

中图分类号: R927.2; R979.1 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2026)03-0097-04
doi: 10.3969/j.issn.1006-4931.2026.03.018



高效液相色谱法测定脂质体制剂中依地酸二钠含量

许风伟, 叶露, 罗钟明, 马润青

(杭州高田生物医药有限公司, 浙江 杭州 310051)

摘要:目的 建立测定脂质体制剂中依地酸二钠含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 YMC Pack C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为 20 mmol/L 四丁基溴化铵与 83 mmol/L 乙酸钠混合溶液(用磷酸调 pH 至 4.0) - 甲醇(80:20, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 254 nm, 柱温为 30 °C, 进样量为 20 μL。结果 依地酸二钠的质量浓度在 0.010~0.100 mg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($R^2 = 1.0000, n = 5$); 定量限为 0.65 μg/mL; 精密性、稳定性、重复性、耐用性试验结果的 RSD 均小于 3%; 平均加样回收率为 96.46%, RSD 为 1.92% ($n = 9$)。3 批样品中依地酸二钠的含量均为 0.06 mg/mL。结论 所建立的方法操作简便、重复性好、准确度高, 可用于测定脂质体制剂中依地酸二钠的含量。

关键词: 依地酸二钠; 脂质体制剂; 高效液相色谱法; 含量测定

Content Determination of Disodium Edetate in Liposomes by HPLC

XU Fengwei, YE Lu, LUO Zhongming, MA Runqing

(High Field Biopharmaceuticals Corporation, Hangzhou, Zhejiang 310051, China)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the content determination of disodium edetate in liposomes. **Methods** The chromatographic column was YMC Pack C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was the mixture of 20 mmol/L tetrabutylammonium bromide and 83 mmol/L sodium acetate (adjusted to pH 4.0 with phosphoric acid) - methanol (80:20, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 254 nm, the column temperature was 30 °C, and the injection volume was 20 μL. **Results** The linear range of disodium edetate was 0.010 - 0.100 mg/mL ($R^2 = 1.000, n = 5$). The limit of quantification was 0.65 μg/mL. The RSDs of precision, stability, repeatability, and durability test results were all lower than 3%. The average recovery of disodium edetate was 96.46% with an RSD of 1.92% ($n = 9$). The content of disodium edetate in the three batches of samples was 0.06 mg/mL. **Conclusion** The established method is simple, with good repeatability and high accuracy, which can be used for the content determination of disodium edetate in liposomes.

Key words: disodium edetate; liposome preparations; HPLC; content determination

脂质体制剂较其他注射剂的脂质组分复杂, 不同待测化合物的溶解度差异显著, 且辅料种类繁多, 各种辅料的含量控制对脂质体制剂的安全性和有效性至关重要。辅料依地酸二钠能有效抑制制剂中的脂质氧化, 维持脂质体的结构完整性、稳定性^[1], 保持活性成分的化学稳定性, 进而提升药物质量的可控性^[2-5]。同时, 依地酸二钠含量的精确控制至关重要, 其含量过高可能引发潜在的毒性风险, 如肾脏毒性、低钙血症、肌肉痉挛、心律失常等^[6-10]。关于依地酸二钠的含量测定, 早期的滴定法操作虽简便, 但精度不高^[11-12]。由于脂质体制剂组分复杂, 其余原辅料对依地酸二钠常规的光谱法检测干扰较大^[13]。高效液相色谱(HPLC)法可测定奈替米星注射液^[14]和氯雷他定糖浆^[15]中依地酸二钠的含量, 且结果准确、稳定^[16-19]。故本研究中建立了测定脂质体制剂中依地酸二钠含量的 HPLC 法。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

UltiMate™3000 型 HPLC 仪(美国 Thermo Fisher Sci-

entific 公司, 配有自动进样器、光电二极管阵列检测器及 Chromeleon 7 工作站); MX-S 型涡旋振荡仪(大龙兴创实验仪器 <北京> 股份公司); SevenCompact™ S210 型 pH 计(精度为 0.01 g), XPR36DR 型电子天平(精度为 0.001 mg), 均购自瑞士 Mettler Toledo 公司; Centrifuge 5417R 型台式离心机(德国 Eppendorf 公司)。

1.2 试剂

脂质体制剂(批号分别为 A202302001, A202405001, A202405002), 阴性样品(不含依地二酸钠), 水为纯化水, 均由杭州高田生物医药有限公司提供; 依地酸二钠对照品(欧洲药品质量管理局, 含量为 100.0%); 甲醇(批号为 218273), 乙腈(批号为 F22M7B201), 均为色谱纯, 均购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 四丁基溴化铵(上海麦克林生化科技股份有限公司, 批号为 C14477615); 乙酸钠(批号为 C14444597), 磷酸(批号为 E2013059), 均购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 五水硫酸铜(国药集团化学试剂有限公司)。

第一作者: 许风伟, 男, 硕士研究生, 工程师, 研究方向为药剂学, (电子信箱) xufw@hf-biopharm.com。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: YMC Pack C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 20 mmol/L 四丁基溴化铵与 83 mmol/L 乙酸钠混合溶液(用磷酸调 pH 至 4.0) - 甲醇(80:20, V/V); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 254 nm; 柱温: 30 °C; 进样量: 20 μL。

2.2 溶液制备

硫酸铜溶液: 称取五水硫酸铜粉末适量, 置棕色容量瓶中, 用水稀释至浓度为 0.04 mol/L。

供试品溶液: 移取脂质体样品 200 μL, 加水 200 μL, 置孔径为 100 kd 的 1.5 mL 超滤管中, 吹打混匀, 离心(离心力为 1 000 g) 15 min, 取超滤液 200 μL, 加 10 μL 硫酸铜溶液, 混匀, 室温静置 30 min, 即得。

对照品溶液: 精密称取依地酸二钠对照品 20 mg, 置 20 mL 容量瓶中, 用水溶解, 定容, 即得对照品贮备液。取对照品贮备液 1 mL, 置 20 mL 容量瓶中, 用水溶解并定容, 即得对照品溶液。

阴性对照品溶液: 取不含依地酸二钠的脂质体样品、水各 200 μL, 置 1.5 mL 100 kd 超滤管中, 按供试品溶液制备方法制备, 即得。

空白溶液: 取水 400 μL, 置 1.5 mL 100 kd 超滤管中, 按供试品溶液制备方法制备, 即得。

系列对照品溶液: 精密称取依地酸二钠对照品 20 mg, 置 20 mL 容量瓶中, 用水溶解并定容, 即得质量浓度为 1 mg/mL 的对照品贮备液。分别精密移取对照品贮备液适量, 分别置不同容量瓶中, 用水稀释为质量浓度分别为 0.010, 0.020, 0.050, 0.075, 0.100 mg/mL 的系列标准品溶液。分别精密移取上述系列标准品溶液各 200 μL, 按供试品溶液制备方法, 即得标准曲线溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验: 取 2.2 项下空白溶液、阴性对照品溶液、对照品溶液、供试品溶液各适量, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录色谱图。结果供试品溶液色谱中, 在与对照品溶液色谱相同保留时间处有相应色谱峰出现, 且

阴性对照无干扰, 表明方法专属性良好。详见图 1。

线性关系考察: 精密移取 2.2 项下系列标准品溶液各适量, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 以依地酸二钠质量浓度(X , mg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归, 得回归方程 $Y = 9\,058.107\,2X + 2.995\,2$, $R^2 = 1.000\,0$ ($n = 5$)。结果表明, 依地酸二钠的质量浓度在 0.010 ~ 0.100 mg/mL 范围内与峰面积线性关系良好。

定量限: 取 2.2 项下对照品贮备液适量, 用水稀释为系列浓度, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 以信噪比(S/N)为 10:1 时的质量浓度为定量限。结果定量限为 0.65 μg/mL, RSD 为 0.93% ($n = 6$)。

精密度试验: 取 2.2 项下供试品溶液适量, 按 2.1 项下色谱条件于同 1 d 内连续进样测定 6 次, 记录峰面积。结果的 RSD 为 0.90% ($n = 6$), 表明仪器日内精密度良好。

重复性试验: 取同一批(批号为 A202302001)脂质体样品, 按 2.2 项下方法制备供试品溶液, 平行 6 份, 按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积, 并计算含量。结果含量为 0.07 mg/mL, RSD 为 0.31% ($n = 6$), 表明方法重复性良好。

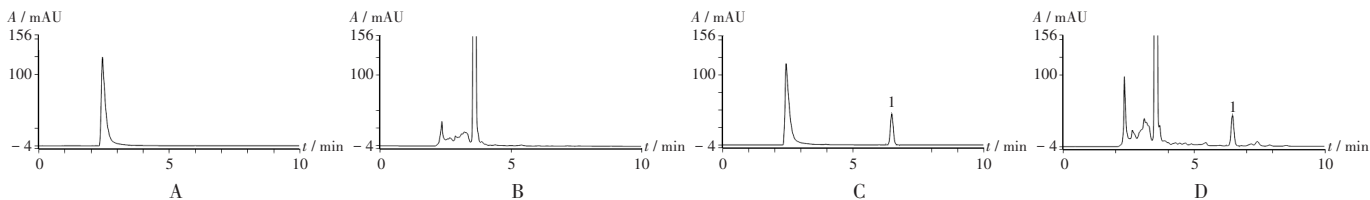
稳定性试验: 取 2.2 项下供试品溶液, 分别于室温放置 0, 10, 13, 15 h 时按 2.1 项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果的 RSD 为 0.16% ($n = 4$), 表明供试品溶液室温放置 15 h 内稳定性良好。

加样回收试验: 取脂质体样品 10 mL, 置 100 mL 容量瓶中, 平行 9 份, 分别加入依地酸二钠对照品 5, 10, 15 mg, 各 3 份, 用水定容, 分别移取上述溶液各 200 μL, 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, 并计算回收率。结果见表 1。

耐用性试验: 取 2.2 项下供试品溶液, 分别在 2.1 项下色谱条件基础上更改流速(1.2, 1.0, 0.8 mL/min)和柱温(28, 30, 32 °C)后进样测定, 并记录峰面积。结果的 RSD 均小于 3%, 表明方法耐用性良好。

2.4 样品含量测定

取 3 批(批号分别为 A202302001、A202405001、A202405002)样品各适量, 按 2.2 项下方法制备供试品



1. 依地酸二钠

A. 空白溶液 B. 阴性对照品溶液 C. 对照品溶液 D. 供试品溶液

图 1 高效液相色谱图

1. Disodium edetate

A. Blank solution B. Negative reference solution C. Reference solution D. Test solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

表1 加样回收试验结果($n = 9$)
Tab. 1 Results of the recovery test ($n = 9$)

加入量(mg)	测得量(mg)	回收率(%)	\bar{X} (%)	RSD(%)
5.31	5.06	95.29		
5.20	4.96	95.38		
5.38	5.09	94.61		
10.60	10.31	97.26		
10.64	10.26	96.43	96.46	1.92
10.63	9.99	93.98		
15.46	14.99	96.96		
15.47	15.42	99.68		
15.48	15.25	98.51		

溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并按外标法计算含量。结果3批样品中依地酸二钠的含量均为0.06 mg/mL。

3 讨论

3.1 检测方法选择

2020年版《中国药典(四部)》中采用滴定法测定辅料依地酸二钠的含量^[12]。预试验中首先考察了滴定法,但由于脂质体制剂中依地酸二钠的浓度偏低,滴定法灵敏度欠佳,加之制剂中其他辅料干扰,致使难以判断滴定终点,且该方法的重复性也欠佳。查阅文献^[14-15]发现,复杂注射剂中依地酸二钠的含量测定多通过三氯化铁或硫酸铜试剂衍生后,采用HPLC法,于254 nm波长下检测。但由于脂质体制剂中含有磷脂、胆固醇、MPEG2000-DSPE等辅料,若直接与铜离子(Cu^{2+})或三价铁离子(Fe^{3+})衍生,在254 nm波长下检测的干扰较大,严重干扰依地酸二钠的色谱峰,导致方法的专属性较差。故基于HPLC法进一步优化检测条件,最终确定2.1项下色谱条件。

3.2 供试品溶液制备方法选择

脂质体制剂的活性成分装载于粒径约80 nm的球形脂质体载体中,为供试品溶液制备带来了挑战。预试验中参考了常见脂质体制剂的处理方式,采用甲醇破乳法,以期将脂质体纳米粒分散为单个化合物分子,以便后续检测。虽使用5倍以上体积的甲醇能分散脂质体,但存在负面效应。一是依地酸二钠被进一步稀释,降低检测灵敏度;二是分散后的脂质组分干扰 Cu^{2+} 和 Fe^{3+} 的衍生,降低色谱信号值,进而降低方法的回收率和重复性。

为解决上述问题,本研究中创新性地采用孔径为100 kd的超滤管,利用其孔径精准截留脂质体纳米粒,而允许水溶性依地酸二钠小分子自由通过超滤膜的特性,成功实现脂质体组分的高效去除。同时对超滤液中的依地酸二钠小分子进行硫酸铜试剂衍生。

3.3 方法评价

本研究中建立的方法专属性强、灵敏度高、重复性好、结果准确,可用于测定脂质体制剂中依地酸二钠的含量。但本方法仅适用于脂质体膜外水溶性小分子的检测,对于脂质体膜上及脂质体膜内的组分和脂溶性强的磷脂组分的检测,仍需依据待测物的性质开发相应方法。

参考文献

- [1] JASMINE M, JEAN DAVID R, MASUMI D. Oxidative Stability in Lipid Formulations: a Review of the Mechanisms, Drivers, and Inhibitors of Oxidation [J]. AAPS PharmSciTech, 2022, 23(5):151.
- [2] HADIS A, BAHARE S, PARASTOO P, et al. Encapsulation of marine bioactive compounds using liposome technique: Evaluation of physicochemical properties and oxidative stability during storage [J]. Food Structure, 2023, 35: 100308.
- [3] MICHAEL L, SUSANNE S, GWENDOLA P, et al. Liposome oxidation model: A novel model to test the oxidative stability of polyunsaturated fatty acids under conditions representative for biological membranes [J]. Abstracts of Papers of the American Chemical Society, 2009, 238:288.
- [4] GUNER S, OZTOP HM. Food grade liposome systems: Effect of solvent, homogenization types and storage conditions on oxidative and physical stability [J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2017, 513:468-478.
- [5] KARKAD AA, PIRKOVIĆ A, MILOŠEVIĆ M, et al. Silibinin - Loaded Liposomes: The Influence of Modifications on Physicochemical Characteristics, Stability, and Bioactivity Associated with Dermal Application [J]. Pharmaceutics, 2024, 16(11):1476.
- [6] WANG Y, TANG ZL, MENG RQ, et al. Side effects of incardronate disodium compared to pamidronate disodium in the treatment of bone metastasis pain: a systematic review and meta-analysis [J]. Ann Palliat Med, 2021, 10(11):11950-11959.
- [7] SMITH SW. The role of chelation in the treatment of other metal poisonings [J]. J Med Toxicol, 2013, 9(4):355-369.
- [8] LAMAS AG, NAVAS-ACIEN A, MARK BD, et al. Heavy Metals, Cardiovascular Disease, and the Unexpected Benefits of Chelation Therapy [J]. J Am Coll Cardiol, 2016, 67(20):2411-2418.
- [9] 任铁石, 顾光霞. 依地酸二钠钙联合微量元素合剂治疗铅中毒108例临床分析 [J]. 新乡医学院学报, 2006, 23(1):82-83.
- [10] 朱光辉, 戴植本. 复方胆盐依地酸二钠乙酰胺半胱氨酸和单辛酯交替应用溶解胆管残留结石的临床研究 [J]. 广东医学, 1996, 17(10):662-663.
- [11] HINSVARK NO, O'HARA JF. Determination of Total Sulfur in Petroleum Products. Combustion and Disodium Ethylenediamine Tetraacetate Titrimetric Method [J]. Anal Chem, 1957, 29(9):1318-1322.
- [12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(四部) [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020:688-689.