

HPLC法测定注射用唑来膦酸中3种有关物质

王洪森^{1,2}, 张 敏³, 朱汉帅¹, 刘钦伟², 李辉辉², 王 颖³, 杨 春², 戚利强², 张 燕^{1*}

1. 江苏恒瑞医药股份有限公司, 江苏 连云港 222000

2. 江苏原创药物研发有限公司, 江苏 连云港 222042

3. 江苏海洋大学 药学院, 江苏 连云港 222005

摘要: 目的 建立同时测定注射用唑来膦酸中杂质B、C、D的HPLC法。方法 采用Titank Phenyl-Hexyl色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 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, 乙腈-缓冲液(4:96)为流动相, 体积流量0.8 mL·min⁻¹, 柱温20℃, 检测波长为215 nm, 进样量为10 μL。结果 在该色谱条件下, 杂质B、C、D之间的色谱峰分离度良好; 各杂质的检测限和定量限分别为126.0~454.5 ng·mL⁻¹、315.0~1515.0 ng·mL⁻¹; 各杂质在相应浓度范围内线性关系良好, R²在0.999 3~1.000 0; 平均回收率在93.1%~102.5%, RSD均小于10.0%; 且3批注射用唑来膦酸样品检测结果显示, 杂质B、C、D的质量分数均低于0.5%。结论 该方法简便、灵敏、专属性好, 适用于注射用唑来膦酸中有关物质的测定。

关键词: 注射用唑来膦酸; 有关物质; 高效液相色谱法; 含量检测; 方法学验证

中图分类号: R932 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2023)12-2525-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.12.004

Determination of three related substances in Zoledronic Acid Injection by HPLC

WANG Hongsen^{1,2}, ZHANG Min³, ZHU Hanshuai¹, LIU Qinwei², LI Huihui², WANG Ying³, YANG Chun², QI Liqiang², ZHANG Yan¹

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

2. Jiangsu Original Drug Research and development Co., Ltd., Lianyungang 222042, China

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

Abstract: **Objective** An HPLC method was developed for the simultaneous determination of impurity B, impurity C and impurity D in Zoledronic Acid Injection. **Methods** The separation was performed on a Titank Phenyl-Hexyl column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with 8 mg·mL⁻¹ sodium 1-octanesulfonate and 0.037 mg·mL⁻¹ EDTA-disodium as the buffer, acetonitrile-buffer (4 : 96) as the mobile phase, at a flow rate of 0.8 mL·min⁻¹, and the column temperature of 20 °C, with a detection wavelength of 215 nm. The injection volume was 10 μL. **Results** Under these chromatographic conditions, the peaks between impurity B, impurity C and impurity D were well separated. The limits of detection and quantification of each impurity were 126.0 to 454.5 ng·mL⁻¹ and 315.0 to 1 515.0 ng·mL⁻¹, respectively. The linearity of each impurity in the corresponding concentration range was good, with R₂ in the range of 0.999 3 to 1.000 0, and the average recoveries were in the range of 93.1% to 102.5% with the RSDs less than 10.0%. The test results of three batches of Zoledronic Acid Injection showed that the contents of impurities B, C and D were all lower than 0.5%. **Conclusion** The method is simple, sensitive and specific, and is suitable for the determination of related substances in zoledronic acid for injection.

Key words: Zoledronic Acid Injection; related substances; high performance liquid chromatography; content determination; method validation

收稿日期: 2023-09-04

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: 王洪森(1970—), 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

*通信作者: 张 燕, 女, 硕士研究生, 主要从事药品质量研究。E-mail: yan_zhang_123@163.com

注射用唑来膦酸属于药物活性最高、不良反应最小的第三代双膦酸盐,是目前使用较为广泛的一种骨吸收抑制剂^[1],其作用机制是通过抑制甲羟戊酸通路中的法尼基焦磷酸合成酶和双香叶基焦磷酸,抑制破骨细胞结构蛋白的合成,使破骨细胞丧失骨吸收能力并加速其凋亡,并抑制破骨细胞介导的骨吸收过程^[2]。在一定程度上可缓解恶性肿瘤溶骨性骨转移引起的骨痛,减少骨折等相关事件的发病率^[3-4],也可与其他药物联合治疗与骨质疏松相关的疾病^[5-7]。

有关物质研究在药品研发过程中有重要作用,贯穿整个药品研究的始终,其是否能得到合理、有效的控制,直接关系到药品的质量可控性和安全性,所以规范地进行有关物质的研究,并将其控制在一个安全、合理的限度范围之内,将直接关系到药品的质量及安全性^[8]。参考相关文献报道^[9-10],在合成唑来膦酸过程中会产生杂质B、杂质C及杂质D 3种有关物质,结构式见图1。其检测方法主要以HPLC为主^[11-15],但同时对3种有关物质进行质控的方法,还未见报道。目前《中国药典》尚未收录唑来膦酸有关物质的检测方法,《欧洲药典》采用液相色谱方法只对其杂质A、B、E、F进行检测,《印度药典》中虽有收录但并未提及对任何特定杂质的测定,而《美国药典》及其他药典并未对唑来膦酸进行收录。为了提高注射用唑来膦酸的质控标准,提升产品竞争力,本研究开发了同时测定注射用唑来膦酸中杂质B、杂质C及杂质D的HPLC法,可实现有关物质的定量分析。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

LC-20AT 高效液相色谱仪(日本岛津),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

注射用唑来膦酸(冻干粉,江苏恒瑞医药有限公司,规格:4 mg,批号:210215AJ、210323AJ、210530AJ);唑来膦酸对照品(中国食品药品检定研究院,质量分数:92.7%);杂质B对照品(Sigma-Aldrich,质量分数:100%);杂质C对照品(Sigma-Aldrich,质量分数:99.8%);杂质D对照品(Sigma-Aldrich,质量分数≥98%);甘露醇(MackLin,质量分数:98%);枸橼酸钠(国药集团药业股份有限公司);乙腈(HPLC级,MackLin);1-辛烷磺酸钠(AR级,TCL);EDTA-二钠(AR级,国药集团药业股份有限公司);高氯酸(AR级,南京化学试剂股份有限公司);磷酸(AR级,国药集团药业股份有限公司)。

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8 g和EDTA-二钠约37 mg,精密称定,置于1 000 mL量瓶中,再精密移取10 mL高氯酸和2 mL磷酸,加超纯水溶解稀释定容至刻度,混匀,制得缓冲液;精密量取缓冲液960 mL,用乙腈定容至1 000 mL,制得空白溶液。

2.1.2 空白辅料溶液 分别取枸橼酸钠约600 mg、甘露醇约5 500 mg,精密称定,置于50 mL量瓶中,加入稀释液溶解定容制得空白辅料储备液,再逐级稀释成空白辅料溶液。

2.1.3 对照品溶液 取唑来膦酸对照品约10 mg,精密称定,加稀释液溶解定容制得1 mg·mL⁻¹的对照品溶液。

2.1.4 杂质对照品储备液 取唑来膦酸各杂质约2 mg,精密称定,加稀释液溶解定容制得200 μg·mL⁻¹的各杂质对照品储备液。

2.1.5 杂质对照品溶液 精密移取1 mL各杂质对照品储备液,置于不同的10 mL量瓶中,加稀释液溶解定容制得20 μg·mL⁻¹的各杂质对照品溶液。

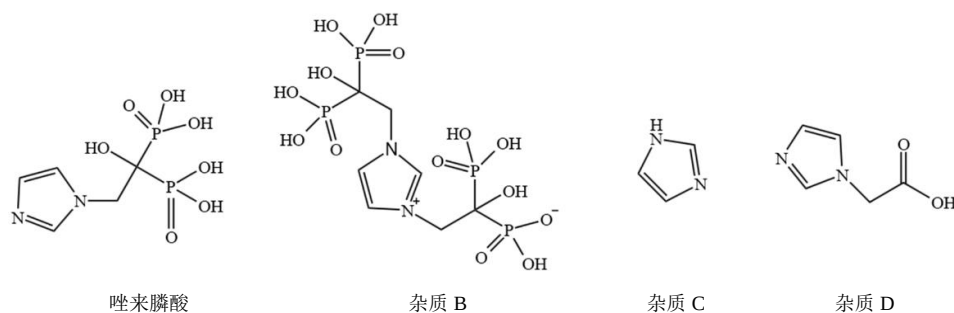


图1 唑来膦酸、杂质B、杂质C、杂质D的结构

Fig. 1 Structure diagram of zoledronic acid, impurity B, impurity C and impurity D

2.1.6 供试品溶液 取唑来膦酸冻干粉1支,精密加入4 mL稀释液,制得 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 供试品储备液,再逐级稀释成供试品溶液。

2.1.7 限度对照品溶液(系统适用性溶液) 精密移取5 mL唑来膦酸对照品储备液,置于10 mL量瓶中,再精密加入1 mL各杂质对照品溶液,用稀释液稀释定容制得唑来膦酸质量浓度约为 $500\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、各杂质的质量浓度约为 $2\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的限度对照品溶液。

2.1.8 限度加标供试品溶液 精密移取5 mL供试品储备液,置于10 mL量瓶中,再精密加入1 mL各杂质对照品溶液,用稀释液稀释并定容制得唑来膦酸质量浓度为 $500\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、各杂质的质量浓度为 $2\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的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);流动相为乙腈-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 $20\text{ }^{\circ}\text{C}$;进样量10 μL 。

2.3 专属性与系统适用性试验

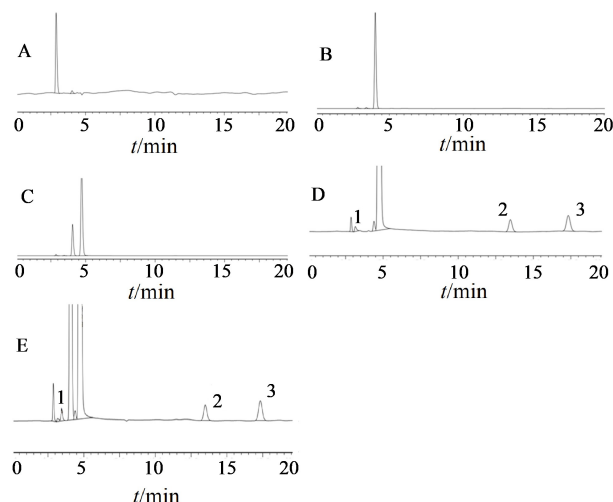
取“2.1”项中的空白溶液、空白辅料溶液、供试品溶液、限度对照品溶液、加标供试品溶液,按“2.2”项下的色谱条件进行检测,并记录色谱图。如图2所示,空白溶液和空白辅料溶液均不干扰杂质B、C、D的测定,限度对照品溶液中,杂质B与周围峰的分度为1.54,杂质C与杂质D之间的分度为8.55;供试品溶液中各杂质均未检出。

2.4 检测限和定量限检测

取“2.1”项下各杂质对照品储备液逐级稀释,按“2.2”项中的色谱条件进行测定,以信噪比3:1估算各杂质的检测限,以信噪比10:1估算各杂质的定量限。结果显示,杂质B、C、D的检测限分别为454.5、126.0、150.0 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,定量限分别为1 515.0、315.0、500.0 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,结果表明本法灵敏度好。

2.5 线性关系考察

根据唑来膦酸的杂质限度(0.5%),将“2.1”项下各杂质对照品溶液稀释至不同质量浓度的杂质B、C、D的线性溶液。按照“2.2”项下色谱条件进行测定,记录峰面积,以各杂质质量浓度对峰面积绘制线性回归图,得到线性方程和 R^2 ,见表1。结果表明,杂质B、C、D在线性范围内线性关系良好,相关系数符合要求。



1-杂质B;2-杂质D;3-杂质C

1- Impurity B; 2- impurity D; 3- impurity C

图2 空白溶液(A)、空白辅料溶液(B)、供试品溶液(C)、限度对照品溶液(D)、加标供试品(E)色谱图

Fig. 2 Chromatogram of blank solution (A), blank excipient solution (B), test product solution (C), limit reference solution (D), and marked test product (E)

表1 唑来膦酸相关杂质线性关系考察结果

Table 1 Results of linear relationship between zoledronic acid relevant impurities

杂质	线性方法	R^2	线性范围/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
杂质B	$y=2\,574.6x-1431.1$	0.999 3	1.515~9.100
杂质C	$y=23\,922x+617.7$	1.000 0	0.280~11.200
杂质D	$y=14\,956x+464.4$	0.999 7	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份限度加标供试品溶液,按“2.2”项下规定的色谱条件进行分析,杂质B、C、D的峰面积RSD分别为9.6%、1.3%、1.6%。结果表明该方法的重复性良好。

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,平行配制6份限度加标供试品溶液,按“2.2”项下规定的色谱条件进行分析,杂质B、C、D的峰面积RSD分别为7.2%、1.2%、2.0%,该6份限度加标供试品溶液与“2.6”项下的6份限度加标供试品溶液,共12份限度加标供试品溶液中,杂质B、C、D的峰面积RSD分别为8.1%、1.2%、1.9%。结果表明该方法中间精密度良好。

2.8 回收率试验

移取12份2.5 mL空白辅料溶液,置于不同的10 mL量瓶中,分别精密移取各杂质对照品溶液0.5、0.5、1.0、1.5 mL,加稀释剂定容,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,记录色谱图并计算回收率。杂质B、C、D的平均回收率为93.1%、96.2%、102.5%,对应的回收率RSD分别为6.0%、2.7%、2.2%,表明该方法准确度良好。

2.9 溶液稳定性试验

按照“2.1”项配制溶液,将限度对照品溶液、供试品溶液和限度加标供试品溶液在室温下放置0、1、3、7、12 h后进样,观察杂质B、C、D的峰面积变化。结果显示,限度对照品溶液中杂质B、C、D的峰面积RSD分别为1.3%、0.3%、1.0%,限度加标供试品溶液中杂质B、C、D的峰面积RSD分别为2.7%、0.9%、0.5%,供试品溶液未检测到杂质B、C、D,且室温下限度对照品溶液、供试品溶液和限度加标供试品溶液在12 h内均稳定。

2.10 耐用性试验

按照“2.1”项配制的限度对照品溶液、限度加标供试品溶液和供试品溶液,按“2.2”项下规定的色谱条件进行分析,分别考察不同柱温($\pm 2^\circ\text{C}$)、体积流量($\pm 0.2\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$)、波长($\pm 2\text{ nm}$)、辛烷磺酸钠浓度($\pm 0.5\%$)、高氯酸浓度($\pm 0.1\%$)、乙腈比例($\pm 1\%$)条件下的耐用性。结果显示,不同条件下限度对照品溶液中杂质B、C、D的含量RSD分别为0.2%、0.2%、0.2%,限度加标供试品溶液中杂质B、C、D的含量RSD分别为0.3%、0.3%、0.2%,供试品溶液中均未检出各杂质,符合验证要求,耐用性良好。

2.11 样品有关物质测定

取3批注射用唑来膦酸(批号210215AJ、210323AJ、210530AJ),按照“2.1.6”项方法,每批样品平行配制2份供试品溶液,每份分别进样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质量分数。经测定,3批样品中均未检出杂质B、C、D(表2)。

表2 样品有关物质测定结果

Table 2 Test results of related substances in sample

名称	210215AJ	210323AJ	210530AJ	限度/%
杂质B	ND	ND	ND	0.5
杂质C	ND	ND	ND	0.5
杂质D	ND	ND	ND	0.5

3 讨论

3.1 流动相的选择

实验初期选用三乙胺作为流动相的缓冲液时,

杂质C和杂质D色谱峰分离度不佳,且色谱峰整体前移,而采用1-辛烷磺酸钠可有效分离主成分及各杂质。在缓冲液中加入EDTA-二钠可以去除色谱柱上金属离子的干扰,减少二磷酸结构与金属离子的络合作用,改善氮原子与色谱柱上硅醇基作用导致色谱峰拖尾的情况。

3.2 色谱条件的选择

唑来膦酸因含有咪唑基团,在210 nm处有最大吸收,检测波长较低,流动相中加入EDTA-二钠使其在低波长检测时出现鬼峰,因此本实验将检测波长提高至215 nm,且在该波长条件下能检出210 nm处可检出的所有杂质。其次,唑来膦酸酸性较强,保留能力比较差,试用了Agilent ZORBAX Eclipse XDB、Waters C₁₈和Titank Phenyl-Hexyl 3种色谱柱后,发现采用Titank Phenyl-Hexyl柱不仅可以增强保留时间,实现基线分离,并且能够呈现良好的峰形。而在35、30、25、20℃柱温条件下进行检测分析,发现色谱柱的温度对有关物质的色谱分离效果无明显区别,因此,测定可在室温下进行。

3.3 本实验优势

国内外最新研究^[16-17]采用三乙胺-乙腈或乙酸铵缓冲液-乙腈为流动相,本实验采用离子对试剂1-辛烷磺酸钠缓冲体系作为流动相,可增加色谱峰保留时间、改善分离性质,显著缩短分离时间,有效改善峰形。本研究首次建立检测注射用唑来膦酸中的3种有关物质的HPLC法,并测定了3批样品。方法专属性强、灵敏度高、操作简单,可准确测定注射用唑来膦酸中3种有关物质的含量,满足本品质量研究的要求,为其质量标准提升,提供理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 张宇, 解新鹏, 李峰, 等. 唑来膦酸对乳腺癌治疗相关骨流失保护作用的研究进展 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2021, 27(12): 1853-1858.
Zhang Y, Xie X P, Li F, et al. Research progress on the protective effect of zoledronic acid on bone loss related to breast cancer treatment [J]. Chin J Osteoporos, 2021, 27(12): 1853-1858.
- [2] 陈颖, 何柳柳, 邓伟民, 等. 唑来膦酸治疗原发性骨质疏松症的长期疗效 [J]. 实用医学杂志, 2023, 39(10): 1278-1284.
Chen Y, He L L, Deng W M, et al. Long-term efficacy of Zoledronic in treatment of primary osteoporosis [J]. J Pract Med, 2023, 39(10): 1278-1284.

- [3] 吕鹏, 张京莉, 杨涛, 等. 注射用唑来膦酸药物利用评价标准的建立与应用 [J]. 中国医院药学杂志, 2023, 43(11): 1266-1270.
Lv P, Zhang J L, Yang T, et al. Establishment and application of evaluation criteria for drug utilization of zoledronic acid for injection [J]. Chin J Hosp Pharm, 2023, 43(11): 1266-1270.
- [4] 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.
- [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] 杜桂平, 高胜男, 齐冉, 等. 地舒单抗和唑来膦酸治疗绝经后骨质疏松症的成本-效用分析 [J]. 中国药房, 2022, 33(14): 1742-1747.
Du G P, Gao S N, Qi R, et al. Cost-effectiveness analysis of disuzumab and zoledronic acid in the treatment of postmenopausal osteoporosis [J]. China Pharm, 2022, 33(14): 1742-1747.
- [7] 陈清河, 曾维铨, 黄少辉, 等. 碳酸钙D3、骨化三醇联合唑来膦酸对2型糖尿病合并原发性骨质疏松症患者骨密度和骨痛的影响 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2020, 26(2): 202-204, 226.
Chen Q H, Zeng W Q, Huang S H, et al. Effects of calcium carbonate D3 and calcitriol combined with zoledronic acid on bone mineral density and bone pain in elderly patients with T2DM complicated with primary osteoporosis [J]. Chin J Osteoporos, 2020, 26(2): 202-204, 226.
- [8] 焦增华, 刘希望, 杨亚军, 等. HPLC法测定阿司匹林丁香酚酯的研究 [J]. 动物医学进展, 2020, 41(4): 72-76.
Jiao Z H, Liu X W, Yang Y J, et al. Study on determination of AEE related substances by HPLC [J]. Prog Vet Med, 2020, 41(4): 72-76.
- [9] 殷吉磊, 刘力超, 匡建明, 等. 唑来膦酸的合成工艺研究 [J]. 中国抗生素杂志, 2019, 44(8): 938-941.
Yin J L, Liu L C, Kuang J M, et al. Study on the synthesis of zoledronic acid [J]. Chin J Antibiot, 2019, 44(8): 938-941.
- [10] 张萌萌. 双膦酸盐的今昔与思考 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2017, 23(3): 381-387.
Zhang M M. The past and thinking of the bisphosphonates [J]. Chin J Osteoporos, 2017, 23(3): 381-387.
- [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, 颜镔, 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] 蒋晔, 张晓青, 徐智儒. 高效液相色谱法测定唑来膦酸及其制剂含量 [J]. 药物分析杂志, 2005, 25(4): 406-408.
Jiang Y, Zhang X Q, Xu Z R. HPLC determination of content of zoledronic acid and its preparations [J]. Chin J Pharm Anal, 2005, 25(4): 406-408.
- [15] Petrovici A R, Silion M, Simionescu N, et al. Quantification of low amounts of zoledronic acid by HPLC-ESI-MS analysis: Method development and validation [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(11): 5944.
- [16] 姚曦. HPLC法测定唑来膦酸原料药中的有关物质 [J]. 今日药学, 2019, 29(4): 231-233.
Yao X. Determination of content and related substances of zoledronic acid by HPLC [J]. Pharm Today, 2019, 29(4): 231-233.
- [17] Burmaoglu R E, Saglik Aslan S. Determination of zoledronic acid and its related substances by high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection [J]. J Chromatogr Sci, 2019, 57(1): 33-43.

[责任编辑 兰新新]