

双波长HPLC法同时测定盐酸氮草斯汀鼻喷雾剂中主成分与依地酸二钠的含量



罗晓磊^{1, 2}, 李翊桐³, 秦立^{1, 2}

1. 云南省食品药品监督检验研究院 (昆明 650106)
2. 工业和信息化部产业技术基础公共服务平台 (昆明 650106)
3. 中国药科大学中药学院 (南京 211198)

【摘要】目的 建立双波长HPLC柱前衍生化方法同时测定盐酸氮草斯汀鼻喷雾剂中盐酸氮草斯汀与依地酸二钠的含量。**方法** 色谱柱为Waters XTerra RP₁₈柱 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相为乙腈-醋酸-醋酸钠缓冲液 (pH 4.5, 含 10 mmol/L 四丁基溴化铵), 梯度洗脱; 柱温为 30 °C; 检测波长分别为 289 nm (盐酸氮草斯汀) 和 254 nm (依地酸二钠); 流速为 1.0 mL/min; 进样体积为 20 μL。**结果** 盐酸氮草斯汀和依地酸二钠分别在 10.11 ~ 202.19 μg/mL、5.47 ~ 109.53 μg/mL 范围内, 浓度与峰面积的线性关系良好 ($r \geq 0.9999$); 平均回收率分别为 99.3% 和 99.7%, RSD 均小于 0.8% ($n = 9$); 定量限分别为 0.40、0.22 μg/mL; 精密度、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 2.0% ($n = 6$)。**结论** 该方法操作简便, 重复性和准确度良好, 可以同时测定盐酸氮草斯汀鼻喷雾剂中盐酸氮草斯汀与依地酸二钠的含量。

【关键词】 高效液相色谱法; 鼻喷雾剂; 盐酸氮草斯汀; 依地酸二钠; 含量测定

【中图分类号】 R927.2

【文献标识码】 A

Simultaneous determination of principal component and disodium edetate in azelastine hydrochloride nasal spray by dual-wavelength HPLC

LUO Xiaolei^{1,2}, LI Yitong³, QIN Li^{1,2}

1. Yunnan Institute for Food and Drug Control, Kunming 650106, China
 2. Industrial Technology Basic Public Service Platform of the Ministry of Industry and Information Technology, Kunming 650106, China
 3. China Pharmaceutical University School of Traditional Chinese Pharmacy, Nanjing 211198, China
- Corresponding author: QIN Li, Email: 987385622@qq.com

【Abstract】Objective To establish a dual-wavelength HPLC method with pre-column derivatization for the determination of azelastine hydrochloride and disodium edetate in azelastine hydrochloride nasal spray. **Methods** The chromatographic column was Waters XTerra RP₁₈ column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase was acetonitrile-acetic acid-sodium acetate buffer (pH 4.5) containing 10 mmol/L tetrabutylammonium bromide, and gradient elution was employed. The column temperature was set at 30 °C. The detection wavelengths were set at 289 nm for azelastine hydrochloride and 254 nm for disodium edetate. The flow rate was 1.0 mL/min and injection volume was 20 μL. **Results** Good linear relationships between the concentration and peak area were obtained for azelastine hydrochloride and disodium edetate over the ranges of 10.11-

202.19 $\mu\text{g/mL}$ and 5.47-109.53 $\mu\text{g/mL}$, respectively ($r \geq 0.999\ 9$). The average recoveries were 99.3% and 99.7%, respectively, with all RSD values less than 0.8% ($n=9$). The limits of quantitation were 0.40 $\mu\text{g/mL}$ and 0.22 $\mu\text{g/mL}$ for the two analytes, respectively. The RSD values of precision, stability and repeatability tests were all lower than 2.0% ($n=6$). **Conclusion** This method is simple to operate and shows good repeatability and accuracy; it can be used for the simultaneous determination of azelastine hydrochloride and disodium edetate in azelastine hydrochloride nasal spray.

【Keywords】 HPLC; Nasal spray; Azelastine hydrochloride; Disodium edetate; Content determination

盐酸氮草斯汀鼻喷雾剂是第二代选择性 H_1 受体拮抗鼻用制剂, 具有强效抗组胺与稳定肥大细胞的双重作用^[1], 且中枢嗜睡不良反应轻微, 是治疗过敏性鼻炎的一线药物。依地酸二钠是药物制剂中常用的螯合剂, 用于掩蔽杂质金属离子, 但其对人体钙、镁等金属离子代谢的不良影响可能导致电解质紊乱, 且高浓度依地酸二钠对鼻腔黏膜存在刺激。《中国药典》2025 年版四部^[2] 规定药用辅料应满足药品安全性和有效性的要求, 并进行相应的质量控制。制剂中的依地酸二钠是否按照处方剂量进行合理添加, 需要建立准确便捷的方法来测定。目前常用的依地酸二钠含量测定方法有滴定法和 HPLC 法。滴定法需要加入一定量有机溶剂掩蔽干扰^[3], 对环境及检验人员健康不利。HPLC 法^[4-14] 大多以硫酸铜或氯化铁为衍生化试剂, 与依地酸二钠发生络合反应, 生成具有紫外吸收的络合物, 用含有离子对试剂的流动相进行分离测定。但目前尚未见到采用 1 个色谱系统同时测定制剂主成分与依地酸二钠含量的研究报道。本研究采用双波长 HPLC 柱前衍生化方法同时测定盐酸氮草斯汀鼻喷雾剂中的盐酸氮草斯汀与依地酸二钠的含量, 优化检测方法, 提升检测效率, 对该品种质量标准的完善具有重要的参考价值, 现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 主要仪器

Ultimate 3000 高效液相色谱仪 (包括四元泵, 二极管阵列检测器及变色龙 7.0 软件, 美国赛默飞公司); SECURA225D-1CN 电子天平 (德国赛多利斯公司, 精度 0.01 mg)。

1.2 主要药品与试剂

盐酸氮草斯汀鼻喷雾剂 (昆明源瑞制药公司, 批号: 20241201、20241202、20241203, 规

格: 10 mL : 10 mg); 盐酸氮草斯汀 (批号: 100604-202203, 纯度 99.9%) 和依地酸二钠 (批号: 101310-202401, 纯度 90.5%) 对照品均购自中国食品药品检定研究院; 乙腈 (色谱纯, 德国默克公司); 四丁基溴化铵、冰醋酸、醋酸钠、硫酸铜均为分析纯; 水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Waters XTerra RP₁₈ 柱 (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈 (A)-醋酸-醋酸钠缓冲液 (取醋酸钠 18 g, 加冰醋酸 9.8 mL 及四丁基溴化铵 3.2 g, 用水稀释至 1 000 mL, 调节 pH 至 4.5, 含 10 mmol/L 四丁基溴化铵) (B), 梯度洗脱 (0 ~ 3.5 min, 97% B, 3.6 ~ 9.5 min, 60% B, 9.6 ~ 17 min, 97% B); 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$; 检测波长: 289 nm (盐酸氮草斯汀)、254 nm (依地酸二钠); 流速: 1.0 mL/min; 进样体积: 20 μL 。

2.2 溶液制备

2.2.1 衍生化试剂

称取硫酸铜粉末约 100 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 质量浓度约为 1 mg/mL, 作为衍生化试剂。

2.2.2 混合对照品溶液

分别取盐酸氮草斯汀和依地酸二钠对照品适量, 精密称定, 加乙腈或水适量溶解, 加水稀释至刻度, 制成质量浓度约为 1 mg/mL 的盐酸氮草斯汀对照品贮备液和 0.5 mg/mL 的依地酸二钠对照品贮备液。精密量取对照品贮备液各 1 mL, 置同一 20 mL 量瓶中, 加入衍生化试剂 1 mL, 加水稀释至刻度, 用 0.45 μm 滤膜滤过, 取续滤液即得质量浓度分别为 50.549 4、27.381 8 $\mu\text{g/mL}$ 的混合对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液

精密量取盐酸氮草斯汀鼻喷雾剂样品 1 mL,

置 20 mL 量瓶中, 加入衍生化试剂 1 mL, 加水稀释至刻度, 用 0.45 μm 滤膜滤过, 取续滤液即为供试品溶液。

2.2.4 空白溶剂

超纯水。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性试验

分别取空白溶剂和“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液各 20 μL , 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图 (图 1)。供试品溶液色谱图中, 在与混合对照品溶液色谱图相同保留时间处有相应色谱峰出现, 空白溶剂无干扰, 表明方法专属性良好。

2.3.2 线性关系考察

分别精密量取“2.2.2”项下对照品贮备液 1.0、1.0、1.0、1.0、1.0、2.0 mL, 置 100、50、25、20、10、10 mL 量瓶中, 各加入衍生化试剂 1 mL, 加水稀释至刻度, 即得系列质量浓度的混合对照品溶液。按“2.1”项下色谱条件进样测定, 以质量浓度为横坐标 (X , $\mu\text{g/mL}$)、峰面积为纵坐标 (Y) 进行线性回归。结果盐酸氮草斯汀和依地酸二钠的回归方程分别为 $Y = 21.5547X + 13.5835$ 、 $Y = 10.0549X + 1.7888$, r 分别为 0.9999、1.0000, 线性范围分别为 10.11 ~ 202.19 $\mu\text{g/mL}$ 、5.47 ~

109.53 $\mu\text{g/mL}$, 表明盐酸氮草斯汀和依地酸二钠在各自质量浓度范围内与峰面积线性关系良好。

2.3.3 定量限考察

取最低浓度的线性溶液, 倍比稀释, 以信噪比约为 10 时的质量浓度为定量限。结果显示, 盐酸氮草斯汀和依地酸二钠的定量限分别为 0.40、0.22 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.3.4 破坏试验

为考察本品在实验操作时的光稳定性以及色谱系统对杂质分离的有效性, 进行以下强制破坏实验: 取样品倒入烧杯中, 日光下放置 8 h, 即得光破坏样品; 取样品在 60 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中放置 20 h, 即得热破坏样品; 取样品 1 mL, 加入 1 mol/L 盐酸溶液 1 mL, 放置 10 min, 用 1 mol/L 氢氧化钠溶液 1 mL 中和, 即得酸破坏样品; 取样品 1 mL, 加入 1 mol/L 氢氧化钠溶液 1 mL, 放置 10 min, 用 1 mol/L 盐酸溶液 1 mL 中和, 即得碱破坏样品。将上述强制破坏样品按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录色谱图 (图 2)。结果显示, 在正常光照条件下, 本品在溶液制备过程中对光稳定。色谱系统能够将降解产生的杂质与 2 个待测成分有效分离。

2.3.5 精密度试验

取“2.2.2”项下混合对照品溶液, 按“2.1”

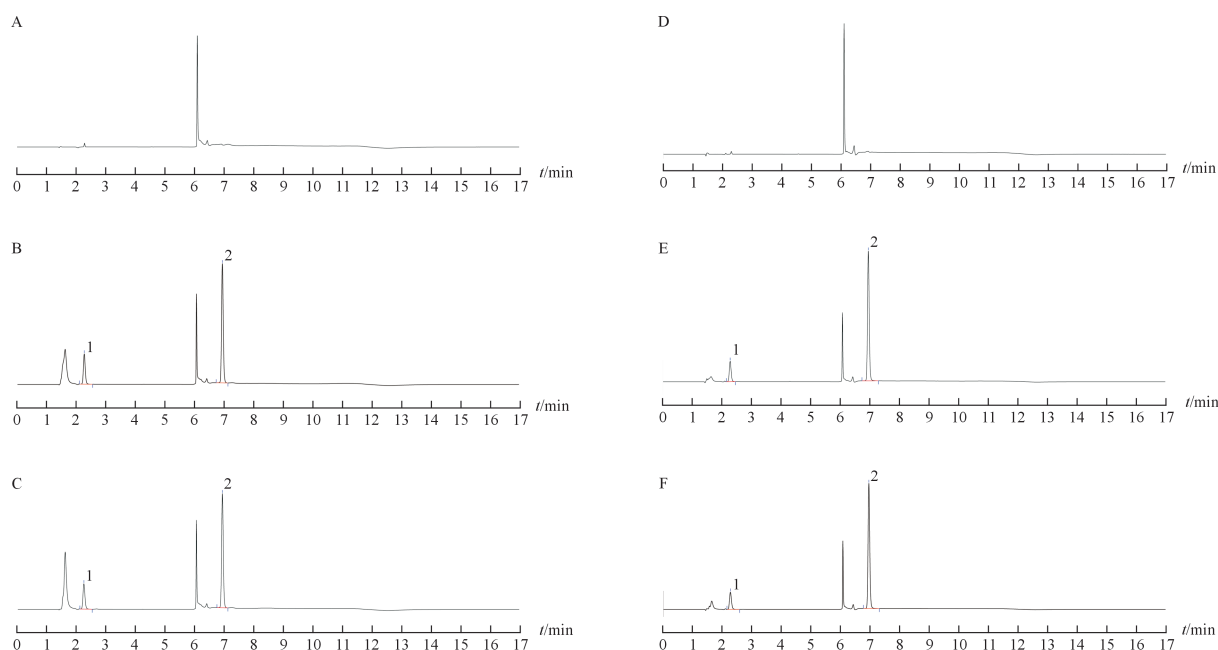


图 1 HPLC 色谱图

Figure 1. HPLC chromatograms

注: A. 空白溶剂 (254 nm); B. 混合对照品溶液 (254 nm); C. 供试品溶液 (254 nm); D. 空白溶剂 (289 nm); E. 混合对照品溶液 (289 nm); F. 供试品溶液 (289 nm); 1. 依地酸二钠; 2. 盐酸氮草斯汀。

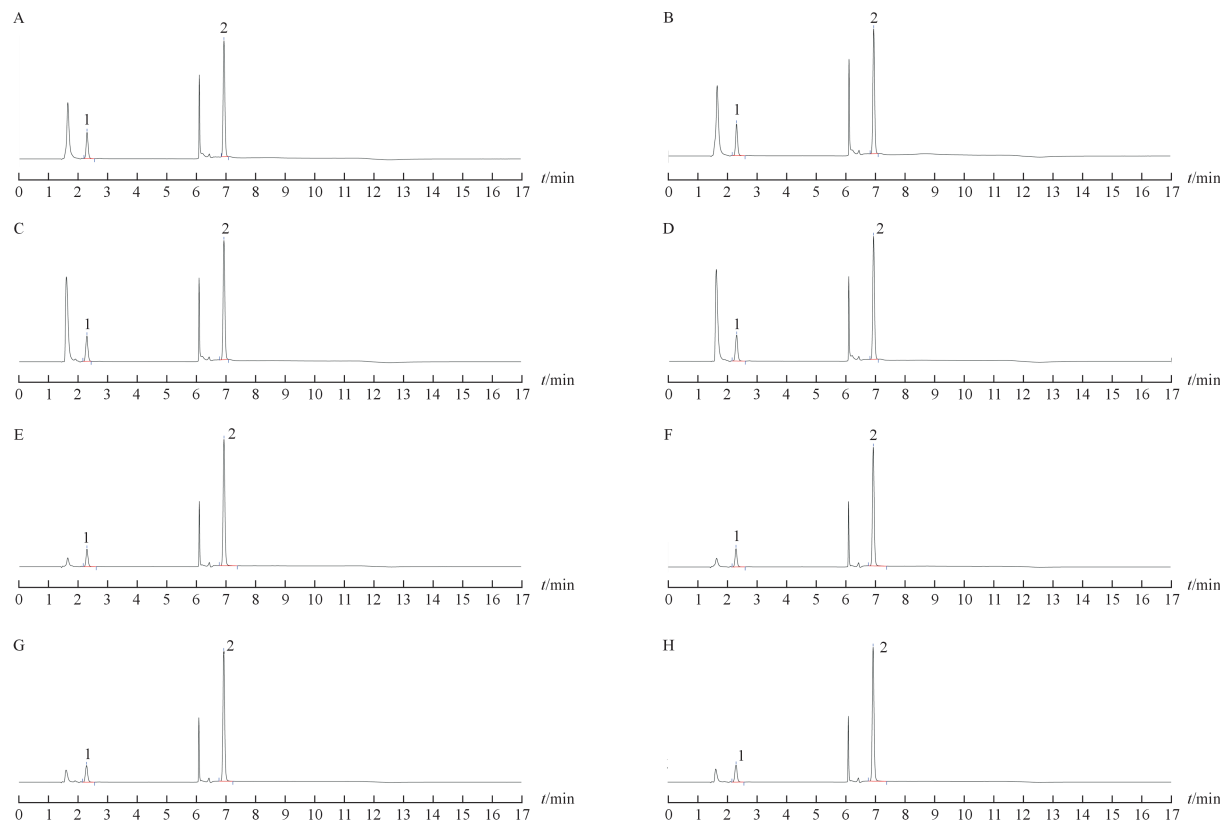


图2 强制破坏试验HPLC 色谱图

Figure 2. HPLC chromatograms of forced degradation tests

注：A. 光破坏溶液（254 nm）；B. 热破坏溶液（254 nm）；C. 酸破坏溶液（254 nm）；D. 碱破坏溶液（254 nm）；E. 光破坏溶液（289 nm）；F. 热破坏溶液（289 nm）；G. 酸破坏溶液（289 nm）；H. 碱破坏溶液（289 nm）；1. 依地酸二钠；2. 盐酸氮草斯汀。

项下色谱条件连续进样测定6次，记录色谱图。结果盐酸氮草斯汀和依地酸二钠峰面积的RSD分别为0.12%、0.66%（n=6），表明仪器精密度良好。

2.3.6 重复性试验

取同一批样品（批号：241202），平行6份，按“2.2.3”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，并按外标法计算含量。结果盐酸氮草斯汀和依地酸二钠平均含量分别为0.968、0.488 mg/mL，RSD分别为1.39%、1.02%（n=6），表明方法重复性良好。

2.3.7 稳定性试验

取样品（批号：241202）适量，按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，分别于室温放置0、2、5、7、9、24 h时，按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果盐酸氮草斯汀和依地酸二钠峰面积的RSD分别为0.61%、1.74%（n=6），表明供试品溶液室温放置24 h内稳定性良好。

2.3.8 加样回收率试验

精密量取已知含量的样品（批号：241201）

1 mL，置50 mL量瓶，平行9份，分别精密量取“2.2.2”项下对照品贮备液1.0、1.5、2.0 mL加入，各平行3份，各加衍生化试剂1 mL，加水稀释至刻度，按“2.1”项下色谱条件进样测定。结果盐酸氮草斯汀和依地酸二钠的平均加样回收率分别为99.3%、99.7%，RSD分别为0.61%、0.74%（n=9），表明方法准确度良好。

2.4 样品含量测定

取3批（批号为20241201、20241202、20241203）样品各适量，按“2.2.3”项下方法制备供试品溶液，各平行2份，按“2.1”项下色谱条件进样测定，记录峰面积，按外标法计算含量，结果见表1。

表1 3批样品中2种成分的含量测定结果（mg/mL，n=2）
Table. 1. Results of the content determination of two components in three batches of samples (mg/mL, n=2)

成分	批号			平均值
	20241201	20241202	20241203	
盐酸氮草斯汀	0.980 8	0.971 0	0.982 2	0.978 0
依地酸二钠	0.491 7	0.487 7	0.493 6	0.491 0

3 讨论

3.1 检测波长的选择

依地酸二钠无明显紫外吸收,与硫酸铜发生络合反应后生成稳定的五元环螯合物,在254 nm有最大吸收。盐酸氮草斯汀的最大吸收波长为289 nm,其结构中缺乏螯合位点,与硫酸铜不发生络合反应。本研究选择双波长检测方法,分别在2个成分的最大吸收波长处测定其含量,获得满意结果。

3.2 流动相的选择

依地酸二钠与硫酸铜的络合反应受pH值的影响显著,pH 4~6为较适宜区间。反应产物为强亲水阴离子,在C₁₈柱几乎无保留,需要在流动相中加入阳离子型离子对试剂,与其形成中性疏水离子缔合物后方可获得有效保留。本研究经过多次探索试验后,最终选择乙腈与醋酸-醋酸钠缓冲液(pH 4.5,含10 mmol/L四丁基溴化铵)作为流动相,进行梯度洗脱,既让依地酸二钠在色谱柱上获得有效保留,同时还改善了盐酸氮草斯汀峰形拖尾的问题。

3.3 方法评价

《中国药典》自2015年版起收载盐酸氮草斯汀鼻喷雾剂^[15-17],但目前尚未设置定量测定依地酸二钠的检测项目,企业注册申报的质量标准则采用滴定法进行测定。将本研究中2种成分的含量测定结果与注册检验的测定结果进行比较,相对偏差≤0.8%,提示测定结果基本一致。

本研究建立的双波长HPLC柱前衍生化方法可以同时测定盐酸氮草斯汀鼻喷雾剂中的盐酸氮草斯汀与依地酸二钠的含量,方法操作简便、精密度与准确度高,既避免了滴定法的不便,也避免了使用两种液相系统分别测定的繁琐,极大地提高了检验效率,为该品种质量标准的完善提供了有价值的参考。本方法的局限性是仅考察了3批供试品,也未进行耐用性考察。今后若开展本品质量标准的提高工作,将对方法的耐用性及各影响因素进行更全面深入的考察。

参考文献

- 魏桂芳,卢帕他定片联合盐酸氮卓斯汀鼻喷雾剂治疗过敏性鼻炎患者的临床疗效及安全性[J].中国医药指南,2026,24(2): 103-105. [Wei GF. Clinical efficacy and safety of lupatadine combined with azelastine hydrochloride nasal spray in the

- treatment of allergic rhinitis[J]. Guide of China Medicine, 2026, 24(2): 103-105.] DOI: [10.15912/j.issn.1671-8194.2026.02.029](https://doi.org/10.15912/j.issn.1671-8194.2026.02.029).
- 中国药典2025年版. 四部[S]. 2025: 60, 787.
- 国家药品监督管理局. 进口药品注册标准. JX20170012[S]. 2017.
- 顾倩,顾晓风. HPLC法测定盐酸氮卓斯汀滴眼液中依地酸二钠的含量[J]. 广东化工, 2021, 48(18): 189-190. [Gu Q, Gu XF. Determination of disodium edetate content in azelastine hydrochloride eye drops by HPLC[J]. Guangdong Chemical, 2021, 48(18): 189-190.] DOI: [10.3969/j.issn.1007-1865.2021.18.081](https://doi.org/10.3969/j.issn.1007-1865.2021.18.081).
- 许风伟,叶露,罗钟明,等. 高效液相色谱法测定脂质体制剂中依地酸二钠含量[J]. 中国药业, 2026, 35(3): 97-100. [Xu FW, Ye L, Luo ZM, et al. Content determination of disodium edetate in liposomes by HPLC[J]. China Pharmaceuticals, 2026, 35(3): 97-100.] DOI: [10.3969/j.issn.1006-4931.2026.03.018](https://doi.org/10.3969/j.issn.1006-4931.2026.03.018).
- 顾晓风,唐倩倩. HPLC法测定注射用艾司奥美拉唑钠中依地酸二钠的含量[J]. 中国药品标准, 2021, 22(3): 238-241. [Gu XF, Tang QQ. Determination of disodium edetate in esomeprazole sodium for injection by HPLC[J]. Drug Standards of China, 2021, 22(3): 238-241.] DOI: [10.19778/j.cdp.2021.03.009](https://doi.org/10.19778/j.cdp.2021.03.009).
- 姚枝玉,黄朝瑜,蔡美明,等. 高效液相色谱法测定咪达唑仑注射液中的依地酸二钠的含量[J]. 中南药学, 2020, 18(1): 102-104. [Yao ZY, Huang CY, Cai MM, et al. HPLC determination of disodium edetate in midazolam injection[J]. Central South Pharmacy, 2020, 18(1): 102-104.] DOI: [10.7539/j.issn.1672-2981.2020.01.020](https://doi.org/10.7539/j.issn.1672-2981.2020.01.020).
- 陈蓉,郭彬,马冬阳,等. 高效液相色谱法测定多种滴眼液中辅料依地酸二钠的含量[J]. 中南药学, 2025, 23(10): 2957-2961. [Chen R, Guo B, Ma DY. Content determination of excipient edetate disodium in different eye drops by HPLC[J]. Central South Pharmacy, 2025, 23(10): 2957-2961.] DOI: [10.7539/j.issn.1672-2981.2025.10.024](https://doi.org/10.7539/j.issn.1672-2981.2025.10.024).
- 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. [Chen X, Yan LN, Duan HX, et al. Determination of disodium edetate in levofloxacin lactate and sodium chloride injection by HPLC[J]. Chinese Journal of Antibiotics, 2022, 47(3): 252-256.] DOI: [10.13461/j.cnki.cja.007299](https://doi.org/10.13461/j.cnki.cja.007299).
- 雷小平,杨明亮,姚吉颢,等. 注射用泮托拉唑钠中依地酸二钠含量分析方法的建立[J]. 上海医药, 2022, 43(5): 77-80. [Lei XP, Yang ML, Yao JX, et al. Establishment of method for disodium edetate in pantoprazole sodium for injection[J]. Shanghai Medical and Pharmaceutical Journal, 2022, 43(5): 77-80.] DOI: [10.3969/j.issn.1006-1533.2022.05.020](https://doi.org/10.3969/j.issn.1006-1533.2022.05.020).
- 姚文静,李琬晴,孙建绪,等. 高效液相色谱法测定盐酸纳美芬注射液中的依地酸二钠含量[J]. 国际药学研究杂志, 2017, 44(1): 70-73. [Yao WJ, Li WQ, Sun JX, et al. Determination of disodium edetate in nalmefene hydrochloride injection by HPLC[J]. Journal of International Pharmaceutical Research, 2017, 44(1): 70-73.] DOI: [10.13220/j.cnki.jipr.2017.01.012](https://doi.org/10.13220/j.cnki.jipr.2017.01.012).
- 赵亚绘,王彦竹,宋丽明,等. 丁酸氯维地平注射剂中依地酸二钠的含量测定[J]. 天津医科大学学报, 2016, 22(1): 73-79. [Zhao

- YH, Wang YZ, Song LM, et al. Determination of EDTA-2Na in clevipine butyrate injectable emulsion[J]. Journal of Tianjin Medical University, 2016, 22(1): 73-79.] DOI: [10.20135/j.issn.1006-8147.2016.01.024](https://doi.org/10.20135/j.issn.1006-8147.2016.01.024).
- 13 沈丹丹, 许娟, 姜学美, 等. 高效液相色谱法检测环索奈德鼻喷雾剂的防腐剂[J]. 中国药业, 2019, 28(9): 46-49. [Shen DD, Xu J, Jiang XM, et al. Determination of preservatives in ciclesonide nasal spray by HPLC[J]. China Pharmaceuticals, 2019, 28(9): 46-49.] DOI: [10.3969/j.issn.1006-4931.2019.09.013](https://doi.org/10.3969/j.issn.1006-4931.2019.09.013).
- 14 Palakurthi AK, Dongala T. HPLC-UV method development for the determination of EDTA in oxycodone HCL oral liquids with derivatization technique. robustness by design of experiments approach[J]. Anal Chem Lett, 2019, 9(5): 594-607. DOI: [10.1080/22297928.2019.1674186](https://doi.org/10.1080/22297928.2019.1674186).
- 15 中国药典 2015 年版. 二部[S]. 2015: 1088.
- 16 中国药典 2020 年版. 二部[S]. 2020: 1303-1304.
- 17 中国药典 2025 年版. 二部[S]. 2025: 1361.
- 收稿日期: 2026 年 06 月 30 日 修回日期: 2026 年 08 月 25 日
本文编辑: 周璐敏 洗静怡