

离子色谱法测定唑来膦酸原料药及其粉针剂中有关物质磷酸盐和亚磷酸盐

张 燕¹, 王维平², 闫占宽^{1, 3}, 朱汉帅¹, 张 敏², 刘钦伟³, 杨 春³, 王洪森^{1, 3*}

1. 江苏恒瑞医药股份有限公司, 江苏 连云港 222000

2. 江苏海洋大学 药学院, 江苏 连云港 222005

3. 江苏原创药物研发有限公司, 江苏 连云港 222042

摘要: 目的 建立一种同时测定唑来膦酸原料药及其粉针剂中的磷酸盐和亚磷酸盐的离子色谱方法。方法 采用 Dionex™IonPac™AS18Analytical (250 mm×4 mm) 色谱柱, Dionex™IonPac™AG18Analytical (50 mm×4 mm) 为保护柱, 以碳酸钠和碳酸氢钠水溶液为淋洗液进行等度洗脱, 体积流量为 1.0 mL·min⁻¹, 采用抑制型电导检测器检测。结果 亚磷酸根和磷酸根与相邻峰的分离效果良好, 分离度均大于 1.5。亚磷酸根和磷酸根分别在 2.075~20.750 μg·mL⁻¹ 和 2.000~20.000 μg·mL⁻¹ 范围内线性关系良好, 相关系数均大于 0.998 9; 原料药中亚磷酸根和磷酸根的回收率分别在 94.7%~108.0% 和 98.4%~106.3%, 回收率 RSD 分别为 3.6% 和 2.3%; 粉针剂中亚磷酸根和磷酸根回收率分别在 93.9%~100.4% 和 98.2%~104.4%, 回收率 RSD 分别为 2.5% 和 1.9%; 重复性、精密度、耐用性、溶液稳定性均符合要求。3 批原料药及粉针剂中均未检出亚磷酸根和磷酸根杂质。结论 该方法准确、灵敏、操作简单, 适用于唑来膦酸及其粉针剂中磷酸盐和亚磷酸盐杂质的质控研究。

关键词: 唑来膦酸; 有关物质; 离子色谱法; 磷酸盐; 亚磷酸盐

中图分类号: R932 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376 (2023) 12-2530-05

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.12.005

Determination of related substances phosphate and phosphite in zoledronic acid API and its powder-injection by ion chromatography

ZHANG Yan¹, WANG Weiping², YAN Zhankuan^{1, 3}, ZHU Hanshuai³, ZHANG Min², LIU Qinwei¹, YANG Chun³, WANG Hongsen^{1, 3}

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

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

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

Abstract: **Objective** A method for simultaneous determination of phosphate and phosphite in zoledronic acid and its powder-injection by ion chromatography was developed. **Methods** A Dionex™IonPac™AS18Analytical (250 mm × 4 mm) column and a Dionex™IonPac™AG18Analytical (50 mm×4 mm) guard column were used for isocratic elution with aqueous sodium carbonate and sodium bicarbonate as the eluent. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, and the detection was performed with a suppression type conductivity detector. **Results** The separation of phosphite and phosphate from the surrounding peaks was good, and the separation was greater than 1.5. The linear ranges of phosphite and phosphate were 2.075 to 20.750 μg·mL⁻¹ and 2.000 to 20.000 μg·mL⁻¹, respectively, with the correlation coefficients R^2 greater than 0.998 9. The recovery rates of phosphates and phosphates in the raw materials are 94.7% to 108.0% and 98.4% to 106.3%, respectively, with RSDs of 3.6% and 2.3%. The recovery rates of phosphates and phosphates in the powder injection were 93.9% to 100.4% and 98.2% to 104.4%, respectively, with RSDs of 2.5% and 1.9%; The repeatability, precision, durability, and solution stability all meet the requirements. No phosphite and phosphate impurity were detected in the 3 batches of raw materials and powder injection. **Conclusion** The method is accurate, sensitive, simple to operate, and

收稿日期: 2023-08-02

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: 张 燕(1980—), 女, 硕士研究生, 主要从事药品质量研究。E-mail: zhangyan_tg@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

is suitable for the quality control of phosphate and phosphite impurities in zoledronic acid and its powder injection.

Key words: zoledronic acid; related substances; Ion Chromatography; phosphate; phosphite

唑来膦酸属于第3代双膦酸盐类药物^[1],化学名为1-羟基-2-(咪唑-1-基)-亚乙基-1,1-二磷酸,化学结构见图1。该药物是一种强力骨吸收抑制剂,能与肿瘤组织中表达的特异性受体结合,促进破骨细胞的修复和转移,抑制癌细胞的增殖、活性和血管生成^[2-3],可用于恶性肿瘤引起的高钙血症以及多发性骨髓瘤和实体瘤骨转移等相关疾病的治疗^[4]。据临床试验显示,唑来膦酸是目前抗骨质疏松疗效最好的双膦酸盐类药物^[5]。唑来膦酸在合成过程中可能会产生磷酸盐和亚磷酸盐及其他有关物质^[6-7],影响用药安全,应加以控制。文献报道^[8-13]多采用高效液相色谱法检测唑来膦酸有关物质和含量,误差较大。而离子色谱法操作简单,且无需使用有机溶剂,对无机酸、各类阴离子和阳离子成分测定具有一定的优势,已经越来越多的应用于药物的杂质检查及含量测定中。张洁等^[14]建立离子色谱法测定磷酸和亚磷酸,该方法简单、灵敏、重复性好,本研究在此基础上对其淋洗液和洗脱方式进行改进,建立一种离子色谱电导抑制法测定唑来膦酸原料药及其粉针剂中亚磷酸盐和磷酸盐杂质,缩短洗脱时间,为控制其有关物质的限度提供参考。



图1 唑来膦酸、亚磷酸根、磷酸根结构

Fig. 1 Structure of zoledronic acid, phosphite and phosphate

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Thermo Scientific ICS-900 离子色谱系统(赛默飞世尔科技有限公司),电导检测器;XS3DU型百万分之一、XS105DU型十万分之一电子分析天平(Mettler Toledo);Milli-Q 超纯水仪(昆山禾创超声仪器有限公司);KH-300B 超声仪(Millipore)。

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、20221003);唑来膦酸粉针剂(江苏恒瑞医药有限公司,批号 210215AJ、

210323AJ、210530AJ);磷酸根离子标准溶液(国家有色金属及电子材料分析测试中心,批号 229040-1,质量浓度 $1\,000\,\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$);亚磷酸对照品(QCSRM,批号 15294,质量分数 96.77%);碳酸钠(分析纯)、碳酸氢钠(分析纯),均购自上海凌峰化学试剂有限公司;超纯水由 Milli-Q 纯水系统制备。

2 方法与结果

2.1 溶液配制

2.1.1 空白溶液(稀释剂) 由 Milli-Q 纯水系统制备超纯水作为空白溶液。

2.1.2 空白辅料溶液 取枸橼酸钠约 24 mg、甘露醇约 220 mg,精密称定,加 3 mL 稀释剂溶解,摇匀,制得空白辅料溶液。

2.1.3 磷酸盐储备液 精密移取磷酸根离子标准溶液 1 mL,置于 10 mL 量瓶中,加稀释剂溶解稀释定容至刻度,混匀,制得磷酸根质量浓度约为 $100\,\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品储备液。

2.1.4 亚磷酸盐储备液 取亚磷酸对照品约 10 mg,精密称定,置于 100 mL 量瓶中,加稀释剂溶解稀释定容至刻度,混匀,制得亚磷酸根质量浓度约为 $100\,\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品储备液。

2.1.5 混合对照品储备液 取亚磷酸对照品约 10 mg,精密称定,置于 10 mL 量瓶中,加入稀释剂稀释定容至刻度,摇匀;分别精密移取 2 mL 上述溶液和磷酸根离子标准溶液,置于同一个 20 mL 量瓶中,加入稀释剂稀释定容至刻度,摇匀,制得亚磷酸根和磷酸根离子质量浓度均约为 $100\,\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合对照品储备液。

2.1.6 混合对照品溶液 精密移取 1 mL 混合对照品储备液,置于 10 mL 量瓶中,加入稀释剂稀释定容至刻度,摇匀,制得亚磷酸根和磷酸根离子质量浓度均约为 $10\,\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液。

2.1.7 供试品溶液 取唑来膦酸粉针剂约 40 mg,精密称定,置于 10 mL 量瓶中,加稀释剂溶解稀释定容,摇匀,制得唑来膦酸质量浓度约为 $4\,\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的供试品溶液。原料药供试品制备方法同粉针剂。

2.1.8 100% 加标供试品溶液 取唑来膦酸粉针剂约 40 mg,精密称定,置于 10 mL 量瓶中,精密加入 1 mL 混合对照品储备液后,用稀释剂溶解稀释定容,摇匀,制得唑来膦酸质量浓度约为 $4\,\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、亚磷酸根和磷酸根质量浓度均约为 $10\,\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的

100%加标供试品溶液。原料药加标供试品制备方法同粉针剂。

2.2 色谱条件

采用Dionex™IonPac™AS18Analytical(250 mm×4 mm)色谱柱, Dionex™IonPac™AG18 Analytical(50 mm×4 mm)为保护柱;以4.5 mmol·L⁻¹碳酸钠和1.4 mmol·L⁻¹碳酸氢钠水溶液为淋洗液,进行等度洗脱;体积流量1.0 mL·min⁻¹;进样量10 μL;运行时间20 min;检测器:电导检测器;抑制器:Thermo Scientific DionexAERS500,抑制电流为30 mA。

2.3 专属性试验

取“2.1”项中的空白溶液、空白辅料溶液、混合对照品溶液、供试品溶液、100%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,空白溶液和空白辅料溶液均不干扰亚磷酸根、磷酸根的测定,供试品溶液中亚磷酸、磷酸根出峰位置无干扰,混合对照品溶液中亚磷酸根和磷酸根的峰分离度为4.9。

2.4 检测限和定量限

取“2.1”项下亚磷酸对照品储备液和磷酸根对照品储备液,逐级稀释,按“2.2”项中的色谱条件进行检测,以信噪比(S/N)≥3估算亚磷酸根和磷酸根的检测限, S/N ≥10估算亚磷酸根和磷酸根的定量限。结果显示,亚磷酸根和磷酸根的定量限分别为587和1 000 ng·mL⁻¹;检测限分别为176和300 ng·mL⁻¹。

2.5 线性关系考察

根据唑来膦酸的杂质限度(0.25%),将“2.1”项下混合对照品储备液分别稀释成20%、50%、80%、100%、150%和200%的不同浓度的亚磷酸根和磷酸根的线性溶液。按照“2.2”项下色谱条件进行检测,以各组分质量浓度($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)为X轴,响应为Y轴绘制线性曲线,计算相关系数 R^2 。结果表明,亚磷酸根和磷酸根在线性范围内线性关系良好,相关系数符合要求。结果见表1。

2.6 进样精密度试验

按照“2.1”项下,配制1份混合对照品溶液,连续进样6针,亚磷酸根和磷酸根峰面积RSD分别为4.4%、7.5%,均小于10%,表明该方法仪器精密度良好。

2.7 重复性试验

按照“2.1”项下的方法平行配制6份100%加标供试品溶液,进样测定,原料药中亚磷酸根和磷酸

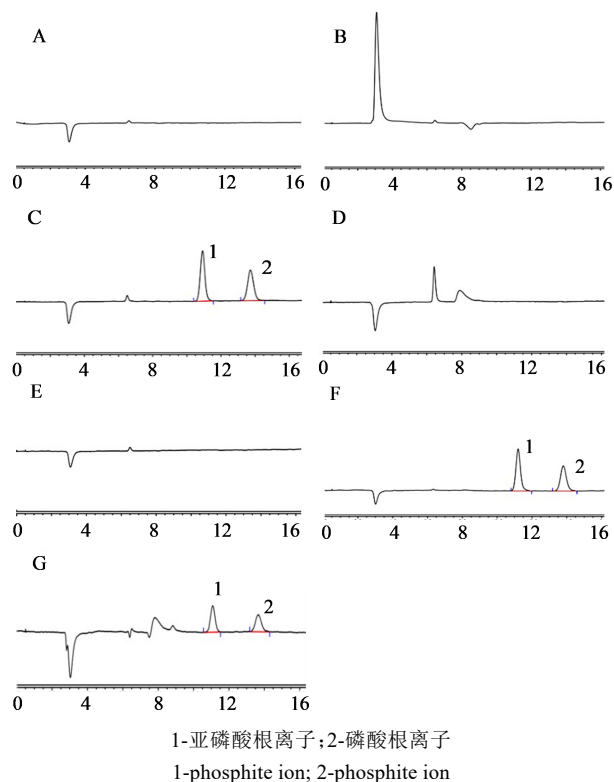


图2 空白溶液(A)、空白辅料溶液(B)、混合对照品溶液(C)、原料药供试品溶液(D)、粉针剂供试品溶液(E)、原料药100%加标供试品(F)、粉针剂100%加标供试品(G)色谱图

Fig. 2 Chromatographic diagram of blank solution (A), blank excipient solution (B), mixed reference solution (C), raw material test solution (D), powder injection test solution (E), raw material 100% plus standard test product (F) and powder injection 100% plus standard test product (G)

表1 线性关系考察

Table 1 Linear relationship

名称	线性方程	R^2	线性范围/ ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
亚磷酸根	$y=0.0279x-0.0047$	0.9989	2.075~20.750
磷酸根	$y=0.0226x-0.0077$	0.9998	2.000~20.000

根的峰面积RSD分别为1.4%、1.7%,粉针剂中亚磷酸根和磷酸根的峰面积RSD分别为1.8%、0.8%,结果表明该方法重复性良好。

2.8 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100%加标供试品溶液,原料药中亚磷酸根和磷酸根的峰面积RSD分别为3.1%、2.8%,粉针剂中亚磷酸根和磷酸根峰面积RSD分别为1.3%、2.0%。该项下的6份100%加标供试品溶液与重复性试验项下的6份100%加标供试品溶液,共12份加标供试品溶液中,原料药的亚磷酸根和磷酸根的

峰面积RSD分别为5.1%、9.9%，粉针剂的亚磷酸根和磷酸根峰面积RSD分别为5.1%和5.4%，均小于10%。结果表明该方法中间精密度良好。

2.9 回收率试验

称取9份唑来膦酸供试品，分别置于10 mL量瓶中，精密量取并加入混合对照品储备液1、2、3 mL，加稀释剂定容，制成50%、100%和150%浓度水平的加标供试品溶液，每个浓度平行制备3份。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。经计算，原料药中亚磷酸根和磷酸根的回收率分别在94.7%~108.0%和98.4%~106.3%，回收率RSD分别为3.6%和2.3%；粉针剂中亚磷酸根和磷酸根回收率分别在93.9%~100.4%和98.2%~104.4%，回收率RSD分别为2.5%和1.9%，结果表明方法的准确度良好。

2.10 溶液稳定性试验

按照“2.1”项配制溶液，将混合对照品溶液、供试品溶液和100%加标供试品溶液在室温下放置0、2、5、20、22.5、27 h后进样，观察亚磷酸根和磷酸根的峰面积变化。结果显示，混合对照品溶液中，亚磷酸根和磷酸根峰面积RSD分别为3.9%和6.2%；100%加标供试品溶液中，原料药的亚磷酸根和磷酸根的峰面积RSD分别为2.3%和5.4%，粉针剂的亚磷酸根和磷酸根峰面积RSD分别为3.3%和6.9%；供试品溶液中未有亚磷酸根和磷酸根的检出。室温下混合对照品溶液、供试品溶液和100%加标供试品溶液在27 h内均稳定。

2.11 耐用性试验

取“2.1”项下配制的混合对照品溶液和100%加标供试品溶液，按“2.2”项下规定的色谱条件进行分析，分别考察不同体积流量($\pm 0.1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$)和淋洗液($\pm 0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸钠、 $\pm 0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸氢钠)条件下的耐用性。结果显示，混合对照品溶液中，粉针剂的亚磷酸根、磷酸根峰面积RSD均为1.1%；100%加标供试品溶液中，原料药的亚磷酸根和磷酸根的峰面积RSD分别为2.4%和5.1%；粉针剂的亚磷酸根和磷酸根峰面积RSD分别为1.7%和1.8%。表明该方法耐用性良好。

2.12 样品有关物质测定

取3批唑来膦酸原料药(批号20221001、20221002、20221003)和3批唑来膦酸粉针剂(批号210215AJ、210323AJ、210530AJ)，按照“2.1”项，每批样品平行配制2份供试品溶液，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。经

测定，3批原料药和3批粉针剂中均未检出亚磷酸根和磷酸根(表3)。

表3 样品有关物质测定结果

Table 3 Test results of related substances in sample

名称	批号	亚磷酸根	磷酸根
原料药	20221001	ND	ND
	20221002	ND	ND
	20221003	ND	ND
粉针剂	210215AJ	ND	ND
	210323AJ	ND	ND
	210530AJ	ND	ND

ND-未检出

ND-not detected

3 讨论

唑来膦酸含有咪唑基团，利用其末端紫外吸收，可采用高效液相色谱紫外检测器测定其含量，但该方法无法检测磷酸盐、亚磷酸盐这类无紫外吸收的杂质，而离子色谱法在检测这些化合物时却更有优势，且能同时测定多种阴离子，仪器稳定性好，可减少操作过程带来的误差。

在离子色谱系统中，淋洗液的组成和浓度都是影响测定结果的重要因素。试验初期采用KOH作为淋洗液进行梯度洗脱，发现基线不稳，且运行时间长，所以采用了洗脱能力较强的碳酸钠和碳酸氢钠水溶液作为淋洗液，调整其浓度，考察不同浓度的淋洗液对于检测结果的影响。结果表明， $4.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸钠和 $1.4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 碳酸氢钠水溶液的淋洗液可以提高亚磷酸根和磷酸根的分度并改善其峰形。

本实验建立了一种离子色谱法测定唑来膦酸原料药及其粉针剂中的亚磷酸根和磷酸根，该方法专属性强、操作简单快速、灵敏度高，可准确测定唑来膦酸原料药及其粉针剂中的磷酸盐和亚磷酸盐这两种有关物质。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] Neville-Webbe H L, Coleman R E. The use of zoledronic acid in the management of metastatic bone disease and hypercalcaemia [J]. Palliat Med, 2003, 17(6): 539-553.
- [4] 马在松, 马锐, 安伟, 等. 唑来膦酸钠的临床应用进展 [J]. 新疆医学, 2019, 49(12): 1180-1186.
- Ma Z S, Ma R, An W, et al. Progress in clinical application of zoledronic acid sodium [J]. Xinjiang Med J, 2019, 49(12): 1180-1186.
- [5] 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.
- [6] 杨清翠, 孙晓红, 刘源发, 等. 唑来膦酸合成方法的研究进展 [J]. 合成化学, 2010, 18(6): 660-663.
- Yang Q C, Sun X H, Liu Y F, et al. Research progress on the synthetic methods of zoledronic acid [J]. Chin J Synth Chem, 2010, 18(6): 660-663.
- [7] 李杰. 唑来膦酸中试工艺和杂质研究 [D]. 长春: 吉林大学, 2015.
- Li J. Study on pilot-scale process and impurities of zoledronic acid [D]. Changchun: Jilin University, 2015.
- [8] 马仕珉, 石松安, 季晶晶, 等. 高效液相色谱法测定唑来膦酸中的磷酸盐和亚磷酸盐 [J]. 淮海工学院学报: 自然科学版, 2010, 19(4): 40-42.
- Ma S M, Shi S A, Ji J J, et al. Determination of phosphate and phosphite in zoledronic acid by HPLC [J]. J Huaihai Inst Technol Nat Sci Ed, 2010, 19(4): 40-42.
- [9] 胡汉昆, 颜锵, 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.
- [10] 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.
- [11] 严翠霞, 张颖, 孙珍, 等. 离子色谱法同时测定醋酸阿托西班原料药及其注射液中的三氟乙酸与乙酸 [J]. 中国医药工业杂志, 2023, 54(1): 135-140.
- Yan C X, Zhang Y, Sun Z, et al. Simultaneous determination of trifluoroacetic acid and acetic acid in atosiban acetate bulk drug and its injection by ion chromatography [J]. Chin J Pharm, 2023, 54(1): 135-140.
- [12] 沈于兰, 尧爱珉, 杨敏智. 离子色谱法测定利塞膦酸钠片的有关物质及含量 [J]. 中国药师, 2020, 23(4): 777-780.
- Shen Y L, Yao A M, Yang M Z. Determination of related substances and content of risedronate sodium tablets by ion chromatography [J]. China Pharm, 2020, 23(4): 777-780.
- [13] 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.
- [14] 张洁, 胡泽锴, 陈霞. 离子色谱法测定唑来膦酸中的磷酸与亚磷酸 [J]. 华西药理学杂志, 2021, 36(6): 706-708.
- Zhang J, Hu Z K, Chen X. Determination of phosphoric acid and phosphorous acid in Zoledronic acid by Ion chromatography [J]. West China J Pharm Sci, 2021, 36(6): 706-708.

[责任编辑 兰新新]