离子色谱法同时测定奥拉西坦注射液中微量 EDTA及磷酸根离子

吕蓓蓓[1], 李涛[2], 田静[1], 周英兰[1], 杨清敏[1], 王晶翼[1]
(1. 齐鲁制药有限公司研究院, 济南 250100; 2. 山东省药品检验所, 济南 250101)

摘要 目的: 建立同时测定微量 EDTA及磷酸根离子的抑制型离子色谱法。方法: 采用 IonPac AS 11 HC(250 mm × 4 mm)色谱柱和 CSRSULTRAⅡ 4 mm自身循环抑制器, 以氢氧化钾淋洗液梯度洗脱, 流速为 1.0 mL·min^{-1}, 抑制电流为 59 mA, 电导检测器温度 35℃。结果: EDTA和磷酸根离子线性范围分别为 0.15~0.51 μg·mL^{-1}和 0.75~3.51 μg·mL^{-1}, 回收率为 97%~101%。结论: 本方法准确、简便、快速, 可用于注射液中微量 EDTA及磷酸根离子的快速测定。

关键词: 离子色谱; EDTA; 磷酸根; 奥拉西坦注射液
中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)05-0987-03

IC determination of trace EDTA and phosphate in oxiracetam injection

LÜ Bei-bei[1], LI Tao[2], TIAN Jing[1], ZHOU Ying-lan[1], YANG Qing-min[1], WANG Jing-yi[1]
(1. Research and Development Division, Qilu Pharmaceutical Co. Ltd, Jinan 250100, China;
2. Shandong Institute for Drug Control, Jinan 250101, China)

Abstract **Objective:** To develop a suppressed conductivity ion chromatography method for the determination of trace EDTA and phosphate in oxiracetam injection. **Methods:** Chromatographic separation was achieved on an IonPac AS 11 HC(250 mm × 4 mm) column with KOH gradient elution. The flow rate was 1.0 mL·min^{-1}. The suppressor(ASRS ULTRA Ⅱ 4 mm) was operated at an applied current of 59 mA in the auto suppression recycle mode. The conductivity detector temperature was maintained at 35 ℃. **Results:** The linear ranges of EDTA and phosphate were 0.15-0.51 μg·mL^{-1} and 0.75-3.51 μg·mL^{-1}, respectively. The recoveries of both the anion ions were between 97% - 101%. **Conclusion:** The method is proved to be rapid, accurate, and convenient, and provides a reliable way for determination the trace EDTA and phosphate in injection products.

Key words: ion chromatography(IC); EDTA; phosphate; oxiracetam injection

乙二胺四乙酸(EDTA, 常以二钠盐或钠钙盐形式存在)及磷酸二氢钠是医药工业中常用的辅料。其中 EDTA能够与金属离子形成稳定的水溶性络合物, 从而降低药物与金属离子间的氧化反应, 提高药物的稳定性, 常用剂量为 0.01% ~ 0.05%。磷酸二氢钠则主要用于药物的酸碱度调节。

目前, 文献报道的 EDTA含量测定方法包括滴定法[1]、极谱法[2]、气相色谱法[3]、液相色谱法[4]等。虽然气相色谱及液相色谱法的应用大大提高了 EDTA含量测定的准确性, 但由于 EDTA本身难挥发性及较弱的紫外吸收等性质, 使上述方法的可操作性降低。磷酸根含量测定方法则主要有钒磷钼黄分光光度法[5]和容量法[6], 灵敏度均较低。尤其是样品中含有其他酸性物质时, 采用容量法测定则会出现较大偏差。

离子色谱法已广泛应用于医药食品行业中, 对于离子型化合物的测定能够达到快速、准确、灵敏。采用该法测定磷酸根离子已经比较成熟, 而 EDTA离子的测定则主要有以下几种方法: (1)采用碳酸钠-碳酸氢钠淋洗液系统进行洗脱[7]; (2)采用适用于多价离子化合物分离的离子色谱柱, 如 IonPac AS7阴离子交换柱进行分析。本文目的是选用背景电导更低的氢氧化钾淋洗液和常规阴离子分析柱 AS 11 HC进行上述 2种阴离子的分析, 以建立一种

第一作者 Tel: (0531) 83129505, E-mail: beibei.lu@qilu-pharma.com

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

更为简便易行、更高灵敏度的含量分析方法。

1 仪器与试药

美国戴安 ICS-1500型离子色谱仪,配有 EGC Ⅱ KOH 自动淋洗液发生器, AS 40自动进样器。Mettler Millipore simplicity超纯水机。

乙二胺四乙酸钠钙盐(基准试剂)购于天津科密欧化学试剂有限公司。磷酸二氢钠一水合物(优级纯)购于默克公司。试验用水由 Milli Q 超纯水机制备(电阻率 18.2 MΩ·cm^{-1})。奥拉西坦对照品为自制,纯度 99.64%;样品分别为本实验室自制注射液及市售奥拉西坦注射液(广东世信,批号 091017)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 保护柱: IonPac AS 11 HC guard (15 mm×4 mm);色谱柱: IonPac AS 11 HC (250 mm×4 mm)。氢氧化钾淋洗液随时间变化条件为: 0~5 min, 2 mmol·L^{-1}; 5~5.5 min, 2~26 mmol·L^{-1}; 5.5~20 min, 26 mmol·L^{-1}; 20~25 min, 2 mmol·L^{-1}。流速 1.0 mL·min^{-1};氮气压力 34 kPa,柱温 30 ℃;抑制器为 ASRS ULTRA Ⅱ 4 mm 自身循环抑制器,抑制电流 59 mA;电导检测器温度 35 ℃;进样量 25 μL。

2.2 储备液及混合对照品溶液的配制

2.2.1 对照品储备液 分别精密称定乙二胺四乙酸钠钙盐 62.6 mg和磷酸二氢钠一水合物 314.0 mg,置 50 mL量瓶中,用超纯水溶解,定容至刻度,摇匀。另精密移取上述溶液各 1.0 mL于相应 50 mL量瓶中,用超纯水定容至刻度,得到浓度分别为 25.04 μg·mL^{-1}和 125.60 μg·mL^{-1}的 EDTA 及磷酸根离子储备液。

2.2.2 奥拉西坦储备液 称取奥拉西坦 0.9950 g,置 25 mL量瓶中,加超纯水溶解并定容至刻度,即得。

2.2.3 混合对照品溶液 分别移取 EDTA 和磷酸根离子对照品储备液各 0.8 mL,置同一 50 mL量瓶中,用超纯水溶解并定容至刻度,摇匀,得到二者的混合对照品溶液。

2.3 方法学验证

2.3.1 专属性实验 取超纯水作为空白样品按上述色谱条件进行分析;另取混合对照溶液,在相同色谱条件下分析。结果显示空白样品在 EDTA 和磷酸根离子相应保留时间处无色谱峰,说明空白背景对测定结果无干扰,见图 1。

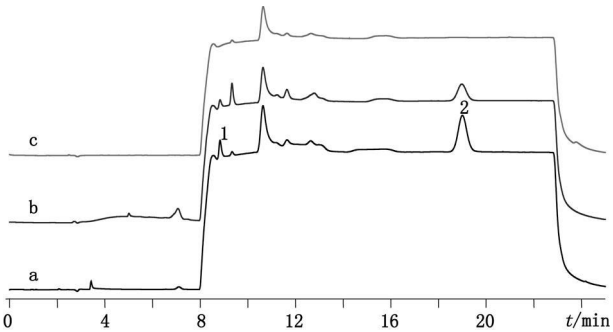

图 1 对照品(a)、样品(b)和超纯水(c)色谱图

Fig 1 IC chromatograms of reference substances (a), sample (b), and ultrapure water (c)

1. EDTA 2. PO_4^{3-}

2.3.2 线性关系考察及定量限 分别精密移取各对照品储备液 0.3, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 mL于 50 mL量瓶中,用超纯水稀释至刻度,摇匀。用 0.22 μm 滤膜过滤,分别进样 25 μL,记录色谱图。分别以 EDTA 和磷酸根离子的峰面积对浓度(X, μg·mL^{-1})进行线性回归,得 EDTA 和磷酸根离子的线性方程分别为:

$Y = 0.039X - 0.0013$ $r = 0.9997$

$Y = 0.515X - 0.0015$ $r = 0.9998$

结果表明,EDTA 离子在 0.15~0.51 μg·mL^{-1}范围内,磷酸根离子在 0.75~3.51 μg·mL^{-1}范围内具有良好的线性关系。取上述线性溶液逐级稀释,得 EDTA 和磷酸根离子的定量限(以信噪比为 10计)分别为 0.04 μg·mL^{-1}和 0.10 μg·mL^{-1}。

2.3.3 精密度试验 取混合对照品溶液,用 0.22 μm 滤膜过滤,连续进样 6针,计算 EDTA 和磷酸根离子峰面积的 RSD分别为 1.8%和 0.8%。

2.3.4 回收率试验 精密移取磷酸根离子对照品储备液 0.4, 0.5, 0.6 mL于 50 mL量瓶中,分别加入奥拉西坦储备液各 1.0 mL、EDTA 离子对照品储备液各 0.50 mL,用超纯水稀释至刻度,摇匀,过滤,得到含磷酸离子 80%, 100%, 120%的 3个不同浓度的回收率供试溶液,每个浓度平行配制 3份。另精密移取 EDTA 离子对照品储备液 0.4, 0.5, 0.6 mL于 50 mL量瓶中,分别加入奥拉西坦储备液 1.0 mL和磷酸根离子对照品储备液 0.50 mL,用超纯水稀释至刻度,摇匀,过滤,得到含 EDTA 离子 80%, 100%, 120%的 3个不同浓度的回收率供试溶液,每个浓度平行配制 3份。按上述色谱条件进样测定,计算回收率及 RSD,结果见表 1。

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1 EDTA及磷酸根离子回收率结果 ($n = 3$)

Tab 1 The recoveries of EDTA and phosphate

成分 (component)	水平 (level)	加入量(added) /μg·mL⁻¹	平均回收率 (average recovery) /%	RSD /%
EDTA	80%	0.2003	98.44	1.0
	100%	0.2504	97.50	0.6
	120%	0.3005	98.62	1.5
PO_4^{3-}	80%	1.0048	98.32	0.8
	100%	1.2560	100.2	2.0
	120%	1.5072	99.37	2.0

2.3.5 稳定性试验 取混合对照品溶液,过滤后分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12 h进样,计算 EDTA和磷酸根离子峰面积的 RSD分别为 2.7%和 1.2%,说明混合对照品溶液在 12 h内稳定。另取本实验室自制注射液直接进样,分别考察 0, 2, 4, 6, 8, 12 h的稳定性,结果 EDTA和磷酸根离子峰面积的 RSD分别为 2.9%和 1.0%,表明样品在 12 h内稳定。

2.3.6 耐用性试验 改变流速至 0.8 mL·min⁻¹, EDTA及磷酸根离子的保留时间分别为 10.32 min和 22.80 min,且分离度良好。改变流速至 1.2 mL·min⁻¹, EDTA保留时间在 7.26 min,与相邻色谱峰难以实现基线分离;磷酸根离子保留时间在 15.61 min,且分离度良好。另选用 IonPac AS 11 (250 mm×4 mm)色谱柱及 IonPac AS 11 guard(15 mm×4 mm)保护柱进行分析,其色谱行为与使用 IonPac AS 11 HC(250 mm×4 mm)色谱柱基本一致,但由于其色谱柱容量低于 AS 11 HC色谱柱,在分析样品时易出现色谱柱过载现象,故采用高容量色谱柱较适合该样品分析。

2.4 样品测定 取本实验室自制奥拉西坦注射液适量,直接注入离子色谱仪,计算 EDTA及磷酸根离子含量分别为 0.31 μg·mL⁻¹和 1.47 μg·mL⁻¹;另取广东世信奥拉西坦注射液适量,直接注入离子色谱仪,结果并未检出 EDTA,磷酸根离子含量为 1.18 μg·mL⁻¹。

3 讨论

淋洗液的选择:采用碳酸钠-碳酸氢钠系统进行分析时,背景电导较高,且 EDTA峰形较差。加入有机改性剂可改善峰形,但须采用外接水模式进行测试,较为烦琐。故本实验选用背景电导较低的氢氧化钾淋洗液,以提高样品的检出限及可行性。

梯度条件优化:当采用 15 mmol·L⁻¹氢氧化钾淋洗液进行等度洗脱时, EDTA离子在 5 min内出峰,且与水中杂质峰相互干扰,而磷酸根离子则有较好的保留。故本实验选择梯度方式进行二者的分离。当氢氧化钾初始浓度在 5~10 mmol·L⁻¹时, EDTA与样品中其他色谱峰无法实现基线分离。经色谱条件优化,将初始浓度降低至 1~2 mmol·L⁻¹,维持 5 min时, EDTA能够与样品中其他色谱峰实现较好的分离。氢氧化钾淋洗液终止浓度在 20~28 mmol·L⁻¹时,磷酸根离子保留时间在 17~22 min,且分离度良好,但低浓度会使磷酸根峰形略微展宽,故最终选择 26 mmol·L⁻¹作为终止浓度。

综上所述,该法灵敏度高,可同时测定药品中微量 EDTA及磷酸根离子含量,能够提高样品检出限及工作效率。

参考文献

1 Clinckemaille G G. Determination of nitrilotriacetic acid and ethylenediaminetetraacetic acid in granular detergent formulation. *Anal Chim Acta*, 1968, 43: 520

2 Nomura T, Nakagawa G. Tensammetric determination of microgram amounts of EDTA using a catalytic oxidation of 2-amino-4-methylphenol with vanadium. *J Electroanal Chem*, 1980, 111(2): 319

3 Nishikawa Y, Okumura T. Determination of nitrilotriacetic acid and ethylenediaminetetraacetic acid in environmental samples as their methyl ester derivatives by gas chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1995, 690(1): 109

4 Pistos C, Parissi-Poulou M. Determination of ethylenediamine tetraacetic acid in injection forms by ion-pair chromatography. *J Pharm Biomed Anal*, 2002, 28(6): 1073

5 LI Xing-li(李兴利). Fast determination of potassium dihydrogenphosphate content in potassium dihydrogenphosphate by spectrophotometry(钒磷钼黄分光光度法快速测定磷酸二氢钾的纯度). *Chin Anal Meter*(化学分析计量), 2007, 16(1): 46

6 ChP(中国药典). 2000. Vol II (二部): 867

7 ZHU Yan(朱岩), CHEN Zhi-qiang(陈志强), YU Jian-guo(俞建国), *et al*. Determination of EDTA and phosphate in detergent by ion chromatography(离子色谱法测定洗涤剂中乙二胺四乙酸、磷酸盐). *Chem World*(化学世界), 1998, 39(9): 495

(本文于 2010年 5月 24日收到)

© 1994-2012 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net