

中图分类号: R917; R927 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2025)18-0084-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2025.18.018



高效液相色谱法同时测定注射用硫化胶体冻干品中依地酸二钠和硫代硫酸钠含量*

康肖梦^{1,2,3}, 吴福海^{1,2,3}, 孙钰林^{1,2,3△}

(1. 原子高科股份有限公司, 北京 102413; 2. 国家原子能机构核技术 < 放射性药物工程转化 > 研发中心, 北京 102413; 3. 中核集团放射性药物工程技术研究中心, 北京 102413)

摘要:目的 建立同时测定注射用硫化胶体冻干品(简称冻干品)中依地酸二钠和硫代硫酸钠含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Waters XBridge C₁₈ 柱(150 mm × 4.6 mm, 3.5 μm), 保护柱为 XBridge BEH C₁₈ 柱(5 mm × 3.9 mm, 5 μm), 流动相为磷酸盐溶液(含 20 mmol/L 磷酸二氢钠和 5 mmol/L 四丁基氢氧化铵) - 甲醇(90:10, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 214 nm, 柱温为 30 °C, 进样量为 5 μL。结果 依地酸二钠和硫代硫酸钠质量浓度分别在 0.107 7~0.861 4 mg/mL($r=0.999\ 9$)和 0.109 4~0.874 8 mg/mL($r=0.999\ 7$)范围内与峰面积线性关系良好, 定量限分别为 0.107 7 mg/mL 和 0.109 4 mg/mL。精密度、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 3.0%, 平均加样回收率分别为 100.75% 和 98.41%, RSD 分别为 1.69% 和 2.20%($n=9$); 耐用性试验结果的 RSD 均小于 5.0%。3 批样品中依地酸二钠和硫代硫酸钠含量均在质量标准限定范围内, 且均值与企业原用滴定法测定结果相近。结论 该方法操作简便、结果准确, 可用于同时测定冻干品中依地酸二钠和硫代硫酸钠的含量。

关键词:注射用硫化胶体冻干品; 依地酸二钠; 硫代硫酸钠; 高效液相色谱法; 质量标准

Simultaneous Determination of Disodium Edetate and Sodium Thiosulfate in Lyophilized Products of Vulcanized Colloidal for Injection by HPLC

KANG Xiaomeng^{1,2,3}, WU Fuhai^{1,2,3}, SUN Yulin^{1,2,3}

(1. Beijing Atom High - Tech Co., Ltd., Beijing, China 102413; 2. National Atomic Energy Agency Nuclear Technology < Radioactive Drug Engineering Transformation > Research and Development Center, Beijing, China 102413; 3. China National Nuclear Corporation Radiopharmaceutical Engineering Technology Research Center, Beijing, China 102413)

Abstract: Objective To establish a high - performance liquid chromatography (HPLC) method for simultaneous determination of the contents of disodium edetate and sodium thiosulfate in lyophilized products of vulcanized colloidal for injection (referred to as lyophilized products). **Methods** The chromatographic column was Waters XBridge C₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 3.5 μm), the guard column was XBridge BEH C₁₈ column (5 mm × 3.9 mm, 5 μm), the mobile phase was phosphate solution (containing 20 mmol/L sodium dihydrogen phosphate and 5 mmol/L tetrabutylammonium hydroxide) - methanol (90:10, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 214 nm, the column temperature was 30 °C, and the injection volume was 5 μL. **Results** The linear ranges of disodium edetate and sodium thiosulfate were 0.107 7 - 0.861 4 mg/mL ($r=0.999\ 9$) and 0.109 4 - 0.874 8 mg/mL ($r=0.999\ 7$), respectively; the limit of quantitation were 0.107 7 mg/mL and 0.109 4 mg/mL, respectively. The RSDs of precision, stability, and repeatability test results were all lower than 3.0%; the average recoveries were 100.75% and 98.41%, respectively, with RSDs of 1.69% and 2.20% ($n=9$); the RSDs of robustness test results were lower than 5%. The contents of disodium edetate and sodium thiosulfate in the three batches of samples were within the specified range of the quality standard, and the average values were similar to the results obtained by the original titrimetric analysis method used by the enterprise. **Conclusions** The method is simple and accurate, which can be used for the simultaneous determination of disodium edetate and sodium thiosulfate in lyophilized products.

Key words: lyophilized products of vulcanized colloidal for injection; disodium edetate; sodium thiosulfate; HPLC; quality standard

锝[^{99m}Tc]硫化胶体注射液是一种锝[^{99m}Tc]即时标记药物, 主要用于乳腺癌和恶性黑色素瘤的淋巴结定位, 以及肝、脾、骨髓功能网状内皮细胞区域成像。注射用硫化胶体冻干品(简称冻干品)是用于制备锝[^{99m}Tc]

硫化胶体注射液的药盒, 其主要由硫代硫酸钠、依地酸二钠、明胶3种成分组成。其中硫代硫酸钠为冻干品的主要活性成分, 为后续反应提供硫原子; 明胶为大分子胶体, 包覆在硫原子聚集形成的颗粒表面, 控制颗粒的

*基金项目: 中核集团青年英才科研项目[中核科发[2023]384号]。

第一作者: 康肖梦, 女, 硕士, 工程师, 研究方向为药物分析, (电子信箱) kangxiaomeng@circ.com.cn。

△通信作者: 孙钰林, 男, 博士, 高级工程师, 研究方向为放射性药物研发, (电子信箱) sunyulin@circ.com.cn。

大小,稳定胶体溶液^[1-2];依地酸二钠为金属螯合剂,可保证药物在生产、储存和使用过程中的稳定性^[3]。每瓶冻干品规格为含硫代硫酸钠约2.0 mg,依地酸二钠约2.3 mg,企业内控质量标准规定冻干品中依地酸二钠和硫代硫酸钠含量均应在规定的80.0%~120.0%范围内。目前,依地酸二钠或硫代硫酸钠含量标准测定常用方法为滴定法,此外还包括高效液相色谱(HPLC)法^[4-6]、离子色谱法^[7]、液质联用法^[8]、紫外分光光度法^[9]等。本研究中拟建立同时测定冻干品中依地酸二钠和硫代硫酸钠含量的HPLC法,为冻干品的质量控制提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

1260型高效液相色谱仪(美国Agilent公司);MS204S型电子天平(精度为0.1 mg)、MS105型电子天平(精度为0.01 mg),均购自瑞士Mettler Toledo公司;Milli-Q纯水机(德国Merck Millipore公司)。

1.2 试剂

注射用硫化胶体冻干品(原子高科股份有限公司,批号分别为20230812,20230818,20230821);依地酸二钠标准溶液(北京北方伟业计量技术研究院,批号为2024010431,标示值0.050 07 mol/L);硫代硫酸钠对照品(上海阿拉丁生化科技股份有限公司,批号为D2110197,含量99.99%);明胶[罗赛洛(广东)明胶有限公司,批号为3455437];甲醇和无水磷酸二氢钠均为色谱纯,10%四丁基氢氧化铵水溶液、六水合氯化钴及其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Waters XBridge C₁₈柱(150 mm×4.6 mm, 3.5 μm);保护柱:XBridge BEH C₁₈柱(5 mm×3.9 mm, 5 μm);流动相:磷酸盐溶液(含20 mmol/L磷酸二氢钠和5 mmol/L四丁基氢氧化铵)-甲醇(90:10,V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:214 nm;柱温:30℃;进样量:5 μL。

2.2 溶液制备

混合对照品溶液:取六水合氯化钴适量,精密称定,加水溶解,摇匀,制成含氯化钴质量浓度为12.6 mg/mL的前处理溶液。取硫代硫酸钠对照品10 mg,精密称定,置25 mL容量瓶中,加入0.05 mol/L依地酸二钠标准溶液0.64 mL及前处理溶液0.8 mL,加水定容,摇匀,静置约30 min,即得,其中依地酸二钠质量浓度为0.43 mg/mL,硫代硫酸钠质量浓度为0.4 mg/mL,氯化钴的物质的量约为依地酸二钠的2.4倍。

供试品溶液:取前处理溶液0.37 mL,加水定容至10 mL,摇匀,制成含氯化钴质量浓度为0.466 2 mg/mL

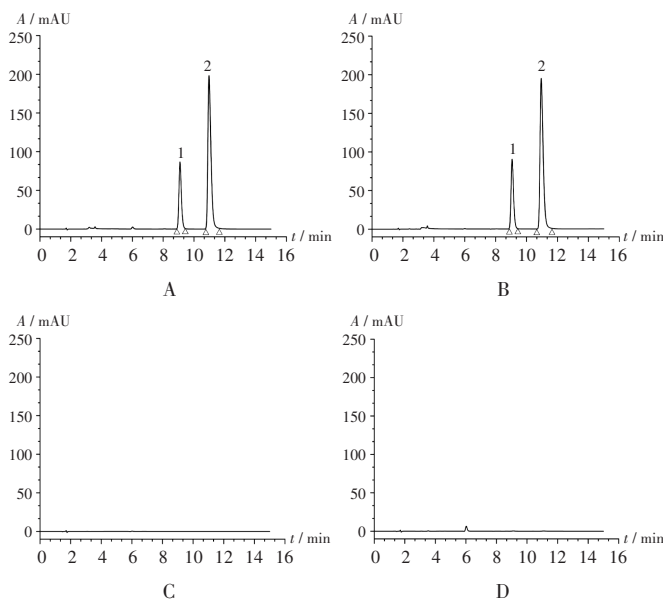
的供试品稀释液。取样品1瓶,加入供试品稀释液5 mL,摇匀,静置约30 min,即得,其中氯化钴的物质的量约为依地酸二钠的2.6倍。

阴性对照品溶液:取明胶适量,加水溶解,混匀,制成含明胶质量浓度为3.6 mg/mL的溶液。

空白对照品溶液:前处理溶液。

2.3 方法学考察

系统适用性和专属性试验:取2.2项下4种溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果2种成分不对称度均小于2.0,理论塔板数均大于2 000,两者分离度大于1.5,分离效果良好,且阴性对照无干扰,表明专属性良好。详见图1。



1. 依地酸二钠络合物 2. 硫代硫酸钠

A. 混合对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

D. 空白对照品溶液

图1 高效液相色谱图

1. Disodium edetate complex 2. Sodium thiosulfate

A. Mixed reference solution B. Test solution C. Negative reference solution D. Blank control solution

Fig.1 HPLC chromatograms

线性关系及定量限考察:按对照品溶液配制方法,制备5个不同质量浓度的系列混合对照品溶液,其中依地酸二钠质量浓度分别为0.107 7,0.215 4,0.430 7,0.706 3,0.861 4 mg/mL,硫代硫酸钠质量浓度分别为0.109 4,0.218 7,0.437 4,0.717 3,0.874 8 mg/mL。取适量,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分质量浓度(X,mg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归。以上述2种成分系列溶液的最低质量浓度作为定量限,经验证,信噪比均大于10:1。结果见表1。

精密度试验:取2.2项下混合对照品溶液5 μL,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果

表 1 线性关系及定量限考察结果 (n = 5)

Tab. 1 Results of linear relationship and quantitation limit (n = 5)

待测成分	回归方程	r	线性范围(mg/mL)	定量限(mg/mL)
依地酸二钠	$Y_1 = 37.486X_1 - 0.0567$	0.9999	0.1077~0.8614	0.1077
硫代硫酸钠	$Y_2 = 105.88X_2 + 1.7938$	0.9997	0.1094~0.8748	0.1094

依地酸二钠和硫代硫酸钠峰面积的 RSD 分别为 0.62% 和 0.67% (n = 6), 表明仪器精密度良好。

稳定性试验: 取 2.2 项下供试品溶液, 分别于室温放置 0, 6, 12, 24 h 时按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果依地酸二钠和硫代硫酸钠峰面积的 RSD 均小于 3.0% (n = 4), 表明供试品溶液室温放置 24 h 内基本稳定。

重复性试验: 取样品 (批号为 20230812) 适量, 精密称定, 共 6 份, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 并计算含量。结果依地酸二钠和硫代硫酸钠含量的 RSD 分别为 0.27% 和 0.89% (n = 6), 表明方法重复性良好。

加样回收试验: 取已知含量样品 (批号为 20230812) 适量, 共 9 份, 分别加入一定量的依地酸二钠和硫代硫酸钠单一对照品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录色谱, 并计算加样回收率。结果见表 2。

表 2 加样回收试验结果 (n = 9)

Tab. 2 Results of the recovery test (n = 9)

待测成分	样品含量(mg)	加入量(mg)	测得量(mg)	$\bar{X}$ (%)	RSD(%)
依地酸二钠	0.1636	0.2154	0.3779	100.75	1.69
	0.1636	0.2154	0.3777		
	0.1636	0.2154	0.3781		
	0.2102	0.1077	0.3188		
	0.2102	0.1077	0.3176		
	0.2102	0.1077	0.3176		
	0.3271	0.4307	0.7647		
	0.3271	0.4307	0.7773		
	0.3271	0.4307	0.7659		
硫代硫酸钠	0.1448	0.217	0.3539	98.41	2.20
	0.1448	0.217	0.3538		
	0.1448	0.217	0.3545		
	0.1862	0.1085	0.2923		
	0.1862	0.1085	0.2914		
	0.1862	0.1085	0.2930		
	0.2896	0.434	0.7254		
	0.2896	0.434	0.7333		
	0.2896	0.434	0.7259		

耐用性试验: 取 2.2 项下混合对照品溶液和供试品溶液各适量, 分别考察不同流速 (0.8, 1.0, 1.2 mL/min), 柱温 (25, 30, 35 °C), 波长 (200, 214, 250 nm) 和流动相 [磷酸盐溶液 (含 20 mmol/L 磷酸二氢钠, 3, 5, 10 mmol/L 四丁基氢氧化铵) - 甲醇 (90:10, V/V)] 对样品中依地

酸二钠和硫代硫酸钠峰面积、分离度的影响。结果在各色谱条件下, 依地酸二钠络合峰和硫代硫酸钠峰不对称度均小于 2.0、理论塔板数均大于 2000, 两者分离度均大于 1.5, 依地酸二钠和硫代硫酸钠结果的 RSD 均小于 5.0%, 表明流速、柱温、波长、流动相比比例发生一定程度变化时, 本方法能满足试验要求, 耐用性良好。

2.4 样品含量测定

取 3 批样品各 2 瓶, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 按外标法计算质量浓度, 并转换为百分含量 [依地酸二钠 (%) = (质量浓度测定值 × 稀释体积) / 2.3 × 100%; 硫代硫酸钠 (%) = (质量浓度测定值 × 稀释体积) / 2.0 × 100%]。将结果与企业原用滴定法测定结果进行对比, 质量标准限定值设定为 80.0% ~ 120.0%。结果见表 3。

表 3 样品含量测定结果 (% , n = 2)

Tab. 3 Results of the content determination of samples (% , n = 2)

批号	HPLC 法		滴定法	
	依地酸二钠	硫代硫酸钠	依地酸二钠	硫代硫酸钠
20230812	101.96	104.55	98.3	106.8
20230818	105.83	108.85	98.7	110.8
20230821	103.70	104.23	98.8	102.9
$\bar{X}$	103.83	105.88	98.6	106.8

3 讨论

3.1 前处理溶液选择

依地酸二钠同时具有氨基氮和羧基氧配位基, 故能与大部分金属离子螯合, 形成具有五元环结构的配合物, 配位比基本为 1:1。本研究利用这一特性, 筛选出合适的金属离子与依地酸二钠进行配位螯合, 形成稳定的具有紫外吸收的络合物。常见金属离子与乙二胺四乙酸 (EDTA) 形成络合物的稳定常数 (lgK_{MY}) 排序多为 Fe³⁺ (约 25.1) > Cu²⁺ (约 18.8) > Pb²⁺ (约 18.4) > Zn²⁺ (约 16.5) > Co²⁺ (约 16.3) > Ca²⁺ (约 10.7) > Mg²⁺ (8.7)^[10], 其中如 Fe³⁺、Cu²⁺ 等金属离子会与硫代硫酸钠发生氧化还原反应, 综合考虑上述螯合 lgK_{MY} 及硫代硫酸钠的还原特性, 预试验时分别考察了 Ca²⁺ (氯化钙)、Mg²⁺ (氯化镁) 和 Co²⁺ (六水合氯化钴) 3 种金属离子。结果发现, 氯化钙与依地酸二钠形成的络合物峰面积持续下降, 稳定性较差, 氯化镁与依地酸二钠形成的络合物峰拖尾情况较严重。最终使用六水合氯化钴作为前处理溶液。样品制备时, 前处理溶液用量 (物质的量) 为依地酸二钠的 1.5~4.0 倍 (优选 2.5 倍左右), 确保 Co²⁺ 与依地酸二钠充分络合的同时不影响色谱柱性能。

3.2 色谱条件选择

检测波长: 有文献报道, 硫代硫酸钠在 (215 ± 2) nm 波长处有强吸收^[11]。本研究中选择 214 nm 作为检测波长, 依地酸二钠络合物与硫代硫酸钠在该波长处均有