

# 离子色谱法测定维生素 B<sub>1</sub> 注射液中的 EDTA 及硝酸根离子

陈柳生, 蔡自由\*, 周伟明

(广东食品药品职业学院, 广州 510520)

**[摘要]** 目的: 建立测定维生素 B<sub>1</sub> 注射液中 EDTA 及硝酸根离子含量的离子色谱法。方法: 采用 IonPac AS 11-HC 色谱柱 (4.0 mm × 250 mm), IonPac AS 11-HC guard 保护柱 (4.0 mm × 50 mm) 和 ASRS 300 抑制器 (4 mm), 淋洗液为 12 mmol·L<sup>-1</sup> 氢氧化钠, 流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 抑制电流 60 mA, 电导检测器温度 35 ℃, 柱温 30 ℃, 进样体积 25 μL。结果: EDTA 和硝酸根离子检出限分别为 0.29, 0.01 mg·L<sup>-1</sup>, EDTA 在 1.19 ~ 23.8 mg·L<sup>-1</sup>, 线性关系良好 ( $r=0.9997$ ), 回收率为 98.2% ~ 100.6%; 硝酸根离子在 1.0 ~ 10.0 mg·L<sup>-1</sup> 线性关系良好 ( $r=0.9996$ ), 回收率为 97.9% ~ 99.5%。结论: 该实验方法选择性高, 灵敏度高, 测定结果准确, 并且简便, 快速, 可用于注射液中 EDTA 及硝酸根离子的测定研究和质量控制。

**[关键词]** 离子色谱; 乙二胺四乙酸; 硝酸根离子; 维生素 B<sub>1</sub> 注射液

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)14-0061-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.2014140061

## IC Determination of EDTA and Nitrate Ion in Vitamin B<sub>1</sub> Injection

CHEN Liu-sheng, CAI Zi-you\*, ZHOU Wei-ming

(Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520, China)

**[Abstract]** **Objective:** To develop a method by ion chromatography with suppressed conductivity detection for the determination of EDTA and nitrate ion in vitamin B<sub>1</sub> injection. **Method:** Chromatographic

**[收稿日期]** 20140204(001)

**[基金项目]** 广东省医学科学技术研究基金项目(A2012155)

**[第一作者]** 陈柳生, 硕士, 实验师, 从事天然产物化学和药物分析研究, Tel: 020-28854900, E-mail: chenls@gdzy.edu.cn

**[通讯作者]** \* 蔡自由, 教授, 从事药物分析研究, Tel: 020-28854975, E-mail: caizy@gdzy.edu.cn

- [3] Frankel E N, Waterhouse A L, Kinsella J E. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol [J]. *Lancet*, 1993, 341(3):1103.
- [4] Pace-Asciak C R, Hahn S, Diamandis E P, et al. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis; implications for protection against coronary heart disease [J]. *Clin Chim Acta*, 1995, 235(3):207.
- [5] Jang M, Cai L, Udeani G O, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes [J]. *Science*, 1997, 275(6):218.
- [6] Giovannini L, Migliori M, Longoni B M, et al. Resveratrol, a polyphenol found in wine, reduces ischemia reperfusion injury in rat kidneys [J]. *J Cardiovas Pharmacol*, 2001, 37(3):262.
- [7] Shao B, Guo H Z, Cui Y J, et al. Steroid saponins from *Smilax china* and their anti-inflammatory activities [J]. *Phytochemistry*, 2007, 68(4):623.
- [8] 陆瑶, 黄志军, 袁洪. 白藜芦醇对细胞色素 P450 酶活性影响的研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2013, 38(5):653.
- [9] Zhu Z, Klironomos G, Vachereau A, et al. Determination of trans-resveratrol in human plasma by HPLC [J]. *J Chromatogr B*, 1999, 724(2):389.
- [10] Vitaglione P, Sforza S, Galaverna G, et al. Bioavailability of trans-resveratrol from red wine in humans [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2005, 49(3):495.
- [11] Wang D G, Hang J, Wu C Y, et al. Identification of the major metabolites of resveratrol in rat urine by HPLC-MS/MS [J]. *J Chromatogr B*, 2005, 829(1/2):97.

[责任编辑 邹晓翠]

separation was achieved on an IonPac AS 11-HC column (4.0 mm × 250 mm) with an IonPac AS 11-HC guard column (4.0 mm × 50 mm) and an ASRS 300 suppressor (4 mm). The eluent was 12 mmol · L<sup>-1</sup> NaOH with flow rate 1.0 mL · min<sup>-1</sup>. The suppressor current was 60 mA, and the conductivity detector temperature was set at 35 °C while the column temperature was maintained at 30 °C. The injection volume was 25 μL. **Result:** The limit of determination of EDTA and nitrate ion were 0.29 mg · L<sup>-1</sup> and 0.01 mg · L<sup>-1</sup> respectively. The standard curve of EDTA was linear in the concentration range of 1.19-23.8 mg · L<sup>-1</sup> and the correlation coefficient was 0.999 7. The recoveries of the EDTA were between 98.2% -100.6%. The standard curve of nitrate ion was linear in the concentration range of 1.0-10.0 mg · L<sup>-1</sup> and the correlation coefficient was 0.999 6. The recoveries of the nitrate ion were between 97.9% -99.5%. **Conclusion:** The proposed method shows high selectivity, sensitivity and good results. It is proved to be rapid and convenient. It can be employed for the quality control and research of EDTA and nitrate ion in injection products.

[**Key words**] ion chromatography; EDTA; nitrate ion; vitamin B<sub>1</sub> injection

乙二胺四乙酸(EDTA,常以二钠盐形式存在)是一种有效的金属离子络合剂,在药剂上用作水的软化剂、抗氧增效剂和稳定剂,是医药工业中常用的辅料。它能与碱金属以外的绝大多数金属如碱土金属、重金属和黑色金属等离子生成稳定的水溶性络合物以降低金属离子的催化氧化,从而提高药物制剂稳定性,常用剂量为 0.01% ~ 0.05%<sup>[1]</sup>。

硝酸盐摄入人体,经肠道中微生物的作用,能转变成亚硝酸盐而出现毒性作用,一般认为过量的摄入该类物质可能导致高铁血红蛋白血症,并在体内转变成致癌性的亚硝酸胺<sup>[2]</sup>。持续摄入少量的硝酸根会引起消化不良、精神抑郁和头痛<sup>[3]</sup>。按 2010 年版《中国药典》规定,纯化水和注射用水均要求硝酸盐含量以硝酸根计算,不得大于 0.000 006%<sup>[4]</sup>,维生素 B<sub>1</sub> 原料中硝酸盐含量以硝酸根计算不得大于 0.25%<sup>[4]</sup>。

目前,文献报道的 EDTA 含量测定方法包括滴定法<sup>[5]</sup>、极谱法<sup>[6]</sup>、气相色谱法<sup>[7]</sup>、液相色谱法<sup>[8]</sup>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。硝酸根离子的测定方法有酚二磺酸光度法、镉柱还原法、戴氏合金还原法、紫外法、电极法等<sup>[9]</sup>,这些分析方法操作繁琐,灵敏度低,易受水中其他物质的干扰。离子色谱法(Ion chromatography, IC)是在离子交换色谱法的基础上建立起来的一种离子色谱分析液相色谱技术<sup>[10]</sup>,已广泛应用于药物分析中,能快速、准确地测定各种阴、阳离子,较少使用有毒试剂,与 HPLC 法相比,其对阴阳离子选择性更好,更为环保,已在 2010 年版《中国药典》附录中刊载。本文采用离子色谱法能检测出制剂中 EDTA

和硝酸根的含量,不仅丰富了维生素 B<sub>1</sub> 注射液的质量评价方法,同时对分析和评价维生素 B<sub>1</sub> 注射液样品质量及工艺的一致性和差异性提供了科学依据。

## 1 材料

DIONEX ICS2000 型离子色谱仪(美国戴安公司),注射用水(广州白云山天心制药股份有限公司),氢氧化钠(分析纯,广州化学试剂厂),乙二胺四乙酸二钠盐对照品(批号 20120201)、硝酸根标准溶液(10.0 mg · L<sup>-1</sup>,批号 20120518)均购于中国食品药品检定研究院,维生素 B<sub>1</sub> 注射液为 9 个企业 72 批样品。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液的配制

**2.1.1 对照品溶液的制备** EDTA 对照品溶液:精密称取乙二胺四乙酸二钠盐对照品 11.9 mg,加注射用水稀释至 100 mL,精密量取 5 mL,加注射用水稀释至 50 mL。硝酸根对照溶液:精密量取 10.0 mg · L<sup>-1</sup> 硝酸根标准溶液 5 mL,加注射用水稀释至 10 mL。

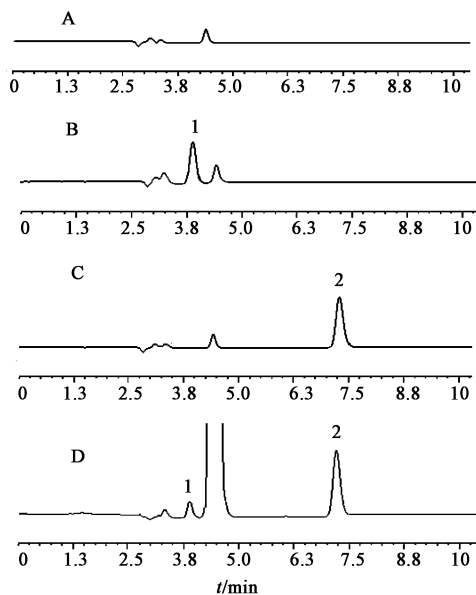
**2.1.2 供试品溶液的制备** 精密量取维生素 B<sub>1</sub> 注射液 1 mL,加注射用水稀释至 10 mL。

**2.2 色谱条件** IonPac AS 11-HC 色谱柱(4.0 mm × 250 mm),IonPac AS 11-HC guard 保护柱(4.0 mm × 50 mm),抑制器 ASRS 300(4 mm),抑制电流 60 mA,电导检测器温度 35 °C,柱温 30 °C,氢氧化钠淋洗液浓度 12 mmol · L<sup>-1</sup>,流速 1.0 mL · min<sup>-1</sup>,进样量 25 μL。

### 2.3 方法学验证

**2.3.1 专属性试验** 取注射用水作为空白样品,另取对照品溶液和维生素 B<sub>1</sub> 注射液供试品溶液,在 2.2 项色谱条件下分析。结果显示空白样品在

EDTA 离子相应保留时间 3.9 min 处无色谱峰,在硝酸根离子相应保留时间 7.3 min 处无色谱峰,说明空白背景对测定结果无干扰,见图 1。



A. 注射用水;B,C. 硝酸根对照品;  
D. 供试品;1. EDTA;2. 硝酸根

图 1 维生素 B<sub>1</sub> 注射液离子色谱图

**2.3.2 线性关系考察** EDTA:精密称取乙二胺四乙酸二钠盐对照品适量,加注射用水稀释制成含 EDTA 1.19,2.38,5.95,11.9,23.8 mg·L<sup>-1</sup> 的溶液,注入离子色谱仪,以 EDTA 的峰面积对质量浓度进行线性回归,得到线性方程为  $Y = 0.0341X - 0.0353$  ( $r = 0.9997$ )。硝酸根:精密量取硝酸根标准溶液适量,加注射用水稀释制成含硝酸根 1.0,2.0,3.0,4.0,5.0,7.5,10.0 mg·L<sup>-1</sup> 的溶液,注入离子色谱仪,以硝酸根的峰面积对浓度进行线性回归,得到线性方程为  $Y = 0.087X - 0.0407$  ( $r = 0.9996$ )。结果表明,EDTA 离子在 1.19 ~ 23.8 mg·L<sup>-1</sup>,硝酸根离子在 1.0 ~ 10.0 mg·L<sup>-1</sup> 具有良好的线性关系。

**2.3.3 精密度试验** 分别取 2.1 项下的 EDTA 对照品溶液和硝酸根对照溶液,连续进 6 针,EDTA 和硝酸根离子峰面积的 RSD 分别为 1.4%,0.3%。

**2.3.4 重复性试验** 取同一批维生素 B<sub>1</sub> 注射液平行制备 6 份供试品溶液,进样测定,EDTA 和硝酸根离子峰面积的 RSD 分别为 0.53%,0.78%。

**2.3.5 检测限与定量限** 分别取上述线性溶液逐级稀释,进样并记录色谱图,按信噪比(S/N)为 3 和 10 计算,EDTA 和硝酸根离子检测限分别为 0.29,0.01 mg·L<sup>-1</sup>,定量限分别为 0.89,0.03 mg·L<sup>-1</sup>。

**2.3.6 回收率试验** 精密量取 12 份同一批次已知

含量的维生素 B<sub>1</sub> 注射液供试品 0.5 mL,置于 10 mL 量瓶中,分别精密加入 11.9 mg·L<sup>-1</sup> EDTA 对照品溶液 1 mL 6 份和 5.0 mg·L<sup>-1</sup> 硝酸根离子对照溶液 6 mL 6 份,加注射用水至刻度,摇匀,按 2.2 项下色谱条件测定,结果见表 1。

表 1 维生素 B<sub>1</sub> 注射液中 EDTA 及硝酸根离子的加样回收率测定

成分	样品中量 /μg	加入量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
EDTA	11.65	11.9	23.34	98.2	99.1	0.92
	11.88	11.9	23.85	100.6		
	12.23	11.9	24.06	99.4		
	11.74	11.9	23.46	98.5		
	11.82	11.9	23.67	99.6		
	12.10	11.9	23.81	98.4		
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	29.76	30.0	59.32	98.5	98.8	0.60
	29.02	30.0	58.76	99.1		
	29.35	30.0	58.73	97.9		
	29.28	30.0	59.14	99.5		
	29.57	30.0	59.08	98.4		
	30.03	30.0	59.78	99.2		

**2.3.7 稳定性试验** 取 2.1 项下供试品溶液,按 2.2 项下色谱条件分别在 2,4,6,8,10,12 h 进样测定,计算 EDTA 和硝酸根离子的峰面积 RSD 分别为 0.86%,0.97%。结果表明,供试品溶液在 12 h 内稳定。

**2.4 样品测定** 对 9 家生产企业 72 个批次的维生素 B<sub>1</sub> 注射液供试品按上述方法测定(根据具体供试品浓度进行稀释测定),按外标法计算 EDTA 及硝酸根的含量。EDTA 在 0.00 ~ 0.07 g·L<sup>-1</sup>,硝酸根在 0.08% ~ 0.39%。见表 2。

### 3 讨论

采用碳酸钠-碳酸氢钠淋洗液进行分析时,背景电导较高,且 EDTA 峰形较差。故本实验选用背景电导较低的氢氧化钠淋洗液。

当氢氧化钠淋洗液浓度在 5 ~ 10 mmol·L<sup>-1</sup> 时,EDTA 峰形较差。当氢氧化钠淋洗液浓度 > 15 mmol·L<sup>-1</sup> 时,EDTA 与水中其他杂质的峰相互干扰。通过筛选,采用 12 mmol·L<sup>-1</sup> 的氢氧化钠淋洗液分离度较好。

9 家生产企业均添加了 0.10 g·L<sup>-1</sup> EDTA 作为金属离子螯合剂,72 个批次中有 16 个批次未检出 EDTA,其余 56 个批次实测 EDTA 含量均低于添加量。通过 ICP-OES 测定样品中的阳离子得知样品

表 2 维生素 B<sub>1</sub> 注射液中 EDTA 及硝酸根离子含量测定

批号	EDTA /g·L <sup>-1</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /%	批号	EDTA /g·L <sup>-1</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> /%
1201159	0.009	0.177	1203168	0.022	0.158
1203179	0.000	0.122	1201095	0.016	0.120
1202057	0.017	0.234	1203163	0.015	0.141
1207275	0.000	0.285	1201179	0.014	0.178
1112062	0.022	0.101	1201092	0.000	0.157
1110253	0.000	0.257	1202053	0.041	0.129
1202052	0.043	0.182	1201092	0.000	0.136
1108163	0.033	0.156	1109252	0.056	0.301
1105162	0.070	0.127	1106158	0.043	0.339
1201064	0.021	0.205	1106172	0.062	0.197
1103142	0.048	0.275	1105261	0.036	0.116
1206078	0.027	0.174	1103183	0.032	0.157
120104	0.000	0.204	120105	0.008	0.218
111203	0.011	0.277	120101	0.000	0.283
120102	0.000	0.225	110706	0.015	0.183
110701	0.005	0.145	110703	0.006	0.264
1110271	0.014	0.121	1110291	0.024	0.120
1206051	0.000	0.129	1206352	0.000	0.285
1110242	0.018	0.324	1205142	0.007	0.178
1110294	0.032	0.215	1110293	0.027	0.237
1204101	0.000	0.228	1201061	0.004	0.260
1107251	0.008	0.162	1107071	0.016	0.150
1106161	0.011	0.080	1106171	0.018	0.122
1201041	0.007	0.276	1201031	0.009	0.175
110502	0.023	0.263	110802	0.006	0.207
111201	0.019	0.180	111202	0.023	0.225
110801	0.000	0.218	111203	0.027	0.223
110805	0.010	0.172	110804	0.012	0.196
111201	0.015	0.220	110702	0.021	0.262
111203	0.018	0.183	120202	0.007	0.269
110701	0.019	0.265	120203	0.000	0.216
120204	0.000	0.228	120205	0.008	0.242
1109062	0.014	0.390	1201311	0.025	0.241
1204191	0.000	0.255	1109061	0.018	0.360
1109063	0.016	0.383	1204192	0.000	0.262
1201314	0.027	0.248	1201312	0.020	0.237

硝酸根的测定结果表明,维生素 B<sub>1</sub> 注射液样品中的硝酸根含量参差不齐。9 家生产企业 72 个批次中有 21 个批次的硝酸根含量超过原料项下的限度 0.25%,表明维生素 B<sub>1</sub> 注射液制剂中硝酸根含量超标的问题比较普遍,可能与制剂过程中的原辅料质量、注射用水质量、及工艺过程控制有关。因本次研究发现硝酸根含量在一定程度上反映了该制剂原辅料、工艺的稳定性,因此硝酸根的含量可作为今后企业控制维生素 B<sub>1</sub> 注射液工艺质量的一个重要的参数。该法操作简便快速,灵敏度高,测定结果准确可靠,可用于注射液中 EDTA 及硝酸根离子的测定研究和质量控制。

[参考文献]

[1] 吕蓓蓓,李涛,田静,等. 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[J]. 药物分析杂志,2011,31(5):987.

[2] 钟莺莺,陈平,俞雪钧,等. 改进的离子色谱法测定乳制品中亚硝酸盐和硝酸盐[J]. 色谱,2012,30(6):635.

[3] 李良,王晴,江勇,等. 离子色谱法同时测定奶粉中亚硝酸盐、硝酸盐、氯离子和磷酸根[J]. 理化检验-化学分册,2007,43(10):835.

[4] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 二部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:500,896.

[5] Clincemaille G G. Determination of nitrilotriacetic acid and ethylenediaminetetraacetic acid in granular detergent formulation[J]. Anal Chim Acta,1968,43:520.

[6] 赵常志,郭震,赫春香,等. 壳聚糖修饰玻碳电极卷积分安法测定环境水中的 EDTA[J]. 分析试验室,2003,22(3):38.

[7] Nisikawa Y, Okumura T. Determination of nitrilotriacetic acid and ethylenediaminetetraacetic acid in environmental samples as their methyl ester derivatives by gaschromatography-mass spectrometry[J]. J Chromatogr A,1995,690(1):109.

[8] 耿小锋,高明,徐艳林,等. 高效液相色谱法测定透明质酸中乙二胺四乙酸[J]. 理化检验-化学分册,2013,49(4):442.

[9] 国家环境保护总局水和废水监测分析方法编委会. 水和废水监测分析方法[M]. 4 版. 北京:中国环境科学出版社,2002:156.

[10] Small H, Stevens T, Baumann W. Novel ion exchange chromatographic method using conductimetric detection[J]. Anal Chem, 1975, 47(11):1801.

中含有大量的 B, Al, 表明样品中的 EDTA 大部分与 B, Al 进行了螯合。

[责任编辑 顾雪竹]