 and 168. Putting samples under condition of 50 °C for 0, 5, 10 d to evaluate the antioxidant immigration. **RESULTS** The 11 antioxidants were well separated. The specificity, the linear range, the precision, the accuracy and the robustness were good. The content of antioxidants were increased after 5, 10 d under 50 °C, among which BHA, XH-245, BHT, 3114, 1010 and 1076 had increased significantly. **CONCLUSION** The method is sensitive, rapid and accurate with good repeatability, which can be used to evaluate the migration of antioxidants from packaging materials and containers to tobramycin eye drops.

**KEYWORDS:** HPLC; tobramycin eye drops; antioxidant; compatibility between drug and the container

塑料药品包装材料作为药品组成的一部分, 其安全性一直受到广泛关注, 在生产过程中, 为使其易于加工, 在储存、使用过程中更加稳定, 不因光、氧等因素影响而导致材料老化、性质改变、破损等问题, 通常需加入多种助剂, 如抗氧化剂、抑酸剂、润滑剂等, 抗氧化剂是其中一种主要添加剂<sup>[1]</sup>。塑料产品中常用的抗氧化剂主要包含抗氧化剂 BHA、抗氧化剂 XH-245、塑料添加剂 07(抗氧化剂 BHT)、抗氧化剂 1790、抗氧化剂 LK-1081、抗氧化剂 702、塑料添加剂 13(抗氧化剂 3114)、塑料添加剂 09(抗氧化剂 1010)、塑料添加剂 10(抗氧化剂 330)、塑料添加剂 11(1076)、塑料添加剂 12(抗氧化剂 168)等。在包材使用过程中, 抗氧化剂可能与其包装的药品发生相互作用, 因此, 在考察药品与其包装材料的相容性时, 有必要对其中所含的抗氧化剂及其分解物

进行考察<sup>[2]</sup>。欧洲药典(EP9.0)中对各种塑料材料中添加剂的添加量进行了限定, 并给出了试验方法<sup>[3]</sup>, 国内外研究人员也对不同塑料材料中的抗氧化剂含量, 抗氧化剂分解物及迁移量测定方法进行了研究<sup>[4-9]</sup>。本实验参考 EP9.0 及相关文献<sup>[10]</sup>, 利用 BRP 固相萃取小柱对样品中抗氧化剂进行富集, 采用 HPLC 进行含量测定, 该方法检出限低, 污染小, 前处理过程简单, 方法可靠, 为药包材的质量研究以及药物与药包材的相容性试验提供参考方法。按建立的方法测定了 21 家企业妥布霉素滴眼液样品, 并进行迁移试验, 对提取结果及迁移结果进行评估。

### 1 仪器与试剂

岛津 LC-20A 高效液相色谱仪; Welch 固相萃取小柱(BRP 200 mg/6 mL, 30 PK, 批号:

作者简介: 张冬梅, 女, 硕士, 副主任药师 Tel: (0531)81216552 E-mail: zhangdm1000@163.com

E11M05D; 聚合物基质吸附剂); 丁基羟基茴香醚 (butylated hydroxyanisole, BHA, 批号: 20606; 含量: 97.0%)、2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(BHT, 批号: PUB8L; 含量: 99.0%)、抗氧剂 XH-245(批号: 5787, 含量: 100%)、抗氧剂 1790(批号: 5707; 含量: 100%)、抗氧剂 LK-1081(批号: 5689; 含量: 100%)、抗氧剂 702(批号: MKBR3310V; 含量: 98%)、抗氧剂 1010(批号: 5692; 含量: 100%)、抗氧剂 330(批号: MKBF6188V; 含量: 99%)、抗氧剂 1076(批号: MKBB8963V; 含量: 99%)和抗氧剂 168(批号: MKBF0813V; 含量: 98%)均来自 SIGMA; 抗氧剂 3114(BESTOWN-振翔公司, 批号: P2155013; 含量: 99%); 异丙醇(天津市科密欧化学试剂有限公司, 分析纯, 批号: 201S0426)。妥布霉素滴眼液来自 2018 年国家评价性抽验, 来源于 21 家企业, 具体见表 1。

表 1 妥布霉素滴眼液来源厂家及其批号  
Fig.1 Source manufacturer and batch number of tobramycin eye drops

企业	企业代码	批号
s.a.ALCON-COUVREUR n.v.	1	17H21BA
长春迪瑞制药有限公司	2	180201
永光制药有限公司	3	171103
黑龙江龙桂制药有限公司	4	170601
南京恒生制药有限公司	5	12171101
湖北远大天明制药有限公司	6	171001
江苏祥瑞药业有限公司	7	1801108
黑龙江天龙药业有限公司	8	20170812
江苏汉晨药业有限公司	9	1710061
江苏普华克胜药业有限公司	10	170503
杭州国光药业股份有限公司	11	171201
辰欣佛都药业(汶上)有限公司	12	1610253101
南京天朗制药有限公司	13	171003
广东宏盈科技有限公司	14	17092102
宁夏康亚药业股份有限公司	15	3171107
河北医科大学制药厂	16	170602
珠海亿胜生物制药有限公司	17	11180101
四川升和药业股份有限公司	18	1712101
重庆科瑞制药(集团)有限公司	19	247004
杭州民生药业有限公司	20	51180101
开封制药(集团)有限公司	21	20161203

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

Inertsil ODS-3 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为水(A)-乙腈(B), 梯度洗脱: 0 min, 70%A,

1 mL·min<sup>-1</sup>; 20 min, 2%A, 1 mL·min<sup>-1</sup>; 25 min, 2%A, 2 mL·min<sup>-1</sup>; 55 min, 2%A, 2 mL·min<sup>-1</sup>; 55.1 min, 70%A, 1 mL·min<sup>-1</sup>; 63 min, 70%A, 1 mL·min<sup>-1</sup>。柱温 50 °C, 测定波长 200 nm, 进样体积 20 μL。

### 2.2 对照品溶液的制备

分别精密称取 11 种抗氧剂各 25 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加异丙醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为贮备液。精密量取贮备液各 1 mL, 置同一 100 mL 量瓶中, 加异丙醇稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液。

### 2.3 供试品溶液的制备

取滴眼液 10 支, 以 1~2 mL·min<sup>-1</sup> 的流速缓慢过小柱, 加水 5 mL 冲洗小柱, 抽干, 用异丙醇 5 mL 洗脱小柱, 洗脱液置 5 mL 量瓶中, 用异丙醇定容, 即得。

### 2.4 系统适用性试验

取对照品溶液, 进样测定, 色谱图中各相邻峰之间的分离度均≥1.5。系统适用性色谱图见图 1, 供试品色谱图见图 2。

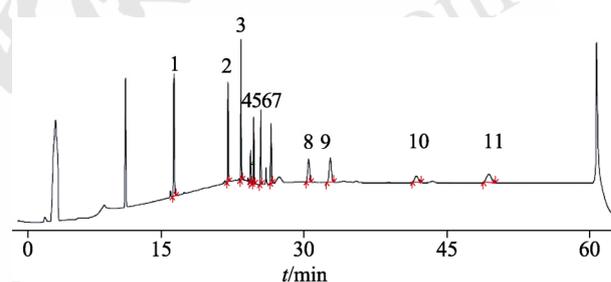


图 1 系统适用性试验色谱图

1-BHA; 2-抗氧剂 XH-245; 3-BHT; 4-抗氧剂 1790; 5-抗氧剂 LK-1081; 6-抗氧剂 702; 7-抗氧剂 3114; 8-抗氧剂 1010; 9-抗氧剂 330; 10-抗氧剂 1076; 11-抗氧剂 168。

Fig. 1 Chromatogram for system suitability test

1-BHA; 2-antioxidant XH-245; 3-BHT; 4-antioxidant 1790; 5-antioxidant LK-1081; 6-antioxidant 702; 7-antioxidant 3114; 8-antioxidant 1010; 9-antioxidant 330; 10-antioxidant 1076; 11-antioxidant 168.

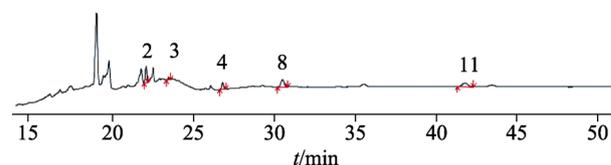


图 2 供试品色谱图(企业 8, 批号: 20170812)

2-抗氧剂 XH-245; 3-BHT; 4-抗氧剂 1790; 8-抗氧剂 1010; 11-抗氧剂 168。

Fig. 2 Chromatograms of sample(manufacture 8, batch: 20170812)

2-antioxidant XH-245; 3-BHT; 4-antioxidant 1790; 8-antioxidant 1010; 11-antioxidant 168.

## 2.5 专属性试验

按各处方工艺配制阴性对照溶液,按“2.1”项下方法进样测定,结果显示阴性对照无干扰。

## 2.6 线性关系

分别精密量取“2.2”项下的对照品贮备液 0.1, 0.5, 1, 2, 5, 10 mL 置 100 mL 量瓶中,加异丙醇稀释至刻度,摇匀,测定,绘制峰面积与对照品溶液浓度的标准曲线,结果见表 2。

表 2 线性范围结果

Tab. 2 Results of linear range

抗氧化剂	线性范围/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	回归方程	$r$
BHA	0.48~47.72	$y=110\ 000x+22\ 979$	0.999 8
XH-245	0.51~51.04	$y=63\ 084x+2\ 850$	1.000 0
BHT	0.55~54.91	$y=73\ 990x+19\ 719$	0.999 9
1790	0.46~45.92	$y=28\ 598x+6\ 170$	0.996 6
LK-1081	0.51~50.71	$y=39\ 571x+3\ 583$	0.999 9
702	0.50~50.50	$y=48\ 916x+759$	1.000 0
3114	0.48~48.19	$y=55\ 580x-552$	1.000 0
1010	0.48~48.06	$y=45\ 406x-4\ 546$	1.000 0
330	0.50~50.33	$y=53\ 576x-4\ 855$	1.000 0
1076	0.48~47.91	$y=29\ 228x-717$	1.000 0
168	0.50~50.48	$y=55\ 125x+40$	1.000 0

## 2.7 精密度试验

精密量取对照品溶液,重复进样 6 次,RSD 结果在 0.4%~1.3%( $n=6$ ),说明仪器精密度良好。同时在不同日期由不同人员分别进样测试,RSD 结果均在 0.2%~0.8%( $n=6$ ),说明中间精密度良好。

## 2.8 检出限(LOD)和定量限(LOQ)

分别以信噪比( $S/N$ )为 3 和 10 为指标,测定各抗氧化剂的 LOD 和 LOQ,结果见表 3。

## 2.9 稳定性试验

将抗氧化剂对照品混合溶液室温放置,于 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 h 分别进样测定,各抗氧化剂峰面积 RSD 在 0.8%~2.1%,说明溶液室温 24 h 稳定性良好。

## 2.10 加样回收率试验

按企业提供处方配制溶液,平行制备 9 份,分别置 10 mL 量瓶中。另精密量取“2.2”项下对照品贮备液 5.0 mL,置 50 mL 量瓶中,加异丙醇稀释至刻度,摇匀,精密量取 0.5, 1.0, 1.5 mL,置上述 10 mL 量瓶中,制成每个浓度各 3 份,按“2.3”项下方法处理,测定,各抗氧化剂的平均回收率在 86.6%~100.4%,RSD 在 0.5%~6.9%,回收率良好,结果见表 3。

表 3 定量限、检出限、回收率结果( $n=9$ )

Tab. 3 Results of LOD, LOQ and recovery( $n=9$ )

抗氧化剂	LOD/ng	LOQ/ng	平均回收率/%	RSD/%
BHA	38	12	100.4	0.5
XH-245	51	17	94.5	6.9
BHT	37	10	94.7	5.3
1790	23	11	86.6	4.1
LK-1081	101	34	92.1	5.7
702	63	25	92.5	6.5
3114	96	32	92.2	5.3
1010	160	48	91.2	6.1
330	168	50	90.3	5.8
1076	479	160	88.9	5.6
168	505	168	88.2	5.3

2.11 抗氧化剂迁移试验 取 10 瓶样品,50 °C 放置 5, 10 d,按“2.3”项下方法处理,计算包装容器中抗氧化剂向样品中的迁移量,以主成分标示量计算。结果显示,不同企业产品中均有抗氧化剂检出,其中 BHA、XH-245、BHT、3114、1010、1076 检出较多。结果见表 4。高温放置后部分抗氧化剂含量明显增加,结果见图 3。

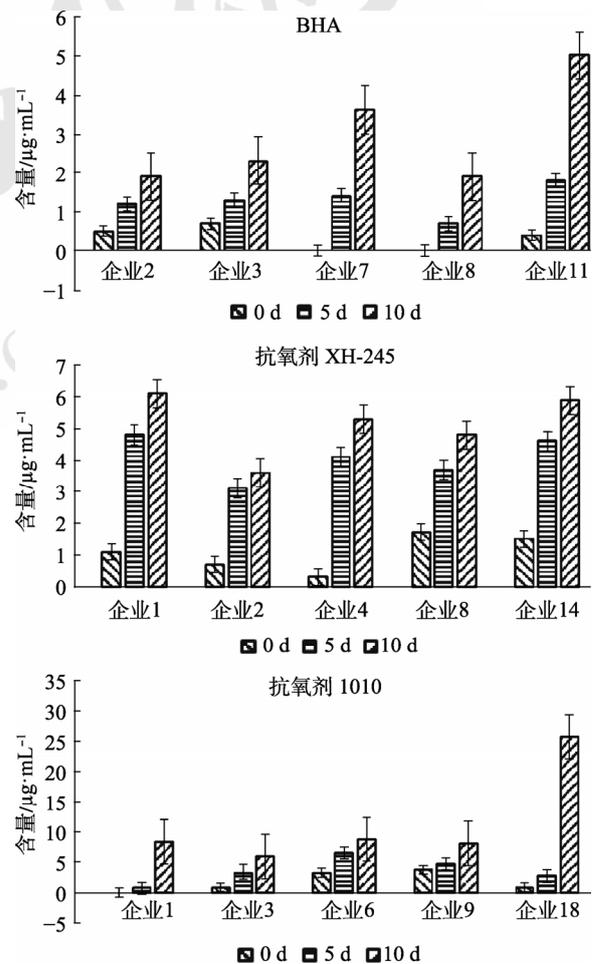


图 3 部分企业产品的迁移结果

Fig. 3 Results of immigration test of some enterprise products

表 4 样品测定结果

Tab. 4 Test results of samples

企业	时间/ d	BHA/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	XH-245/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	BHT/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	3114/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	1010/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	1076/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	企业	时间/ d	BHA/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	XH-245/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	BHT/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	3114/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	1010/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	1076/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
1	0	/	1.1	0.8	4.1	/	2.4	12	0	3.8	0.8	1.5	1.5	4.1	2.8
	5	/	4.8	0.6	3.5	0.7	2.8		5	3.1	20.6	1.6	1.9	2.1	6.1
	10	/	6.1	1.3	3.3	8.3	8.4		10	3.1	11.4	1.9	3.0	4.2	8.9
2	0	0.5	0.7	0.4	3.9	0.2	2.1	13	0	0.4	0.4	1.1	1.6	2.1	2.1
	5	1.2	3.1	0.3	1.4	0.3	1.7		5	0.7	2.3	0.8	1.4	1.5	1.8
	10	1.9	3.6	0.4	1.7	0.7	4.2		10	1.8	4.9	1.0	2.2	2.8	4.0
3	0	0.7	/	5.8	2.5	3.2	3.6	14	0	/	1.5	1.6	7.6	2.2	5.1
	5	1.3	/	0.7	1.7	5.9	2.0		5	/	4.6	0.3	2.4	1.3	1.9
	10	2.3	/	2.6	3.2	7.9	19.3		10	/	5.9	0.7	3.2	4.2	6.2
4	0	/	0.3	1.0	9.2	2.2	3.3	15	0	0.8	0.7	1.1	1.2	1.6	4.1
	5	/	4.1	0.4	4.9	0.5	2.0		5	0.3	1.6	0.5	5.5	2.2	1.6
	10	/	5.3	0.5	1.9	2.7	8.5		10	0.7	3.3	0.4	5.5	3.6	2.9
5	0	/	2.3	1.5	3.3	/	/	16	0	0.4	/	1.1	7.3	1.6	3.4
	5	/	2.1	0.7	2.5	/	/		5	3.1	/	0.8	2.2	2.6	6.0
	10	/	3.5	0.6	2.6	5.0	3.9		10	2.6	3.5	1.2	1.7	1.3	7.7
6	0	/	3.5	0.8	2.1	3.2	5.2	17	0	2.9	0.9	1.2	3.4	3.1	5.0
	5	/	1.4	0.3	7.1	6.5	5.4		5	1.8	3.4	0.2	3.6	0.5	5.1
	10	/	3.7	0.7	4.2	8.7	5.1		10	3.7	4.2	0.8	2.7	3.1	5.8
7	0	/	1.1	0.8	4.4	1.2	3.5	18	0	1.0	0.7	0.6	2.0	0.8	2.9
	5	1.4	1.1	0.7	3.2	0.3	6.6		5	7.3	5.3	0.3	2.6	2.7	2.5
	10	3.6	2.8	0.4	3.8	6.5	14.5		10	7.5	5.5	1.1	2.2	25.7	3.7
8	0	/	1.7	0.6	5.0	1.9	1.8	19	0	0.1	0.5	0.8	3.1	1.9	2.6
	5	0.7	3.7	0.2	3.8	2.5	6.5		5	0.0	0.8	0.2	2.4	2.2	0.5
	10	1.9	4.8	0.4	6.2	3.4	4.8		10	1.1	0.5	0.7	2.1	2.4	5.4
9	0	1.2	4.6	0.9	6.0	3.7	3.5	20	0	/	/	0.5	1.4	1.1	3.3
	5	1.2	4.6	0.7	1.0	4.7	3.5		5	/	/	0.6	1.9	3.0	1.5
	10	0.9	5.8	0.6	3.5	8.1	11.2		10	/	/	1.1	2.4	3.6	3.2
10	0	3.1	2.3	0.9	5.4	2.7	5.3	21	0	/	/	/	3.0	/	/
	5	6.5	3.1	0.2	3.5	0.8	6.3		5	/	/	/	3.2	/	/
	10	5.4	6.7	0.7	2.4	7.1	14.9		10	/	/	/	4.4	/	/
11	0	0.4	0.9	1.1	1.5	2.5	4.2	12	0	3.8	0.8	1.5	1.5	4.1	2.8
	5	1.8	19.1	1.2	2.4	7.8	6.9		5	3.1	20.6	1.6	1.9	2.1	6.1
	10	5.0	4.0	0.7	2.3	1.2	6.1		10	3.1	11.4	1.9	3.0	4.2	8.9

### 3 讨论

#### 3.1 检测波长的选择

文献报道和通过全波长紫外吸收光谱, 11 种抗氧化剂在波长 200~400 nm 均有不同程度的紫外吸收, 在 200 nm 处吸收较大, 其检出限、定量限均能达到定性、定量的要求, 综合考虑, 最终选择检测波长 200 nm。

#### 3.2 固相萃取小柱的选择

由于抗氧化剂的迁出非常微量, 直接进入液相无法测出, 因此采用萃取柱进行富集。抗氧化剂不溶于水, 采用聚合物基质吸附剂 BRP 固相萃取小柱。选用月旭公司生产的 Welchrom BRP 200 mg/6 mL, 30 PK, 效果较好。临用时用甲醇 10 mL 活化小柱, 水平衡, 用异丙醇洗脱。

#### 3.3 样品前处理

由于抗氧化剂在包装材料中的含量很小, 迁移

进入药液中的量就更小, 因此采用固相萃取小柱 BRP 型将抗氧化剂富集在小柱上, 用适宜的溶剂将其洗脱再测定的方法。取妥布霉素滴眼液, 以 1~2 mL·min<sup>-1</sup> 的流速缓慢过小柱, 加水 5 mL 冲洗小柱, 抽干, 用异丙醇 5 mL 洗脱小柱, 收集洗脱液, 进液相。

#### 3.4 结果

结果显示, 各批号妥布霉素滴眼液除抗氧化剂 330 外, 其他均有不同程度的迁出, 高温试验条件下加速试验, 部分抗氧化剂呈增长的趋势。

### 4 结论

本方法采用 HPLC 梯度洗脱程序建立了可以同时测定包装材料中 11 种抗氧化剂含量的方法, 并对方法进行了验证。通过 BRP 固相萃取小柱富集, 能有效检测目前包材中所含抗氧化剂的含量, 为滴眼液包材中抗氧化剂的迁移质量控制提供依据。使

用该方法测定了 21 批妥布霉素滴眼液中抗氧化剂迁移的含量, 均有不同程度的检出, 但进口企业检出量明显低于国内企业, 提示生产企业应在包装材料的选择上加以控制, 选用优质包材。使用该方法进行加速迁移试验, 发现随着温度的升高, 部分抗氧化剂的迁移有明显加大的趋势, 提示药品在储存过程中应该控制温度等贮存条件。

## REFERENCES

- [1] LI Y, SUN H M, ZHANG X. Determination of antioxidants in plastic infusion packaging materials and containers and the migration to injections [J]. *Chin Pharm J(中国药学杂志)*, 2016, 19(51): 1699-1705.
- [2] JIANH Y, MA Y N, HUO X M, et al. Interpretation of the guidance of compatibility study of injections and plastic packaging materials-extract and migration study design [J]. *Chin J New Drugs(中国新药杂志)*, 2014, 23(15): 1738-1742.
- [3] EP8.0 [S]. 2014: 380-383.
- [4] LIN H J, WU Y, ZHANG Y L. Extraction and determination of DBP degraded from Irgafos 168 in three-layer coextrusion film for infusion bag [J]. *Chin J Pharm(中国医药工业杂志)*, 2014, 45(7): 677-680.
- [5] GREEN S, BAI S, CHEATHAM M, et al. Determination of antioxidants in polyolefins using total dissolution methodology followed by RPLC [J]. *J Sep Sci*, 2010, 33(22): 3455-3462.
- [6] ZHU B J, HU H G, LI T T, et al. HPLC determination of antioxidant 1010, antioxidant 1076, antioxidant 168 and antioxidant 330 in polypropylene infusion bottles [J]. *Chin J Pharm Anal(药物分析杂志)*, 2012, 32(3): 416-418, 433.
- [7] WANG F, LI Y, SUN H M. Migration studies on the additives of polypropylene infusion bottle [J]. *Chin J Pharm Anal(药物分析杂志)*, 2012, 32(3): 414-415, 446.
- [8] ZHANG L, WANG M, WANG X Y, et al. Determination of the migration of antioxidant in sodium chloride injections packed by polypropylene infusion bottles [J]. *Northwest Pharm J(西北药学杂志)*, 2013, 6(28): 583-587.
- [9] REINGBYER E, BUCHBERGER W. Analysis of polyolefin stabilizers and their degradation products [J]. *J Sep Sci*, 2010, 33(22): 3463-3475.
- [10] PU X C, CHEN R, YOU Y J. HPLC determination for migration of antioxidant 1076 from rubber stopper to micafungin sodium injection [J]. *Chin J Pharm Anal(药物分析杂志)*, 2017, 37(7): 1298-1303.

收稿日期: 2019-12-24  
(本文责编: 蔡珊珊)