

HPLC法测定唑来膦酸原料药中4种有关物质

闫占宽^{1,2}, 王颖³, 朱汉帅², 刘钦伟¹, 张燕², 李军毅¹, 张敏³, 高珣³, 王洪森^{1,2*}

1. 江苏原创药物研发有限公司, 江苏 连云港 222000

2. 江苏恒瑞医药股份有限公司, 江苏 连云港 222000

3. 江苏海洋大学 药学院, 江苏 连云港 222005

摘要: 目的 建立唑来膦酸原料药中杂质 A、B、C、D 的 HPLC 测定方法。方法 采用 Titank Phenyl-Hexyl 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 对杂质 A、B、C、D 进行定量分析, 以 8 mg·mL⁻¹ 的 1-辛烷磺酸钠和 0.037 mg·mL⁻¹ 的 EDTA-二钠为缓冲液, 缓冲液-乙腈 (4:96) 为流动相, 进行等度洗脱, 体积流量为 0.8 mL·min⁻¹, 检测波长为 215 nm, 柱温为 20 °C, 进样量为 10 μL。结果 空白溶液不干扰对各杂质的检测; 各杂质在相应浓度范围内线性关系良好, R²均不小于 0.990; 各杂质的检测限分别为 192.6、545.5、126.0、150.0 ng·mL⁻¹, 定量限分别为 629、1 515、315、500 ng·mL⁻¹; 各杂质的平均回收率分别为 95.4%、82.4%、92.0%、95.9%, RSD 分别为 2.8%、2.7%、2.9%、2.4%; 3 批样品有关物质的测定结果显示, 各杂质的质量分数均低于 0.3%。结论 方法学验证结果显示, 建立的 HPLC 法适用于唑来膦酸原料药中杂质 A、B、C、D 的检测。

关键词: 唑来膦酸; 有关物质; 高效液相色谱法; 含量测定; 方法学

中图分类号: R932 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2023) 12-2520-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.12.003

HPLC method for determination of four related substances in zoledronic acid raw materials

YAN Zhankuan^{1,2}, WANG Ying³, ZHU Hanshuai², LIU Qinwei¹, ZHANG Yan², LI Junyi¹, ZHANG Min³, GAO Xun³, WANG Hongsen^{1,2}

1. Jiangsu Original Drug Research and Development Co., Ltd., Lianyungang, 222000, China

2. Jiangsu Hengrui Pharmaceutical Co., Ltd., Lianyungang 222000, China

3. School of Pharmacy, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China

Abstract: Objective To establish a HPLC method for the determination of impurities A, B, C and D in zoledronic acid. **Methods** A Titank Phenyl-Hexyl column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) was used for quantitative analysis of impurities A, B, C and D. Using 8 mg·mL⁻¹ sodium 1-octanesulfonic acid and 0.037 mg·mL⁻¹ EDTA-disodium as buffer, buffer with acetonitrile (4 : 96) as mobile phase. The elution was carried out at a volume flow rate of 0.8 mL·min⁻¹, the detection wavelength was 215 nm, the column temperature was 20 °C, and the injection volume was 10 μL. **Results** The blank solution did not interfere with the detection of impurities. Each impurity had a good linear relationship in the corresponding concentration range, and the correlation coefficient R² was not less than 0.990. The detection limits of the impurities were 192.6, 545.5, 126.0 and 150.0 ng·mL⁻¹, respectively, and the limits of quantification were 629, 1 515, 315 and 500 ng·mL⁻¹, respectively. The average recovery rates of each impurity were 95.4%, 82.4%, 92.0% and 95.9%, respectively, and the RSD were 2.8%, 2.7%, 2.9% and 2.4%, respectively. The results of three batches of samples showed that the content of each impurity was less than 0.3%. **Conclusion** The method can be used to detect impurities A, B, C and D in zoledronic acid raw materials.

Key words: zoledronic acid; relevant substance; high performance liquid chromatography; detection of content; methodology

收稿日期: 2023-09-02

基金项目: 江苏省产教融合一流课程《药物分析》建设项目; 江苏海洋大学专业学位研究生课程《药品质量控制》案例库建设项目 (YJSZY202102); 江苏海洋大学 2023 年一流课程《药物仪器分析》建设项目; 连云港市政策引导产学研项目 (CYX2202)

第一作者: 闫占宽 (1975—), 男, 本科, 研究方向为药品质量研究和管理。E-mail: yanzhankuan163@163.com

*通信作者: 王洪森, 男, 本科, 主要从事化学药合成及质量标准研究, 江苏省产业教授。E-mail: wanghongsen163163@163.com

在现代制药工业、药物研发领域中,原料药的生产过程中会不同程度地产生一些杂质和副产物,因此对药物中的杂质进行检测对控制药物质量至关重要^[1]。唑来膦酸是治疗绝经后骨质疏松、高血钙症等的常见药物,是第3代二磷酸盐药物^[2-5]。唑来膦酸抑制骨转移和抗骨吸收的作用是前几代双磷酸盐的100~850倍^[6-7]。虽然唑来膦酸主要靶向于破骨细胞的形成和诱导成熟破骨细胞凋亡,但也有研究证明唑来膦酸能抑制成骨细胞的凋亡,且能刺激成骨细胞的增殖和分化^[8-10]。唑来膦酸以杂质C(咪唑)为起始原料,反应过程中生成杂质D,副反应最终会生成杂质A和杂质B(结构图见图1)。这些杂质不仅对药品的稳定性产生不利影响,还可能因为潜在的毒性引发药物不良反应。唑来膦酸原料药合成过程中副产物的检测方法主要以HPLC为主^[11-13]。虽然近几年国内关于唑来膦酸的检测方法屡见报道,但至今《中国药典》尚未收录有关唑来膦酸杂质A、B、C、D的检测方法。目前《欧洲药典10.1》中收录了唑来膦酸杂质A、B、E、F的高效液相色谱检测方法^[14]。《印度药典》2010年版收录了唑来膦酸品种,但未收录任何特定杂质的检测方法^[15]。本研究采用HPLC法对杂质A、B、C、D进行检测,为控制该药物质量、提升产品的国内外竞争力,提供理论支撑。

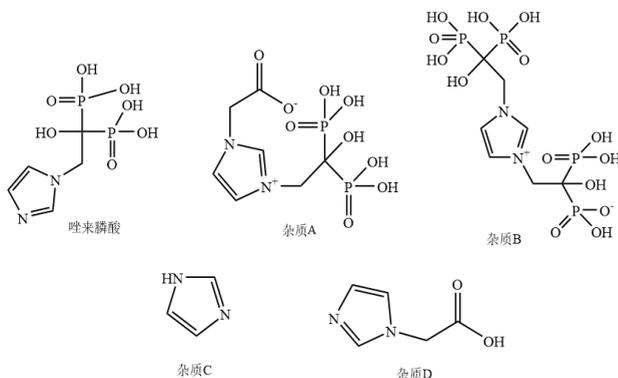


图1 唑来膦酸、杂质A、杂质B、杂质C及杂质D的化学结构
Fig. 1 Chemical structure diagram of zoledronic acid, impurity A, impurity B, impurity C and impurity D

1 仪器与试剂

1.1 仪器

高效液相色谱仪(岛津 LC-20AD);紫外检测器;MS105DU型十万分之一电子分析天平(Mettler Toledo);pH酸碱度计(Mettler Toledo)。

1.2 试剂

唑来膦酸原料药(江苏恒瑞医药有限公司,批号 20221001、20221002、20231003);唑来膦酸对照

品(中国食品药品检定研究院,质量分数 92.7%,批号 100778-201702);杂质A对照品(中国食品药品检定研究院,质量分数 100.0%,批号 Y0002011);杂质B对照品(Sigma-Aldrich,质量分数 100.0%,批号 F120S0);杂质C对照品(中国食品药品检定研究院,质量分数 99.8%,批号 100045-201304);杂质D对照品(Sigma-Aldrich,质量分数 $\geq 98.0\%$,批号 C12945363);乙腈(HPLC级,MackLin);1-辛烷磺酸钠(AR级,TCL);EDTA-二钠(AR级,国药集团);高氯酸(AR级,南京化学试剂股份有限公司);磷酸(AR级,国药集团)。

2 方法与结果

2.1 溶液配制

2.1.1 空白溶液(稀释液) 取1-辛烷磺酸钠约8g和EDTA-二钠约37mg,精密称定,置于1000mL量瓶中,再精密移取高氯酸10mL和磷酸2mL,加超纯水至刻度,作为缓冲液;精密量取缓冲液960mL,用乙腈定容至1000mL,即得空白溶液。

2.1.2 杂质对照品储备液的制备 取唑来膦酸杂质A、B、C、D对照品约2mg,精密称定,置于不同的棕色量瓶中,用稀释液定容至刻度制成约 $200\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的各杂质对照品储备液。

2.1.3 杂质对照品溶液的制备 精密移取1mL各杂质对照品储备液,分别置于不同的棕色量瓶中,用稀释液定容至刻度制成约 $20\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的各杂质对照品溶液1。精密移取5mL各杂质对照品溶液1,分别置于不同的棕色量瓶中,用稀释液定容至刻度制成约 $10\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的各杂质对照品溶液2。

2.1.4 供试品溶液的制备 取唑来膦酸原料药约10mg,精密称定,置于10mL棕色量瓶中,用稀释液定容至刻度,即得。

2.1.5 唑来膦酸对照品溶液的制备 取唑来膦酸对照品约10mg,精密称定,置于10mL棕色量瓶中,用稀释液定容至刻度,即得。

2.1.6 唑来膦酸限度对照品溶液(系统适用性溶液)的制备 取唑来膦酸对照品约10mg,精密称定,置于棕色量瓶中,再精密移取1.5mL各杂质对照品溶液-1,用稀释液定容至刻度制成含唑来膦酸约 $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、杂质A、B、C、D约 $3\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的唑来膦酸限度对照品溶液。

2.1.7 限度加标供试品溶液的制备 取唑来膦酸原料药约10mg,精密称定,置于棕色量瓶中,再精密移取1.5mL各杂质对照品溶液-1,用稀释液定容至刻度制成含唑来膦酸约 $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、杂质

A、B、C、D约 $3\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的原料药限度加标供试品溶液。

2.2 色谱条件

采用 Titank Phenyl-Hexyl 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-缓冲液(含 $8\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的1-辛烷磺酸钠和 $0.037\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的EDTA-二钠)(4:96);体积流量 $0.8\ \text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$;检测波长215 nm;柱温 $20\ ^\circ\text{C}$;进样量 $10\ \mu\text{L}$ 。

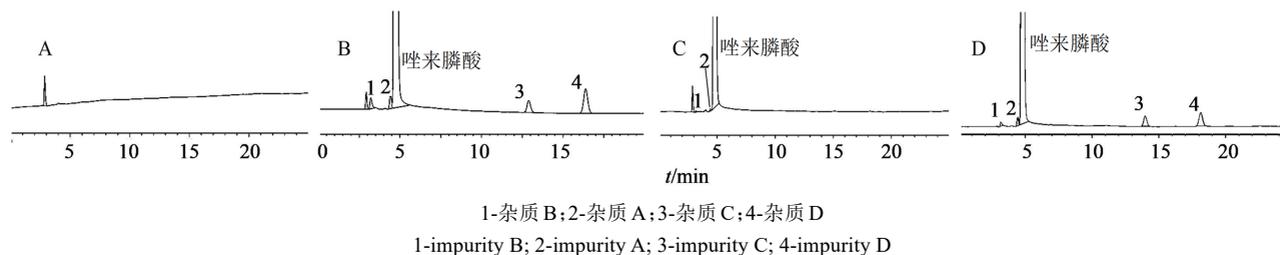


图2 空白溶液(A)、系统适用性溶液(B)、供试品溶液(C)、加标供试品溶液(D)的色谱图

Fig. 2 Chromatograms of blank solution (A), system suitability solution (B), sample solution (C), and spiked test solution (D)

2.4 检测限和定量限

逐级稀释“2.1”项下各杂质对照品储备液,按“2.2”项中的色谱条件对杂质A、B、C、D进行测定,以信噪比 ≥ 3 估算检测限,以信噪比 ≥ 10 估算定量限。结果显示,各杂质的检测限分别为192.6、454.5、126.0、150.0 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,定量限分别为629、1515、315、500 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,结果表明本方法灵敏度好。

2.5 线性关系考察

根据唑来膦酸的杂质限度(0.3%),将“2.1”项下各杂质对照品溶液2稀释至不同浓度的杂质A、B、C、D的线性溶液。按照“2.1”项下色谱条件进行测定,以各组分浓度和色谱峰面积绘制线性曲线并得出相关系数。结果表明,各杂质线性关系良好,相关系数符合要求。结果见表1。

表1 唑来膦酸相关物质线性关系考察结果

Table 1 Results of zoledronic acid related substances linearity and range			
名称	回归方程	R^2	线性范围/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
杂质A	$Y=4974.9X-8.7463$	0.9990	0.611~6.114
杂质B	$Y=2574.6X-1431.1$	0.9993	1.515~9.100
杂质C	$Y=23922X+617.7$	1.0000	0.280~11.200
杂质D	$Y=14956X+464.4$	0.9997	0.571~5.714

2.6 重复性试验

按照“2.1”项下的方法平行配制6份原料药限度加标供试品溶液作为原料药重复性溶液,连续进6针,记录色谱图,计算出杂质A、B、C、D的峰面积

2.3 专属性与系统适用性试验

取“2.1”项中的空白溶液、系统适用性溶液、供试品溶液、加标供试品溶液,按“2.2”项下的色谱条件进行检测,记录色谱图。如图2所示,空白溶液不干扰杂质A、B、C、D的测定,系统适用性溶液中,杂质A、B、C、D之间的分离度分别为5.1、1.4、7.9、25.2;原料药供试品溶液中杂质A、B检出,杂质C、D未检出。

RSD分别为1.6%、4.7%、1.2%、1.2%。结果表明该方法重复性良好。

2.7 中间精密度试验

由不同人员在不同时间,按照“2.1”项下方法平行配制6份原料药限度加标供试品溶液作为中间精密度溶液,杂质A、B、C、D的峰面积RSD分别为1.0%、3.5%、0.5%、0.5%,与重复性6份结果共12份结果中,杂质A、B、C、D的峰面积RSD分别为1.3%、8.3%、0.9%、1.3%。结果表明该方法中间精密度良好。

2.8 回收率试验

分别称取12份供试品,置于不同的10 mL量瓶中,分别精密移取不同浓度的各杂质对照品溶液-2,平行3份置于上述量瓶中,用稀释液稀释定容至刻度,制备得到定量限浓度、50%、100%和150%浓度水平的加标回收率样品。按照“2.2”项下色谱条件进行测定,记录色谱图,并计算出杂质A、B、C、D的平均回收率分别为95.4%、82.4%、92.0%、95.9%,RSD分别为2.8%、2.7%、2.9%、2.4%。结果表明该方法准确度良好。

2.9 溶液稳定性试验

按照“2.1”项下方法配制溶液,将唑来膦酸限度对照品溶液、供试品溶液和限度加标供试品溶液在室温下放置0、2、6、10、12 h后进样,观察杂质A、B、C、D的峰面积变化。结果显示,唑来膦酸限度对照品溶液中各杂质的峰面积RSD分别为2.8%、0.5%、2.1%、1.6%,限度加标供试品溶液中各杂质的峰面

积RSD分别为2.5%、1.8%、2.1%、1.5%，供试品溶液中杂质A、B的峰面积RSD分别为3.9%、1.3%，杂质C、D未检出。

2.10 耐用性试验

对色谱系统进行少量变动，以考察测定结果不受影响的承受程度。按照“2.1”项配制溶液，将唑来膦酸限度对照品溶液、供试品溶液和限度加标供试品溶液分别在柱温变化($\pm 2\text{ }^\circ\text{C}$)、体积流量变化($\pm 0.2\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$)、波长变化($\pm 2\text{ nm}$)、辛烷磺酸钠浓度变化($\pm 0.05\%$)、高氯酸浓度变化($\pm 0.1\%$)、乙腈浓度变化($\pm 1\%$)的条件下进行测定，考察杂质的检出情况。结果显示，不同条件下唑来膦酸限度对照品溶液中各杂质的含量RSD分别为0.3%、0.2%、0.2%、0.2%，限度加标供试品溶液中各杂质的含量RSD分别为0.2%、1.5%、0.2%、0.2%，供试品溶液中杂质A、B的含量RSD分别为0.2%、0.4%，杂质C与杂质D未检出。符合验证要求。

2.11 样品有关物质测定

取3批唑来膦酸原料药(批号20221001、20221002、20221003)，按照“2.1”项方法，每批样品平行配制2份供试品溶液，分别进样2次，按“2.2”项中的色谱条件进行测定，按外标法计算各杂质的含量，杂质A、B质量分数均未超过0.3%、杂质C、D因低于检测限未检出。结果见表2。

表2 唑来膦酸原料药样品相关物质测定结果

Table 2 Determination results of zoledronic acid preparation samples related substances

名称	质量分数/%			限度/%
	20221001	20221002	20221003	
杂质A	0.06	0.06	0.06	0.3
杂质B	0.03	0.03	0.03	0.3
杂质C	ND	ND	ND	0.3
杂质D	ND	ND	ND	0.3

ND-未检出

ND-not detected

3 讨论

3.1 色谱柱的选择

本研究中测定的杂质种类较多且化学结构式相似，色谱峰难以分开。为充分分离，首先考察了Kromasil 100-5-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)和Titank Phenyl-Hexyl柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)。使用Kromasil 100-5-C₁₈柱未能将杂质A、杂质B与唑来膦酸主峰充分分离。选用Titank Phenyl-Hexyl柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)可以获得较好的分离

效果。

3.2 流动相的选择

唑来膦酸在酸性条件下较稳定，因此，本研究考察了不同流动相以及以乙腈-三乙胺为流动相的不同pH值对色谱分离效果的影响。结果表明，在流动相pH为3.5时，主峰前后都有包裹峰且杂质A、B未与其他峰分离；在流动相pH为4.5时，主峰拖尾且杂质A、B未与其他峰分离；在流动相pH为4.0时，主峰峰型尖锐但杂质A、B未与其他峰分离；因此以乙腈-三乙胺为流动相，不同的pH值对唑来膦酸主峰有较大影响且不能实现4个有关物质峰的完全分开。本实验最终选取1-辛烷磺酸钠作为缓冲液，并向其中加入EDTA-2Na，以此减少络合作用，同时稳定流动相的pH，以获得各物质的良好峰型与分离。

本实验建立了一种高效液相色谱法测定唑来膦酸原料药中的杂质A、B、C、D的分析方法，并进行了方法学验证。结果表明该方法专属性强、灵敏度高、操作简单，可准确测定唑来膦酸原料药中的杂质A、B、C、D，为唑来膦酸的质量控制提供了参考依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 雷锦环. 药物中有关物质检测方法的研究进展及应用[J]. 中国化工贸易, 2017, 9(32): 134.
Lei J J. Research progress and application of detection methods for related substances in drugs [J]. China Chem Trade, 2017, 2017, 9(32): 134.
- [2] 彭六保, 崔巍. 唑来膦酸的临床应用研究进展[J]. 中国新药与临床杂志, 2007, 26(3): 237-240.
Peng L B, Cui W. Progress in clinical application of zoledronic acid [J]. Chin J New Drugs Clin Remedies, 2007, 26(3): 237-240.
- [3] 胡志勇, 程文会. 双膦酸盐类药物的研究进展及临床应用[J]. 中国实用乡村医生杂志, 2022, 29(6): 27-30.
Hu Z Y, Cheng W H. Research progress and clinical application of bisphosphonates [J]. Chin Pract J Rural Dr, 2022, 29(6): 27-30.
- [4] 崔巍, 彭六保. 唑来膦酸的临床应用研究进展[J]. 中南药学, 2006, 4(6): 467-469.
Cui W, Peng L B. Progress in clinical application of zoledronic acid [J]. Central South Pharm, 2006, 4(6): 467-469.
- [5] 何明长, 何永志, 林达生, 等. 唑来膦酸与钙尔奇D、骨化三醇联合治疗对老年骨质疏松患者腰背疼痛和血清irisin的影响[J]. 中国老年学杂志, 2022, 42(4): 868-871.

- He M C, He Y Z, Lin D S, et al. Effects of zoledronic acid combined with calcium D and calcitriol on low back pain and serum irisin in elderly patients with osteoporosis [J]. *Chin J Gerontol*, 2022, 42(4): 868-871.
- [6] 蒋晔, 张晓青, 徐智儒. 唑来膦酸的临床研究进展 [J]. *中国医院药学杂志*, 2004, 24(9): 561-563.
- Jiang Y, Zhang X Q, Xu Z R. Clinical research progress of zoledronic acid [J]. *Chin J Hosp Pharm*, 2004, 24(9): 561-563.
- [7] 李慧, 肖欢, 黄明龙, 等. 阿托伐他汀钙联合唑来膦酸钠治疗对老年骨质疏松患者的临床效果及患者骨密度、骨钙素水平变化 [J]. *中国老年学杂志*, 2020, 40(13): 2830-2833.
- Li H, Xiao H, Huang M L, et al. Clinical effect of atorvastatin calcium combined with zoledronic acid sodium on elderly patients with osteoporosis and changes of bone mineral density and osteocalcin level [J]. *Chin J Gerontol*, 2020, 40(13): 2830-2833.
- [8] Derenne S, Amiot M, Barillé S, et al. Zoledronate is a potent inhibitor of myeloma cell growth and secretion of IL-6 and MMP-1 by the tumoral environment [J]. *J Bone & Mineral Res*, 1999, 14(12): 2048-2056.
- [9] Plotkin L I, Manolagas S C, Bellido T. Dissociation of the pro-apoptotic effects of bisphosphonates on osteoclasts from their anti-apoptotic effects on osteoblasts/osteocytes with novel analogs [J]. *Bone*, 2006, 39(3): 443-452.
- [10] Frediani B, Spreafico A, Capperucci C, et al. Long-term effects of neridronate on human osteoblastic cell cultures [J]. *Bone*, 2004, 35(4): 859-869.
- [11] 袁园. 唑来膦酸含量测定及有关物质的研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2017.
- Yuan Y. Determination of zoledronic acid and study on related substances [D]. Changchun: Jilin University, 2017.
- [12] 胡汉昆, 颜镭, 刘薇芝. 高效液相色谱法测定唑来膦酸中有关物质 [J]. *中国医院药学杂志*, 2010, 30(18): 1607-1609.
- Hu H K, Yan Q, Liu W Z. Determination of related substances in zoledronic acid by HPLC [J]. *Chin J Hosp Pharm*, 2010, 30(18): 1607-1609.
- [13] 王玲玲, 高嵩, 宗国军, 等. 高效液相色谱法测定注射用唑来膦酸的含量及有关物质 [J]. *中国新药杂志*, 2006, 15(8): 624-626.
- Wang L L, Gao S, Zong G J, et al. Assay of zoledronic acid for injection and its related substances by HPLC [J]. *Chin J New Drugs*, 2006, 15(8): 624-626.
- [14] *European Pharmacopoeia 10.1* [S]. 2019.
- [15] *Indian Pharmacopoeia* [S]. 2010.

[责任编辑 兰新新]