

高效液相色谱法测定米诺膦酸片中米诺膦酸

邬方宁

天津市药品审评中心, 天津 300191

摘要: 目的 建立高效液相色谱法测定米诺膦酸片中米诺膦酸。方法 采用安捷伦 XDB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.03 mol/L 焦磷酸钠水溶液 (含四丁基溴化铵 0.322 g/L, 以磷酸调节 pH 7.5) - 甲醇 (85 : 20), 体积流量 1 mL/min, 柱温 30 °C, 检测波长 280 nm, 进样量 20 μL。结果 米诺膦酸在 0.02~0.18 mg/mL 时, 峰面积与质量浓度呈良好的线性关系 ($r=0.9999$)。结论 该方法准确、可靠, 可作为米诺膦酸片的测定方法。

关键词: 米诺膦酸片; 米诺膦酸; 骨质疏松; 离子对; 高效液相色谱法

中图分类号: R927.11 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2011)01-0066-02

Determination of minodronic acid in Minodronic Acid Tablets by HPLC

WU Fang-ning

Center for Drug Evaluation, Tianjin Food and Drug Administration, Tianjin 300191, China

Abstract: Objective To establish a RP-HPLC method for the determination of minodronic acid in Minodronic Acid Tablets. **Method** The Agilent column XDB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) was used. The mobile phase consisted of 0.03 mol/L sodium pyrophosphate (0.322 g/L tetrabutylammonium bromide, adjusting pH value to 7.5 with phosphorous acid)-methanol (85 : 20). The flow rate was 1.0 mL/min with the column temperature at 30 °C. The detection wavelength was 280 nm and the injection volume was 20 μL. **Results** The solution of minodronic acid was stability. The linear range for minodronic acid was 0.02—0.18 mg/mL ($r=0.9999$). **Conclusion** The method is accurate and reliable, which is suitable for the determination of Minodronic Acid Tablets.

Key words: Minodronic Acid Tablets; minodronic acid; osteoporosis; ion pair; HPLC

米诺膦酸是由日本山之内制药公司合成的第三代氮杂芳基双膦酸盐衍生物, 其抗骨吸收活性较帕米膦酸盐高 100~1 000 倍, 且能拮抗骨髓瘤和肿瘤引起的骨质溶解。米诺膦酸水合物口服制剂由 Astellas 和 Ono 两家公司分别以商品名 Bonoteo 和 Recalbon 在日本上市, 用于治疗骨质疏松症^[1-2]。国内对于该品种仍处于研发阶段。二膦酸盐类药物的分析方法主要有紫外-可见分光光度法、高效液相色谱 (HPLC) 法、酶分析法、毛细管电泳法等^[3-6]。本实验采用离子对 RP-HPLC 法, 对米诺膦酸片中的米诺膦酸进行测定。

1 仪器与试剂

日本岛津 LC—10AT 高效液相色谱仪, SPD—10A 紫外可见检测器。米诺膦酸片 (1 mg/片, 批号 100301、100302、100303); 米诺膦酸对照品 (质量分数 99.7%) 均为自制。甲醇为色谱纯; 四丁基溴化铵、无水焦磷酸钠均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

安捷伦 XDB-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.03 mol/L 焦磷酸钠水溶液 (含四丁基溴化铵 0.322 g/L, 以磷酸调节 pH 7.5) - 甲醇 (80 : 20), 体积流量 1 mL/min, 检测波长 280 nm, 进样量 20 μL。

2.2 供试品溶液的制备

取米诺膦酸片 10 片, 研细, 精密称取片粉适量 (约相当于米诺膦酸 10 mg), 置 100 mL 量瓶中, 加流动相超声使溶解, 放冷至室温, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 即得。

2.3 对照品溶液的制备

取米诺膦酸对照品 10 mg, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.4 系统适用性试验

按以上色谱条件进行测定, 由于辅料无干扰, 相邻杂质峰的分离度符合要求; 理论板数按米诺膦酸峰计算不低于 2 000。见图 1。

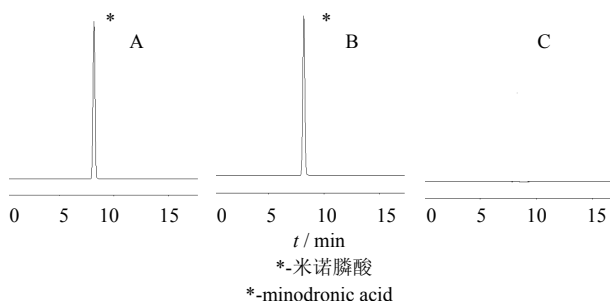


图1 对照品(A)、米诺膦酸片(B)、空白(C) HPLC图
Fig.1 HPLC chromatograms of reference substance (A), Minodronic Acid Tablets (B), and the blank (C)

2.5 线性关系考察

取米诺膦酸对照品 10 mg, 精密称定, 置 50 mL 量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为储备液。分别量取储备液 1.0、3.0、5.0、7.0、9.0 mL 置 10 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀。各取 20 μ L 注入色谱仪, 进行测定。结果显示米诺膦酸在 0.02~0.18 mg/mL 时, 峰面积与质量浓度呈良好的线性关系, 回归方程为 $A=32\ 719\ C+99\ 520$, $r=0.999\ 9$ 。

2.6 重现性试验

将同一批号 100301 样品制备 6 份供试品溶液, 测定, 结果米诺膦酸质量分数的 RSD 为 0.82%。

2.7 稳定性试验

取供试品(批号 100301)溶液, 分别于 0、2、4、6、12、24 h 精密量取 20 μ L 注入色谱仪中, 记录色谱图。结果显示, 米诺膦酸峰面积的 RSD 为 0.37%, 表明该供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.8 中间精密度试验

不同操作人员于不同时间、用不同仪器, 对同一批米诺膦酸片样品(批号 100301), 测定 6 次。结果米诺膦酸峰面积的 RSD 为 0.59%。

2.9 回收率试验

精密称取米诺膦酸对照品 14、20、26 mg, 按处方配比, 加入适量辅料, 分别置 100 mL 量瓶中, 加流动相适量超声使溶解, 放冷至室温, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 滤过, 精密量取滤液 5 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加流动相稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 20 μ L 注入色谱仪中, 记录色谱图。另取米诺膦酸对照品溶液, 同法测定, 计算米诺膦酸的回收率, 结果平均回收率为 99.9%, RSD 为 0.54%($n=9$)。

2.10 样品测定

采用外标法计算批号 100301、100302、100303 米诺膦酸片中米诺膦酸, 结果米诺膦酸的平均质量分数分别为 99.82%、99.56%、99.91% ($n=2$)。

3 讨论

目前对于磷酸盐类的 HPLC 法检测, 多使用离子交换色谱柱。米诺膦酸属双磷酸类药物, 极性较强, 在 C_8 、 C_{18} 等非极性色谱柱上不保留, 因此常采用离子交换色谱法对该类物质进行分析。

为了保证米诺膦酸良好的分离, 通常需采用强酸或强碱性流动相进行梯度洗脱, 过程复杂。本实验通过在流动相中加入离子对试剂, 使米诺膦酸在非极性色谱柱上保留时间延长, 通过等度洗脱即可达到分离效果。由于米诺膦酸在碱性溶液中的溶解度较好, 同时考虑色谱柱对流动相 pH 值承受范围, 选择以缓冲液和甲醇作为流动相。但采用磷酸盐缓冲溶液作为流动相, 所得色谱峰主峰扩展严重; 用分子结构较相近的焦磷酸钠后, 主峰形较尖锐, 对称。

当使用离子对试剂四丁基溴化铵时, 色谱柱平衡的时间非常缓慢。通过改变加入的抗衡离子 $P_2O_7^{4-}$ 浓度, 即焦磷酸钠的浓度来缩短平衡时间。结果显示, 随着焦磷酸钠浓度的增加, 色谱系统平衡时间缩短, 但考虑到盐浓度增高易析出, 因此采用 0.03 mol/L 的最终浓度。

温度对离子对色谱的峰宽、峰间距等影响很大。通过耐用性试验, 考察了在 30、40 $^{\circ}$ C 的条件下米诺膦酸的出峰情况。结果显示, 温度对色谱峰无影响, 因此本方法未对柱温进行要求。

参考文献

- [1] 姚文瑾, 范 鸣. 治疗骨质疏松症的新药米诺膦酸 [J]. 药学进展, 2009, 33(11): 526-527.
- [2] 赵丽嘉, 王利华, 胡雅萍, 等. 米诺膦酸水合物 [J]. 药物评价研究, 2010, 33(6): 479-484.
- [3] 周自桂, 金 春, 徐 成, 等. 阿仑膦酸钠肠溶胶囊的质量研究 [J]. 医药导报, 2010, 29(6): 792-795.
- [4] 陈倩超, 黄红兵, 曾昭蕾, 等. 不同厂家唑来膦酸制剂的含量考察 [J]. 中国医院用药评价与分析, 2008, 11(8): 840-841.
- [5] Tang K H, Wang Y C, Zhu Q B, *et al.* Determination of zoledronic acid and its related substance by ion exchange HPLC [J]. *China J Antibiot*, 2005, 30 (2): 88-90.
- [6] 赵 静, 郭慧娟, 蒋 晔. 毛细管区带电泳测定唑来膦酸及其制剂的含量 [J]. 药物分析杂志, 2008, 28 (6): 870-872.