

唑来膦酸含量及有关物质质控分析方法的建立

张耕,陈刚,戴萍(武汉市第一医院,湖北 武汉 430022)

摘要:目的 测定唑来膦酸的含量及有关物质。方法 高效液相色谱法。色谱条件: Hypersil-SAX 色谱柱,流动相为磷酸溶液(1.0 mL→1000 mL, pH 4.3 ± 0.2),流速为 0.8 mL·min⁻¹,检测波长 210 nm。结果 唑来膦酸在 0.2~2.0 mg·mL⁻¹ 范围内线性关系良好, $r=0.9995$, 线性方程为 $C=225436A-3930$ 。重现性 RSD=0.5% ($n=5$)。结论 该方法能简单、快捷、准确地同时测定唑来膦酸的含量及有关物质。

关键词: 唑来膦酸; 含量测定; 有关物质; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.101; R977.5

文献标识码: B

文章编号: 1007-7693(2003)04-0307-02

Establishment of analytical method to determine the purity and related substances for zoledronic acid

ZHANG Geng, CHEN Gang, DAI Ping(*The First Hospital of Wuhan city, Wuhan 430022, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To study the method for determination of purity and related substances of zoledronic acid. **METHOD** HPLC method was used, chromatography condition included Hypersil-SAX column and mobile phase consisted of phosphoric acid (1.0 mL→1000 mL, pH 4.3 ± 0.2), the flow rate was 0.8 mL·min⁻¹, and the detection wavelength was 210 nm. **RESULTS** The calibration curves was linear in the range of 0.2~2.0 mg·mL⁻¹. $r=0.9995$. $C=225436A-3930$, RSD=0.5% ($n=5$). **CONCLUSION** The method was found to be simple, quick and accurate for simultaneous determination of Zoledronic acid.

KEY WORDS zoledronic acid, content determination, related substances, HPLC

双膦酸类药物作为一种强力骨吸收抑制剂的研究开发早在上世纪 60 年代即已开始,唑来膦酸为最新一代的双膦酸类药物,动物模型显示它对高血钙的作用比目前临床代表药物帕米膦酸二钠强 850 倍[Drugs of Future 2000, 25(3): 259-268]。瑞士 Novartis 公司开发,于 2000 年 10 月首次在加拿大上市,规格为 4 mg 注射用冻干粉针。但国内未见有关唑来膦酸的研究报道,我们采用 HPLC 法对其含量及纯度检查方法进行了研究。

1 仪器与试剂

LC-10A 系列高效液相色谱仪(日本岛津公司),包括 LC-10AT 泵,SPD-10A 紫外检测器,C-18A 积分仪,7725i 型 20 μL 定量进样器;色谱柱: Hypersil-SAX 色谱柱(5 μm, 4.6 mm × 250 mm)(大连依利特分析仪器有限公司);磷酸为国产分析纯试剂;唑来膦酸对照品、原料及中间体均由武汉迈特威新技术开发有限公司提供。

2 色谱条件

色谱柱: Hypersil-SAX 色谱柱(5 μm, 4.6 mm × 250 mm);流动相磷酸溶液(0.8 mL→1000 mL),用 2 mol/L 氢氧化钠调节 pH 值 4.3 ± 0.2 为流动相;流速 0.8 mL/min;检测波长 210 nm。

3 方法的专属性考察

3.1 原料与中间体的分离效能

根据生产工艺,唑来膦酸合成过程中可能引入的杂质主要是中间体 1H-咪唑-1-乙酸,它也是本品水解的主要产物。

取合成反应的中间体 1H-咪唑-1-乙酸的标准品用流动相制成每 1 mL 中含 0.01 mg 的溶液,分别取唑来膦酸粗品、精制品用流动相分别制成每 1 mL 中含 2 mg 唑来膦酸的溶液。然后将 3 种溶液分别进样及等比例混合后进样 20 μL,结果发现中间体 1H-咪唑-1-乙酸及唑来膦酸的保留时间分别为 7.14 min 和 8.28 min。在此色谱条件下原料药和中间体能够完全分离。中间体在唑来膦酸粗品中含量很高,经过精制后,其含量降低,甚至近乎为零。

3.2 降解产物的检出

本品的主要降解产物是 1H-咪唑-1-乙酸,取唑来膦酸经强光照射 36 h,120 °C 36 h 强条件破坏后的样品,用流动相分别制成每 1 mL 中含 2 mg 的溶液,分别取 20 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图,并以唑来膦酸峰计算,理论塔板数 $N=5450$,1H-咪唑-1-乙酸与唑来膦酸的分离度 $R=1.62>1.5$ 。表明在我们选定的色谱条件下,1H-咪唑-1-乙酸与唑来膦酸能得到良好的分离分析,说明该方法的专属性较强。

3.3 最低检测限量

在本实验选定的色谱条件下,按信噪比为 3 对最低检测限进行测定,结果表明:1H-咪唑-1-乙酸与唑来膦酸的最低检测量分别为 0.78 ng,0.156 μg。

4 线性关系及方法学研究

4.1 线性关系

精密称取唑来膦酸对照品 0.1014 g 置 50 mL 量瓶中,加入适量流动相使溶解并稀释至刻度,摇匀;精密吸取 1, 3, 5,

7.9 mL 分别置 10 mL 量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀配成系列对照品溶液,分别取 20 μ L 注入液相色谱仪,记录色谱图及峰面积。以浓度 C ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) 对峰面积 A 进行线性回归得方程($n=5$) $C=225436 A-3930$, $r=0.9995$ 。结果表明唑来膦酸在流动相中浓度在 0.2 ~ 1.8 mg/mL 范围内与峰面积呈良好的线性关系。我们拟定的进样浓度为 1.0 mg/mL 。

4.2 进样精密度试验

取唑来膦酸对照品适量,加流动相制成每 1 mL 中约含 1.0 mg 的溶液,在上述色谱条件下,连续重复进样五次,记录色谱图及峰面积,结果峰面积的 RSD 为 0.3 %,表明唑来膦酸进样精密度良好。

4.3 回收率试验

采用加样回收法进行回收率的测定。精密称取唑来膦酸 20011021 批样品(含量 99.04 %) 适量,加入对照品同置 50 mL 量瓶中,加流动相使溶解并稀释至刻度,摇匀,分别取 20 μ L 注入液相色谱仪,记录色谱图及峰面积,计算回收率。结果唑来膦酸的平均回收率为 99.39 %,RSD=0.6 %($n=5$)

4.4 重现性试验

精密称取唑来膦酸 20010821 批样品适量(40,50,60 mg 各三份)置 50 mL 量瓶中,加流动相使溶解并稀释至刻度,摇匀,在上述色谱条件下依法进样测定,结果 RSD 为 0.5 %。

5 样品的测定结果

采用上述色谱条件,对 6 批唑来膦酸的含量进行了测定,采用杂质自身对照法计算 1 H-咪唑-1-乙酸的含量,供试品中杂质和均小于 1 %,结果表明,唑来膦酸原料样品具有较高的化学纯度。结果见表 1。

表 1 样品测定结果(%, $n=6$)

Tab 1 Determination results of samples

批 号	含 量	有关物质
20011021	99.04	0.36
20011103	99.65	0.42
20011109	99.40	0.67
20020122	99.46	0.39
20020204	99.06	0.54
20020210	99.80	0.62

6 讨论

6.1 含量分析方法的选择

根据唑来膦酸分子结构和化学性质,我们进行了以下方法学研究用于测定本品的含量。

6.1.1 非水滴定法 唑来膦酸分子结构中的咪唑环系有机氮化合物,呈弱碱性,可以考虑采用非水滴定法,但在溶剂的选择上有困难,我们试验过数种溶剂,结果是唑来膦酸不溶于冰醋酸、醋酸酐、苯、硝基甲烷、氯苯等溶剂,因此无法采用非水溶液滴定法。

6.1.2 酸碱中和滴定法 唑来膦酸在水溶液中呈强酸性,可与氢氧化钠溶液发生中和反应生成唑来膦酸钠盐(最少生成单钠盐,最多可生成四钠盐)。经实验发现滴定终点不明显,即使采用电位滴定法,也无明显的突变点,这可能与常温常压下多元酸成盐不完全有关。

在化学容量法不理想的情况下,采用了仪器分析的高效液相色谱法。

6.2 HPLC 色谱条件的确定

唑来膦酸在流动相中的紫外吸收图谱显示最大吸收波长为 210 nm。因此选用 210 nm 波长作为检测波长。

在确定流动相条件时,我们对多组流动相进行了筛选,经过比较实验,认为当磷酸离子浓度一定时,酸度影响分离度;pH 值越高,分离度愈大,但样品的洗脱能力也呈下降趋势;当酸度一定时,离子浓度增大,样品保留时间逐渐缩短,分离度降低。根据实验结果,确定磷酸溶液(0.8 mL $\rightarrow$ 1000 mL),用 2 mol/L 氢氧化钠调节 pH 值 4.3 ± 0.2 为流动相。在该条件下,主峰保留时间恰当,合成反应的中间体及降解产物均能得到较好的分离检出。

6.3 有关物质的计算方法

分别精密称取 1 H-咪唑-1-乙酸与唑来膦酸各适量,用流动相制备成混合溶液(含 1 H-咪唑-1-乙酸 1.6 $\mu\text{g/mL}$, 唑来膦酸 2 mg/mL),取 20 μ L 注入液相色谱仪,记录各自的峰面积,计算 1 H-咪唑-1-乙酸与唑来膦酸的峰面积相对校正因子 $F=135$ (以唑来膦酸计作 1),由于 F 值高,因此无论采用峰面积归一化法,还是自身低浓度对照法,其准确度都是不高的。只有采用杂质自身对照法,才能准确定量计算。所以采用杂质自身对照法定量检查 1 H-咪唑-1-乙酸的含量。

6.4 所建立的 HPLC 法灵敏、准确,重现性好,唑来膦酸浓度在 0.2 ~ 2.0 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内与峰面积呈良好线性关系,且操作简便,可同时测定唑来膦酸的含量及其有关物质。