

HPLC法测定注射用泮托拉唑钠中乙二胺四乙酸二钠的含量

刁岩忠, 韩继永, 陈祥峰*

(江苏奥赛康药业有限公司, 南京 211112)

摘要 目的: 建立注射用泮托拉唑钠中乙二胺四乙酸二钠的含量测定方法。方法: 色谱柱为 Shin-Pack VP-ODS(150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈(A) - 0.025 mol·L⁻¹ 硫酸铵(用稀硫酸调节 pH 至 3.0)(B), 梯度洗脱(0~5 min 100% B, 5~10 min 100% B → 50% B, 10~15 min 50% B, 15~20 min 50% B → 100% B), 柱温为 25℃, 检测波长为 254 nm, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 进样量为 20 μL。结果: 乙二胺四乙酸二钠进样量在 0.083~0.83 μg 范围内线性关系良好($r = 0.9999$), 平均回收率为 99.9% ($n = 9$)。结论: 本法简便、准确, 灵敏度高, 重复性好, 可用于注射用泮托拉唑钠中乙二胺四乙酸二钠的含量测定。

关键词: HPLC; 泮托拉唑钠; 乙二胺四乙酸二钠; 含量测定

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2011)02-0282-03

HPLC determination of disodium edetate in pantoprazole sodium for injection

DIAO Yan-zhong HAN Ji-yong CHEN Xiang-feng*

(Jiangsu Aosa Kang Pharmaceutical CO. LTD., Nanjing 211112, China)

Abstract Objective To determine the contents of disodium edetate in pantoprazole sodium for injection. **Methods** The chromatographic column was Shin-Pack VP-ODS(150 mm × 4.6 mm, 5 μm); the mobile phase consisted of acetonitrile(A) - 0.025 mol·L⁻¹ ammonium sulfate(adjusted to pH 3.0 with diluted sulfuric acid)(B), gradient elution(changed from 0-5 min with 100% B; 5-10 min with 100% B → 50% B; 10-15 min with 50% B; 15-20 min with 50% B → 100% B), the column temperature was 25℃; the detection wavelength was 254 nm and the flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the amount of injection was 20 μL. **Results** The calibration curve of disodium edetate was linear in the range of 0.083-0.83 μg($r = 0.9999$), the average recovery was 99.9% ($n = 9$). **Conclusions** The method is simple, accurate, sensible and reproducible, which can be used for the determination of disodium edetate in pantoprazole sodium for injection.

Key words HPLC; pantoprazole sodium; disodium edetate; assay

泮托拉唑(pantoprazole)为质子泵抑制剂, 通过与胃壁细胞的 H⁺ - K⁺ ATP 酶系统的 2 个位点共价结合而抑制胃酸产生的最后步骤。注射用泮托拉唑钠用于治疗十二指肠溃疡、胃溃疡、急性胃黏膜病变、复合性胃溃疡等引起的急性上消化道出血^[1]。但在临床使用时, 注射用泮托拉唑钠配制成输液后有时出现变色及混浊现象^[2]。国内外上市的许多质子泵抑制剂注射剂都在处方中添加了乙二胺四乙酸二钠, 如 PROTONIX IV、洛赛克和耐信等。我们在处方筛选研究中通过检测不溶性微粒发现, 当注射用泮托拉唑钠处方中乙二胺四乙酸二钠添加量在

每支 1 mg 以上时, 可以显著减少所得输液的不溶性微粒数量, 提高输液稳定性, 其原理为乙二胺四乙酸二钠可与金属离子形成稳定的水溶性螯合物, 能够防止金属离子对药物自身氧化的催化, 有利于提高药物在制备、存储和临床配制过程中的稳定性。乙二胺四乙酸二钠被列为 GRAS 安全物质, 收载于 FDA《非活性组分指南》, 英国也许可用于非注射和注射给药制剂。在药物剂型中乙二胺四乙酸二钠被用作螯合剂的一般浓度为 0.005% ~ 0.1% (W/V)^[3]。因此本公司在注射用泮托拉唑钠处方中添加一定量的乙二胺四乙酸二钠(1 mg·支⁻¹)。但

* 通讯作者 Tel: (025) 51198909 E-mail: ty870801@126.com

如果人体大量摄入乙二胺四乙酸二钠, 它会与血液及骨骼中的钙形成水溶性螯合物, 被排出体外, 引起低血钙症或骨钙流失。为确保用药安全, 参照相关文献[4~6]建立了注射用泮托拉唑钠中乙二胺四乙酸二钠的含量测定方法。

1 仪器与试剂

Aglient 1200 高效液相色谱仪, VWD 检测器, Chem station system 化学工作站 (美国安捷伦公司); BP211D 电子天平 (德国塞多利斯公司); PHS-3C 型精密 pH 计 (上海精密科学仪器有限公司)。

注射用泮托拉唑钠 (规格: $40 \text{ mg} \cdot \text{瓶}^{-1}$; 批号: 080801, 080802, 080803 由江苏奥赛康药业有限公司提供); 乙二胺四乙酸二钠对照品 (批号: 20080501; 纯度: 以 $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 计 99.5%; 由杭州利人药业有限公司提供); 乙腈为色谱纯 (美国 Tedia 公司), 硫酸铵、硫酸铜均为分析纯, 水为超纯水。

2 色谱条件

色谱柱: Shim-Pack VP-ODS ($150 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$); 流动相: 乙腈 (A) - $0.025 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸铵 (用稀硫酸调节 pH 至 3.0) (B), 梯度洗脱 ($0 \sim 5 \text{ min}$, 100% B; $5 \sim 10 \text{ min}$, 100% B $\rightarrow$ 50% B; $10 \sim 15 \text{ min}$, 50% B; $15 \sim 20 \text{ min}$, 50% B $\rightarrow$ 100% B); 柱温: 25°C ; 检测波长: 254 nm ; 流速: $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 进样量: $20 \mu\text{L}$ 。

3 溶液的制备

3.1 硫酸铜溶液 取硫酸铜适量, 精密称定, 加水溶解并稀释制成 $0.04 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硫酸铜溶液, 精密量取 1 mL , 置 50 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 以 $0.45 \mu\text{m}$ 的微孔滤膜滤过, 即得。

3.2 对照品溶液 取乙二胺四乙酸二钠适量, 精密称定, 加水使溶解并定量稀释成 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的乙二胺四乙酸二钠溶液, 精密量取 5 mL 置 50 mL 量瓶中, 加 $0.04 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸铜溶液 1.0 mL , 加水稀释至刻度, 摇匀, 以 $0.45 \mu\text{m}$ 的微孔滤膜滤过, 即得。

3.3 供试品溶液 取注射用泮托拉唑钠适量 (相当于乙二胺四乙酸二钠 1.0 mg), 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加水适量使溶解, 加 $0.04 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸铜溶液 1.0 mL , 加水稀释至刻度, 摇匀, 以 $0.45 \mu\text{m}$ 的微孔滤膜滤过, 即得。

3.4 空白溶液 取泮托拉唑钠原料约 44 mg 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加水适量使溶解, 加 $0.04 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸铜溶液 1.0 mL , 加水稀释至刻度, 摇匀, 以 $0.45 \mu\text{m}$ 的微孔滤膜滤过, 即得。

4 方法与结果

4.1 系统适用性试验 精密量取硫酸铜溶液、空白溶液、供试品溶液及对照品溶液各 $20 \mu\text{L}$, 分别注入色谱仪, 记录色谱图, 结果表明, 乙二胺四乙酸铜络合物峰的理论塔板数为 2500 左右, 乙二胺四乙酸铜络合物、泮托拉唑铜络合物与硫酸铜的分离度良好, 见图 1。

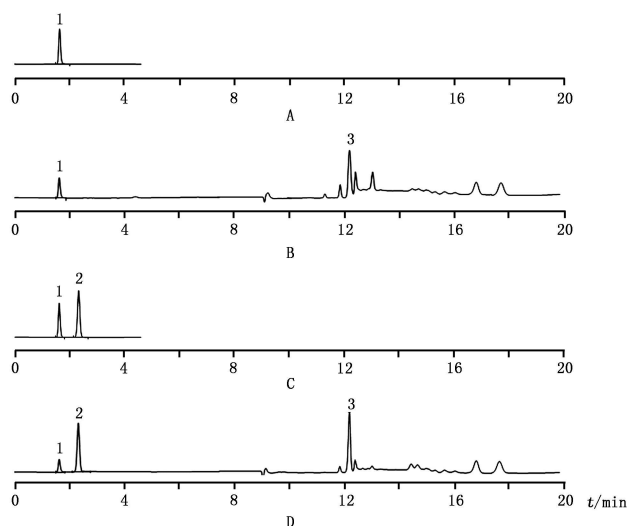


图 1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

A. 硫酸铜 (copper sulfate) B. 空白 (blank) C. 对照品 (reference substance) D. 样品 (sample)

1. 硫酸铜 (copper sulfate) 2. 乙二胺四乙酸铜络合物 (EDTA copper complex) 3. 泮托拉唑铜络合物 (pantoprazole copper complex)

4.2 线性关系考察 精密量取 $0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的乙二胺四乙酸二钠溶液 1 mL , 2 mL , 4 mL , 5 mL , 6 mL , 10 mL , 分别置 50 mL 量瓶中, 分别加 $0.04 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸铜溶液 1.0 mL , 用水稀释至刻度, 摇匀, 以 $0.45 \mu\text{m}$ 的微孔滤膜滤过, 分别精密量取滤液 $20 \mu\text{L}$, 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 以乙二胺四乙酸二钠进样量为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 绘制标准曲线, 得回归方程:

$$Y = 498.02X + 0.3878 \quad r = 0.9999$$

结果表明: 乙二胺四乙酸二钠进样量在 $0.083 \sim 0.83 \mu\text{g}$ 范围内线性关系良好。

4.3 精密度试验 分别精密量取对照品溶液 $20 \mu\text{L}$, 连续进样 6 次, 记录色谱图, 以峰面积计算, RSD 为 0.047% 。另取同一批号 (批号: 080801) 供试品溶液 6 份, 照“2”项下色谱条件测定, 以外标法计算乙二胺四乙酸二钠的含量, RSD 为 0.35% , 结果表明本法精密度良好。

4.4 溶液稳定性 取同一份供试品溶液于 $0, 2, 4$

6 8 10 h 照“2”项下色谱条件,分别测定乙二胺四乙酸铜络合物峰面积, RSD 为 0.42%, 结果表明供试品溶液在 10 h 内稳定性良好。

4.5 回收率试验 取泮托拉唑钠约 44 mg 精密称定,置 50 mL 量瓶中,共称取 9 份,平均分成 3 组。每组分别精密加入 $0.9969 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的乙二胺四乙酸二钠溶液各 0.8 1.0 1.2 mL,照“2”项下色谱条件测定,按外标法计算乙二胺四乙酸二钠的量,结果低、中、高 3 个浓度的回收率 ($n=3$) 分别为 99.9%, 99.2%, 100.6%, 总回收率 ($n=9$) 为 99.9%。结果表明本法准确性良好。

4.6 定量限及检测限 取乙二胺四乙酸二钠对照品溶液,用水逐级稀释,分别加 $0.04 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸铜溶液 1.0 mL,用水稀释至 50 mL,摇匀,以 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过,分别精密量取 20 μL 注入色谱仪,记录色谱图,按信噪比为 10:1 计算定量限,结果为 10.1 ng 按信噪比为 3:1 计算检测限,结果为 4.2 ng。

4.7 样品中乙二胺四乙酸二钠含量测定 取 3 批注射用泮托拉唑钠,照“3.2”和“3.3”项下方法,分别制备对照品溶液和供试品溶液,照“2”项下色谱条件分别测定,批号为 080801, 080802, 080803 的样品中乙二胺四乙酸二钠的含量分别为 0.993 1.002 0.989 $\text{mg} \cdot \text{支}^{-1}$ 。

5 讨论

5.1 检测方法的选择 乙二胺四乙酸二钠含量测定多采用滴定法和比色法。由于这些方法很难将乙二胺四乙酸二钠螯合物和其他螯合物区分,选择性差,存在干扰,故考虑采用专属性较高的 HPLC 法。HPLC 法是通过检测乙二胺四乙酸二钠的金属螯合物对其含量进行测定。乙二胺四乙酸二钠易与金属离子螯合,形成稳定的水溶性螯合物。其中与铜离子形成的螯合物稳定系数较高^[7], 本法采用加入硫酸铜溶液,使乙二胺四乙酸二钠和铜离子形成比较稳定的螯合物,可以避免乙二胺四乙酸二钠和色谱柱不锈钢表面发生作用,提高检测灵敏度,改善峰形。

5.2 硫酸铜用量的确定 乙二胺四乙酸二钠与硫酸铜形成螯合物的同时,主药泮托拉唑钠与硫酸铜也能够螯合。为保证供试品溶液中的乙二胺四乙酸二钠完全被铜离子螯合,故进行硫酸铜用量筛选。研究表明,乙二胺四乙酸二钠相对于泮托拉唑钠而

优先与硫酸铜螯合。当 $0.04 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸铜溶液用量为 1.0 mL 以上时,乙二胺四乙酸二钠和泮托拉唑钠被螯合完全。泮托拉唑钠与硫酸铜溶液反应后可生成蓝绿色沉淀,供试品溶液经过滤后,将大部分泮托拉唑钠沉淀除去,从而避免了对乙二胺四乙酸二钠测定的干扰作用。

5.3 考察了乙二胺四乙酸铜络合物在不同 pH 环境下的稳定性,发现其在 $0.025 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸铵溶液 (pH 3.0) 中稳定性最佳,以此溶液为流动相,泮托拉唑铜络合物保留时间在 1 h 以上,因此流动相采用梯度洗脱,以缩短样品的分析时间。根据不同处方中乙二胺四乙酸二钠的添加量,通过加入过量的硫酸铜,在相同色谱条件下对注射用奥美拉唑钠、注射用兰索拉唑等同类制剂中乙二胺四乙酸二钠的含量进行测定,结果表明方法仍适用。

5.4 采用本法测定注射用泮托拉唑钠中乙二胺四乙酸二钠的含量,简便、准确,灵敏度高,重复性好。

参考文献

- 1 ZHANG Yan-mei (张艳梅), CHEN Xiao-hong (陈晓红), LIU Yuan-yuan (刘媛媛). Clinical application of pantoprazole sodium (泮托拉唑钠的临床应用). *Cap Med* (首都医药), 2007, 14(2): 40
- 2 LI Jun (李军), BU Jing-shun (部敬顺), ZHANG Jian (张鉴). Study on the stability of injection pantoprazole sodium (注射用泮托拉唑钠的稳定性考察). *China Pharm* (中国药房), 2005, 16(21): 1655
- 3 ZHENG Jun-min (郑俊民). Handbook of Pharmaceutical Excipients (药用辅料手册). Beijing (北京): Chemical Industry Press (化学工业出版社), 2005. 263
- 4 Lon HALL, Lloyd Takahashi. Quantitative determination of disodium edetate in ophthalmic and contact lens care solutions by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J Pharm Sci*, 1988, 77(3): 247
- 5 LIU Peng-chun (刘鹏春), LI Hong-ming (李鸿鸣), WANG Bing (王冰). HPLC determination of EDTA- Na_2 in pickles (高效液相色谱法测定酱菜中 EDTA- Na_2 的含量). *China Public Health* (中国公共卫生), 2001, 17(11): 1027
- 6 LUO Yi (罗伟), ZHAO Yong-biao (赵永彪), LI Su-juan (李淑娟), et al. Determination of EDTA in food by RP-HPLC (反相高效液相色谱法测定食品中 EDTA 的含量). *China Food Add* (中国食品添加剂), 2006, 4: 156
- 7 LI Fa-mei (李发美). Analytical Chemistry (分析化学). Beijing (北京): People's Medical Publishing House (人民卫生出版社), 2008. 87

(本文于 2010 年 4 月 1 日收到)