中图分类号：R927.2；R986　　文献标志码：A　　文章编号：1006－4931(2024)01－0083－05
doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2024.01.018

高效液相色谱法测定复方甘草酸单铵系列注射剂中乙二胺四乙酸二钠含量

路愜楠，田晓彤，王　柳，张轶华，高燕霞△

（河北省药品医疗器械检验研究院·国家药品监督管理局仿制药质量控制与评价重点实验室，河北 石家庄　050200）

摘要：目的　建立快速测定复方甘草酸单铵系列注射剂中乙二胺四乙酸二钠(EDTA－2Na)含量的高效液相色谱(HPLC)法。**方法**　色谱柱为 Hypersil GOLD C_{18} 柱(250 mm×4.6 mm，5 μm)，流动相为 50 mmol/L 磷酸二氢钠溶液(含 5 mmol/L 四丁基溴化铵，用磷酸溶液调 pH 至 4.5)－乙腈(90∶10，*V*/*V*)，流速为 1.0 mL/min，检测波长为 257 nm，柱温为 40 ℃，进样量为 10 μL。**结果**　EDTA－2Na 质量浓度在 2～200 μg/mL 范围内与 EDTA－Fe^{3+} 线性关系良好(R^2=0.999 8，n=7)；检测限为 0.02 μg/mL，定量限为 0.06 μg/mL；精密度、重复性、稳定性试验的 *RSD* 均小于 2.0%；复方甘草酸铵注射液、复方甘草酸单铵注射液、复方甘草酸单铵 S 氯化钠注射液、甘草酸单铵半胱氨酸氯化钠注射液、注射用复方甘草酸单铵 S 的平均回收率分别为 100.57%，100.90%，100.86%，100.95%，101.03%，*RSD* 分别为 0.21%，0.82%，0.60%，0.64%，0.67%(n=9)。2 家生产企业的样品中均未检出 EDTA－2Na，7 家生产企业的样品中 EDTA－2Na 含量均超出浓度(*m*/*V*)范围 0.005%～0.1%，其他生产企业的样品中 EDTA－2Na 含量均在限定浓度范围内。**结论**　该方法操作简便、重复性好、准确度高，可用于复方甘草酸单铵系列注射剂中 EDTA－2Na 的含量测定。各生产企业样品中 EDTA－2Na 添加量差异较大，其处方合理性有待提升。

关键词：复方甘草酸单铵系列注射剂；乙二胺四乙酸二钠；高效液相色谱法；快速测定；合理性评估

Content Determination of Ethylenediaminetetraacetic Acid Disodium in Compound Ammonium Glycyrrhetate Series Injections by HPLC

LU Qienan, TIAN Xiaotong, WANG Liu, ZHANG Yihua, GAO Yanxia

(Hebei Institute for Drug and Medical Device Control · NDMA Key Laboratory for Quality Control and Evaluation of Generic Drug, Shijiazhuang, Hebei, China　050200)

Abstract: Objective　To establish a high－performance liquid chromatography (HPLC) method for the rapid determination of ethylenediaminetetraacetic acid disodium (EDTA-2Na) in Compound Ammonium Glycyrrhetate Series Injections. **Methods**　The chromatographic column was Hypersil GOLD C_{18} column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was 50 mmol / L sodium dihydrogen phosphate solution (containing 5 mmol / L tetrabutylammonium bromide, pH was adjusted to 4.5 with phosphoric acid solution) － acetonitrile (90∶10, *V* / *V*), the flow rate was 1.0 mL / min, the detection wavelength was 257 nm, the column temperature was 40 ℃, and the injection volume was 10 μL. **Results**　The mass concentration of EDTA － 2Na showed a good linear relationship with EDTA － Fe^{3+} in the range of 2 － 200 μg / mL (R^2 = 0.999 8, n = 7). The limit of detection (LOD) was 0.02 μg / mL, and the limit of quantitation (LOQ) was 0.06 μg / mL. The *RSD*s of precision, repeatability, and stability tests were lower than 2.0%. The average recoveries of Compound Ammonium Glycyrrhizin Injection, Compound Ammonium Glycyrrhetate Injection, Compound Ammonium Glycyrrhetate S and Sodium Chloride Injection, Compound Ammonium Glycyrrhetate Cysteine Sodium Chloride Injection, and Compound Ammonium Glycyrrhetate S for Injection were 100.57%, 100.90%, 100.86%, 100.95%, and 101.03% with *RSD*s of 0.21%, 0.82%, 0.60%, 0.64%, and 0.67% (n = 9), respectively. No EDTA － 2Na was detected in the samples from two manufacturers, and the content of EDTA － 2Na in the samples from seven manufacturers exceeded the concentration (*m* / *V*) range of 0.005% － 0.1%. The content of EDTA － 2Na in the samples from other manufacturers was within the limited concentration range. **Conclusion**　This method is simple, reproducible, and accurate, which can be used for the determination of EDTA － 2Na in Compound Glycyrrhetate Series Injections. The additional amount of EDTA － 2Na in samples from different manufacturers varies greatly, and its rationality needs to be further improved.

Key words: Compound Glycyrrhetate Series Injections; EDTA － 2Na; HPLC; rapid determination; rationality evaluation

复方甘草酸单铵系列注射剂是由甘草酸单铵、甘氨酸、盐酸半胱氨酸组成的复方制剂，主要用于治疗湿疹、皮炎、荨麻疹、慢性肝病及改善肝功能异常[1－3]。乙二胺四乙酸二钠(EDTA－2Na)作为药物制剂中常用的螯合剂，是注射剂中常用的稳定剂和掩蔽剂，进入血液后可与钙离子结合，导致血钙降低，故需严格控制其添

第一作者：路愜楠，女，硕士研究生，主管药师，研究方向为药物分析，(电子信箱)851264618@qq.com。
△**通信作者：**高燕霞，女，硕士研究生，主任药师，研究方向为药品质量控制和药物分析，(电子信箱)657968434@qq.com。

加量，已有文献研究其含量测定方法[4-11]。复方甘草酸单铵系列制剂临床应用广泛，处方中多含有EDTA－2Na。前期研究显示，各生产企业制剂中EDTA－2Na添加量差异较大，且原研制剂中未添加EDTA－2Na。原研制剂上市较早，随着药物制剂理念的更新及工艺的发展，各仿制药企业可能研制出较原研制剂更合理的处方与工艺。本研究中建立了快速测定复方甘草酸单铵系列注射剂中EDTA－2Na含量的高效液相色谱（HPLC）法。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

S6000 PLUS型高效液相色谱仪（华谱科仪＜北京＞科技有限公司）；XSR205DU/A型电子天平（精度为0.01 g），S220型酸度计，均购自瑞士Mettler Toledo公司。

1.2 试药

EDTA－2Na对照品（曼哈格＜上海＞生物科技有限公司，批号为D0017327，纯度为99.9%）；甲醇（色谱纯，美国Sigma公司）；三氯化铁（分析纯，天津市博迪化工有限公司）；其余试剂均为分析纯，水为超纯水；复方甘草酸单铵系列注射剂35批，样品信息见表1。

表1 复方甘草酸单铵系列注射剂样品信息

Tab. 1 Information of Compound Glycyrrhetate Series Injections

药品名称	生产企业	批号	规格（按甘草酸铵计）
复方甘草酸铵注射液	A	2008007	2 mg/mL
	B	2008538，2103204，2108628	2 mg/mL
	C	20210505，20220108，20210901	2 mg/mL
复方甘草酸单铵注射液	D	21082811，22022011，22022211	2 mg/mL
	E	1B211108101，1B211108102，1B211108202	2 mg/mL
	F	2107110141，2107130141	2 mg/mL
	G	2111001，2112004	2 mg/mL
复方甘草酸单铵S氯化钠注射液	H	2110093101	0.8 mg/mL
	I	21082501	0.8 mg/mL
甘草酸单铵半胱氨酸氯化钠注射液	J	2022020902，2022030305，2021052002	0.6 mg/mL
注射用复方甘草酸单铵S	K	2111013	每瓶40 mg
	L	9215210401，9215210402，9215210403	每瓶40 mg
	M	20211101	每瓶80 mg
	N	0210419，0211028，0211029	每瓶80 mg
	O	210604，220102，220202	每瓶40 mg
	P	09211101	每瓶40 mg
	Q	32220001	每瓶40 mg

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱：Hypersil GOLD C_{18}柱（250 mm×4.6 mm，5 μm）；流动相：50 mmol/L磷酸二氢钠溶液（含5 mmol/L四丁基溴化铵，用磷酸溶液调pH至4.5）－乙腈（90∶10，*V*/*V*）；流速：1.0 mL/min；柱温：40 ℃；检测波长：257 nm；进样量：10 μL。

2.2 溶液制备

衍生化溶液：取三氯化铁0.54 g，精密称定，加水200 mL溶解，摇匀，制成含Fe^{3+}约为0.01 mol/L的溶液。

对照品溶液：取EDTA－2Na对照品51.12 mg，精密称定，置50 mL容量瓶中，加水溶解并定容，摇匀，作为EDTA－2Na对照品贮备液A（质量浓度为1 000 μg/mL）；精密量取EDTA－2Na对照品贮备液A 2 mL，置50 mL容量瓶中，加水稀释并定容，摇匀，作为EDTA－2Na对照品贮备液B（质量浓度为40 μg/mL）；精密量取EDTA－2Na对照品贮备液A 2 mL，置100 mL容量瓶中，加衍生化溶液1 mL，再加水定容，摇匀，即得EDTA－2Na对照品溶液。

供试品溶液：1）复方甘草酸铵注射液。精密量取样品2 mL，置20 mL容量瓶中，加衍生化溶液1 mL，再加水定容，摇匀，即得。2）复方甘草酸单铵注射液。操作同复方甘草酸铵注射液。3）复方甘草酸单铵S氯化钠注射液。精密量取样品5 mL，置20 mL容量瓶中，加衍生化溶液1 mL，再加水定容，摇匀，即得。4）甘草酸单铵半胱氨酸氯化钠注射液。精密量取样品12 mL，置20 mL容量瓶中，加衍生化溶液1 mL，再加水定容，摇匀，即得。5）注射用复方甘草酸单铵S。取样品50 mg，精密称定，置20 mL容量瓶中，加衍生化溶液1 mL，再加水定容，摇匀，即得。

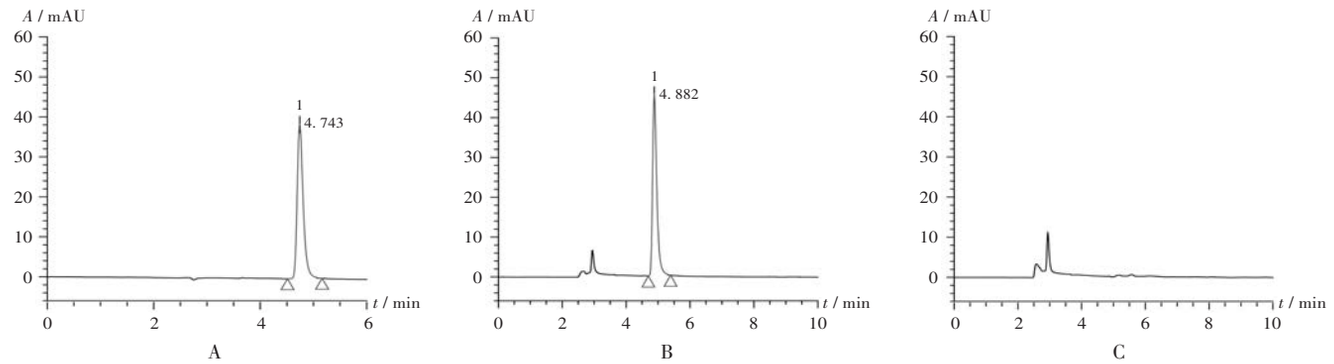
阴性对照品溶液：选用所有制剂中的辅料，按处方中的最大用量制备溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验：吸取2.2项下对照品溶液、供试品溶液、阴性对照品溶液各适量，按2.1项下色谱条件进样测定。供试品溶液色谱中，在与对照品溶液相同保留时间处有相应色谱峰出现，且阴性对照无干扰。详见图1。

线性关系考察：取EDTA－2Na对照品贮备液A，加衍生化溶液1 mL，得EDTA－2Na质量浓度分别为200，100，50，20，10，5，2 μg/mL的系列标准曲线溶液，按2.1项下色谱条件进样测定，以EDTA－2Na质量浓度（*X*，μg/mL）为横坐标、EDTA－Fe^{3+}峰面积（*Y*）为纵坐标进行线性回归，得回归方程$Y=14\,335.0425X+4\,510.4042$（$R^2=0.9998$，$n=7$）。结果表明，EDTA－2Na质量浓度在2～200 μg/mL范围内与EDTA－Fe^{3+}峰面积线性关系良好。

定量限与检测限确定：吸取EDTA－2Na对照品贮备液B适量，置20 mL容量瓶中，加衍生化溶液1 mL，再加水定容，摇匀，制成系列质量浓度的溶液，按2.1项下色谱条件进样测定，以信噪比（*S*/*N*）为3∶1时的质量浓



1. 乙二胺四乙酸二钠

A. 对照品溶液　B. 供试品溶液（批号为 210604）　C. 阴性对照品溶液

图 1　高效液相色谱图

1. EDTA - 2Na

A. Reference solution　B. Test solution (batch number: 210604)　C. Negative reference solution

Fig. 1　HPLC chromatograms

度为检测限，以 *S* / *N* 为 10∶1 时的质量浓度为定量限。结果检测限为 0. 02 μg / mL，定量限为 0. 06 μg / mL。

精密度试验：精密量取 2. 2 项下 EDTA - 2Na 对照品贮备液 B 10 mL，置 20 mL 容量瓶中，加衍生化溶液 1 mL，再加水定容，摇匀，按 2. 1 项下色谱条连续进样测定 6 次，记录色谱图。结果 EDTA - Fe^{3+} 峰面积的 *RSD* 为 0. 22%（n = 6），表明仪器精密度良好。

重复性试验：精密量取复方甘草酸单铵 S 氯化钠注射液（批号为 2110093101）5 mL，置 20 mL 容量瓶中，按 2. 2 项下方法平行制备供试品溶液 6 份，按 2. 1 项下色谱条件进样测定，记录色谱图。结果 EDTA - Fe^{3+} 峰面积的 *RSD* 为 0. 99%（n = 6），表明方法重复性良好。

稳定性试验：精密量取 2. 2 项下 EDTA - 2Na 对照品贮备液 B 10 mL，置 20 mL 容量瓶中，加衍生化溶液 1 mL，再加水定容，摇匀，分别于制备后 0，2，4，8，12 h 时按 2. 1 项下色谱条件进样测定，记录色谱图。结果 EDTA - Fe^{3+} 峰面积的 *RSD* 为 0. 43%（n = 5），表明 EDTA - 2Na 溶液在 12 h 内稳定性良好。

加样回收试验：分别精密量取 2. 2 项下复方甘草酸铵注射液、复方甘草酸单铵注射液、复方甘草酸单铵 S 氯化钠注射液、甘草酸单铵半胱氨酸氯化钠注射液（批号分别为 2008538，1B211108101，2110093101，2022020902）1，1，2. 5，6 mL，置 20 mL 容量瓶中，共 9 份；另取注射用复方甘草酸单铵 S（批号为 9215210403）0. 5 g，精密称定，置 20 mL 容量瓶中，加水定容，摇匀，精密量取上述溶液各 1 mL，置 20 mL 容量瓶中，共 9 份。上述溶液分别按高、中、低质量浓度加入 EDTA - 2Na 对照品贮备液 B，各 3 份，分别加衍生化溶液 1 mL，加水定容，依法制备供试品溶液，按 2. 1 项下色谱条件进样测定。结果见表 2。

2. 4　样品含量测定

取复方甘草酸单铵系列注射剂各适量，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。《药用辅料手册》记载，EDTA - 2Na 在药物中作为螯合剂的一般浓度（*m* / *V*）为 0. 005% ~ 0. 1%[12]。本研究中复方甘草酸铵注射液生产企业 B 和 C 的样品中均未检出 EDTA - 2Na，复方甘草酸单铵 S 氯化钠注射液和甘草酸单铵半胱氨酸氯化钠注射液生产企业的测定结果均在限定浓度范围内；注射用复方甘草酸单铵 S 生产企业 K - Q 的样品中 EDTA - 2Na 含量均超标。详见表 3。

3　讨论

3. 1　衍生化试剂选择

EDTA 可与金属元素螯合，直接进样测定受金属元素影响，主峰拖尾严重[13]。EDTA 与常见金属离子的稳定常数的对数值（$\lg K_{MY}$）Fe^{3+} 为 24. 23，Cu^{2+} 为 18. 7，Ca^{2+} 为 10. 69。结果表明 Fe^{3+} 稳定性最高，生成的螯合物 EDTA - Fe^{3+} 最稳定[14]。前期试验中分别考察了三氯化铁和硫酸铜作为衍生化试剂，结果 EDTA - Fe^{3+} 的色谱峰对称性更佳，故选择三氯化铁作为衍生化试剂。曾考察 0. 01 mol / L 三氯化铁的用量，结果用量为 1. 0 mL 时可保证对照品溶液和供试品溶液中 2 000 μg 的 EDTA 全部转化为螯合物 EDTA - Fe^{3+}，故衍生化试剂采用含 0. 01 mol / L Fe^{3+} 的溶液。

3. 2　基于一致性评价维度分析

原研制剂复方甘草酸苷注射液中未检出 EDTA - 2Na，目前市场销售的注射用剂型中含量均超标，最大含量超出限度的 10 倍。注射液剂型中，仅 2 家生产企业的产品中未添加 EDTA - 2Na，其余生产企业的产品中均添加，且添加量差异较大。随着技术的进步和安全用药意识的增强，原研制剂处方中 EDTA - 2Na 用量逐渐减少。作为 EDTA - 2Na 的替代品，依地酸钠钙已被多方推荐[15]。建议生产企业以此为标准，重新评估上述 5 个产品处方的合理性。

表 2 复方甘草酸单铵系列注射剂加样回收试验结果（$n=9$）

Tab. 2 Results of the recovery test of Compound Glycyrrhetate Series Injections ($n=9$)

药品名称	样品浓度（μg/mL）	添加浓度（μg/mL）	测定浓度（μg/mL）	回收率（%）	$\bar{X}$（%）	RSD（%）
复方甘草铵注射液	0	16.342	16.456	100.70		
	0	16.342	16.480	100.84		
	0	16.342	16.472	100.80		
	0	20.428	20.479	100.25		
	0	20.428	20.539	100.54	100.57	0.21
	0	20.428	20.498	100.34		
	0	24.513	24.612	100.40		
	0	24.513	24.688	100.71		
	0	24.513	24.652	100.57		
复方甘草酸单铵注射液	10.026	6.128	16.254	101.63		
	10.026	6.128	16.261	101.75		
	10.026	6.128	16.274	101.96		
	10.026	10.214	20.302	100.61		
	10.026	10.214	20.364	101.21	100.90	0.82
	10.026	10.214	20.353	101.11		
	10.026	14.299	24.279	99.68		
	10.026	14.299	24.318	99.95		
	10.026	14.299	24.354	100.20		
复方甘草酸单铵S氯化钠注射液	10.110	6.128	16.307	101.13		
	10.110	6.128	16.353	101.88		
	10.110	6.128	16.322	101.37		
	10.110	10.214	20.442	101.16		
	10.110	10.214	20.415	100.89	100.86	0.60
	10.110	10.214	20.409	100.83		
	10.110	14.299	24.434	100.17		
	10.110	14.299	24.402	99.95		
	10.110	14.299	24.466	100.40		
甘草酸单铵半胱氨酸氯化钠注射液	8.481	6.128	14.701	101.50		
	8.481	6.128	14.712	101.68		
	8.481	6.128	14.727	101.93		
	8.481	10.214	18.734	100.38		
	8.481	10.214	18.795	100.98	100.95	0.64
	8.481	10.214	18.788	100.91		
	8.481	14.299	22.789	100.06		
	8.481	14.299	22.834	100.38		
	8.481	14.299	22.878	100.69		
注射用复方甘草酸单铵S	9.707	6.128	15.919	101.37		
	9.707	6.128	15.927	101.50		
	9.707	6.128	15.954	101.94		
	9.707	10.214	20.102	101.77		
	9.707	10.214	20.026	101.03	101.03	0.67
	9.707	10.214	19.988	100.65		
	9.707	14.299	24.122	100.81		
	9.707	14.299	24.023	100.12		
	9.707	14.299	24.019	100.09		

表 3 样品中 EDTA－2Na 含量测定结果（%）

Tab. 3 Results of content determination of EDTA－2Na in samples (%)

药品名称	生产企业	批号	浓度*
复方甘草酸铵注射液	A	2008007	0.015
	B	2008538,2103204,2108628	均未检出
	C	20210505,20220108,20210901	均未检出
复方甘草酸单铵注射液	D	21082811,22022011,22022211	0.019,0.020,0.019
	E	1B211108101,1B211108102,1B211108202	0.020,0.020,0.020
	F	2107110141,2107130141	0.019,0.019
	G	2111001,2112004	0.020,0.019
复方甘草酸单铵S氯化钠注射液	H	2110093101	0.008 1
	I	21082501	0.007 3
甘草酸单铵半胱氨酸氯化钠注射液	J	2022020902,2022030305,2021052002	0.002 8,0.002 8,0.002 8
注射用复方甘草酸单铵S	K	2111013	1.20
	L	9215210401,9215210402,9215210403	0.76,0.78,0.78
	M	20211101	0.19
	N	0210419,0211028,0211029	0.22,0.22,0.22
	O	210604,220102,220202	0.76,0.76,0.76
	P	09211101	0.80
	Q	32220001	0.82

注：*指每 100 mL 或 100 g 样品中所含待测物含量。

Note:* refers to the content of the substance to be tested in every 100 mL or 100 g of the sample.

参考文献

[1] 魏 洁，颜元良，曾双双，等. 复方甘草酸苷注射液的临床应用及分析[J]. 中国药业，2019，28(15)：79－81.

[2] 吴志鹏. 复方甘草酸铵治疗湿疹性皮炎临床疗效分析[J]. 中国实用医药，2016，11(8)：142－143.

[3] 禚旭晶，苑振亭. 高效液相色谱法测定复方甘草酸单铵 S 氯化钠注射液中的甘草酸单铵 S 的含量[J]. 中国药物与临床，2011，11(8)：922－923.

[4] 赵 磊，刘北力，蒋黄卉，等. 高效液相色谱法测定碳酸氢钠注射液中乙二胺四乙酸二钠[J]. 化学分析计量，2020，29(1)：23－25.

[5] 陈 希，鄢雷娜，段和祥，等. HPLC 法测定乳酸左氧氟沙星氯化钠注射液中的依地酸二钠[J]. 中国抗生素杂志，2022，47(3)：252－256.

[6] 郭丹峰，雷建刚，章泽恒，等. 高效液相色谱法测定克林霉素磷酸酯注射液中依地酸二钠含量[J]. 中南药学，2021，