

Comparative Research on Two Methods of Measuring EDTA-K₂·2H₂O Content in Human Venous Blood Sample Collection Container

Yang Qin^{1,2,3} Lili Liu^{1,2,3} Fang Chen^{1,2,3} Xiaowen Bo^{1,2,3} Changshuai Zhao^{1,2,3}

1. Shandong Quality Inspection Center for Medical Devices, Jinan, Shandong, 250101, China

2. NMPA Key Laboratory for Safety Evaluation of Biomaterials and Medical Devices, Jinan, Shandong, 250101, China

3. Shandong Key Laboratory of Biological Evaluation for Medical Devices, Jinan, Shandong, 250101, China

Abstract

Objective: To investigate the value of Osmotic Pressure and titration analysis in the determination of EDTA-K₂·2H₂O in Single-use Evacuated Tubes for Blood Specimen Collection. **Methods:** The osmotic pressure method and the titration method results were compared to determine EDTA-K₂·2H₂O content of the same sample. The precision, recovery rates and detection results of the above two methods were compared. **Conclusion:** The two detection methods in determination of EDTA-K₂·2H₂O in Single-use Evacuated Tubes for Blood Specimen Collection have high recovery rate and precision. But the Osmotic Pressure method has higher request to the precision of the instrument, the comprehensive comparison results show that the titration method is superior to the osmotic pressure method.

Keywords

titration analysis; EDTA-K₂·2H₂O; Assay; Osmotic pressure method; Blood specimen collection

人体静脉血样采集容器中 EDTA-K₂·2H₂O 含量的两种测定方法的比较研究

秦洋^{1,2,3} 刘莉莉^{1,2,3} 陈方^{1,2,3} 薄晓文^{1,2,3} 赵长帅^{1,2,3}

1. 山东省医疗器械产品质量检验中心, 中国·山东 济南 250101

2. 国家药品监督管理局生物材料器械安全性评价重点实验室, 中国·山东 济南 250101

3. 山东省医疗器械生物学评价重点实验室, 中国·山东 济南 250101

摘要

目的: 比较研究渗透压法和钙滴定法测定人体静脉血样采集容器中 EDTA-K₂·2H₂O 的方法。**方法:** 通过两种方法的精密度、重现性、回收率等参数, 考察两种方法对添加剂含量测定的可行性。**结论:** 两种检测方法均具有较高精密度、重现性、回收率, 能比较准确测定采血容器中 EDTA-K₂·2H₂O 含量。相比较而言, 滴定法精密度、回收率更好, 适合测定采血容器中 EDTA-K₂·2H₂O 含量。

关键词

滴定; EDTA-K₂·2H₂O; 含量测定; 渗透压法; 采血容器

1 引言

乙二胺四乙酸可以有效地螯合血液中的钙离子, 将钙从反应点移走来阻止和终止内源性或外源性凝血过程, 从而防止血液凝固, 其对血球的凝集及血细胞的形态影响较小, 故通常使用 EDTA 盐 (2K、3K、2Na) 作为抗凝剂, 用于一般血液学检查中血细胞计数, 特别是血小板计数^[1]。其最佳浓度为 1.5~2.2mg/mL 全血。浓度过高过低均会导致白细胞分类结果不理想等^[2-4]。添加剂原料、配制、配制后的保存、

添加剂物理形态、添加设备预置添加剂等因素也会影响采血容器中添加剂的含量^[5]。ICSH 的 1993 年文件^[6]、《一次性使用真空采血管产品注册技术审查指导原则》^[3]以及行业标准 YY 0314-2007《一次性使用人体静脉血样采集容器》^[7]对 EDTA 抗凝剂含量予以限定。WS/T224-2018《真空采血管的性能验证》对添加剂性能效果提供验证途径^[8]。EDTA 盐 (2K、3K、2Na) 抗凝剂的定量显得尤为重要。

目前, 通过 EDTA 络合滴定法通过添加掩蔽剂直接测定物质中的金属含量的方法, 广泛地应用于合金成分、药物分析、

食品等领域,适用范围广^[9-13],方法成熟。借鉴食品标准^[14-15]的方法,利用适宜浓度钙标准溶液测定 EDTA 盐(2K、3K、2Na)抗凝剂含量具有一定的可行性。同时 EDTA 抗凝剂采血容器中成分单一,仅为 EDTA 盐,且添加公称容量水稀释定容后的溶液为 EDTA 盐的稀溶液,可以利用渗透压法进行定量测定^[16-17]。

本研究从线性范围、精密度、重现性、回收率等方面验证比较渗透压法和钙滴定法测定人体静脉血样采集容器 EDTA-K₂·2H₂O 浓度。以期选定合适的方法,满足检测和科研工作的需要。

2 实验方法

2.1 渗透压法

2.1.1 仪器和试剂

罗泽冰点渗透压仪(德国罗泽公司); EDTA-K₂·2H₂O(中国医药集团上海化学试剂公司,分析纯,经基准物标定溶液纯度为 99.57%)。

2.1.2 实验方法

精密称取 EDTA-K₂·2H₂O 适量,加水溶解并稀释至浓度为 10mg/mL 的溶液,作为标准贮备液。精密量取该贮备液适量加水稀释成含 EDTA-K₂·2H₂O 浓度为 1.0 ~ 3.0mg/mL 的系列标准溶液。按照《中华人民共和国药典》2015 年版四部 0632 渗透压摩尔浓度测定法^[9-10],测定每个浓度溶液的渗透压值,以浓度(mg/mL)为纵坐标,渗透压值(mOsm/kg)为横坐标绘制标准曲线,并求出回归方程。同法测量加水至公称容量的采血容器中 EDTA-K₂·2H₂O 溶液的渗透压,将测定结果代入线性回归方程计算 EDTA-K₂·2H₂O 浓度。

2.2 钙滴定法

2.2.1

试剂: 1 mol/L 氢氧化钾溶液; 羟基萘酚蓝指示剂(C₂₀H₁₂N₂O₁₁S₃Na₂, CAS # 165660-27-5, ACS 试剂级,称取 1g 羟基萘酚蓝二钠盐,与 99g 氯化钾混匀,研磨均匀,即得); 0.002mol/L 钙滴定液(购买经过认证 0.01mol/L 钙标准溶液稀释 5 倍,即得)。

2.2.2 实验方法

取适量蒸馏水溶解采血容器中添加剂,冲洗管壁和管帽,将所有溶液收集至 250mL 锥形瓶中,加入 5mL 氢氧化钾溶液和 0.3mg 羟基萘酚蓝指示剂。用 0.002mol/L 钙滴定液滴定供

试液至变成酒红色,保持 60s 不变,即为终点,记录消耗滴定液体积。并将滴定的结果用空白试验校正。1mL 钙滴定液(0.002mol/L)对应的 0.809 mg 的 EDTA-K₂·2H₂O,再将 EDTA-K₂·2H₂O 含量除以公称容量即为 EDTA-K₂·2H₂O 浓度。

3 结果与分析

3.1 线性范围实验

3.1.1 渗透压法

按照 2.1.2 项方法测定每个浓度的渗透压,计算回归方程(n=5)为: y=0.146x+0.095,相关系数 r=0.9992,结果表明: EDTA-K₂·2H₂O 浓度在 1.0~4.0mg/mL 范围内,渗透压与浓度呈正比,且相关性良好。

3.1.2 钙滴定法

临床使用的采血容器公称容量一般为 2mL~5mL,按照 2.2.2 考察钙溶液滴定体积为 1mL 至 10mL 2.0 mg/mL EDTA-K₂·2H₂O 的消耗量。以滴定体积为横坐标, EDTA-K₂·2H₂O 溶液体积为纵坐标计算回归方程(n=5)得: y=0.4049x+0.0080,相关系数 r=1.00,结果表明: 消耗的滴定液体积与 2.0 mg/mL 浓度的 EDTA-K₂·2H₂O 溶液体积在 1mL~10mL 范围内呈正比,且相关性良好。

3.2 精密度实验

分别用渗透压法和滴定法连续测定 8 次 2mL 的 2.0mg/mL EDTA-K₂·2H₂O 溶液。结果见表 1:

表 1 精密度实验结果

方法	渗透压法	滴定法
实验结果, mg/mL	1.98 1.98 1.84 1.98 1.98 1.98 1.84 1.94	2.00 1.99 1.98 2.01 2.00 1.98 2.01 2.00
平均值, mg/mL	1.94	1.99
RSD %	3.24	0.55

由以上数据可知,两种方法实验结果 RSD 值分别为 3.24% 和 0.55%,均有较好的精密度,且滴定法有更高的精密度。

3.3 重现性试验

不同实验室按照相同的实验方法对同一批次 2mL、5mL 的 2mg/mL EDTA-K₂·2H₂O 溶液进行试验,实验结果见表 2。

表 2 重现性实验结果

公称容量	实验方法	实验结果, mg/mL			
		机构 A	机构 B	机构 C	RSD%
2mL	渗透压	1.96	1.89	2.05	4.08
	滴定法	1.99	1.97	1.95	1.02
5mL	渗透压	1.74	1.84	1.78	2.82
	滴定法	1.82	1.84	1.82	0.63

测定结果显示,两种方法测定结果 RSD 值分别为 4.06% 和 2.79%、1.01% 和 0.66%, 总体测定结果表明两种方法实验室间重现性良好。

3.4 回收率实验

以 2mL 的已知 EDTA-K₂·2H₂O 含量的采血容器样品 (1.83 mg/mL) 为基质, 分别加入不同量的 EDTA-K₂·2H₂O, 进行加标回收实验。实验结果见表 3。

表 3 回收率实验结果 (n=3)

添加量, mg	方法	回收量, mg			回收率 (%)		
1.0	渗透压法	1.01	1.01	1.01	101.0	101.0	101.0
	钙滴定法	1.00	0.99	0.99	100.0	99.0	99.0
1.6	渗透压法	1.58	1.72	1.58	98.8	107.5	98.8
	钙滴定法	1.59	1.60	1.59	99.4	100.0	99.4
2.0	渗透压法	1.89	2.04	1.96	94.5	102.0	98.0
	钙滴定法	1.99	1.99	2.01	99.5	99.5	100.5

由表可知,两种方法的加标回收率分别为 94.5%~107.5% 和 99.0%~100.5%, 均小于《药品质量标准分析方法验证指导原则》要求待测成分含量在 0.1% ~ 1% 回收率要求 90%~108% 的限定, 具有良好的回收率, 测定结果较准确。

4 结论

本研究分别采用较渗透压法和钙滴定法对人体静脉血样采集容器中 EDTA 盐浓度进行测定, 结果显示两种检测方法实验结果的相对偏差较小, 方法的精密度和准确度较高, 均能够比较准确测定采血容器中 EDTA-K₂·2H₂O 含量。渗透压法的实验数据的波动也反映出, 该方法对仪器稳定性和精密度具有较高的要求。相对而言, 滴定法成本低、实验过程简便, 在精密度、重现性及回收率方面优于渗透压法, 可以为 EDTA-K₂·2H₂O 浓度的测定提供参考依据。

参考文献

- [1] 敬华, 易勇, 陈兴明, 等. 采血管与检验质量保证, 总装备部医学学报, 2010(04):34-35.
- [2] 俞善丁, 寇丽筠. 临床基础检验学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1997.
- [3] 国家食品药品监督管理局. 一次性使用真空采血管产品注册技术审查指导原则 [S]. 2011.
- [4] 秦培华. 真空采血管的使用及注意事项, 检验医学与临床 [J]. 2012(22):2911-2912.
- [5] 钟德优, 范月珍, 黄丽芳, 等. 真空采血管添加剂质量控制及其临床应用影响因素 [J]. 国际检验医学杂志, 2014(07):881-882.
- [6] 邹麟, 程大林. 五种真空促凝剂在生化检验中的应用及评价 [J]. 现代检验医学, 2007(04):22-23.
- [7] 国家食品药品监督管理局. YY0314-2007 一次性使用人体静脉血样采集容器 [S]. 2007.
- [8] 中华人民共和国卫生部. WST224-2018 真空采血管的性能验证 [S]. 2018.
- [9] 胡珊玲, 宋瑞平, 林燕, 等. EDTA 滴定法测定镁-锌-钇三元合金成分, 冶金分析, 2010(04):69-72.
- [10] 李晓晶, 马强, 盛振华, 等. ICP-OES 法与 EDTA 直接滴定法测定含石膏方剂中钙离子含量研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013(06):69-74.
- [11] 付晖, 李想, 韩蓓, 等. 络合滴定法测定复方钾钙镁溶液中氯化钙含量的方法学验证与不确定度分析 [J]. 中国医院用药评价与分析, 2019(03):331-339.
- [12] 夏黎明, 王宏青. EDTA 络合滴定钙镁方法的改进 [S]. 精细化工中间体, 1998(02):43-45.
- [13] 王也, 裘国丽, 黄华. 络合滴定法测定葡萄糖酸钙含量的不确定度评定 [J]. 海峡药学, 2011(11):54-57.