

离子色谱法测定达肝素钠中的亚硝酸根

韩春霞¹ 梁立娜¹ 范慧红²

(1. 戴安中国有限公司应用研究中心, 北京 100085; 2. 中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要 目的: 建立并优化一种简单、快速、高灵敏度、重现性好的离子色谱法测定达肝素钠中残留的亚硝酸根含量。方法: 达肝素钠制成 $40 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 加 9 倍体积乙醇沉淀, 离心后取上层清液过滤后直接进样。分离使用 IonPac AS19 分析柱和保护柱, 淋洗液为 $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠, 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。AMMS 300 膜抑制器, 化学抑制, 再生液为 $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸。进样量 $100 \mu\text{L}$, 柱温 30°C , 电导检测器检测。结果: 亚硝酸根检出限为 $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 在 $25 \sim 1000 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内, 相关系数 0.9997, 平行试验 RSD 小于 4%, 加标浓度为 $25 \sim 200 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 亚硝酸根, 方法回收率为 98.5% ~ 107.9%。结论: 本实验得到的方法灵敏度高, 回收率好, 重现性好, 利于延长色谱柱寿命。本方法可用于达肝素钠的质量控制, 也为其他多糖类化合物中阴离子测定提供参考。

关键词: 低分子肝素; 达肝素钠; 亚硝酸根; 离子色谱法

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2011)11-2171-03

Determination of nitrite in dalteparin sodium by ion chromatography

HAN Chun-xia¹, LIANG Li-na¹, FAN Hui-hong²

(1. Dionex China Limited Application Research Center, Beijing 100085, China; 2. National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Abstract Objective: A simple, rapid, reliable and high sensitive ion chromatographic method was established and improved for determination of nitrite in low-molecular-weight heparin. **Methods:** Ethanol was added in dalteparin sodium solution. The suspension was centrifuged and filtered. Filtrate was injected to IC. Separation was performed on Ion Pac AS19 column equipped with a guard column of the same material. The eluent was $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH. The column temperature was maintained at 30°C . Conductivity detector and AMMS 300 membrane suppressor was used and regenerant solution was $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2SO_4 . The flow rate and sample volume injected were $1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ and $100 \mu\text{L}$, respectively. **Results:** Detection limit of nitrite was $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. The calibration curve of nitrite was linear in the concentration range of $25 \sim 1000 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ and the coefficient was 0.9997. The RSD of parallel tests did not exceed 4%. The average recovery of the described method was 98.5% ~ 107.9% spiked with $25 \sim 200 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ nitrite. **Conclusions:** The new method could protect the separation column and obtain high reproducibility. Consequently, it was more suitable to determine nitrite content in dalteparin sodium.

Key words: low-molecular-weight heparin; dalteparin sodium; nitrite; ion chromatography

低分子肝素 (low-molecular-weight heparin, LMWH) 是近年发展起来的新一代肝素类抗血栓药物, 其抗血栓作用优于肝素, 而抗凝血作用低于肝素, 且具有皮下注射吸收良好、生物利用度高、体内半衰期长、出血倾向小等优点, 目前已广泛应用于临床。根据 LMWH 的来源、生产工艺、末端结构的不同, LMWH 分为许多不同的种类, 如达肝素钠、依诺

肝素、纳肝素钙、帕肝素钠、汀肝素钠等。达肝素钠 (Dalteparin Sodium) 是低分子肝素的一种, 由亚硝酸降解肝素得到, 重均分子量 $5600 \sim 6400$, 峰位分子量 6000 , 硫酸化程度为 $2.0 \sim 2.5$ / 双糖单位^[1]。

达肝素钠的生产过程中使用了亚硝酸。亚硝酸根是一种毒性物质, 在人体特定的环境条件下, 可以合成一种很强的化学致癌物——N-亚硝基化合

第一作者 Tel: (010) 62849182; E-mail: hehxia@126.com

物,能够诱发几乎所有内脏器官的肿瘤。因此,检测达肝素钠中残留的亚硝酸根含量,对保证患者用药安全具有重要意义。目前欧洲药典使用离子色谱-安培检测法测定达肝素钠中亚硝酸根含量,国内低分子肝素标准中使用化学方法对亚硝酸根进行限度检查,无含量测定^[2,3]。欧洲药典的方法未对样品进行前处理,达肝素钠保留在色谱柱上,缩短柱寿命,且重现性较差。本文建立了离子色谱法分离、电导检测器检测达肝素钠中的亚硝酸根含量的方法,灵敏度高、线性、回收率、重现性好,可以延长色谱柱寿命。

1 仪器与试剂

仪器: Dionex ICS3000 离子色谱仪(包括等度泵、EG 淋洗液在线发生器、检测器/色谱模块、电导检测器、AMMS 300 膜抑制器、AS 自动进样器、VWD 紫外检测器、Chromelon 软件)、Sartorius BS210S 电子天平、Anke TGL-16GB 高速离心机、Milli-Q 超纯水机。

试剂:亚硝酸根标准溶液(国家标准物质中心),达肝素钠样品(中国药品生物制品检定所提供),水为 18.2 MΩ·cm 去离子水,其他试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: IonPac AS19 分析柱 4 mm × 250 mm, IonPac AG19 保护柱 4 mm × 50 mm; 淋洗液: 20 mmol·L⁻¹ 氢氧化钠; 再生液: 25 mmol·L⁻¹ 硫酸; 柱温: 30 °C; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 进样量: 100 μL。亚硝酸根保留时间约为 8.4 min。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液 精密量取亚硝酸根标准溶液,加水稀释成含亚硝酸根 25、50、100、500、1000 μg·L⁻¹ 的溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密称取达肝素钠 0.4 g,加水溶解并稀释至 10 mL。精密量取 1 mL 至离心管中,加无水乙醇 9 mL,摇匀,10000 r·min⁻¹ 离心 20 min。取上清液,过 0.22 μm 滤膜,续滤液进样。

2.3 方法学考察

2.3.1 空白及基线噪音 取空白进样,图谱中未见色谱峰出现。基线噪音 0.001 μS。

2.3.2 检测限及定量限 取 20 μg·L⁻¹ 的亚硝酸根标准溶液进样,测定其峰高 0.060 μS,按照 3 倍信噪比计算其检测限为 1 μg·L⁻¹,按照 10 倍信噪比计算其定量限为 3.3 μg·L⁻¹。

2.3.3 专属性实验 取 6 种阴离子混合溶液进样,6 种阴离子分离度均大于 2,色谱图见图 1。

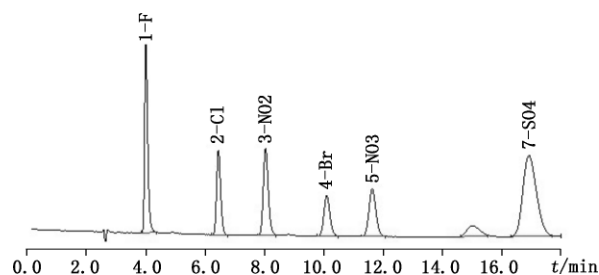


图 1 6 种阴离子混标分离色谱图

Fig 1 Chromatogram of 6 anions standard solution

2.3.4 精密度试验 取 25 μg·L⁻¹、500 μg·L⁻¹ 标准溶液分别进样 6 次,保留时间 RSD 分别为 0.1%、0.1%; 峰面积 RSD 分别为 0.5%、0.4%。

2.3.5 线性范围 取“2.2.1”项下 25 ~ 1000 μg·L⁻¹ 亚硝酸根标准溶液进样,以峰面积 A 对浓度 C 进行回归计算,回归方程为:

$$A = 0.000787C + 0.001007 \quad r = 0.9997$$

2.3.6 回收率 精密称取样品适量,精密量取标准溶液适量加入,按“2.2.1”项下方法处理样品,分别制成加标浓度为 25、50、100、100 μg·L⁻¹ 的溶液,回收率分别为 98.5% ~ 107.9% (n=3),见表 1。

表 1 回收率试验测定结果

Tab 1 Results of recovery test

样品溶液含量 (amount in sample solution) / μg·L ⁻¹	加标量 (spiked value) / μg·L ⁻¹	检出量 (found) / μg·L ⁻¹	回收率 (recovery) / %
160.4	25	187.4 ± 2.8	107.9
	50	210.8 ± 2.8	100.8
	100	259.0 ± 3.0	98.5
	200	361.6 ± 4.4	100.6

2.3.7 样品测定 取样品 3 批,按“2.2.1”项下方法处理后测定,测定结果分别为 40.1 mg·kg⁻¹、40.9 mg·kg⁻¹、42.2 mg·kg⁻¹ (n=3)。图 2 为样品色谱图。

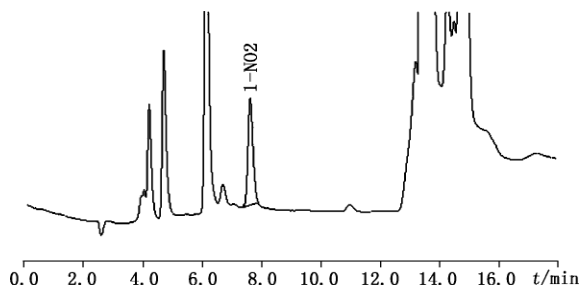


图 2 样品色谱图

Fig 2 Chromatogram of sample

3 讨论

3.1 色谱柱的选择 样品溶液含有的阴离子,除达肝素钠正常含有的硫酸根、残留的亚硝酸根外,还含有氯离子、磷酸根离子及其他未知阴离子。分别使用 IonPac AS11-HC, IonPac AS15, IonPac AS19, IonPac AS23 等色谱柱进行分离。在氯离子和亚硝酸根之间出现未知色谱峰,保留时间与亚硝酸根接近。降低淋洗液浓度,可增加未知峰与亚硝酸根的分度,但同时也造成分析时间延长。比较以上不同色谱柱的测定结果,在保证未知峰与亚硝酸根分离度的前提下, IonPac AS19 色谱柱的分析时间最短,亚硝酸根出峰时间可控制在 10 min 以内。IonPac AS19 色谱柱良好的分离效果与其高容量有关。

3.2 检测器的选择 测定亚硝酸根可用的检测器有三种:电导检测器、紫外检测器和安培检测器。欧洲药典中使用直流安培检测法检测亚硝酸根,在此条件下其他常见离子无响应值,选择性高,但峰面积重现性较差。电导检测器对于常见阴阳离子均有响应,灵敏度高,可检出 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 级的亚硝酸根;紫外检测器检测亚硝酸根时,为保证高的响应值,选择 220 nm 作为检测波长,而在此波长下,亚硝酸根检出限为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。通过比较,选择使用信噪比最高且重现性更好的电导检测器。

3.3 样品前处理方法的选择 欧洲药典方法未对样品进行前处理,样品溶解后直接进样。此方法简便易操作,但重现性差,会造成保留时间逐渐缩短。这是由于达肝素钠是多羟基的多糖类物质,碱性条件下离子化,在离子交换柱上有很强的保留,即使使用强的洗脱溶液如 $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化钠也很难将其洗脱。达肝素钠侵占色谱柱中的位点,造成色谱柱容量下降,离子保留时间缩短。为解决这一问题,比较了四种不同的前处理方法,去除待测液中的达肝素

钠后进样。

去除达肝素钠的方法主要有乙醇沉淀、阳离子表面活性剂沉淀、超滤、透析等。阳离子表面活性剂的引入,会降低色谱柱的柱效;超滤膜可能含有亚硝酸根残留,影响测定结果;透析需要的时间较长。与以上三种方法相比,醇沉操作简单、快捷,重现性好,且不易引入杂质。

3.4 抑制模式的选择 使用电导检测器时,淋洗液有很高的检测信号。抑制器可降低淋洗液的背景电导,增加被测离子的电导值,改善信噪比。常用的抑制模式有化学抑制、电抑制等。测定阴离子时,化学抑制使用酸作为再生液;电抑制使用外接水或电导池后流出的废液作为再生液。本方法的待测溶液中含有高浓度的乙醇,在电抑制模式下,乙醇有响应且会干扰亚硝酸根的测定,而化学抑制模式下乙醇无响应值。因此,本法采用 $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸作为再生液,选用膜抑制器化学抑制。

综上所述,本文建立的亚硝酸根的测定方法,不仅操作简单,灵敏度高,更具有重现性高,更好的保护色谱柱等优点。本方法不仅可用于低分子肝素的质量控制,其前处理方法和检测方法也适用于其他多糖类药物中的阴离子测定。

参考文献

- 1 LI Jing(李京), FAN Hui-hong(范慧红), XU Kang-sen(徐康森). Study on the current status and the quality standard of low-molecular-weight heparin(低分子肝素药用现状及质量标准概况). *Chin J Biochem Pharm* (中国生化药物杂志) 2004 25(1): 53
- 2 Drug Specifications Promulgated by State Food and Drug Administration, P R China(国家食品药品监督管理局标准). WS1-(X-149)-2005Z
- 3 EP7.0(欧洲药典第7版)

(本文于 2011 年 3 月 5 日收到)

欢迎投稿

欢迎订阅

欢迎刊登广告