

doi: 10.11751/ISSN.1002-1280.2020.06.06

离子色谱法测定磺胺氯吡嗪钠中的钠离子

杨 星¹, 高立红², 龚旭昊¹, 马秋冉¹, 董玲玲¹, 赵富华¹, 于晓辉^{1*}

(1. 中国兽药药品监察所, 北京 100081; 2. 赛默飞世尔科技(中国)有限公司, 北京 100102)

[收稿日期] 2020-03-16 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2020)06-0042-07 [中图分类号] S859.79

[摘要] 建立了离子色谱法测定磺胺氯吡嗪钠中钠离子含量的方法。试验采用 Dionex IonPac CS12A(4 mm×250 mm) 阳离子交换色谱柱, 以甲烷磺酸溶液为淋洗液, 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 30℃, 抑制型电导检测器。试验结果表明钠离子与常见成盐阳离子分离良好, 在 0.2~15 μg/mL 浓度范围内呈良好的线性关系($r^2 = 1.0000$), 加样回收率为 100.7% ($n = 9, RSD = 3.0%$)。建立的方法准确、灵敏、专属性好, 可用于测定磺胺氯吡嗪钠中钠离子的含量。

[关键词] 离子色谱; 磺胺氯吡嗪钠; 钠离子

Determination of Sodium Ion in Sulfachloropyrazine Sodium by Ion Chromatography

YANG Xing¹, GAO Li-hong², GONG Xu-hao¹, MA Qiu-ran¹, DONG Ling-ling¹,
ZHAO Fu-hua¹, YU Xiao-hui^{1*}

(China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing, 100081, China; Thermo Fisher Scientific, Beijing, 100102 China)

Corresponding author: YU Xiao-hui, E-mail: Shuilon0220@sina.com

Abstract: A method for content determination of sodium ion in sulfachloropyrazine sodium was developed by ion chromatography with inhibitory electrical conductivity detector. Analysis was performed on a Dionex IonPac CS12A column(4 mm×250 mm), using methane sulfonic acid solution as the mobile phase. The flow rate was 1.0 mL/min and the column temperature was set at 30℃. Results showed that a good separation was accepted between sodium ion and other conventional cations. The standard curve was linear in the range of 0.2~15 μg/mL ($r^2 = 1.0000$). The average recovery was 100.7% ($n = 9, RSD = 3.0%$). In conclusion, this method is accurate, sensitive and specific for the determination of sodium ion in sulfachloropyrazine sodium.

Key words: ion chromatography; sulfachloropyrazine sodium; sodium ion

作者简介: 杨 星, 助理研究员, 从事兽用化学药品检验工作。

通讯作者: 于晓辉。E-mail: Shuilon0220@sina.com

成盐是改善药物分子理化性质,提高其成药性的有效手段之一,可改变药物的溶解性,改善其依从性,提高其稳定性,减少其不良反应,而且在药物开发中,还可利用成盐来延长药物的专利保护期或规避其专利保护^[1]。磺胺氯吡嗪是磺胺类抗球虫药,对球虫具有良好的活性,作用峰期为球虫的第二代裂殖体,对第一代裂殖体亦有一定的作用。其多在球虫病爆发时短期应用,尤其是对感染后大量处于裂殖生殖阶段的球虫,具有良好的杀灭作用,同时对大部分革兰氏阴性和阳性菌具有较强的抑制作用,能预防各种细菌的继发感染^[2]。由于磺胺氯吡嗪的水溶性不佳,实际上市的药物是其钠盐磺胺氯吡嗪钠。

在化学对照品标定中,通常采用质量平衡法进行赋值,对于成盐对照品,需要准确测定成盐离子的含量。离子色谱法具有快速、方便、灵敏度高、选择性好,可同时分析多种离子,样品用量少等优点,目前已成为分析化学领域中发展最快的分析方法之一,被广泛地用于无机阴、阳离子和有机离子的测定^[3-10]。因此,本研究建立了离子色谱法测定磺胺氯吡嗪钠中钠离子的含量,该方法准确,灵敏度高,专属性强,对于磺胺氯吡嗪钠对照品的标定赋值具有重要意义。

1 仪器与试剂

Dionex Integriion 离子色谱仪,配有 CSRS 300(4 mm)抑制器,电导检测器及甲烷磺酸(MSA)在线淋洗液发生器(Thermo 公司,Chromeleon 7 色谱工作站);Milli-Q 去离子水发生系统(Millipore 公司);Mettler Toledo XS 205 型电子分析天平(Mettler 公司)。

磺胺氯吡嗪钠(扬州天和药业有限公司生产,批号:20180205);钠单元素标准溶液(国家有色金属及电子材料分析测试中心,1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$,批号:GSB04-1738-2004);阳离子混合标准溶液(Thermo,含 Li^+ 50 mg/L 、 Na^+ 200 mg/L 、 NH_4^+ 400 mg/L 、 K^+ 200 mg/L 、 Mg^{2+} 200 mg/L 、 Ca^{2+} 1000 mg/L ,批号:130204);水为 18.2 $\text{M}\Omega \cdot \text{cm}$ 超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件 色谱柱:Dionex IonPac CS12A

(250 mm \times 4 mm),保护柱:Dionex IonPac CG12A (50 mm \times 4 mm),流速:1.0 mL/min ,柱温:30 $^\circ\text{C}$,进样量:25 μL ,检测器:电导检测器,抑制器电流:117 mA,以淋洗液发生器产生的甲烷磺酸溶液为流动相,按表 1 进行梯度洗脱。

表 1 梯度淋洗条件

Tab 1 Procedure of gradient elution

时间/min	流速/($\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$)	淋洗液浓度/($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)
0.0	1.0	5.0
16.0	1.0	5.0
16.1	1.0	40.0
21.0	1.0	40.0
21.1	1.0	5.0
25.0	1.0	5.0

2.2 溶液的制备

2.2.1 系统适用性试验溶液 精密量取阳离子混合标准溶液(含 Li^+ 50 mg/L 、 Na^+ 200 mg/L 、 NH_4^+ 400 mg/L 、 K^+ 200 mg/L 、 Mg^{2+} 200 mg/L 、 Ca^{2+} 1000 mg/L)5 mL,置 100 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀。

2.2.2 对照品储备液 精密量取钠单元素标准溶液(含 Na^+ 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)10 mL,置 100 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀。

2.2.3 对照品溶液 精密量取钠单元素标准溶液(含 Na^+ 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)1 mL,置 100 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀。

2.2.4 供试品储备液 取磺胺氯吡嗪钠约 150 mg,精密称定,置 100 mL 量瓶中,加水使溶解并稀释至刻度,摇匀。

2.2.5 供试品溶液 取磺胺氯吡嗪钠约 15 mg,精密称定,置 100 mL 量瓶中,加水使溶解并稀释至刻度,摇匀。

2.2.6 线性试验溶液 精密量取对照品储备液适量,加水稀释制成含钠离子分别为 0.2、1、2、5、8、10、12、15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液。

2.2.7 回收率试验溶液 精密量取 9 份供试品储备液 5 mL,分别置 100 mL 量瓶中,再分别精密加入

对照品储备液 3、5、7 mL 各 3 份,加水稀释至刻度,摇匀,制成含钠离子 8、10、12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的溶液。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性 分别精密量取 2.2.1 项下系统适用性试验溶液、2.2.3 项下对照品溶液、2.2.5 项下

供试品溶液各 25 μL ,照 2.1 项下色谱条件测定。结果显示,在该色谱条件下, Na^+ 与 Li^+ 、 NH_4^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 均能基线完全分离, Na^+ 测定不受干扰,方法专属性强,见图 1~3 图。

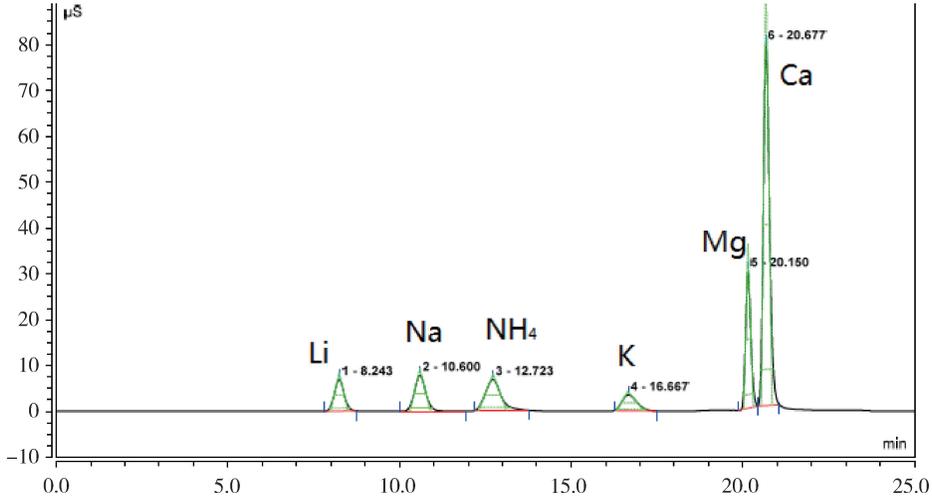


图 1 系统适用性试验溶液色谱图

Fig 1 Chromatogram of the system suitability solution

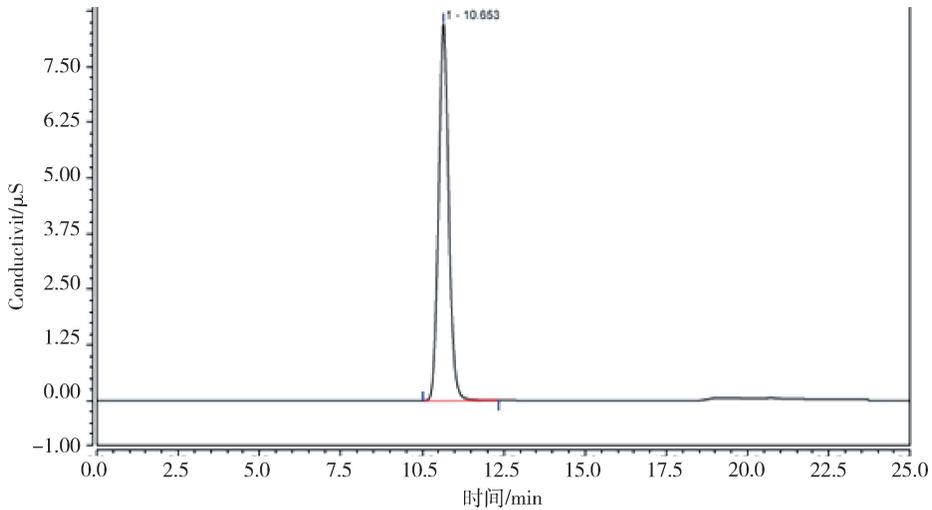


图 2 对照品溶液色谱图

Fig 2 Chromatogram of the standard solution

2.3.2 线性关系考察 分别精密量取 2.2.6 项下线性试验溶液各 25 μL ,照 2.1 项下色谱条件测定。以平均峰面积为 y 轴,钠离子浓度为 x 轴,计算回归方程。结果表明:在 0.2 ~ 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度范围内,钠离子溶液的峰面积与其浓度呈良好的线性关

系,线性方程为 $y = 0.3132x + 0.0068$, $r^2 = 1.0000$ 。

2.3.3 精密度试验 取浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的对照品溶液,照 2.1 项下色谱条件,连续重复进样 6 次,钠离子峰面积的 RSD 为 0.1%。

2.3.4 重复性试验 平行配制 6 份磺胺氯吡嗪钠

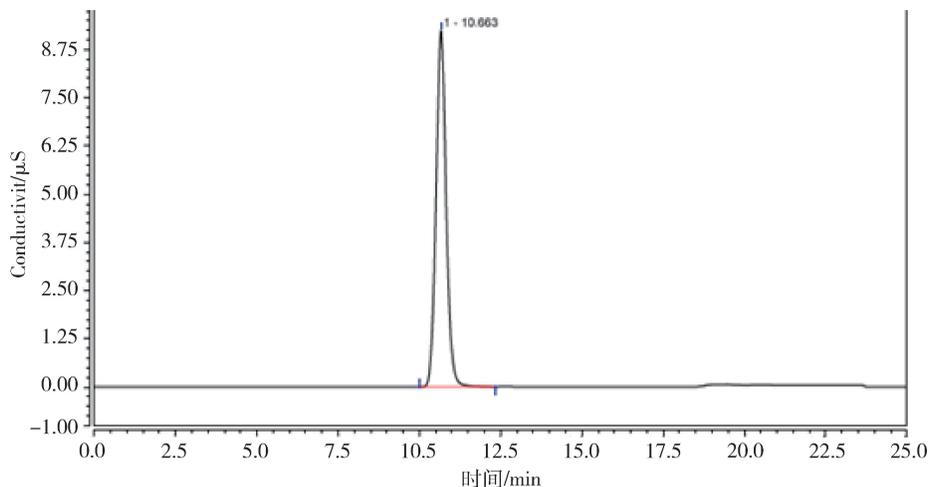


图 3 供试品溶液色谱图

Fig 3 Chromatogram of the sample solution

供试品溶液,照 2.1 项下色谱条件测定,计算钠离子的含量,平均含量为 6.67%,RSD 为 0.4%。

2.3.5 回收率试验 采用加样回收率试验测定准确度。分别精密量取 2.2.7 项下回收率试验溶液各 25 μL,照 2.1 项下色谱条件测定,采用外标法计算回收率,结果见表 2。

表 2 钠离子回收率

Tab 2 Recovery of Sodium ion

加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
0.3000	0.3202	106.7		
0.3000	0.2964	98.8		
0.3000	0.2935	97.8		
0.5000	0.4998	100.0		
0.5000	0.5168	103.4	100.7	3.0
0.5000	0.5168	103.4		
0.7000	0.6885	98.4		
0.7000	0.6907	98.7		
0.7000	0.6920	98.9		

2.3.6 检测限与定量限 取钠离子线性试验溶液适量,用水逐步稀释至一定浓度后测定,钠离子定量限为 0.2 μg/mL(S/N > 10),检测限为 0.1 μg/mL(S/N > 3)。

2.3.7 耐用性试验 采用不同柱温、不同流速进

行测定。结果如表 3 所示,不同柱温、流速的耐用性均良好,仅保留时间发生改变。

表 3 耐用性试验

Tab 3 Robustness test

色谱条件	钠离子出峰时间/min	钠离子与相邻色谱峰分离度	钠离子理论塔板数
柱温 30℃	10.600	符合规定	5211
柱温 35℃	10.373	符合规定	5599
柱温 40℃	10.177	符合规定	5725
流速 0.9 mL/min	11.753	符合规定	5450
流速 1.0 mL/min	10.600	符合规定	5211
流速 1.1 mL/min	9.640	符合规定	5027

2.3.8 样品测定 取供试品溶液,照 2.1 项下色谱条件测定,采用外标法以峰面积计算,钠离子含量为 6.66%。

3 讨论

3.1 系统适用性试验溶液的考察 为了考察环境、使用的试剂和容器中可能存在的微量 Li⁺、Na⁺、NH₄⁺、K⁺、Mg²⁺、Ca²⁺ 等阳离子对测定结果的影响^[11-12],系统适用性试验溶液选择 Thermo 公司生产的含 6 种阳离子的混合标准溶液(含 Li⁺ 50 mg/L、Na⁺ 200 mg/L、NH₄⁺ 400 mg/L、K⁺ 200 mg/L、Mg²⁺ 200 mg/L、Ca²⁺ 1000 mg/L)稀释制得。

3.2 色谱条件的考察 参考离子色谱法测定钠离子相关检测方法^[10-16], 色谱柱选择 Dionex IonPac CS12A, 流动相选择甲烷磺酸溶液(MSA), 不同文献 MSA 的浓度从 2.2 mmol/L 至 20 mmol/L 不等。本研究最初选择 15 mmol/L 的 MSA 作为淋洗液, 在该条件下系统适用性试验溶液 6 种阳离子色谱峰之间的分离度均大于 1.5, 但在测定磺胺氯吡嗪钠时发现, 虽然钠离子与铵根离子分离度大于 1.5, 但两峰的基线未完全分离。为消除铵根离子对钠离子测定的干扰, 经考察, 在淋洗液为 5 mmol/L 的 MSA 时, 钠离子与铵根离子色谱峰的基线能完全分离, 再通过梯度洗脱程序提高 MSA 浓度, 增强洗脱能力, 将其余阳离子迅速洗脱出来, 缩短检测时间。

3.3 空白干扰与进样浓度的考察 在钠离子含量测定时, 钱敏等^[10,13]选择外标法不扣除空白, 闻宏亮等^[12,14]选择标准曲线法不扣除空白, 冯光等^[11]选择标准曲线法扣除空白, 张军霞等^[15-16]选择外标法扣除空白进行计算, 为了确定选择何种方式进行计算, 本研究考察了空白对测定结果的影响。

使用 PP 进样瓶直接从超纯水机接 18.2 MΩ·cm 的去离子水作为空白时, 空白中未检出 Na⁺ (图 4), 但在进行检测限考察时发现, 钠离子对照品溶液 0.03、0.01、0.005 μg/mL 的峰面积分别为 0.0066、0.0059、0.0040, 浓度与峰面积不呈线性, 因此, 推测在溶液配制过程中引入了微量钠离子。梳理整个溶液配制过程, 需经过以下环节: 盛装去离子水的塑料瓶、移液器枪头、玻璃量瓶、一次性无菌注射器、滤头、进样瓶。经试验, 每个环节均可能引入 Na⁺, 除玻璃量瓶外, 其他环节引入钠离子的峰面积总计低于 0.004。

设计一组试验考察玻璃量瓶对空白的干扰。取 10 mL 量瓶, 用去离子水稀释至刻度, 摇匀, 取其溶液作为清洗 0 次的空白溶液; 将该量瓶中的水弃去, 再用去离子水稀释至刻度, 摇匀, 取其溶液作为清洗 1 次的空白溶液; 依次配制 10 mL 量瓶分别清洗 0、1、3、5、7、9、11 次的空白溶液, 每份溶液进样 2 次, 以清洗次数为横坐标, 平均峰面积为纵坐标, 作图(图 5)。由图可知, 当清洗 0 次时, 钠离子峰面

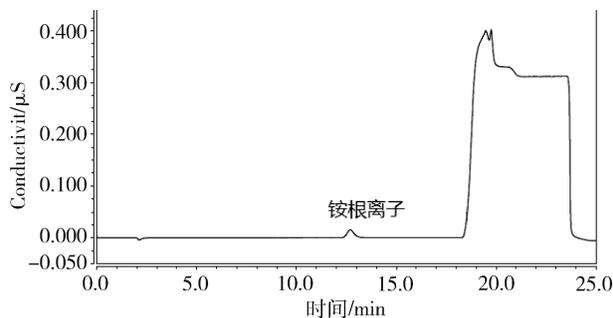


图 4 水空白 (18.2 MΩ·cm) 色谱图

Fig 4 Chromatogram of the water (18.2 MΩ·cm)

积高达 0.025, 清洗 5 次以上后, 钠离子峰面积降至低于 0.005, 与其他环节总计引入的钠离子峰面积基本一致, 可认为已消除玻璃量瓶引入的干扰。因此, 为尽可能减少实验操作引入的空白干扰, 在后续试验时, 将玻璃量瓶用去离子水清洗 9 次。同时, 为了验证 9 次的清洗次数是否充分, 本研究测定了其他两种规格量瓶 (50 mL、100 mL) 分别清洗 9 次后的空白溶液, 钠离子峰面积分别为 0.002 和 0.003 (见图 6)。

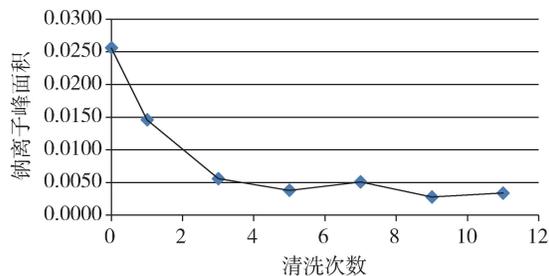


图 5 清洗次数对钠离子峰面积的影响

Fig 5 Effects of the number of cleaning on peak area

综上所述, 使用离子色谱法测定钠离子时, 为降低环境、容器和操作引入的钠离子对测定造成的干扰, 建议将量瓶用去离子水清洗 9 次, 小心操作避免汗液等污染引入钠离子。

不同文献钠离子测定时选择的进样浓度从 0.7、1.5 至 24 μg/mL 不等^[10-16], 经考察, 空白溶液、2、10 μg/mL 对照品溶液中钠离子的峰面积分别约为 0.003、0.64、3.14, 当进样浓度从 2 μg/mL 提高至 10 μg/mL 时, 空白干扰对测定结果造成的偏差从 0.5% 降低至 0.1%, 同时考虑样品是否易

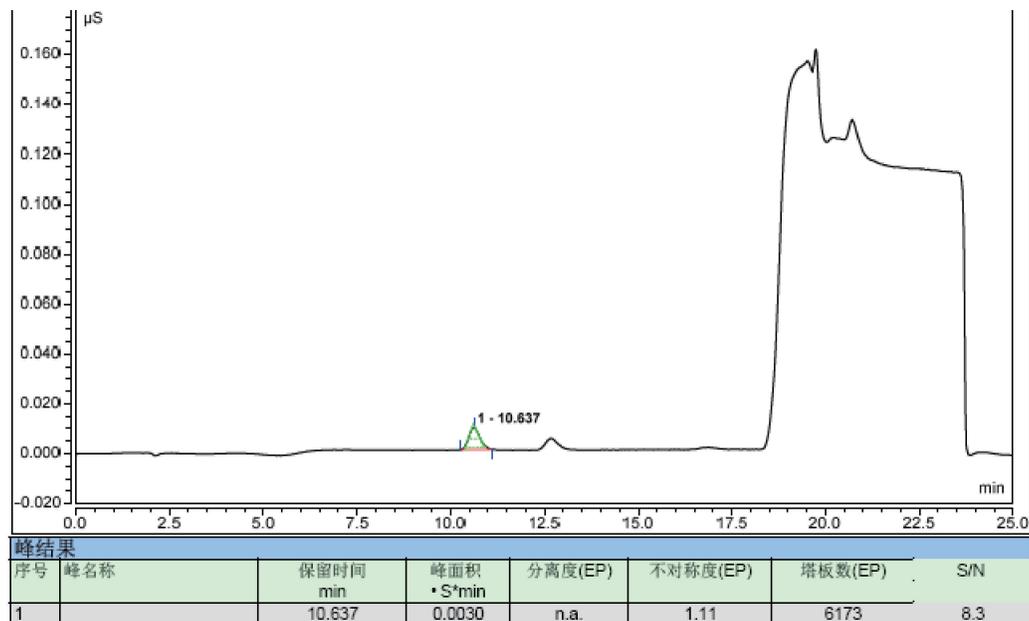


图 6 用去离子水清洗 9 次后的量瓶空白溶液色谱图

Fig 6 Chromatogram of the blank of volumetric flask with nine times cleaning

溶于水等因素,本研究选择 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ 作为进样浓度,此时空白造成的干扰较小,可不扣除空白直接采用外标法进行计算。

3.4 检测限与定量限的考察 由于空白溶液中含有钠离子干扰,本研究未选择仪器计算所得信噪比作为方法的信噪比来确定检测限与定量限,而是将空白溶液中钠离子的峰面积(低于 0.005)作为噪音,选择钠离子峰面积为 0.026(大于 3 倍的空白溶液峰面积)的浓度 $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 作为检测限,选择钠离子峰面积为 0.052(大于 10 倍的空白溶液峰面积)的浓度 $0.2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 作为定量限。

4 结论

本研究建立了离子色谱-抑制型电导检测器法测定磺胺氯吡嗪钠中钠离子的含量,该方法可实现 Na^+ 与 Li^+ 、 NH_4^+ 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 等常见阳离子的有效分离,具有专属性强、灵敏度高、操作简便、快速准确、环保无污染等特点,对磺胺氯吡嗪钠对照品的质量平衡法赋值具有重要意义。

参考文献:

[1] 沈芳,苏颖,周伟澄. 成盐药物的研究与开发[J]. 药学进

展, 2012, 36(04): 151-157.

Shen F, Su Q, Zhou W C. Research and development of pharmaceutical salts [J]. Progress in Pharmaceutical Sciences, 2012, 36(04): 151-157.

[2] 中国兽药典委员会. 兽药质量标准(化学药品卷), 2017 年版 [S].

Chinese Veterinary Pharmacopoeia Committee. Quality standards of veterinary chemical drugs, 2017 Edition [S].

[3] 王海蓝,陈引生,石晶盈. 离子色谱法在食品检测中的研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4(05): 1437-1444. Wang H L, Chen Y S, Shi J Y. Progress in Ion Chromatography in Food Analysis [J]. Journal of Food Safety and Quality, 2013, 4(05): 1437-1444.

[4] 刘朝霞,李婕,吴健敏,等. 离子色谱法测定盐酸伐昔洛韦中的氯离子[J]. 中国新药杂志, 2017, 26(03): 271-273.

Liu Z X, Li J, Wu J M, et al. Determination of chloride ion in valacyclovir hydrochloride by ion chromatography [J]. Chinese Journal of New Drugs, 2017, 26(03): 271-273.

[5] 戴青,韩宁宁,于丽娜,等. 离子色谱法测定盐酸头孢噻吩中的氯离子[J]. 中国兽药杂志, 2018, 52(04): 26-31.

Dai Q, Han N N, Yu L N, et al. Determination of Chloride Ion in Cefotiofur Hydrochloride by Ion Chromatography [J]. Chinese Journal of Veterinary Drug, 2018, 52(04): 26-31.

[6] 张才煜,张晓栋,宁保明,等. 离子色谱法测定化学对照品中盐酸盐的含量[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(06): 1005

- 1008.
- Zhang C Y, Zhang X D, Ning B M, *et al.* Determination of hydrochloride salt content in the chemical reference standards by ion chromatography [J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2018, 38(06): 1005 - 1008.
- [7] 刘朝霞, 何兰, 丁丽霞. 国内离子色谱技术在化学药品质量控制中的应用[J]. *中国药师*, 2016, 19(05): 966 - 969.
- Liu Z X, He L, Ding L X. Domestic application of ion chromatography in quality control of chemical drugs [J]. *China Pharmacist*, 2016, 19(05): 966 - 969.
- [8] 刘英, 李茜. 离子色谱在抗生素药物分析中的应用[J]. *药物分析杂志*, 2012, 32(01): 179 - 185.
- Liu Y, Li Q. Application of ion chromatography method in analysis of antibiotics [J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2012, 32(01): 179 - 185.
- [9] 李婕, 韩春霞, 黄海伟, 等. 离子色谱法测定药物中氨丁三醇的含量[J]. *中国新药杂志*, 2016, 25(06): 712 - 715.
- Li J, Han C X, Huang H W, *et al.* Determination of the content of trometamol in drugs by ion chromatography [J]. *Chinese Journal of New Drugs*, 2016, 25(06): 712 - 715.
- [10] 钱敏, 耿志旺, 彭茗, 等. 离子色谱法测定头孢曲松钠中的钠离子含量以及成盐率[J]. *药物分析杂志*, 2015, 35(03): 435 - 439.
- Qian M, Geng Z W, Peng Ming, *et al.* Determination of sodium ion and salt - forming rate in ceftriaxone sodium by ion chromatography [J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2015, 35(03): 435 - 439.
- [11] 冯光, 李苗. 离子色谱法测定口服补液盐散(II)中总钠和钾的含量[J]. *药物分析杂志*, 2013, 33(06): 1072 - 1075.
- Feng G, Li M. IC determination of total sodium and potassium in oral rehydration salt powder(II) [J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2013, 33(06): 1072 - 1075.
- [12] 闻宏亮, 赵敬丹, 秦峰, 等. 离子色谱法测定头孢噻吩钠中钠离子含量以及成盐率考察[J]. *中国药师*, 2015, 18(02): 212 - 215.
- Wen H L, Zhao J D, Qin F, *et al.* Determination of sodium and salt - forming rate in cefalotin sodium by ion chromatography [J]. *China Pharmacist*, 2015, 18(02): 212 - 215.
- [13] 赵忠琼, 梁隆, 陈媛媛. 离子色谱法测定高热值混合糖电解质注射液中阴阳离子的含量[J]. *药物分析杂志*, 2012, 32(11): 1991 - 1996.
- Zhao Z Q, Liang L, Chen Y Y. Determination of anions and cations in high - energy carbohydrate - electrolyte injection by ion chromatography [J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2012, 32(11): 1991 - 1996.
- [14] 晏菊姣, 付丽娟. 离子色谱法测定注射用头孢他啶中碳酸钠的含量[J]. *药物分析杂志*, 2010, 30(07): 1268 - 1270.
- Yan J J, Fu L J. Determination of sodium carbonate in ceftazidime for injection by ion chromatography [J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2010, 30(07): 1268 - 1270.
- [15] 张军霞, 陈炜, 仲平等. 离子色谱法测定门冬氨酸钾镁注射剂的钾、镁离子含量及钠离子杂质检查[J]. *药物分析杂志*, 2016, 36(09): 1654 - 1659.
- Zhang J X, Chen W, Zhong P, *et al.* IC determination of principal ions K^+ and Mg^{2+} and impurity Na^+ in the potassium aspartate and magnesium aspartate injection [J]. *Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2016, 36(09): 1654 - 1659.
- [16] 肖菁, 王蓉蓉, 李盼盼, 等. 离子色谱法测定门冬氨酸钾镁注射液中钾、镁和钠离子含量[J]. *中国医院药学杂志*, 2016, 36(24): 2144 - 2148.
- Xiao J, Wang R R, Li P P, *et al.* Determination of potassium, magnesium and sodium ions in potassium aspartate and magnesium aspartate injection by ion chromatography [J]. *Chinese Journal of Hospital Pharmacy*, 2016, 36(24): 2144 - 2148.

(编辑:陈希)