

## CE-EMMA 法测定乙脑灭活疫苗中乙二胺四乙酸二钠残留量\*

吴金凤<sup>1</sup>, 白建秋<sup>1\*\*</sup>, 刘卫<sup>1</sup>, 林瑶<sup>1</sup>, 姜廷福<sup>2</sup>

(1. 山东恒业生物技术有限公司, 山东 青岛 266114; 2. 中国海洋大学医药学院, 山东 青岛 266003)

**摘要 目的:**建立毛细管电泳(CE)结合电泳中介微分析(EMMA)测定乙脑灭活疫苗中乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na)残留量的方法。**方法:**运行缓冲液为 0.025 mol·L<sup>-1</sup>磷酸氢二钠缓冲液(pH 2.5),在线络合金属离子为 1.5 mg·mL<sup>-1</sup> Fe<sup>3+</sup>,孵育时间 3 min,分离电压 -25 kV,紫外检测波长 257 nm,压力进样 5 000 Pa × 5 s,检测温度为 25.0 °C。**结果:**EDTA-2Na 在 0.01~0.5 mg·mL<sup>-1</sup>的浓度范围内呈现良好的线性关系, $r$  为 0.999 9,最低检测限为 5 μg·mL<sup>-1</sup>,测定样品 RSD 小于 2.87%,加样回收率为 94.13%~105.56%。**结论:**该方法操作简便,准确度高,稳定性好,可用于乙脑灭活疫苗中 EDTA-2Na 残留量的测定。

**关键词:**毛细管电泳;电泳中介微分析;乙脑灭活疫苗;乙二胺四乙酸二钠;残留量;质量控制

**中图分类号:**R 921.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1009-3656(2024)01-0025-05

**doi:**10.19778/j.chp.2024.01.004

## Determination of residual EDTA-2Na in Japanese encephalitis attenuated live vaccine by capillary electrophoresis with electrophoretically mediated microanalysis\*

WU Jinfeng<sup>1</sup>, BAI Jianqiu<sup>1\*\*</sup>, LIU Wei<sup>1</sup>, LIN Yao<sup>2</sup>, JIANG Tingfu<sup>2</sup>

(1. Shandong Hengye Biotechnology Co., Ltd, Qingdao 266114, China;

2. School of Medicine and Pharmacy, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

**Abstract Objective:** To establish a capillary electrophoresis (CE) with electrophoretically mediated microanalysis (EMMA) method for the determination of EDTA-2Na in Japanese encephalitis attenuated live vaccine.

**Methods:** The test was performed in disodium hydrogen phosphate buffer with pH 2.5, the online metal ions complexation of 1.5 mg·mL<sup>-1</sup> Fe<sup>3+</sup> and incubation time of 3 min. The separation voltage was 25 kV, the detection wavelength was 257 nm, and the column temperature was 25.0 °C.

**Results:** The established method had a good linear relationship in the concentration range of 0.01–0.5 mg·mL<sup>-1</sup> ( $r = 0.999\ 9$ ), the detection limit was 5 μg·mL<sup>-1</sup>, and the relative standard deviation (RSD) of the measured samples was less than 2.87%. The recoveries of spiked samples were between 96.49%–101.02%. **Conclusion:** The optimized method was applied to the determination of EDTA-2Na in Japanese encephalitis attenuated live vaccine. The satisfactory experimental results were obtained.

**Key words:** capillary electrophoresis; electrophoretically mediated microanalysis; Japanese encephalitis attenuated live vaccine; EDTA-2Na; residual quantity; quality control

\* 基金项目:2018年青岛市自主创新重大专项(18-1-1-91-nsh)

第一作者简介:吴金凤,工程师;研究方向:生物制药、血液制品研发。Tel:0532-87903198;E-mail:hengyeoffice@163.com

\*\* 通讯作者简介:白建秋,工程师;研究方向:生物制药、血液制品质量控制。Tel:0532-87903198;E-mail:lc\_sx2003@163.com.cn

乙二胺四乙酸(EDTA)及其盐类 EDTA-2Na 被广泛应用于工业、农业和医药产品领域。在液体医药产品中 EDTA 主要作为有效的抗氧化、增效剂和稳定剂,用来改善液体医药产品的配伍稳定性<sup>[1,2]</sup>。在乙脑灭活疫苗生产过程中,EDTA-2Na 被用来消化病毒细胞,分散病毒,防止聚合,从而提高产品的稳定性。虽然后续工艺中有专门针对 EDTA-2Na 的去除步骤,但由于工艺条件的限制,EDTA-2Na 会有一定的残留。而过量的 EDTA-2Na 在人体中与钙络合会造成低血钙症或骨钙流失等危害<sup>[3,4]</sup>。根据相关技术指南要求,应采用适宜的方法对 EDTA-2Na 进行监测,以评价工艺过程中的去除和产品的质量。

Andrade 等<sup>[5]</sup>将 EDTA 和  $Mn^{2+}$  络合,采用紫外可见分光光度法测定了水体中 EDTA 的含量。刘晓强等<sup>[6]</sup>以硫酸铜为衍生化试剂,通过柱前衍生,采用高效液相色谱(HPLC)法测定了市售不同厂家不同批次注射用奥美拉唑钠中 EDTA-2Na 的含量。任玉卓等<sup>[7]</sup>通过 EDTA-2Na 与  $FeCl_3$  的络合反应,利用 HPLC 对水痘减毒活疫苗中的 EDTA-2Na 残留量进行了检测。气相色谱法(GC)可用于含量较低的水体中 EDTA 的检测<sup>[8]</sup>。上述方法中,作为光谱法的紫外可见分光光度法受基质影响较大,专属性不佳。而利用 HPLC 和 GC 检测 EDTA 时,均需对 EDTA 进行衍生化处理,样品前处理时间较长。

电泳中介微分析(EMMA)是在流动注射分析(FIA)和毛细管电泳(CE)基础上诞生的一项新的分析技术<sup>[9]</sup>。该技术是将试样和试剂作为两个独立的区带先后注入毛细管内,淌度大者在后,经过一定时间的运行两者完全混合并反应,所得产物与试剂经电泳分离并流向检测器检测。因 EMMA 具有反应和检测的一体化、试剂消耗量为纳升级、反应分离速度快、可实现高通量、不受复杂样品基质的干扰等优点,被广泛应用于天然产物中酶激动剂、抑制剂的研究及抑制剂对酶抑制作用机理研究等诸多领域<sup>[10,11]</sup>。虽然毛细管电泳(CE)已被广泛应用于各种基质中 EDTA 和 EDTA-2Na 的测定<sup>[12-15]</sup>,当利用 CE 结合 EMMA 技术分析乙脑灭活疫苗中的 EDTA-2Na 尚未见报道。

本研究建立了一种 CE 结合 EMMA 在线检测 EDTA-2Na 的新方法,并将该方法应用于灭活乙脑疫苗及其中间产品中的 EDTA-2Na 残留量的检测,以及评价生产过程对 EDTA-2Na 的去除,取得了满意的结果。

## 1 仪器与材料

### 1.1 仪器

毛细管电泳仪(美国 Agilent 公司);PHS-3C 型 pH 计(上海雷磁科学仪器厂);D3024 型高速台式离心机(大龙兴创实验仪器(北京)股份公司);HH-1 型数显电子恒温水浴锅(常州国华电器有限公司)。

### 1.2 材料

乙二胺四乙酸二钠(EDTA-2Na)、磷酸二氢钠( $NaH_2PO_4$ )、磷酸氢二钠( $Na_2HPO_4$ )、氯化钠(NaCl)(国药集团化学试剂有限公司);三氯化铁( $FeCl_3$ ,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);所用试剂均为分析纯。乙脑灭活疫苗成品及中间产品 P51 原液(Vero 细胞)均由山东恒业生物技术有限公司提供。

## 2 实验方法

### 2.1 溶液配制及供试品制备

精密称取适量  $Na_2HPO_4$ 、 $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  和 NaCl,溶于 1 000 mL 去离子水中,配置浓度为  $0.013 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸盐缓冲液溶液(PBS)(pH 值 7.2)和浓度的  $0.025 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  一系列不同 pH 值磷酸盐缓冲液(pH 2.0 ~ 6.0),均经  $0.45 \mu\text{m}$  膜过滤备用。

精密称取 EDTA-2Na 50.0 mg,置于 10 mL 容量瓶中,加  $0.013 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (pH 7.2)的 PBS 溶液稀释至刻度, $0.45 \mu\text{m}$  膜过滤备用,用时用  $0.013 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (pH 7.2)的 PBS 溶液稀释至合适的浓度。

精密称取  $FeCl_3$  50.0 mg,置于 10 mL 容量瓶中,加去离子水稀释至刻度, $0.45 \mu\text{m}$  膜过滤备用,用时用去离子水稀释至合适的浓度。

乙脑灭活疫苗原液 P51 及乙脑灭活疫苗成品经水浴锅  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  加热 10 min, $10\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 30 min,取上清液进行测定。

### 2.2 毛细管柱使用维护

每次使用前开机预热,将  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 NaOH 溶液进样对毛细管柱冲洗 10 min,随后分别用  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 NaOH 溶液、双蒸水冲洗毛细管柱 5、3 min。每两次进样间用运行缓冲液冲洗 2 min。试验结束后依次用  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 NaOH 溶液、 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 NaOH 溶液、双蒸水、空气冲洗毛细管柱 10、5、3、3 min。

### 2.3 毛细管电泳条件

缓冲液为  $0.025 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸氢二钠缓冲液(pH

2.5);络合金属离子为  $\text{Fe}^{3+}$ ,浓度为  $1.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;孵育时间为 3 min;电压为  $-25 \text{ kV}$ ;紫外检测波长为  $257 \text{ nm}$ ;进样方式为压力进样  $5000 \text{ Pa} \times 5 \text{ s}$ ,先进  $\text{Fe}^{3+}$ ,再进 EDTA-2Na 标准品(或供试品);检测温度为  $25.0 \text{ }^\circ\text{C}$ 。

### 3 结果与讨论

#### 3.1 EMMA 分离分析条件优化

**3.1.1 反应体系 pH 优化** EDTA-2Na 与  $\text{Fe}^{3+}$  反应可形成稳定的  $\text{NaFeEDTA}$  络合物,该络合物在  $257 \text{ nm}$  波长处有特征紫外吸收,可用于紫外检测器的检测。而反应体系的 pH 对金属离子与 EDTA 的络合有很大影响,所以本研究系统考查了运行缓冲液 pH 在  $2.0 \sim 6.0$  范围内变化时对 EDTA- $\text{Fe}^{3+}$  的影响。结果如图 1 所示。从图中可以看出, pH 从 2.0 到 2.5 时,EDTA- $\text{Fe}^{3+}$  峰面积略有增大。当 pH 从 2.5 到 3.5 时,EDTA- $\text{Fe}^{3+}$  峰面积逐渐降低。pH 从 3.5 到 6.0 时, $\text{Fe}^{3+}$ -EDTA 峰面积几乎不变。而低 pH 的酸性条件有利于提高 EDTA- $\text{Fe}^{3+}$  的稳定性,因此,采用 pH 2.5 的磷酸缓冲液作为运行缓冲液进行后续实验。

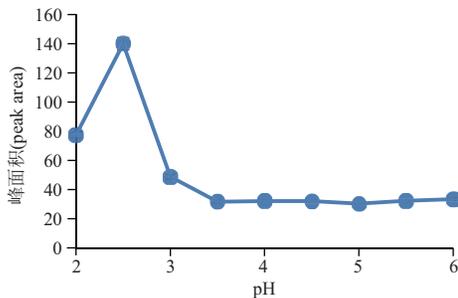


图 1 不同 pH 对络合物峰面积的影响

Fig. 1 Effect of different pH on complex peak area

**3.1.2  $\text{Fe}^{3+}$  离子浓度优化** 为确保 EDTA 在线络合反应的能够彻底进行,本研究考察了  $\text{Fe}^{3+}$  浓度对络合产物的影响。结果如图 2 所示。从图中可以看出,当  $\text{Fe}^{3+}$  在  $0 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  范围内变化时,EDTA- $\text{Fe}^{3+}$  峰面积逐渐增大,而当  $\text{Fe}^{3+}$  浓度大于  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  时,EDTA- $\text{Fe}^{3+}$  峰面积几乎不变。说明当  $\text{Fe}^{3+}$  浓度为  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  时,体系中 EDTA 已被全部络合。因此,采用  $1.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  的  $\text{Fe}^{3+}$  进行后续实验。

**3.1.3 在线孵育时间优化** 在线孵育时间会影响络合物的络合程度,因此我们对孵育时间进行了优化,考察了不同的孵育时间对反应的影响。结果如

图 2~4 所示,随着孵育时间从 0 增大到 3 min 时,EDTA- $\text{Fe}^{3+}$  产率逐渐增大,当孵育时间从 3 min 增大到 5 min 时,EDTA- $\text{Fe}^{3+}$  产率几乎保持不变。为节约分析时间,实验最终选定孵育时间为 3 min。

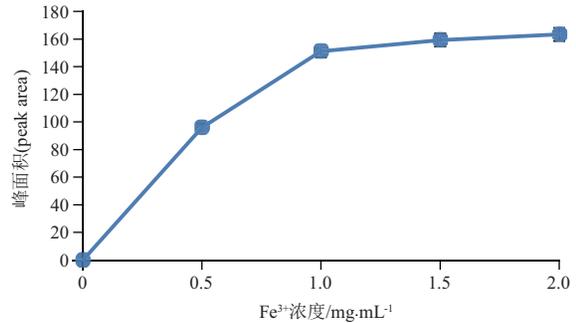


图 2 不同  $\text{Fe}^{3+}$  浓度对络合物峰面积的影响

Fig. 2 Effect of different  $\text{Fe}^{3+}$  concentrations on peak area of complex

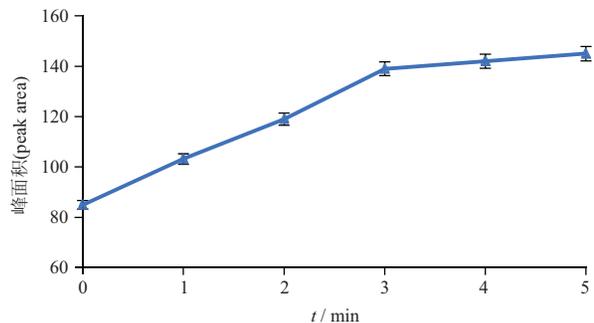


图 3 在线孵育时间对络合物峰面积的影响

Fig. 3 Effect of in-line incubation time on complex peak area

综上所述,EDTA-2Na 的 EMMA 在线络合和 CE 分离分析条件如下:缓冲液为  $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  磷酸氢二钠(pH 2.5);络合金属离子为  $\text{Fe}^{3+}$ ,浓度为  $1.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ;孵育时间为 3 min;电压为  $-25 \text{ kV}$ ;检测波长为  $257 \text{ nm}$ ;进样参数为  $5000 \text{ Pa} \times 5 \text{ s}$ ,先进  $\text{Fe}^{3+}$ ,再进 EDTA-2Na;温度为  $25.0 \text{ }^\circ\text{C}$ 。优化条件下,EDTA-2Na 标准品 CE 分离分析谱图如图 4 所示。

#### 3.2 分析方法验证

**3.2.1 标准曲线的建立** 将  $5.0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  EDTA-2Na 储备液用 PBS 稀释出 5 个浓度水平的标准工作溶液,按照优化的 EMMA 和 CE 条件进行测定,每个浓度做 3 个平行,以各标样峰面积( $y$ )为纵坐标,浓度( $x$ )为横坐标,得到标准曲线线性方程为  $y = 351.92x + 0.0727$ ,线性范围为  $10 \sim 500 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。分别按信噪比( $S/N$ )3 和 10 计算检出限和定量限分别为  $3.3$  和  $10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

表 1 EDTA-2Na 峰面积及时间重现性结果

Tab. 1 EDTA-2Na peak area and time reproducibility results

进样次数 (times)	$t_R$ / min	峰面积 (peak area)
1	6.89	26.70
2	6.86	27.00
3	6.83	25.90
4	6.80	26.00
5	6.80	25.70
6	6.76	24.90
RSD/%	6.82	26.03

**3.2.2 方法精密度** 取 EDTA-2Na ( $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) 同一天内连续进样 6 次, 计算迁移时间和峰面积的相

表 2 真实样品中 EDTA-2Na 测定结果及回收率

Tab. 2 EDTA-2N determination results and recovery in real samples

真实样品 (real sample)	批号 (lot No.)	单剂量检测浓度 (single dose concentration)/ ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	平均回收率 (average recovery)/ %
P51 原液(P51 original solution)	51S2201	0.06	101.05
	51S2202	0.09	
乙脑疫苗成品(Japanese encephalitis inactivated vaccine product)	51P202203001	0.03	98.89
	51P202203002	0.03	

表 2 显示, 在不同批次乙脑灭活疫苗原液和成品中, EDTA-2Na 单剂量浓度为  $0.03 \sim 0.09 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。而 EDTA-2Na 在 FDA 批准药物非活性成分数据库中肌肉注射、静脉注射、皮下注射的单剂量最大使用量均为  $\leq 0.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ [4]。结果表明, 两批次乙脑疫苗成品和 P51 原液中 EDTA-2Na 残留量均符合要求。

#### 4 结论

乙脑灭活疫苗中 EDTA-2NA 为产品的工艺杂质, 目前尚无标准方法可用于该残留物的监测, 本文建立了乙脑灭活疫苗中 EDTA-2NA 的毛细管电泳分离分析新方法, 实验结果表明, 新方法具有快速、高效、灵敏度高、专属性好等优点, 适用于乙脑灭活疫苗中 EDTA-2NA 残留量的检测。该方法的建立为乙脑灭活疫苗质量控制提供技术支撑, 同时也为其他疫苗类生物制品的质量监控提供了一种新的技术手段。

#### 参考文献

[1] SOROURADDIN MH, IRANIFAM M. A new chemiluminescence

对标准偏差 (RSD%), 所得结果列于表 1。分析物迁移时间和峰面积 RSD% 分别为 0.66 和 2.87, 说明该方法具有良好的重现性和稳定性。

**3.2.3 方法回收率** 分别向乙脑灭活疫苗原液 P51 及乙脑灭活疫苗成品中加入三个不同浓度的 EDTA-2Na 对照品, 每个浓度水平配制 3 份, 按“2.1”项下供试品制备方法处理后进样分析, 所得结果列于表 2。结果表明, 方法平均回收率分别为 101.05% 和 98.89%, 表明该方法具有良好的准确度。

#### 3.3 实际样品测定

取不同批次的乙脑灭活疫苗原液 P51 及乙脑灭活疫苗成品 (各两批), 按“2.1”项下供试品制备方法处理后进样分析, 所得结果列于表 2。

method for determination of EDTA in ophthalmic drugs [J]. Chem Anal, 2007, 52(3):481.

[2] 朱彦丹, 陈斌, 应津津, 等. HPLC 测定乙酰半胱氨酸溶液中 EDTA-2Na 含量 [J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(22):2864.

ZHU YD, CHEN B, YING JJ, *et al.* Determination of EDTA-2Na in acetylcysteine solution by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm, 2021, 38(22):2864.

[3] 荣娜娜, 李玉凤, 任李玥, 等. RP-HPLC 法测定诺氟沙星葡萄糖注射液中的乙二胺四乙酸二钠的含量 [J]. 昆明医科大学学报, 2021, 42(8):35.

RONG NN, LI YF, REN LY, *et al.* Determination of norfloxacin glucose injection in EDTA by RP-HPLC method [J]. J Kunming Med Univ, 2021, 42(8):35.

[4] 刁岩忠, 韩继永, 陈祥峰. HPLC 法测定注射用洋托拉唑钠中乙二胺四乙酸二钠的含量 [J]. 药物分析杂志, 2011, 31(2):282.

DIAO YZ, HAN JY, CHEN XF. Determination of disodium edetate in pantoprazole sodium for injection by HPLC [J]. Chin J Pharm Anal, 2011, 31(2):282.

[5] ANDRADE CEO, OLIVEIRA AF, NEVES AA, *et al.* A new spectrophotometric method for determination of EDTA in water using its complex with Mn(III) [J]. Spectrochim. Acta A, 2016, 168(5):253.

- [ 6 ] 刘晓强,汪嘉丽,张岩琛. 柱前衍生化法评价注射用奥美拉唑钠中 EDTA-2Na · 2H<sub>2</sub>O 含量差异[J]. 天津药学, 2022, 34(6): 1.  
LIU XQ, WANG JL, ZHANG YC. Omeprazole sodium for injection by precolumn derivatization method [J]. Tianjin Pharm, 2022, 34(6): 1.
- [ 7 ] 任玉卓,杜岩,王昭,等. 高效液相色谱法测定水痘减毒活疫苗中乙二胺四乙酸二钠残留量[J]. 中国生物制品学杂志, 2016, 29(9): 993.  
REN YZ, DU Y, WANG Z, *et al.* Determination of residual EDTA disodium salt content in live attenuated varicella vaccine by high performance liquid chromatography[J]. Chin J Biol, 2016, 29(9): 993.
- [ 8 ] RANDT C, WITTLINGER R, MERZ W. Analysis of nitrilotriacetic acid (NTA), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA) in water, particularly waste water [J]. Fresenius J Anal. Chem, 1993, 346: 728.
- [ 9 ] LI JX, LI CY, PENG X, *et al.* Recent discovery of tyrosinase inhibitors in traditional Chinese medicines and screening methods [J]. J Ethnopharmacol, 2023, 303: 115951.
- [ 10 ] LI W, ZHANG BF, CHEN ZL. Screening carbonic anhydrase IX inhibitors in traditional Chinese medicine based on electrophoretically mediated microanalysis [J]. Talanta, 2021, 232: 122444.
- [ 11 ] DIOGO AS, JULIANA SC, MICHELE DA. Dual electrophoretically-mediated microanalysis in multiple injection mode for the simultaneous determination of acetylcholinesterase and  $\alpha$ -glucosidase activity applied to selected polyphenols [J]. Talanta, 2021, 224: 121773.
- [ 12 ] PAVEL B, FRANTIŠEK K, ERNST K. Trace determination of iron in water at the ug/L level by on-line coupling of capillary isotachopheresis and capillary zone electrophoresis with UV detection of the EDTA-Fe(III) complex [J]. J Chromatogr A, 1997, 757(1): 297.
- [ 13 ] POZDNIAKOVA S, RAGAUSKAS R, DIKČIUS A, *et al.* Determination of EDTA in used fixing solutions by capillary electrophoresis [J]. J Anal Chem, 1999, 363(1): 124.
- [ 14 ] LAAMANEN PL, MALI A, MATILAINEN R. Simultaneous determination of DTPA, EDTA, and NTA by capillary electrophoresis after complexation with copper. [J]. Anal Bioanal Chem, 2005, 381(6): 1264.
- [ 15 ] SHEPPARD R L, HENION J. Quantitative capillary electrophoresis/ion spray tandem mass spectrometry determination of edta in human plasma and urine [J]. Anal. Chem, 1997, 69: 2901.

(收稿日期:2023-05-11)