中图分类号：R927.2　　文献标志码：A　　文章编号：1006－4931(2024)11－0071－04
doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2024.11.016

高效液相色谱法测定硝酸甘油气雾剂定量阀门中5种抗氧剂含量与迁移量研究

肖海文[1,2]，雷春华[2,3]，林文辉[2,3△]

（1. 湛江市明德医药科技有限公司，广东 湛江　524018；2. 国家中药现代化工程技术研究中心 岭南药用芳香油分中心，广东 湛江　524017；3. 广东同德药业有限公司，广东 湛江　524017）

摘要：目的　建立同时测定硝酸甘油气雾剂定量阀门中5种常见抗氧剂含量的高效液相色谱（HPLC）法，并考察抗氧剂在其中的迁移情况。**方法**　色谱柱为Inertsil®ODS－SP柱（150 mm×4.6 mm，5 μm），流动相为水－四氢呋喃－乙腈（10∶30∶60，*V*/*V*/*V*），流速为1.5 mL/min，柱温为30 ℃，检测波长为280 nm，进样量为20 μL。**结果**　抗氧剂168、抗氧剂330、抗氧剂1010、抗氧剂1076、抗氧剂2,6－二叔丁基对甲酚（BHT）的质量浓度均在0.2～250 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好（$r \geq 0.9998$，$n=6$）；检测限分别为1.58，0.27，0.38，0.94，0.24 μg/mL；定量限分别为3.84，0.91，1.44，3.02，0.60 μg/mL；精密度、稳定性、重复性试验结果的*RSD*均小于2.0%（$n=6$）；回收率分别为100.67%，99.97%，99.93%，99.60%，99.63%，*RSD*分别为0.47%，0.21%，0.93%，0.44%，0.60%（$n=9$）。硝酸甘油气雾剂定量阀门组件材料（内垫圈、阀杆、阀室、吸管）中抗氧剂168、抗氧剂330、抗氧剂1010、抗氧剂1076的检出量均低于其评价阈值（AET），均未检出抗氧剂BHT。加速试验0个月、3个月、6个月，定量阀门组件材料中抗氧剂168、抗氧剂330、抗氧剂1010、抗氧剂1076、抗氧剂BHT的迁移量均低于其AET。**结论**　该方法操作简单、灵敏度高、结果准确、重复性和稳定性均较好，可用于硝酸甘油气雾剂定量阀门中5种抗氧剂的含量测定及迁移量研究。

关键词：硝酸甘油气雾剂；定量阀门；抗氧剂；含量测定；迁移量

Determination of Content and Migration of Five Antioxidants in Quantitative Valve of Nitroglycerin Aerosol by HPLC

XIAO Haiwen[1,2], LEI Chunhua[2,3], LIN Wenhui[2,3]

(1. Zhanjiang Mingde Pharmaceutical Technology Co., Ltd., Zhanjiang, Guangdong, China　524018; 2. National Engineering Research Center for Modernization of Traditional Chinese Medicine Lingnan Medicinal Plant Oil Branch, Zhanjiang, Guangdong, China　524017; 3. Guangdong Tongde Pharmaceutical Co., Ltd., Zhanjiang, Guangdong, China　524017)

Abstract: Objective　To establish a high－performance liquid chromatography (HPLC) method for the simultaneous determination of five antioxidants in quantitative valves of nitroglycerin aerosol, and to investigate the migration of antioxidants in nitroglycerin aerosols. **Methods**　The chromatographic column was Inertsil®ODS－SP column (150 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was water－tetrahydrofuran－acetonitrile (10∶30∶60, *V*/*V*/*V*), the flow rate was 1.5 mL/min, the column temperature was 30 ℃, the detection wavelength was 280 nm, and the injection volume was 20 μL. **Results**　The linear ranges of antioxidants 168, 330, 1010, 1076, BHT were 0.2－250 μg/mL ($r \geq 0.9998$, $n=6$), the limits of detection (LOD) were 1.58, 0.27, 0.38, 0.94, 0.24 μg/mL, the limits of quantification (LOQ) were 3.84, 0.91, 1.44, 3.02, 0.60 μg/mL. The *RSD*s of precision, stability, and repeatability test results were all lower than 2.0% ($n=6$). The recovery rates of the above five antioxidants were 100.67%, 99.97%, 99.93%, 99.60%, and 99.63%, with *RSD*s of 0.47%, 0.21%, 0.93%, 0.44%, and 0.60% ($n=9$), respectively. The detection levels of antioxidants 168, 330, 1010, 1076 in the component materials such as the internal gasket, valve stem, valve chamber, and pipette of the quantitative valve of nitroglycerin aerosol were lower than those of corresponding analytical evaluation threshold (AET), and no antioxidant BHT was detected. After 0, 3, and 6 months of accelerated tests, the migration volumes of antioxidants 168, 330, 1010, 1076, and BHT in the component materials of the quantitative valve were all lower than those of corresponding AET. **Conclusion**　This method is simple, highly sensitive, and accurate, with good repeatability and stability, which can be used for the determination of the content and migration of five antioxidants in quantitative valves of nitroglycerin aerosol.

Key words: nitroglycerin aerosol; quantitative valve; antioxidant; content determination; migration

药品包装材料（简称药包材）直接接触药品，尤其是在药物制剂中，一些剂型本身就依附包装而存在，如气雾剂[1]。《中华人民共和国药品管理法》第52条规定，“直接接触药品的包装材料和容器，必须符合药用要

第一作者：肖海文，男，硕士研究生，中级工程师，研究方向为药物研发，（电话）0759－3516699（电子信箱）343169444@qq.com。
△通信作者：林文辉，男，中级工程师，研究方向为药物质量控制，（电话）0759－3516315（电子信箱）492580075@qq.com。

求，符合保障人体健康、安全的标准。”[2]药包材的选择对于确保药品质量非常重要，不恰当的包装材料会引发药物活性成分的迁移、吸附及化学反应，导致药物失效，甚至发生药品不良反应[1]。硝酸甘油气雾剂主要用于冠状动脉粥样硬化性心脏病（简称冠心病）心绞痛的防治，由药物（硝酸甘油溶液）、辅料（无水乙醇）、抛射剂（四氟乙烷）、耐压容器（气雾剂铝瓶）和定量阀门系统（内垫圈、阀杆、弹簧、阀室、吸管）组成，使用时借助抛射剂的压力使内容物成雾状喷出，喷于口腔、舌下黏膜发挥治疗作用。本研究中通过提取研究和迁移研究[3-4]建立了测定定量阀门中5种常见抗氧剂[抗氧剂168、抗氧剂330、抗氧剂1010、抗氧剂1076、抗氧剂2,6-二叔丁基对甲酚（BHT）]含量的高效液相色谱法，并考察抗氧剂在硝酸甘油气雾剂定量阀门组件材料（内垫圈、阀杆、阀室和吸管）中的迁移情况。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

LC-20A型高效液相色谱仪（日本Shimadzu公司）；Sartorius AG BP211D型电子天平（德国Sartorius公司，精度为十万分之一）；JZ-401A型精密烘箱（苏州德瑞普烘箱制造有限公司）；LHH-150GSP型药品综合稳定性试验箱（上海一恒科学仪器有限公司）。

1.2 试药

抗氧剂168对照品（批号为MKBF0813V，纯度为98%），抗氧剂330对照品（批号为MKBF6188V，纯度为99%），抗氧剂1010对照品（批号为MKBF3728V，纯度为98%），抗氧剂1076对照品（批号为MKBF8963V，纯度为99%），抗氧剂BHT对照品（批号为20627，纯度为99%），均购自Sigma-Aldrich公司；硝酸甘油气雾剂（广东同德药业有限公司，批号分别为20200401，20200402，20200403）；定量阀门（上海华瑞气雾剂有限公司，批号为200204）；甲苯、甲醇均为分析纯，四氢呋喃、乙腈均为色谱纯；超纯水（Milli-Q超纯水系统制备）。

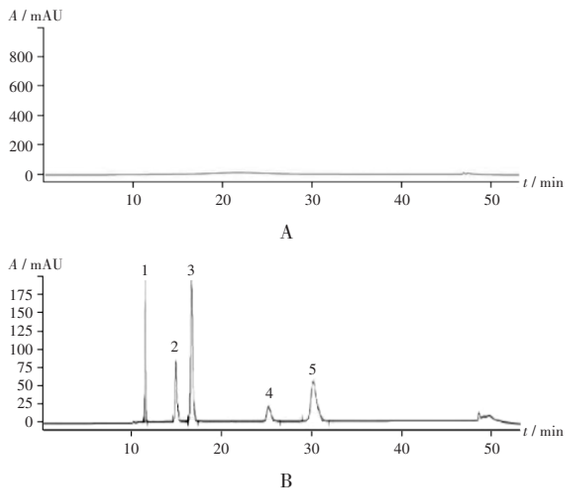
2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱：Inertsil®ODS-SP柱（150 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：水-四氢呋喃-乙腈（10∶30∶60，*V*/*V*/*V*）；流速：1.5 mL/min；柱温：30 ℃；检测波长：280 nm；进样量：20 μL。混合对照品溶液在此色谱条件的色谱图见图1。结果各抗氧剂的分离度均大于1.5，空白溶剂无干扰。

2.2 溶液制备

混合对照品溶液：取抗氧剂168、抗氧剂330、抗氧剂1010、抗氧剂1076、抗氧剂BHT对照品各25 mg，精密称定，置同一100 mL容量瓶中，加流动相溶解并定容，



1. 抗氧剂BHT 2. 抗氧剂1010 3. 抗氧剂330 4. 抗氧剂1076 5. 抗氧剂168

A. 空白溶剂 B. 混合对照品溶液

图1 系统适用性试验高效液相色谱图

1. Antioxidant BHT 2. Antioxidant 1010 3. Antioxidant 330 4. Antioxidant 1076 5. Antioxidant 168

A. Blank solvent B. Mixed reference solution

Fig. 1 HPLC chromatograms of the system suitability test

摇匀，作为混合对照品贮备液；精密移取混合对照品贮备液2 mL，置100 mL容量瓶中，用流动相定容，作为混合对照品溶液。

供试品溶液：取吸管样品2.0 g，精密称定，置烧瓶中，加甲苯80 mL，持续搅拌，加热回流1.5 h，冷却至60 ℃，边搅拌边加入甲醇120 mL，烧结玻璃过滤器，滤过，用甲苯-甲醇（4∶6，*V*/*V*）25 mL冲洗烧瓶和滤渣，合并洗液与滤液，并用甲苯-甲醇（4∶6，*V*/*V*）稀释至250 mL，摇匀，作为吸管供试品溶液。同法制备阀杆供试品溶液、阀室供试品溶液和内垫圈供试品溶液。

空白溶剂：以流动相作为空白溶剂。

2.3 方法学考察[5-12]

线性关系考察：精密量取2.2项下混合对照品贮备液适量，用流动相稀释成含抗氧剂168、抗氧剂330、抗氧剂1010、抗氧剂1076、抗氧剂BHT质量浓度分别为0.2，5，10，25，100，250 μg/mL的系列混合对照品溶液，按2.1项下色谱条件进样测定，以各抗氧剂的质量浓度（*X*，μg/mL）为横坐标、峰面积（*Y*）为纵坐标进行线性回归。结果见表1。

检测限和定量限确定：精密量取2.2项下混合对照品贮备液适量，用流动相逐级稀释，按2.1项下色谱条件进样测定，以信噪比（*S*/*N*）为3∶1时的质量浓度为检测限，以*S*/*N*为10∶1时的质量浓度为定量限。结果抗氧剂168、抗氧剂330、抗氧剂1010、抗氧剂1076、抗氧剂BHT的检测限分别为1.58，0.27，0.38，0.94，0.24 μg/mL，

表 1 线性关系考察结果（$n = 6$）

Tab. 1 Results of the linear relation test ($n = 6$)

抗氧剂	回归方程	r	线性范围（μg / mL）
抗氧剂 168	$Y = 203\,392\,X + 1\,701.8$	0.999 8	0.2 ~ 250
抗氧剂 330	$Y = 400\,127\,X + 47.2$	0.999 9	0.2 ~ 250
抗氧剂 1010	$Y = 286\,973\,X + 432.53$	0.999 8	0.2 ~ 250
抗氧剂 1076	$Y = 160\,500\,X + 1\,416.2$	1.000 0	0.2 ~ 250
抗氧剂 BHT	$Y = 54\,207\,X - 271.79$	1.000 0	0.2 ~ 250

定量限分别为 3.84，0.91，1.44，3.02，0.60 μg / mL。

精密度试验：取线性关系考察项下质量浓度为 10 μg / mL 的混合对照品溶液，按 2.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次，记录峰面积和保留时间。结果抗氧剂 168、抗氧剂 330、抗氧剂 1010、抗氧剂 1076、抗氧剂 BHT 峰面积的 *RSD* 分别为 0.28%，0.11%，0.38%，0.20%，0.15%（$n = 6$），保留时间的 *RSD* 分别为 0.23%，0.25%，0.14%，0.34%，0.30%（$n = 6$），表明仪器精密度良好。

日间精密度试验：供试品溶液与混合对照品溶液每天重新配制，由同一检验人员连续 3 d 在同一仪器测试加标供试品溶液，按 2.1 项下色谱条件进样测定，记录峰面积，并计算含量。结果抗氧剂 168、抗氧剂 330、抗氧剂 1010、抗氧剂 1076、抗氧剂 BHT 含量的 *RSD* 分别为 1.65%，0.41%，1.07%，0.95%，1.41%（$n = 3$），表明日间精密度良好。

重复性试验：取 2.2 项下混合对照品贮备液 5 mL，按 2.2 项下方法制备供试品溶液，平行 6 份，按 2.1 项下色谱条件进样测定，记录峰面积，并计算含量。结果抗氧剂 168、抗氧剂 330、抗氧剂 1010、抗氧剂 1076、抗氧剂 BHT 含量的 *RSD* 分别为 0.86%，0.86%，1.13%，0.87%，1.02%（$n = 6$），表明方法重复性良好。

稳定性试验：取线性关系考察项下质量浓度为 10 μg / mL 的混合对照品溶液，分别于 0，4，8，12，16，24 h 时按 2.1 项下色谱条件进样测定，记录峰面积。结果抗氧剂 168、抗氧剂 330、抗氧剂 1010、抗氧剂 1076、抗氧剂 BHT 峰面积的 *RSD* 分别为 0.76%，0.82%，1.18%，1.32%，0.98%（$n = 6$），表明混合对照品溶液放置 24 h 内稳定性良好。

回收试验：分别量取 2.2 项下混合对照品贮备液 4，5，6 mL，置 250 mL 容量瓶中，各 3 份，按 2.2 项下方法制备供试品溶液，按 2.1 项下色谱条件进样测定，记录峰面积，并计算回收率。结果抗氧剂 168、抗氧剂 330、抗氧剂 1010、抗氧剂 1076、抗氧剂 BHT 的回收率分别为 100.67%，99.97%，99.93%，99.60%，99.63%，*RSD* 分别为 0.47%，0.21%，0.93%，0.44%，0.60%（$n = 9$），表明方法准确度良好。

耐用性试验：更换不同色谱柱［Syncronis C_{18} 柱（150 mm × 4.6 mm，5 μm），CAPCELL PAK C_{18} 柱（150 mm × 4.6 mm，5 μm），Inertsil® ODS - SP 柱（150 mm × 4.6 mm，5 μm）］，不同型号高效液相色谱仪（日本 Shimadzu LC - 20A 型、Agilent 1120 型高效液相色谱仪），柱温 ± 5 ℃，检测波长 ± 5 nm，流速 ± 0.2 mL / min，比较对 5 种抗氧剂测定结果的影响，结果各抗氧剂的分离情况及峰面积均无明显差异，表明方法耐用性良好。

2.4 样品含量测定

精密吸取 2.2 项下供试品溶液，按 2.1 项下色谱条件进样测定。结果定量阀门组件材料中均未检出抗氧剂 BHT，抗氧剂 168、抗氧剂 330、抗氧剂 1010、抗氧剂 1076 的检出量均符合要求。详见表 2 和图 2。

表 2 定量阀门组件材料中 5 种抗氧剂含量测定结果（μg / g）

Tab. 2 Results of content determination of five antioxidants in the quantitative valve component materials (μg / g)

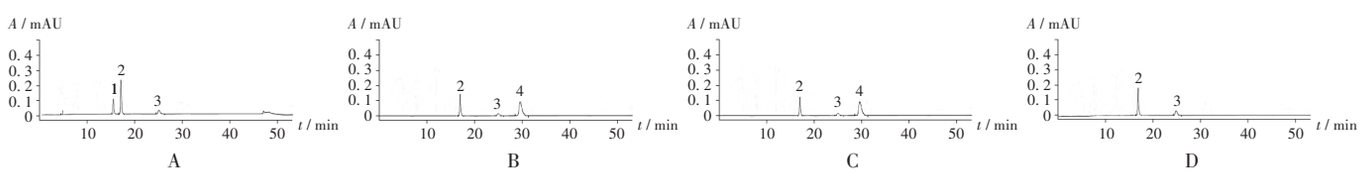
组件材料	抗氧剂 168	抗氧剂 330	抗氧剂 1010	抗氧剂 1076	抗氧剂 BHT
内垫圈	-	< 0.27	< 0.38	< 0.94	-
阀杆	< 1.58	< 0.27	-	< 0.94	-
阀室	< 1.58	< 0.27	-	< 0.94	-
吸管	-	< 0.27	-	< 0.94	-

注：- 为未检出。

Note: - refers to not detected.

2.5 抗氧剂迁移量测定

为在较短时间内获得抗氧剂在硝酸甘油气雾剂中的迁移情况，探讨定量阀门的稳定性。本研究中根据《原料药物与制剂稳定性试验指导原则》的要求[13]，加



1. 抗氧剂 1010 2. 抗氧剂 330 3. 抗氧剂 1076 4. 抗氧剂 168

A. 内垫圈供试品溶液 B. 阀杆供试品溶液 C. 阀室供试品溶液 D. 吸管供试品溶液

图 2 供试品溶液高效液相色谱图

1. Antioxidant 1010 2. Antioxidant 330 3. Antioxidant 1076 4. Antioxidant 168

A. Test solution of internal gasket B. Test solution of valve stem C. Test solution of valve chamber D. Test solution of pipette

Fig. 2 HPLC chromatograms of the test solution

速试验选择0个月、3个月、6个月。取3批（批号分别为20200401，20200402，20200403）样品，除去罩帽，精密称定，在阀门上钻一小孔，插入连有干燥橡皮管的注射针头（勿与液面接触），橡皮管的另一端通入盛有50 mL甲苯－甲醇（4∶6，*V*/*V*）的250 mL容量瓶中，放尽气体，除去阀门，将内容物移入上述容量瓶中，阀门及容器用甲苯－甲醇（4∶6，*V*/*V*）洗涤数次，合并洗液，置上述250 mL容量瓶中，用甲苯－甲醇（4∶6，*V*/*V*）定容，摇匀，作为供试品溶液。

《欧洲药典（10.0版）》规定，抗氧剂添加不得多于3种，抗氧剂单个含量及总含量均不得超过0.3%[4]。按成人体质量50 kg计算，抗氧剂168、抗氧剂330、抗氧剂1010、抗氧剂1076、抗氧剂BHT每日允许接触量（PDE）分别为10，10，50，2，1.5 mg/d，评价阈值（AET）按公式AET=PDE/每日最大用药剂量计算，其中硝酸甘油气雾剂每日最大用药剂量以3 mL计，则上述抗氧剂的AET分别为3.3，3.3，16.7，0.67，0.50 mg/mL。加速试验0个月、3个月、6个月时，3批（批号分别为20200401，20200402，20200403）样品中抗氧剂168、抗氧剂330、抗氧剂1010、抗氧剂1076、抗氧剂BHT的迁移量分别小于1.58，0.27，0.38，0.94，0.20 μg/g，均低于其AET，未产生安全风险。

3 讨论

塑料包装材料尤其是聚乙烯、聚丙烯材料广泛应用于药品包装容器产品中。在成型、储存和使用过程中，材料受到热、光、电场、射线、金属离子、化学介质等作用而老化，从而导致抗冲击强度、抗张强度、伸长率等物理性能大幅下降，故通常在生产过程中会加入抗氧剂，以抑制或延缓其老化降解过程[14－15]。常用抗氧剂有抗氧剂168、抗氧剂245、抗氧剂264、抗氧剂330、抗氧剂1010、抗氧剂1076、抗氧剂1178、抗氧剂3114、抗氧剂BHT等。前期预试验中，曾检测了8家公司的25批定量阀门供试品，结果至少检出抗氧剂168、抗氧剂330、抗氧剂1010、抗氧剂1076、抗氧剂BHT中的2～4种，其他常用抗氧剂未检出，故本研究中选择上述5种常用抗氧剂。

定量阀门部件由内垫圈（氯化丁基橡胶）、阀杆（聚乙烯）、吸管（聚乙烯）、阀室（聚甲醛）和弹簧组成。本研究中只针对直接接触药液并含有抗氧剂的包装组件材料即内垫圈、阀杆、吸管和阀室。文献[16]和试验结果表明，抗氧剂168结构为亚磷酸盐，易被氧化成磷酸盐。样品处理过程中，不可避免地会出现抗氧剂168被氧化的情况，故本研究中以亚磷酸盐和磷酸盐峰面积之和计算抗氧剂168的含量。

前期试验中，曾考察以水－四氢呋喃－乙腈（10∶30∶60，*V*/*V*/*V*），乙腈－水（梯度洗脱），水－甲醇－乙腈（梯度洗脱）为流动相，由于检测抗氧剂种类较多且性质多样，以水－四氢呋喃－乙腈（10∶30∶60，*V*/*V*/*V*）为流动相时基线相对平稳，且无干扰，各待测成分的分离度均相对较好，且保留时间适中，故流动相选择水－四氢呋喃－乙腈（10∶30∶60，*V*/*V*/*V*）。

参考文献

[1] YBB00142002，药品包装材料与药物相容性试验指导原则[S].
[2] 全国人民代表大会．中华人民共和国药品管理法[A/OL].（2019－08－26）[2023－03－15]. https：//www.gov.cn/xinwen/2019－08/26/content_5424780.htm.
[3] 国家食品药品监督管理局．国家食品药品监督管理局关于印发《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）》的通知[A/OL].（2019－09－07）[2023－03－15]. https：//www.nmpa.goc.cn/xxgk/fgwj/gzwj/gzwjyp/20120907093801278.html.
[4] European Pharmacopoeia Commission. EP10.0[M]. Strasbourg：European Directorate Health Care，2019：423－426.
[5] 李　莎，韩海燕，吴红洋，等．高效液相色谱法测定药品胶塞中硫磺和7种抗氧剂含量及迁移[J]．中国药业，2022，31(22)：71－74.
[6] 韩海燕，蒲道俊，吴红洋，等．高效液相色谱法同时测定输液器中7种抗氧剂的迁移量[J]．中国药业，2021，30(23)：58－61.
[7] 喻亮宇，邓勇亮，黄海萍．聚丙烯输液瓶中抗氧剂含量及迁移量的测定研究[J]．海峡药学，2020，32(1)：68－71.
[8] 李　樾，孙会敏，张　烜．塑料输液包装材料与容器中抗氧剂含量测定方法的建立及其在注射液中的迁移研究[J]．中国药学杂志，2016，51(19)：1699－1705.
[9] 蔡心怡，王悦雯，冯　靖，等．药品包装材料用塑料粒料中8个常用抗氧剂的含量测定[J]．药物分析杂志，2020，40(3)：523－528.
[10] 赵　锐，王　丽，张　娟，等．注射用阿莫西林钠克拉维酸钾卤化丁基胶塞中10种抗氧剂的提取和迁移研究[J]．中国药学杂志，2023，58(4)：356－364.
[11] 吴红洋，李　莎，张　璞，等．药用胶塞中抗氧剂2，6－二叔丁基－4－甲基苯酚含量测定及迁移量研究[J]．中国药业，2022，31(1)：63－66.
[12] 陈　芳．三层共挤输液用袋中苯乙烯单体残留量及其在0.9%氯化钠注射液、5%葡萄糖注射液中的迁移量的测定研究[J]．海峡药学，2020，32(12)：87－90.
[13] 国家药典委员会．中华人民共和国药典（四部）[M]．北京：中国医药科技出版社，2020：457－460.
[14] 谢兰桂，汤　龙，孙会敏，等．再生塑料及其检测技术研究进展[J]．药物分析杂志，2010，30(10)：1985－1989.
[15] 朱碧君，胡红刚，李婷婷，等．HPLC法测定聚丙烯输液瓶中抗氧剂1010、抗氧剂1076、抗氧剂168、抗氧剂330的含量[J]．药物分析杂志，2012，32(3)：416－418.
[16] 肖海文，黄洁瑕，雷春华，等．硫酸沙丁胺醇吸入气雾剂与药用气雾剂铝瓶相容性研究[J]．中国药业，2021，30(9)：35－38.

（收稿日期：2023－04－27；二次修回日期：2024－01－11）