

共振光散射光谱法测定依地酸钙钠注射液的含量

余梦婷¹, 刘毅¹, 闫玲玲¹, 马卫兴^{1,2,3*}, 董自波^{1,3}(1.江苏海洋大学药学院, 江苏 连云港 222005; 2.江苏省海洋药物筛选重点实验室, 江苏 连云港 222005; 3.江苏省海洋药用资源开发工程研究中心, 江苏 连云港 222005)

摘要: 目的 建立一种快速测定依地酸钙钠注射液含量的方法。方法 采用共振光散射光谱技术测定 0.01 mol·L⁻¹ NaOH 的碱性条件下依地酸钙钠与草酸钠反应前后的共振光散射光谱强度差。结果 采用激发和发射光带宽 5.0 nm、扫描速度 2 000 nm·min⁻¹ 时, 依地酸钙钠所解离的钙离子与草酸根形成草酸钙分子, 从而使体系的共振光散射光谱强度减弱, 在激发光与发射光波长均在 273 nm 处时, 体系的共振光散射光谱强度差值最大, 并在 0.30~1.20 mg·L⁻¹ 内呈线性关系, 相关系数 $R=0.999\ 2$ 。本法检测限为 0.005 8 mg·L⁻¹, 定量限为 0.019 3 mg·L⁻¹。结论 本法灵敏度高、专属性强、省时简便, 可用于依地酸钙钠注射液的含量分析, 测定值与容量分析法基本一致。

关键词: 依地酸钙钠; 注射液; 草酸钠; 共振光散射法; 含量测定

中图分类号: R927.11

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2021)18-2234-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.18.007

引用本文: 余梦婷, 刘毅, 闫玲玲, 等. 共振光散射光谱法测定依地酸钙钠注射液的含量[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(18): 2234-2238.

Content Determination of Calcium Disodium Edetate Injections by Resonance Light Scattering Spectrometry

YU Mengting¹, LIU Yi¹, YAN Lingling¹, MA Weixing^{1,2,3*}, DONG Zibo^{1,3}(1.School of Pharmacy, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China; 2.Key Laboratory of Marine Drug Screening of Jiangsu Province, Lianyungang 222005, China; 3.Jiangsu Marine Medical Resources Development Engineering Research Center, Lianyungang 222005, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a method to quickly determine the content of calcium disodium edetate injection. **METHODS** Resonance light scattering spectroscopy was used to determine the intensity difference of the resonance light scattering spectra before and after the reaction of calcium disodium edetate and sodium oxalate under the alkaline condition of 0.01 mol·L⁻¹ NaOH. **RESULTS** When the excitation and emission bandwidth was 5.0 nm and the scanning speed was 2 000 nm·min⁻¹, the calcium ions dissociated by calcium disodium edetate and oxalate formed calcium oxalate molecules, which weaken the intensity of the resonance light scattering spectrum of the system. When the excitation and emission wavelengths were both at 273 nm, the difference in the intensity of the resonance light scattering spectrum of the system was the largest, and the relationship was linear in the range of 0.30–1.20 mg·L⁻¹, and the correlation coefficient $R=0.999\ 2$. The detection limit of this method was 0.005 8 mg·L⁻¹ and the limit of quantification was 0.019 3 mg·L⁻¹. **CONCLUSION** This method is highly sensitive, specific, time-saving and simple. It can be used for the content analysis of calcium disodium edetate injection. The measured value is basically consistent with the volumetric analysis method.

KEYWORDS: calcium disodium edetate; injection; sodium oxalate; resonance light scattering method; content determination

癌症和心脑血管疾病与重金属在机体内的不断积累有着密不可分的关联, 体内重金属的超标成为癌症与心脑血管疾病的重要诱因^[1-2], 重金属中毒亦可导致人体神经退行性疾病^[3]。依地酸钙钠注射液作为有效的金属解毒剂, 其在临床上驱铅效果也十分显著^[4]; 也可用于镭、锰等放射性元素损伤机体的治疗^[5]。依地酸钙钠的结构式见图 1, 依地酸钙钠在注射液中以主药形式存在, 根据注射液一致性评价要求, 因其给药途径为直接入血, 存在许多安全隐患, 故对于注射液中依地酸钙钠

的含量控制需谨慎^[6-8]。目前只有中国药典二部采用的容量分析法^[9], 尚无其他方法, 该方法存在操作繁琐、专属性不强等缺点。因此, 开发省时快捷的测定注射液中依地酸钙钠含量的方法, 具有现实意义。本研究首次建立一种共振光散射光谱测定注射液中依地酸钙钠含量的新方法, 以期简便、灵敏地测定依地酸钙的含量。

1 仪器与试剂

RF-6000 型荧光分光光度计、Lab-solutions 色谱工作站均来自日本岛津; BS 210S 分析天平

基金项目: 江苏省教育厅江苏高校品牌专业建设工程二期项目(特色专业, 编号 65)

作者简介: 余梦婷, 女, 硕士生 Tel: 15161303537 E-mail: yumt214@163.com *通信作者: 马卫兴, 男, 博士, 教授 Tel: (0518)85895792 E-mail: weixingma650528@126.com

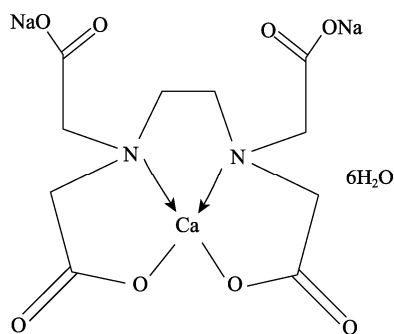


图1 依地酸钙钠化学结构式

Fig. 1 Chemical structure of calcium disodium edetate

(赛多利斯)。乙二胺四乙酸二钠钙($10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 罗恩试剂, 批号: R005290); 草酸钠($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 天津大茂, 批号: 20191015); 氢氧化钠($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 天津恒兴, 批号: 20191123)。以上试剂均为分析纯, 水均为超纯水。

2 方法与结果

2.1 溶液的配制

$10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 依地酸钙钠对照品溶液: 精密称取 0.2 g 乙二胺四乙酸二钠钙, 在 100 mL 烧杯中用适量水溶解后转移至 2 L 量瓶中, 加水定容, 混匀后, 用移液管移取 10 mL 于 100 mL 量瓶中, 加水定容, 摇匀。

测定溶液: 在 10 mL 比色管中依次精密加入适量的 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 依地酸钙钠标准溶液, 0.25 mL $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 草酸钠溶液和 1.00 mL $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液, 用水定容, 摇匀。

试剂空白溶液: 在 10 mL 比色管中依次精密加入 0.25 mL $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 草酸钠溶液和 1.00 mL $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液, 用水定容, 摇匀, 即得。

2.2 共振光散射光谱

精密移取适量 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 依地酸钙钠对照品溶液(所含依地酸钙钠的质量 $< 120 \mu\text{g}$)于 10 mL 比色管中, 依次加入 0.25 mL $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 草酸钠溶液和 1.00 mL $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液, 用超纯水定容, 取适量溶液置于 1 cm 的四面透光的石英比色皿中, 在激发光与发射光波长均在 273 nm 处进行测定, 激发和发射光带宽为 5.0 nm 、扫描速度 $2000 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$ 时, 分别检测试剂空白溶液的光散射光谱强度 I_{RLS1} 和测定溶液的光散射光谱强度 I_{RLS2} , 并计算共振光散射光谱强度差 $\Delta I_{\text{RLS}} = I_{\text{RLS1}} - I_{\text{RLS2}}$ 。当激发波长 λ_{ex} 与发射波长 λ_{em} 相等时, 在 $200 \sim 500 \text{ nm}$ 内分别扫描它们的共振光散射光谱, 结果显示在该条件下试剂空白溶液中形成了

超分子聚集体, 引起了强烈的共振光散射现象, 产生共振光散射光谱; 依地酸钙钠的存在使体系的共振光散射光谱减弱, 说明依地酸钙钠的存在使该超分子聚集体出现分解现象, 从而使共振光散射光谱强度减弱。实验还发现在 273 nm 处有最大的共振光散射光谱强度差。故采用 273 nm 作为本方法的检测波长。结果见图 2。

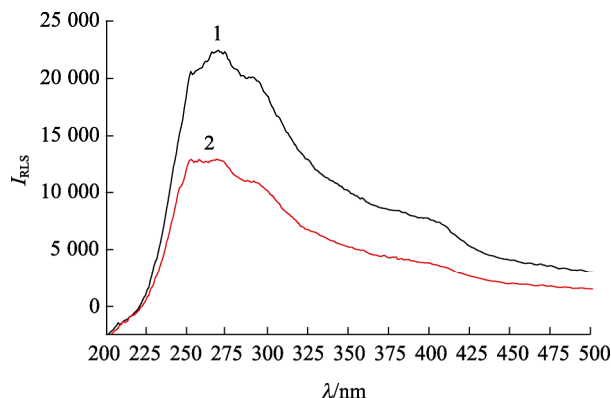


图2 共振光散射光谱

1-空白溶液; 2-测定溶液。

Fig. 2 Resonance light scattering spectroscopy

1-blank solution; 2-test solution.

2.3 草酸钠用量的影响

草酸钠是本体形成超分子聚集体引起共振光散射光谱的关键物质, 因此必须考察其用量影响。当依地酸钙钠浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 草酸钠溶液用量的影响见图 3, 在波长 273 nm 时发现草酸钠溶液用量 $< 0.25 \text{ mL}$ 时随草酸钠用量的不断加大, 其共振光散射光谱的强度差值也在不断增大; 但草酸钠用量 $> 0.25 \text{ mL}$ 时随着用量的增加, 其共振光散射光谱的强度差值在逐渐减少。即草酸钠溶液用量在 0.25 mL 时体系的共振光散射光谱的强度差值出现最大值, 故选择 0.25 mL $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 草酸钠溶液作为测试条件之一。

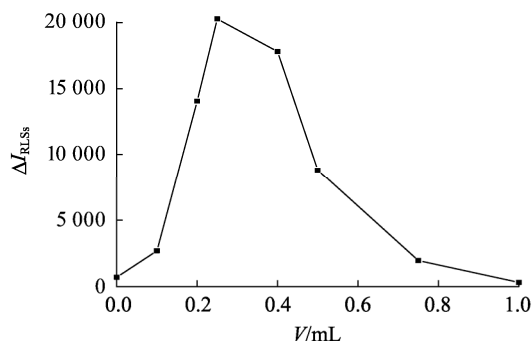


图3 草酸钠溶液用量对共振光散射光谱强度差值的影响

Fig. 3 Effect of sodium oxalate dosage on the difference of resonance light scattering

2.4 NaOH 用量的影响

氢氧根是形成超分子聚集体的关键因素之一, 确保草酸钠在本体系形成足够的超分子聚集体, 以产生足够强度的共振光散射光谱, 因此必须考察氢氧化钠溶液的用量影响。实验发现, 当依地酸钙钠浓度为 $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 氢氧化钠溶液用量的影响见图 4, 在检测波长 273 nm 时, 氢氧化钠溶液用量与草酸钠溶液用量出现相似现象, 氢氧化钠溶液用量 $< 1.00 \text{ mL}$ 时, 随着用量的不断增加, 共振光散射光谱的强度差值在不断增加; 用量 $> 1.00 \text{ mL}$ 时, 随着用量的增加, 其共振光散射光谱的强度差值也在减少; 用量在 1.00 mL 时共振光散射光谱的强度差值最大。故选择 $1.00 \text{ mL } 0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ NaOH}$ 溶液作为测试条件之一。

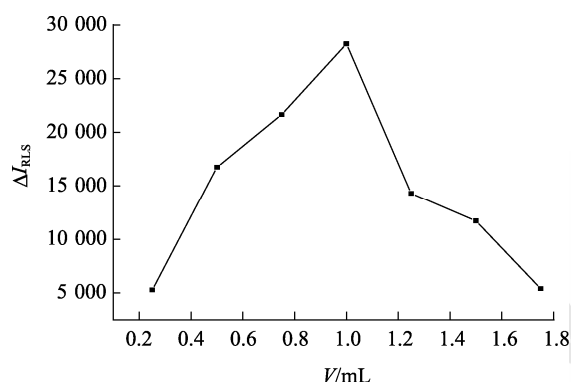


图 4 NaOH 溶液用量对共振光散射光谱强度差值的影响
Fig. 4 Effect of NaOH dosage on the difference of resonance light scattering

2.5 稳定性考察以及试剂加入顺序的考察

2.5.1 时间考察 按“2.2”项下方法配制后, 立即测定, 然后在 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60 min 进行测定, 发现体系的共振光散射光谱的强度差值 $< 1 \text{ h}$, 差值几乎不变, 并且溶液一经配好, 即可进行测定, 仪器扫描速度为 $2000 \text{ nm}\cdot\text{min}^{-1}$, 1 min 就能得到结果, 与常规方法相比, 大大缩短了测定时间。

2.5.2 温度考察 按“2.2”项下方法配制后, 采用水浴加热模拟室温条件, 在分别经过 20, 25, 30°C 水浴加热后, 测定共振光散射强度, 其差值几乎不变。经过时间和温度的考察, 共振光散射差值均出现几乎不变的情况, 可见本法具有较好的稳定性。

2.5.3 试剂加入顺序的考察 按“2.2”项下方法, 考察依地酸钙钠试剂、草酸钠试剂、氢氧化钠试

剂三者的加入顺序对共振光散射差值的影响, 配制试剂空白溶液和含 $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 依地酸钙钠的测定溶液, 结果共振光散射差值几乎不变, 说明加入次序对共振光散射差值无影响。故采用按“2.2”项下方法推荐次序。

2.6 线性范围及检测限考察

精密移取不同体积的 $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的依地酸钙钠溶液, 按“2.2”项下方法测定其共振光散射光谱强度, 并绘制工作曲线, 结果见图 5, 依地酸钙钠浓度在 $0.30\sim 1.20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 内符合线性关系, 其线性回归方程为 $\Delta I_{\text{RLS}} = 8413.9C + 9064.2$ (C 为浓度, 单位 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 相关系数 $R = 0.9992$ 。本法检测限为 $0.0058 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 定量限为 $0.0193 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (10 倍响应的标准偏差/标准曲线的斜率, $n=11$)。

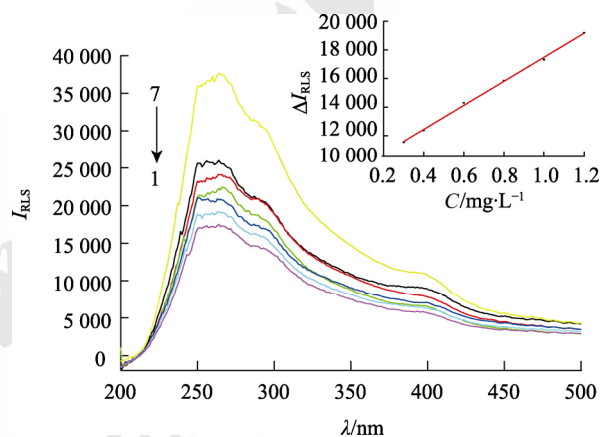


图 5 不同浓度依地酸钙钠溶液的共振光散射光谱图以及对应的工作曲线
曲线 1~6—不同浓度的测定液(依地酸钙钠浓度依次降低); 曲线 7—空白溶液。

Fig. 5 Resonance light scattering spectra and corresponding working curves of different concentrations of calcium disodium edetate solution

Curves 1~6—different concentrations of test solution(the concentration of calcium disodium edetate decreases sequentially); curve 7—blank solution.

2.7 专属性考察

考虑到依地酸钙钠注射液中可能存在的一些物质对本法存在干扰, 故进行干扰试验。其中计算结果相对误差 $\leq 5\%$ 时, 则这些物质对本法不存在干扰。对 $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 依地酸钙钠而言, 100 倍的甘氨酸、丙氨酸、葡萄糖、苯甲酸钠, 50 倍的谷氨酸、 Na^+ 、 Cl^- 、 K^+ , 以及 30 倍的硼酸、DL-丙氨酸对本法不产生干扰, 以上物质均以倍数计。因此, 说明本法具有较好的专属性。

2.8 回收率试验

按处方配制依地酸钙钠模拟注射液(规格:

5 mL : 1 g), 稀释成 10 mg·L⁻¹后精密移取 0.40 mL (模拟注射液 A)或 0.80 mL(模拟注射液 B),按“2.2”项下方法配制后,按照本研究共振光散射光谱法各平行测定 12 次,结果显示,依地酸钙钠注射液的回收率在 99.64%~100.50%,RSD 分别为 0.28% 和 0.21%,RSD 值均小于±5%,符合药品分析的实际工作要求,结果见表 1~2。

表 1 模拟注射液 A 回收率考察(n=12)

Tab. 1 Recovery test of simulated injection A(n=12)

次数	浓度/ mg·L ⁻¹	测定浓度/ mg·L ⁻¹	回收率/%	平均回 收率/%	RSD/%
1	0.40	0.399 0	99.74	99.91	0.28
2	0.40	0.401 3	100.33		
3	0.40	0.399 7	99.91		
4	0.40	0.400 9	100.22		
5	0.40	0.398 6	99.66		
6	0.40	0.399 3	99.83		
7	0.40	0.398 8	99.69		
8	0.40	0.398 8	99.70		
9	0.40	0.398 8	99.71		
10	0.40	0.398 9	99.74		
11	0.40	0.399 7	99.91		
12	0.40	0.402 0	100.50		

表 2 模拟注射液 B 回收率考察(n=12)

Tab. 2 Recovery test of simulated injection B(n=12)

次数	浓度/ mg·L ⁻¹	测定浓度/ mg·L ⁻¹	回收率/%	平均回 收率/%	RSD/%
1	0.80	0.802 1	100.26	99.88	0.21
2	0.80	0.801 1	100.13		
3	0.80	0.799 1	99.89		
4	0.80	0.800 3	100.04		
5	0.80	0.797 7	99.71		
6	0.80	0.797 5	99.69		
7	0.80	0.797 1	99.64		
8	0.80	0.797 6	99.69		
9	0.80	0.798 2	99.77		
10	0.80	0.797 5	99.68		
11	0.80	0.799 9	99.99		
12	0.80	0.800 7	100.08		

2.9 精密度考察

根据 ICH 指导原则,精密度可以从 3 个层面考虑:重复性、中间精密度和再现性。其中,重复性也称为批内精密度。本法通过考察重复性进行精密度的评价。准备 10 mg·L⁻¹依地酸钙钠模拟注射液,精密移取低、中、高 3 个不同浓度的模

拟注射液,按“2.2”项下方法配制后每个浓度平行测定 3 次,RSD 值分别为 0.59%,0.79%和 0.55%,结果见表 3,证明本方法重复性良好。

表 3 重复性试验结果(n=3)

Tab. 3 Results of reproducible experimental(n=3)

组别	浓度/mg·L ⁻¹	测定浓度/mg·L ⁻¹	标示量/%	RSD/%
1	0.300 0	0.298 5	99.53	0.59
2	0.800 0	0.798 0	99.77	0.79
3	1.200 0	1.197 0	99.77	0.55

2.10 样品分析

市售不同产地依地酸钙钠注射液 A 和依地酸钙钠注射液 B(规格: 5 mL : 1 g),取适量稀释成 10 mg·L⁻¹的样品溶液 A 和样品溶液 B,分别精密移取 0.5 mL 样品溶液 A 和 0.5 mL 样品溶液 B,按“2.2”项下方法配制后,依地酸钙钠注射液 A 和依地酸钙钠注射液 B 的最终浓度均为 0.5 mg·L⁻¹。各平行测定 6 次,结果见表 4,与药典规定的硝酸铋配位滴定法测定结果一致^[9]。

表 4 样品分析结果(n=6)

Tab. 4 Results of sample analysis(n=6)

样品	方法	平均测定值/g	平均标示量/%	RSD/%
注射液 A	本法	1.002	100.2	0.44
	药典法 ^[9]	0.998 6	99.86	0.19
注射液 B	本法	1.000	100.0	0.42
	药典法 ^[9]	1.003	100.3	0.15

3 共振光散射光谱产生机制

通过条件优化实验发现,当草酸根与氢氧根之间物质的量浓度比为 1 : 4 时,共振光散射光谱强度差最大。在该条件下,1 个草酸根上的 4 个氧原子分别与 4 个氢氧根离子分别形成 4 个氢键,这 4 个氢氧根分别与 4 个水分子形成氢键,这 4 个水分子分别与另外 4 个氢氧根形成氢键,又与草酸根上的氧原子形成氢键,以此类推,形成了如图 6 所示结构的超分子聚集体,引起了强烈的共振光散射现象,从而产生共振光散射光谱。

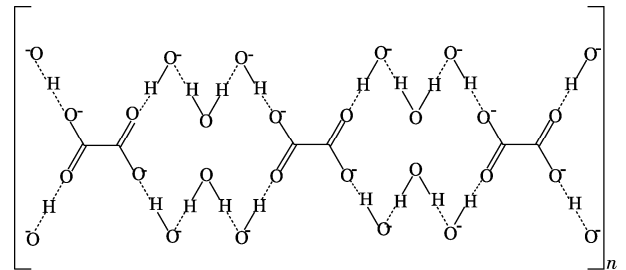


图 6 超分子聚集体

Fig. 6 Supramolecular aggregates

随着依地酸钙钠用量的加入,依地酸钙钠所解离的少量游离钙离子与草酸根结合,形成草酸钙分子,使该超分子聚集体遭到破坏,引起共振光散射现象减弱,从而产生共振光散射光谱减弱现象。随着依地酸钙钠用量的不断增加,共振光散射现象逐渐减弱,形成共振光散射光谱的强度差,并在一定范围内成线性关系。

4 讨论

在 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaOH 溶液的碱性条件下,草酸根和氢氧根以及水分子之间依靠氢键形成了 1 个超分子聚集体,引起共振光散射现象,产生共振光散射光谱。基于依地酸钙钠对草酸钠-NaOH 溶液体系共振光散射光谱的强力减弱反应,首次建立了共振光散射光谱测定依地酸钙钠注射液含量的新方法,该方法具有专属性强、稳定性好、重复性以及回收率好等优点,测定结果与药典的容量分析法基本一致,特别适用于依地酸钙钠注射液快速批量检测。

REFERENCES

- [1] LU F, ZHAO F, CAI J Y, et al. Progress in research of relationship between heavy metal exposure and cardiovascular disease[J]. Chin J Epidemiol(中华流行病学杂志), 2018, 39(1): 102-106.
- [2] LIU Y, ZHANG G, GUO Q, et al. Artificially controlled degradable inorganic nanomaterial for cancer theranostics[J]. Biomaterials, 2017(112): 204-217.
- [3] ALESSANDRO F, MARIA ELENA F. EDTA chelation therapy for the treatment of neurotoxicity[J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(5): 1019.
- [4] YING X L, GAO Z Y, MA W J, et al. Research in Ca Na₂EDTA in the treatment of chronic moderate lead poisoning in children[J]. J Clin Pediatr(临床儿科杂志), 2017, 35(9): 673-677.
- [5] KUMAR N, SONI S, SINGH T, et al. Development and optimization of gastro-retentive controlled-release tablet of calcium-disodium edentate and its *in vivo* gamma scintigraphic evaluation[J]. AAPS PharmSciTech, 2015, 16(6): 1270-1280.
- [6] QIN Y, LIANG Y. Consistency evaluation and quality management in the evaluation process for generic drugs[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2017, 34(4): 609-612.
- [7] WANG Q J, CHEN J. Progress and prospect of generic drug consistency evaluation[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2019, 36(4): 499-502.
- [8] LIU X D, HE J, ZHANG J C, et al. Brief discussion on key points for quality consistency evaluation of injections for generic drugs[J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 2018, 49(7): 999-1005.
- [9] 中国药典. 二部[S]. 2020: 附录: 811-812.

收稿日期: 2020-08-01

(本文责编: 沈倩)