

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.18.018

离子色谱法测定那屈肝素钙注射液中游离硫酸盐含量

李祥胜, 孟雅萍, 许雷鸣[△]

(安徽省食品药品检验研究院, 安徽 合肥 230051)

摘要:目的 建立测定那屈肝素钙注射液中游离硫酸盐含量的离子色谱法。方法 色谱柱为 IonPac™ AS11-HC 柱(250 mm×4 mm), 保护柱为 IonPac™ AG11-HC 柱(50 mm×4 mm), 柱温为 30℃; 以 3 mmol/L 碳酸钠溶液为淋洗液, 流速为 2.0 mL/min; 电导检测器, 电导池温度为 35℃; 抑制电流为 50 mA。结果 硫酸根离子质量浓度在 1.0~20.0 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好, $r=0.999\ 95$ ($n=5$); 精密度、稳定性、重复性试验的 RSD 均小于 1.0%; 平均加样回收率为 98.40%, RSD 为 3.26% ($n=6$)。结论 该方法操作简单, 结果准确, 灵敏度高, 重复性好, 可用于测定那屈肝素钙注射液中游离硫酸盐的含量。

关键词:离子色谱法; 那屈肝素钙注射液; 游离硫酸盐; 含量测定

中图分类号: R927.2

文献标志码: A

文章编号: 1006-4931(2021)18-0073-03

Content Determination of Free Sulfate in Nadroparin Calcium Injection by Ion Chromatography

LI Xiangsheng, MENG Yaping, XU Leiming

(Anhui Institute for Food and Drug Control, Hefei, Anhui, China 230051)

Abstract: **Objective** To establish an ion chromatography method for the content determination of free sulfate in Nadroparin Calcium Injection. **Methods** The chromatographic column was IonPac™ AS11-HC column(250 mm×4 mm) and the guard column was IonPac™ AG11-HC column(50 mm×4 mm), the column temperature was 30℃, 3 mmol/L sodium carbonate solution was used as the isocratic eluent, the flow rate was 2.0 mL/min with a conductivity detector, the temperature of conductivity cell was 35℃, and the suppression current was 50 mA. **Results** The linear range of sulfate ion was 1.0~20.0 μg/mL ($r=0.999\ 95$, $n=5$), The RSD s of precision, stability and repeatability tests were less than 1.0%. The average recovery of sulfate ion was 98.40% with RSD of 3.26% ($n=6$). **Conclusion** The method is simple, accurate, sensitive and reproducible, which can be used for the content determination of free sulfate in Nadroparin Calcium Injection.

Key words: ion chromatography; Nadroparin Calcium Injection; free sulfate; content determination

第一作者: 李祥胜, 男, 硕士, 副主任药师, 研究方向为药品和化妆品质量分析, (电子信箱)lian781010@sina.com。

[△]通信作者: 许雷鸣, 博士, 副主任药师, 研究方向为药品和化妆品质量分析, (电话)0551-63710006。

- [2] 刘晨孝. 礞石滚痰丸治疗痰热郁结型抑郁症的临床研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古医科大学, 2019.
- [3] 钱梦, 王玲玲, 谢鸣. 礞石滚痰丸的临床运用[J]. 天津中医药大学学报, 2018, 37(4): 348-352.
- [4] 王瑞芬, 李凤琴. 一测多评法在冬菊利咽含剂质量控制中的应用研究[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(8): 977-980.
- [5] FENG YM, LI Q, YANG L, et al. Simultaneous determination of osthol, columbianadin, and isoimperatorin in Angelicae pubescentis Radix by high-performance liquid chromatography (HPLC) using a quantitative analysis of multi-components by single marker(QAMS) calibration method[J]. Instrumentation Science & Technology, 2020, 48(5): 550-560.
- [6] MAI J, LIANG J, LIU XF, et al. Simultaneous Determination of 5 Components in the Leaves of *Dimocarpus longan* by Quantitative Analysis of Multicomponents by Single Marker (QAMS) Based on UPLC and HPLC[J]. Journal of Analytical Methods in Chemistry, 2020. doi:10.1155/2020/3950609.
- [7] 李宗云, 刘莉, 何世学, 等. 一测多评法测定心可宁胶囊中 6 种蟾蜍二烯内酯类化合物[J]. 中国现代应用药学, 2020, 37(17): 2093-2097.
- [8] 于娟. 一测多评法测定清热止咳颗粒及中间体中 7 种黄酮类成分的含量[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(19): 4185-4195.
- [9] 张春玲, 范顺明, 罗婷, 等. 滋肾丸 HPLC 指纹图谱及多种成分含量测定研究[J]. 中药材, 2020, 43(5): 1178-1180.
- [10] 张立群, 何胜利. 一测多评法同时测定参桂理中丸中 6 种成分的含量[J]. 现代中药研究与实践, 2019, 33(5): 34-39.
- [11] 丁梦磊, 张变, 张越, 等. 一测多评法测定六神丸中的 6 个蟾蜍二烯内酯类化合物[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(11): 2003-2009.
- [12] 步知思. 一测多评与逆流色谱在两味中药材质量控制中的应用[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2017.
- [13] 刘会珍. 基于“一测多评”及指纹图谱技术的莪术饮片质量标准研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2014.
- [14] 李宇邦, 肖凤霞, 宋小欣, 等. 一测多评法比较毛橘红与光橘红 5 种黄酮类成分含量[J]. 中草药, 2018, 49(2): 444-449.
- [15] 王肖. 一测多评法在山楂叶及其制剂中的应用研究[D]. 承德: 承德医学院, 2015.
- [16] 于晓. 艾叶化学成分及一测多评分析方法的研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2016.

(收稿日期: 2020-12-09; 修回日期: 2021-01-27)

那屈肝素钙注射液临床主要用于外科手术中静脉血栓形成中高度或高度危险的情况^[1],预防静脉血栓栓塞性疾病,治疗已形成的深静脉血栓,以及联合阿司匹林用于不稳定型心绞痛和非Q波性心肌梗死急性期的治疗。其药品说明书所载用法还包括血液透析中预防体外循环中的血凝块形成。那屈肝素钙是由肠黏膜获取的氨基葡聚糖(肝素)片段的钙盐。肝素双糖单位中有多个位置被硫酸基团取代,硫酸基取代的位置及数量与肝素的抗凝活性密切相关。当肝素解聚为那屈肝素钙时,糖链上的硫酸基团会脱落,若生产工艺控制不当,硫酸基团会过度解离,从而影响那屈肝素钙的活性,且那屈肝素钙注射液的硫酸基团在贮藏过程中也有可能脱落,故应严格控制那屈肝素钙制剂中的游离硫酸盐。目前(截至笔者投稿时)在国内上市的那屈肝素钙注射液生产企业有4家,其中国产3家、原研1家(葛兰素史克),仅原研、国产各1家生产企业以离子色谱法对制剂中游离硫酸盐加以控制,但这2家生产企业的离子色谱法均存在氢氧化钠淋洗液浓度偏高导致抑制器电流过大、出峰过早,以及因基线噪音过大影响积分准确性等瑕疵。本研究中参考文献[2-15],通过优化色谱条件等对检测方法进行优化。现报道如下。

1 仪器与试剂

ICS-5000型离子色谱仪(美国Dionex公司)。硫酸根标准溶液(批号为18094,质量浓度为1000 μg/mL),草酸钠标准溶液(批号为19012,浓度为0.1 mol/L),均购自中国计量科学研究院;无水碳酸钠(上海麦克林生化科技有限公司,批号为C10477836,含量为99.0%);那屈肝素钙注射液[南京健友生化制药股份有限公司,批号分别为A40206E, A41105E, A40805E;河北常山生化药业有限公司,批号分别为F423180403, F42319012, F423190101;天津生物化学制药有限公司,批号分别为73190201, 74190202, 74190203;葛兰素史克<天津>有限公司,批号分别为5300(A), 5264, 5300(B)];水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: IonPac™ AS11-HC柱(250 mm×4 mm);保护柱: IonPac™ AG11-HC柱(50 mm×4 mm);柱温: 30℃;电导检测器,电导池温度: 35℃;抑制器电流: 50 mA;淋洗液: 3 mmol/L碳酸钠溶液(等度洗脱);流速: 2.0 mL/min;进样量: 25 μL。

2.2 溶液制备

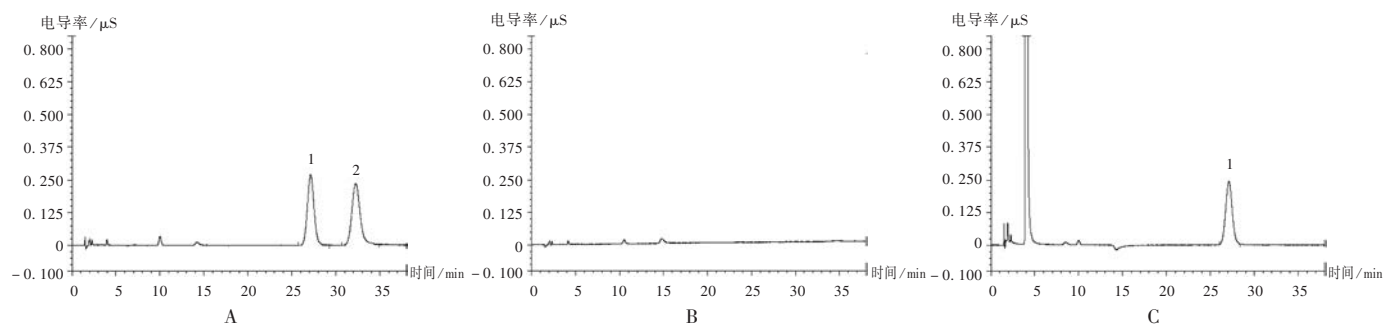
精密量取硫酸根标准溶液(1000 μg/mL)适量,用淋洗液稀释,制成每1 mL分别含硫酸根1, 2, 5, 10, 20 μg的系列硫酸根标准溶液。精密量取草酸钠标准溶液(0.1 mol/L)适量,用淋洗液稀释,制成每1 mL含草酸根50 μg的溶液,取1 mL与硫酸根标准溶液(10 μg/mL)3 mL,置同一10 mL容量瓶中,加淋洗液定容,摇匀,即得对照品溶液。取样品0.5 mL,用淋洗液稀释至50 mL,摇匀,离心,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得供试品溶液。以3 mmol/L碳酸钠溶液(淋洗液)作为空白溶液。

2.3 方法学考察

系统适用性及专属性试验:精密量取2.2项下3种溶液各25 μL,按2.1项下色谱条件进样测定。结果分离度为3.5,空白溶液对硫酸根测定无干扰,详见图1。

线性关系考察:精密量取2.2项下系列硫酸根标准溶液各25 μL,按2.1项下色谱条件进样测定。记录色谱图,以硫酸根质量浓度(X , μg/mL)为横坐标、峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归,得回归方程 $Y = 0.07504X - 0.01498$, $r = 0.99995$ ($n = 5$)。结果表明,硫酸根进样质量浓度在1.0~20.0 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

检测限和定量限确定:取2.2项下硫酸根对照品溶液(5 μg/mL)适量,倍比稀释,并按2.1项下色谱条件进样测定,以信噪比(S/N)为3:1和10:1计算检测



1. 硫酸根 2. 草酸根
A. 对照品溶液 B. 空白溶液 C. 供试品溶液

图1 离子色谱图

1. sulfate ion 2. oxalate ion
A. Reference solution B. Blank solution C. Test solution

Fig. 1 Ion chromatograms

限和定量限。结果硫酸根的检测限为 0.03 $\mu\text{g/mL}$, 定量限为 0.10 $\mu\text{g/mL}$ 。

精密密度试验:精密量取 2.2 项下硫酸根标准溶液 (5 $\mu\text{g/mL}$) 25 μL , 按 2.1 项下色谱条件连续进样 6 次, 记录峰面积。结果的 RSD 为 0.39% ($n=6$), 表明仪器精密密度良好。

稳定性试验:取 2.2 项下供试品溶液适量, 分别于室温下放置 0, 1, 3, 5, 8, 12, 24 h, 按 2.1 项下色谱条件进样分析, 记录峰面积。结果的 RSD 为 0.58% ($n=7$), 表明室温下供试品溶液在 24 h 内稳定。

重复性试验:取样品 (批号为 73190201) 适量, 按 2.2 项下方法制备 6 份供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积并计算含量。结果硫酸根平均含量为 374 $\mu\text{g/mL}$, RSD 为 0.62% ($n=6$), 表明方法重复性良好。

加样回收试验:精密量取已知含量的样品 (硫酸根含量为 374 $\mu\text{g/mL}$, 批号为 73190201) 0.5 mL, 共 6 份, 分别置 50 mL 容量瓶中, 精密加入硫酸根标准溶液 (100 $\mu\text{g/mL}$) 0.5 mL, 用淋洗液定容, 摇匀, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 并计算回收率。结果见表 1。

表 1 加样回收试验结果 ($n=6$)
Tab. 1 Results of the recovery test ($n=6$)

取样量/mL	样品含量/ μg	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	$\bar{X}$ /%	RSD /%
0.5	187	50	238.3	102.60	98.40	3.26
0.5	187	50	235.2	96.40		
0.5	187	50	235.9	97.80		
0.5	187	50	235.1	96.20		
0.5	187	50	234.6	95.20		
0.5	187	50	238.1	102.20		

2.4 样品含量测定

取 12 批样品, 分别以天津生化标准方法 (方法 1)、葛兰素史克标准方法 (方法 2) 及拟订方法 (方法 3) 进行测定。结果见表 2。

表 2 3 种方法含量测定结果比较 ($\mu\text{g/mL}$, $n=3$)

Tab. 2 Comparison of the content of sulfate ion in the samples determined by three methods ($\mu\text{g/mL}$, $n=3$)

批号	方法 1	方法 2	方法 3	批号	方法 1	方法 2	方法 3
A40206E	109	152	149*	73190201	376	408	374*
A41105E	130	177	167*	74190202	249	287	256*
A40805E	218	289	248*	74190203	272	315	286*
F423180403	172	227	202*	5300(A)	88	114	103*
F423190102	164	188	184*	5264	99	113	111*
F423190101	144	181	190*	5300(B)	91	116	107*

注: 与方法 1 或方法 2 比较, * $P < 0.01$ 。

Note: Compared with those determined by method 1 or method 2,

* $P < 0.01$.

3 讨论

葛兰素史克标准方法的测定结果略高于拟订方法的测定结果 (仅 1 批例外), 可能与前者出峰过快 (出峰时间为 3 min) 造成杂质峰不能很好地分离有关; 天津生化标准方法的测定结果低于拟订方法测定结果 (仅 1 批例外), 可能与前者基线噪音较大, 影响积分的准确性有关。且葛兰素史克标准方法中色谱柱是少用于离子色谱法的钢化短柱, 氢氧化钠淋洗液浓度偏高, 导致抑制器电流太高, 影响其使用寿命, 淋洗液配制也相对较烦琐。本研究在参考相关文献的基础上, 通过优化色谱条件来优化检测方法, 新修订的方法对不同企业那屈肝素钙注射液中硫酸盐的含量测定均有良好适用性, 且操作简单, 结果准确, 灵敏度高, 重复性好, 可作为国内上市 4 家企业的那屈肝素钙注射液中游离硫酸盐含量的测定方法。

参考文献

- [1] 钱亚琴, 曲清, 范金华. 单次空腹皮下注射那屈肝素钙注射液在中国健康受试者的生物等效性研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(13): 1875-1878.
- [2] 滕南雁, 梁飞燕. 离子色谱法测定中药西瓜霜硫酸盐的含量[J]. 药物分析杂志, 2011, 31(8): 1549-1551.
- [3] 张静, 王庆全, 刘绪平. 离子色谱法测定硫酸小诺霉素中硫酸盐的含量[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(10): 1845-1846.
- [4] 刘军玲, 张亚中. 离子色谱法测定白花蛇舌草注射液中亚硫酸盐与硫酸盐总量[J]. 安徽医药, 2013, 17(5): 769-770.
- [5] 管惠娟, 丁建文, 张超, 等. 达肝素钠原料药中游离硫酸盐测定方法的研究[J]. 食品与药品, 2014, 16(5): 343-345.
- [6] 宋玉国, 申玉华. 离子色谱法测定苦碟子注射液中硫酸盐和亚硫酸盐[J]. 药物分析杂志, 2012, 32(5): 857-860.
- [7] 刘潇潇, 李雪, 张丽丹, 等. 离子色谱法检测穿山甲饮片非非法掺加硫酸盐或盐酸盐增重[J]. 药学研究, 2018, 37(1): 27-29.
- [8] 吴凡, 刘继华, 李婷婷. 离子色谱法测定硫酸庆大霉素中硫酸盐的含量[J]. 海峡药学, 2017, 29(2): 57-59.
- [9] 王红伟, 陈曦, 牟世芬, 等. 离子色谱法同时测定大气中 NO_3^- 和 SO_4^{2-} 的研究[J]. 卫生研究, 2012, 41(4): 658-661.
- [10] 任华忠, 封家福, 伍朝君. 离子色谱法测定注射用硫代硫酸钠中的亚硫酸盐和硫酸盐[J]. 华西药理学杂志, 2015, 30(1): 103-104.
- [11] 王文佳, 赵洪明, 曾红燕. 生活饮用水中消毒副产物及阴离子的离子色谱测定法[J]. 现代预防医学, 2019, 46(21): 3964-3968.
- [12] 杜宏山, 黄选忠, 万忠卫, 等. 离子色谱法测定纯净水中 6 种阴离子[J]. 化学分析计量, 2015, 24(1): 55-57.
- [13] 郑岩, 赵毅. 离子色谱法测定液体盐中的微量硫酸根盐[J]. 科学与化工, 2017, 46(7): 22-24.
- [14] 徐桂连, 耿欣. 离子色谱法测定碳酸锂原料药中的氯化物及硫酸盐[J]. 中国药师, 2015, 18(2): 324-325.
- [15] 甘盛, 施晓光, 韩婷, 等. 离子色谱法测定药用芒硝中硫酸钠含量[J]. 中国药业, 2012, 21(14): 39-40.

(收稿日期: 2020-12-17; 修回日期: 2021-02-20)