

混合模式色谱柱全水相测定阿仑膦酸钠片的含量和有关物质

步玉如^{1,2}, 顾王文², 熊亮³, 孙考祥^{1*} [1.烟台大学药学院, 山东 烟台 264000; 2.中国科学院上海药物研究所药物制剂研究中心, 上海 201203; 3.赛默飞世尔科技(中国)有限公司, 广州 510300]

摘要: 目的 建立一种混合模式色谱柱联用电雾式检测器测定阿仑膦酸钠片的含量和有关物质的方法。方法 采用 Acclaim Trinity P2 色谱柱(2.1 mm×100 mm, 3 μm), 柱温 35 °C, 以水(A)-100 mmol·L⁻¹ 甲酸铵溶液(用甲酸调至 pH 3.3, B)为流动相进行梯度洗脱(0~4 min, 20%→50%B; 4~6 min, 50%→40%B; 6~8 min, 40%→20%B), 流速为 0.3 mL·min⁻¹, 进样量为 20 μL; 采用电雾式检测器测定, 雾化温度为 50 °C, 采样频率为 5 Hz, 过滤常数为 3.6 s。结果 阿仑膦酸钠在 0.70~1.40 mg·mL⁻¹ 内线性良好($r^2=0.9992$), 方法重复性的 RSD 为 0.53%, 平均加样回收率($n=9$)为 99.8%(RSD=1.25%); 有关物质测定项下, 主成分阿仑膦酸钠, 杂质磷酸盐、亚磷酸盐及 4-氨基丁酸分别在 19.04~76.16, 3.95~49.38, 3.97~49.69, 3.94~49.23 μg·mL⁻¹ 内线性良好($r^2>0.998$), 且各杂质的校正因子为 0.67, 0.56, 0.55, 各杂质定量限约为主成分浓度的 0.05%, 杂质测定方法的平均回收率($n=9$)分别为 86.2%, 85.4%, 91.0%, 且 RSD<2%; 3 家企业生产的阿仑膦酸钠片剂中阿仑膦酸的标示含量分别为 92.0%, 91.5%, 95.2%, 各杂质含量均小于中国药典阿仑膦酸钠项下规定的限度 0.5%。结论 该方法操作简便, 灵敏度和准确性较高, 可用于阿仑膦酸钠片的含量测定和有关物质检查。

关键词: 阿仑膦酸钠; 混合模式色谱柱; 电雾式检测器; 全水相体系; 有关物质

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2021)08-0977-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2021.08.013

引用本文: 步玉如, 顾王文, 熊亮, 等. 混合模式色谱柱全水相测定阿仑膦酸钠片的含量和有关物质[J]. 中国现代应用药学, 2021, 38(8): 977-984.

Determination of the Content and Related Substances of Alendronate Sodium Tablet Using the Mixed-mode Chromatographic Column in All Aqueous System

BU Yuru^{1,2}, GU Wangwen², XIONG Liang³, SUN Kaoxiang^{1*} [1.School of Pharmacy, Yantai University, Yantai 264000, China; 2.Center for Formulations System, Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China; 3.Thermo Fisher Scientific(China) Co., Ltd., Guangzhou 510300, China]

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a mixed-mode chromatographic column coupled with charged aerosol detector method for the determination of related substances and content of the alendronate sodium tablets. **METHODS** The chromatographic separation was achieved on Acclaim Trinity P2 column(2.1 mm×100 mm, 3 μm) with column temperature of 35 °C by a gradient elution using the mobile phase of water(A)-100 mmol·L⁻¹ ammonium formate(B, adjusted with formic acid to pH 3.3)(0~4 min, 20%→50%B; 4~6 min, 50%→40%B; 6~8 min, 40%→20%B). The flow rate was 0.3 mL·min⁻¹, and the injection volume was 20 μL. Charged aerosol detector was used. Nebulization temperature was 50 °C, collection frequency was 5 Hz, and the filter constant was 3.6 s. **RESULTS** The method for content determination of alendronate sodium had a good linearity in the range of 0.70~1.40 mg·mL⁻¹($r^2=0.9992$), the repeatability was good(RSD=0.53%). The average recovery($n=9$) of alendronate sodium was 99.8%(RSD=1.25%). Under the terms of determination of related substances, the main component of alendronate sodium, impurity of phosphate, phosphite and 4-aminobutyric acid had good linear range in 19.04~76.16, 3.95~49.38, 3.97~49.69, 3.94~49.23 μg·mL⁻¹, respectively($r^2>0.998$), and the corrected factors for each impurity were 0.67, 0.56, 0.55. The limit of quantitation concentration of each impurity was about 0.05% of the concentration of the main component. In addition, the average recoveries($n=9$) of impurity test method were 86.2%, 85.4%, 91.0%, and RSD<2%, respectively; the labeled content of alendronate in alendronate sodium tablets produced by three companies were 92.0%, 91.5% and 95.2%, respectively, and the content of each impurity was less than the limit of 0.5% under alendronate sodium in the Chinese Pharmacopoeia. **CONCLUSION** The method is simple, accurate, sensitive, and applicable for the content determination and related substances inspection of alendronate sodium tablets.

KEYWORDS: alendronate sodium; mixed-mode chromatographic column; charged aerosol detector; all aqueous system; related substances

作者简介: 步玉如, 女, 硕士生 Tel: 17862812797 E-mail: bycd19941116@163.com *通信作者: 孙考祥, 男, 教授, 博导 Tel: (0535)6706021 E-mail: sunkx@ytu.edu.cn

阿仑膦酸钠是第3代含P-C-P连接键的双磷酸类药物之一,结构式见图1。它通过抑制破骨细胞的活性而发挥抗骨吸收作用^[1],临床上适用于防治骨质疏松症。在同类双磷酸类药物中,它是国家药品监督管理局批准的唯一一个可治疗男性骨质疏松症的药物。阿仑膦酸钠片最早于1993年在意大利上市,截至2020年,在中国已批准该药的仿制企业达18家。阿仑膦酸钠是以4-氨基丁酸为起始原料,与亚磷酸、三氯化磷反应,再与氢氧化钠成盐而得^[2]。目前各国药典收录的阿仑膦酸钠质量标准中的检测方法不尽相同,英国药典中用阴离子交换树脂结合示差检测器测定主成分阿仑膦酸钠、工艺杂质亚磷酸盐、降解杂质磷酸盐,另一工艺杂质4-氨基丁酸采用了薄层色谱法;美国药典和日本药典用FMOC-Cl衍生后通过阳离子交换柱分离的方法测定阿仑膦酸钠、4-氨基丁酸,但这种方法无法检测磷酸盐、亚磷酸盐;中国药典以阴离子交换柱结合抑制性电导检测器测定亚磷酸盐、磷酸盐,制剂中阿仑膦酸钠的含量测定采用非抑制型电导检测器,原料则采用电位滴定法。可见以上药典收录的方法都不能同时对主成分和3个杂质(4-氨基丁酸、亚磷酸盐、磷酸盐)进行定量测定,而且其中的示差折光检测器灵敏度较低,并与梯度洗脱不相容^[3];柱前衍生-紫外检测法操作繁琐,存在衍生不彻底和衍生产物不稳定的问题^[4];薄层色谱法的重复性不佳^[5];电导检测器易受温度变化^[6]的干扰。

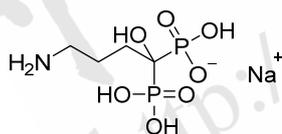


图1 阿仑膦酸钠的化学结构
Fig. 1 Chemical structure of alendronate sodium

阿仑膦酸钠及其杂质4-氨基丁酸、磷酸盐、亚磷酸盐属于可离子化分析物,没有紫外吸收,其极性较大因而在常用的反相色谱系统中无法保留。本实验尝试采用一种混合模式色谱柱(Acclaim Trinity P2柱)和电雾式检测器(charged aerosol detector, CAD)相结合的方法来同时测定阿仑膦酸钠的主成分和有关物质含量。

Acclaim Trinity P2柱是一款具有亲水作用/强阴离子交换/弱阳离子交换功能的三相混合模式色

谱柱。本研究采用 $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲酸铵溶液(pH 3.3)和水形成的全水相体系为流动相,在选定的pH条件下,杂质4-氨基丁酸以阳离子形式存在,杂质磷酸盐、亚磷酸盐分别以阴离子形式存在,利用Acclaim Trinity P2柱的阴阳离子交换区在空间上分隔的特性,阿仑膦酸钠中阿仑膦酸阴离子与其平衡离子 Na^+ 分离度增大,阳离子杂质和阴离子杂质在不同离子强度的流动相洗脱下也得到有效分离,而CAD检测器高灵敏度和宽线性范围的特性,能保证报告限度不低于杂质的最低定量限(limit of quantitation, LOQ),从而建立了一种同时测定阿仑膦酸钠中阿仑膦酸和有关物质(磷酸盐、亚磷酸盐、4-氨基丁酸)的高效液相测定方法,且该方法操作简便、专属性强,为阿仑膦酸钠的全面质量控制提供了一种有效的分析手段。

1 仪器与试剂

Dionex UltiMate 3000 HPLC仪、Dionex Chromeleon 7.0色谱工作站、Dionex Corona Veo电喷雾检测器、Acclaim Trinity P2柱($2.1\text{ mm}\times 100\text{ mm}$, $3\text{ }\mu\text{m}$)均购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司;NiGen LCMS 100型氮气发生器(意大利Claind公司);DL-480A型超声波清洗器(上海之信仪器有限公司);225D-1CN型电子天平(德国赛多利斯公司);Milli-Q超纯水系统。

阿仑膦酸钠三水合物对照品(批号:LM30S75;纯度 $\geq 98\%$)、4-氨基丁酸对照品(批号:LF60T110;纯度 $\geq 98\%$)、NaCl(分析纯)均购自上海百灵威化学科技有限公司;阿仑膦酸对照品(批号:A2352EA27;纯度 $\geq 98\%$)、磷酸对照品(批号:P9482EA83;纯度 $\geq 98\%$)、甲酸铵(色谱纯)均购自上海吉至生化科技有限公司;亚磷酸对照品(Sigma试剂公司,批号:MKCF8925;纯度 $\geq 99\%$);甲酸[色谱纯,梯希爱(上海)化成工业发展有限公司]。

阿仑膦酸钠片[京福元医药股份有限公司(A厂家),批号:21905042,21908002;规格:70 mg。上海海尼药业有限公司(B厂家),批号:1810040;规格:10 mg。万特制药(海南)有限公司(C厂家),批号:20190201;规格:70 mg]。

2 方法

2.1 色谱条件

Acclaim Trinity P2柱($2.1\text{ mm}\times 100\text{ }\mu\text{m}$, $3\text{ }\mu\text{m}$);柱温: $35\text{ }^\circ\text{C}$;流速: $0.3\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$;进样量: $20\text{ }\mu\text{L}$;溶剂:水;流动相:水(A)- $100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲酸铵溶

液(用甲酸调至 pH 3.3, B), 梯度洗脱(0~4 min, 20%→50%B; 4~6 min, 50%→40%B; 6~8 min, 40%→20%B)。CAD 的参数: 雾化器温度 50 °C, 采样频率 5 Hz, 过滤常数 3.6 s, 氮气纯度>99.0%, 氮气压力 64.8 psi。

2.2 溶液的配制

2.2.1 系统适应性溶液 精密称取阿仑膦酸钠、磷酸、亚磷酸、4-氨基丁酸的对照品适量, 置 20 mL 量瓶中, 加溶剂超声溶解并稀释至刻度, 配制成阿仑膦酸钠的浓度为 $8 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 磷酸、亚磷酸、4-氨基丁酸的浓度为 $0.04 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (约相当于主成分阿仑膦酸钠浓度的 0.5%)的系统适应性溶液。

2.2.2 含量测定供试品溶液 取阿仑膦酸钠片剂研细, 取适量精密称定, 置 20 mL 量瓶中, 加溶剂超声溶解并稀释至刻度, 摇匀, 并用 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, 配制含阿仑膦酸钠 $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的含量测定供试品溶液; 精密称取阿仑膦酸钠对照品适量, 同法配制成相同浓度的含量测定对照品溶液(以阿仑膦酸计, 浓度为 $0.8 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)。

2.2.3 有关物质测定供试品溶液 取阿仑膦酸钠片剂研细, 取适量精密称定, 置 20 mL 量瓶中, 加溶剂超声溶解并稀释至刻度, 摇匀, 并用 $0.45 \mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤, 配制得含阿仑膦酸钠 $8 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的有关物质测定供试品溶液; 精密称取各杂质对照品(亚磷酸、磷酸、4-氨基丁酸)适量, 同法配制得 $0.04 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 有关物质测定对照品溶液(约相当于主成分阿仑膦酸钠浓度的 0.5%)。

2.2.4 含量测定与有关物质测定标准曲线溶液 取阿仑膦酸钠对照品适量, 精密称定, 加溶剂超声溶解并稀释至刻度, 配制成质量浓度为 $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的线性储备液 1, 精密量取线性储备液 1, 配制成质量浓度分别为 1.4, 1.3, 1.2, 1.0, 0.8, $0.7 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的阿仑膦酸钠含量测定标准曲线溶液 1。

取阿仑膦酸钠、4-氨基丁酸、磷酸、亚磷酸对照品适量, 精密称定, 加溶剂超声溶解并稀释至刻度, 配制成各成分的质量浓度均为 $2 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 线性储备液 2, 精密量取线性储备液 2 适量, 配制成质量浓度分别为 60, 50, 40, 30, 20, 15, 8, $4 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的有关物质测定标准曲线溶液 2。

2.3 色谱条件的选择

Acclaim Trinity P2 色谱柱中促使成分分离的驱动力是亲水作用力/阴离子交换作用力/阳离子

交换作用力。提高有机溶剂相的比例, 使极性物质先有保留, 这是亲水作用力的体现, 但是本研究发现在一定比例有机试剂如乙腈存在时, 峰形不规则, 所以采用了全水相体系(水-甲酸铵溶液), 此时阿仑膦酸钠以及杂质这类可离子化分析物的分离体现阴阳离子交换原理, 对该全水相体系的优化主要体现在对体系 pH 值、离子强度即缓冲液比例的改变上。

2.3.1 流动相 pH 的选择 对照品中阿仑膦酸钠、亚磷酸、磷酸在不同 pH 环境下有不同程度的解离, 从而有不同的保留时间, 为了阿仑膦酸钠及其杂质磷酸盐、亚磷酸盐的准确定位与定量, 需对体系 pH 进行探究。甲酸铵溶液的 pH 值为 2.87 时, 阿仑膦酸的色谱峰不出现, 是由于流动相 pH 值太低, 抑制药物的离子化, 使之在色谱柱上不发生离子交换作用, 从而不能被洗脱; 甲酸铵溶液的 pH 值为 3.65~5.6 时, 阿仑膦酸和磷酸的峰分离不开, 说明在此 pH 条件下, 它们的解离形式分别与色谱柱基团的离子交换作用相当, 会同时被洗脱; 甲酸铵溶液的 pH 值为 7.55 时, 磷酸和亚磷酸的色谱峰拖尾严重且亚磷酸出现“多峰”现象, 此时亚磷酸出现了多级解离。综上, 甲酸铵溶液的 pH 值应在 2.87~3.65 内选择。不同 pH 值甲酸铵作为流动相分析的色谱图见图 2。

氨基丁酸的等电点为 6 左右, 所以当甲酸铵溶液的 pH 值调至 3.3 左右时, 两性离子 4-氨基丁酸杂质的氨基基团解离程度大, 在水相体系中带正电荷, 杂质磷酸盐、亚磷酸盐则以负电荷形式存在。Acclaim Trinity P2 色谱柱的外孔区域有强阴离子交换特性, 内孔区域有弱阳离子交换特性, 所以阴离子形式的磷酸盐、亚磷酸盐和阳离子形式的 4-氨基丁酸在色谱柱上的保留区是空间分隔的, 这在一定程度上可增大它们的分离度。

2.3.2 流动相梯度条件的优化 甲酸铵溶液浓度的增大有利于饱和固定相, 减弱离子化分析物的峰拖尾现象, 最终选用该色谱柱能耐受的较大浓度($100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), 所以本研究中流动相体系为 $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲酸铵溶液(pH 3.3)-水。

考察发现等比例流动相对目标化合物的离子化效率低, 不能使主成分和杂质达到较好的洗脱分离效果, 所以采用梯度洗脱。初始梯度应减小流动相的离子强度, 使各物质先在色谱柱上有所

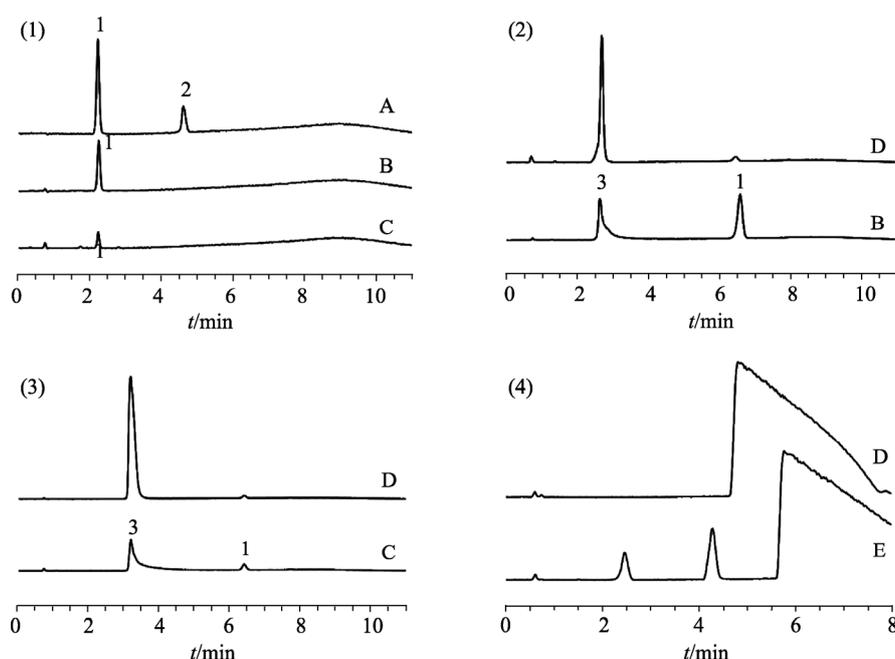


图2 不同 pH 甲酸铵下的色谱图

(1)-pH 2.87; (2)-pH 3.65; (3)-pH 5.6; (4)-pH 7.55; A-NaCl; B-阿仑膦酸钠; C-阿仑膦酸; D-磷酸; E-亚磷酸; 1- Na^+ ; 2- Cl^- ; 3-阿仑膦酸离子。

Fig. 2 Chromatograms at different pH values of ammonium formate

(1)-pH 2.87; (2)-pH 3.65; (3)-pH 5.6; (4)-pH 7.55; A-NaCl; B-alendronate sodium; C-alendronate; D-phosphoric acid; E-phosphorous acid; 1- Na^+ ; 2- Cl^- ; 3-alendronate ion.

保留。当流动相初始为水-甲酸铵溶液(90 : 10)时, 色谱峰对称性欠佳, 所以调整流动相初始为水-甲酸铵溶液(80 : 20), 4 min 内逐渐增大甲酸铵溶液的占比至 50%, 此时离子强度的增大使大多数物质(阿仑膦酸、磷酸盐、亚磷酸盐、 Na^+)按顺序均已洗脱出来, 随后降低甲酸铵比例至 40%, 将色谱柱内孔区域的 4-氨基丁酸洗脱出来, 从而达到各成分的完全分离。

3 结果

3.1 专属性

取磷酸、亚磷酸、4-氨基丁酸、阿仑膦酸、NaCl 对照品适量, 加溶剂超声溶解, 配制成各成分对照溶液, 同时配制阿仑膦酸钠与各杂质对照品的混合液, 和溶剂分别注入液相色谱仪, 记录色谱图, 结果见图 3。

该方法可以在 8 min 内测阿仑膦酸、磷酸盐、亚磷酸盐、 Na^+ 、4-氨基丁酸, 各成分以离子形式存在, 相邻成分间的分离度依次为 4.88, 2.46, 5.48, 4.19, 说明各成分间可达到完全分离。

溶剂水对色谱峰的测定没有干扰。在系统适应性试验中, 阿仑膦酸与杂质以及杂质之间的分离度均>1.5。

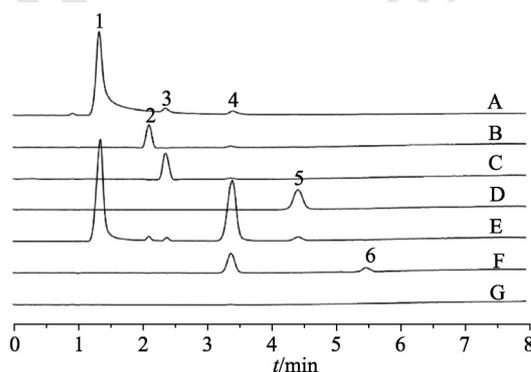


图3 高效液相色谱图

A-阿仑膦酸; B-磷酸; C-亚磷酸; D-4-氨基丁酸; E-阿仑膦酸钠与各杂质的混合物; F-NaCl; G-溶剂; 1-阿仑膦酸离子; 2- H_2PO_4^- ; 3- H_2PO_3^- ; 4- Na^+ ; 5-4-氨基丁酸离子; 6- Cl^- 。

Fig. 3 HPLC chromatograms

A-alendronate; B-phosphoric acid; C-phosphorous acid; D-4-aminobutyric acid; E-mixtures of alendronate sodium and impurities; F-NaCl; G-solvent; 1-alendronate ion; 2- H_2PO_4^- ; 3- H_2PO_3^- ; 4- Na^+ ; 5-4-aminobutyric acid ion; 6- Cl^- 。

3.2 含量测定项的方法学验证

3.2.1 线性与范围 取“2.2.4”项下的阿仑膦酸钠的标准曲线溶液 1 各 20 μL , 注入液相色谱仪, 按“2.1”项下色谱条件测定, 记录色谱图。以阿仑膦酸峰面积(Y)为纵坐标, 对照品溶液中阿仑膦酸浓度(X)为横坐标, 绘制线性曲线, 得到阿仑膦

酸线性浓度为 0.53~1.07 mg·mL⁻¹, 回归方程为 $Y=8.229 9X+3.598 9$, $r^2=0.999 2$, 换算得 0.70~1.40 mg·mL⁻¹ 为阿仑膦酸钠含量测定的线性范围。

3.2.2 重复性试验 取同一批号(批号: 21905042)阿仑膦酸钠样品 6 份, 按“2.2.2”项下的方法平行制备供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样分析, 以阿仑膦酸计, 6 份片剂样品中阿仑膦酸的标示含量为 95.1%($n=6$), RSD 为 0.53%, 表明该方法在含量测定项下的重复性良好。

3.2.3 回收率试验 取阿仑膦酸钠片(批号: 21905042)研细, 取约 53 mg(相当于阿仑膦酸约为 15 mg), 精密称定于 20 mL 量瓶中, 再分别精密加入 80%, 100%, 120% 3 个浓度的阿仑膦酸钠对照品, 每个浓度水平各制备 3 份, 用溶剂稀释至刻度, 溶液用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液按“2.1”项下色谱条件进样, 计算该阿仑膦酸含量测定方法的平均回收率, 结果见表 1。

表 1 阿仑膦酸含量测定回收率($n=9$)

Tab. 1 Recovery of alendronate assay test($n=9$)

加入的含 量水平/%	原有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/%	平均回 收率/%	RSD/ %
80	15.0	12.45	27.30	98.68	99.8	1.25
		12.36	27.60	101.92		
		12.59	27.50	99.25		
100	15.0	15.52	30.72	101.21	99.8	1.25
		15.80	30.79	99.87		
		16.17	31.20	100.17		
120	15.0	18.71	33.71	99.95	99.8	1.25
		18.90	33.67	98.70		
		18.92	33.55	98.03		

3.3 有关物质测定项的方法学验证

3.3.1 线性范围及校正因子 取“2.2.4”项下的阿仑膦酸钠、磷酸、亚磷酸及 4-氨基丁酸的标准曲线溶液 2 各 20 μL, 注入液相色谱仪, 记录色谱图。以各物质峰面积(Y)为纵坐标, 以溶液浓度(X)为横坐标, 绘制线性曲线, 分别得到阿仑膦酸与各杂质的线性方程及相关系数, 并以阿仑膦酸和各杂质对照品线性方程的斜率计算各杂质的校正因子, 即 $f=k_{\text{阿仑膦酸}}/k_{\text{杂质}}$, 结果见表 2。由表 2 数据换算得阿仑膦酸钠有关物质检查的范围为 19.04~76.16 μg·mL⁻¹。

3.3.2 检测限(limit of detection, LOD)与 LOQ 取“2.2.4”项下的对照品溶液逐步稀释, 注入液相色谱仪测定, 按信噪比(S/N)约为 3 : 1 计算 LOD,

磷酸盐浓度约为主成分阿仑膦酸钠浓度的 0.03%, 亚磷酸盐约为 0.03%, 4-氨基丁酸则约为 0.01%; 按 S/N 约为 10 : 1 计算 LOQ, 磷酸盐、亚磷酸盐、4-氨基丁酸浓度各自约为主成分浓度的 0.05%, 定量限色谱图见图 4。

表 2 线性数据的汇总

Tab. 2 Summary of linear data

物质	线性范围/ μg·mL ⁻¹	线性方程	相关系数 ($n=6$)	校正因子
阿仑膦酸	14.59~58.35	$Y=0.027X-0.283 2$	$r^2=0.998 7$	-
磷酸盐	3.95~49.38	$Y=0.040X+0.052 6$	$r^2=0.998 0$	0.67
亚磷酸盐	3.97~49.69	$Y=0.048X-0.059 9$	$r^2=0.998 2$	0.56
4-氨基丁酸	3.94~49.23	$Y=0.049X+0.206 7$	$r^2=0.998 5$	0.55

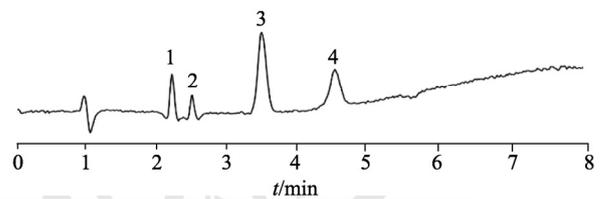


图 4 定量限色谱图

1-H₂PO₄⁻; 2-H₂PO₃⁻; 3-Na⁺; 4-4-氨基丁酸离子。

Fig. 4 LOQ chromatogram

1-H₂PO₄⁻; 2-H₂PO₃⁻; 3-Na⁺; 4-4-aminobutyric acid ion.

3.3.3 仪器精密度试验 取“2.2.1”项下的系统适应性溶液, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 结果阿仑膦酸、磷酸盐、亚磷酸盐及 4-氨基丁酸的峰面积 RSD 分别为 0.89%, 0.52%, 0.70%, 0.65%, 表明仪器精密度良好。

3.3.4 溶液稳定性试验 取“2.2.1”项下的系统适应性溶液, 放置于室温, 在 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 内按“2.1”项下色谱条件测定, 记录主成分和各杂质在不同时间的峰面积, 并计算 RSD, 结果阿仑膦酸、杂质(磷酸盐、亚磷酸盐、4-氨基丁酸)峰面积的 RSD($n=6$)均<2%, 表明有关物质溶液室温放置 10 h 稳定。

3.3.5 杂质回收率的测定 取未含 3 个杂质的阿仑膦酸钠片(批号: 21905042)研细, 精密称定 9 份, 每份含阿仑膦酸钠约 80 mg, 分别置 10 mL 量瓶中, 按杂质限度值(0.5%)的 80%, 100%, 120% 精密加入混合杂质对照品溶液(磷酸、亚磷酸、4-氨基丁酸各 0.4 mg·mL⁻¹)0.8, 1.0, 1.2 mL, 每个浓度水平各 3 份, 用溶剂稀释至刻度, 溶液用 0.45 μm 微孔滤膜过滤, 取续滤液按“2.1”项下色谱条件进样, 并计算该样品中各杂质含量的平均回收率, 结果见表 3。

表 3 有关物质的回收率(n=9)

Tab. 3 Recovery of related substances(n=9)

有关物质	浓度水平/ %	加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
磷酸盐	80	33.75	28.69	85.00	86.2	0.95
			29.34	86.92		
			28.63	84.82		
			36.51	86.55		
			36.18	85.75		
	100	42.19	36.66	86.89		
			43.98	86.87		
			43.70	86.32		
			43.92	86.75		
			43.92	86.75		
亚磷酸盐	80	33.90	28.41	83.82	85.4	1.87
			28.50	84.07		
			29.09	85.82		
			36.27	85.61		
			36.50	86.13		
	100	42.37	35.91	84.76		
			44.72	87.96		
			44.49	87.49		
			42.39	83.37		
			42.39	83.37		
4-氨基丁酸	80	33.12	30.11	90.90	91.0	1.79
			30.25	91.33		
			30.86	93.16		
			37.69	91.04		
			38.41	92.77		
	100	41.41	38.14	92.11		
			43.98	88.51		
			44.77	90.11		
			44.10	88.76		
			44.10	88.76		

3.4 有关物质和含量测定

取分别来自于 A 厂家、B 厂家、C 厂家的 3 批片剂,按“2.2.2”项下方法制备含量测定供试品溶液和对照品溶液,同时按“2.2.3”项下方法制备有关物质供试溶液和对照溶液,取续滤液分别按“2.1”项下色谱条件进样,分别计算阿仑膦酸的标示含量和有关物质磷酸盐、亚磷酸盐、4-氨基丁酸的含量,测定结果见表 4,有关物质色谱图见图 5。中国药典阿仑膦酸钠项下含量测定的限度为 90.0%~110.0%,各杂质的限度为 0.5%。结果可知 3 个厂家生产的片剂的含量和有关物质均符合规定。

表 4 阿仑膦酸钠片剂含量与有关物质测定结果

Tab. 4 Content and related substances test results of alendronate sodium tablets

批号	单个杂质			阿仑膦酸含量/%
	磷酸盐	亚磷酸盐	4-氨基丁酸	
21908002(A 厂家)	<0.05	<0.05	<0.05	92.0
1810040(B 厂家)	<0.05	-	0.16	91.5
20190201(C 厂家)	-	0.12	<0.05	95.2

注: -代表未检出。

Note: - represented not detected.

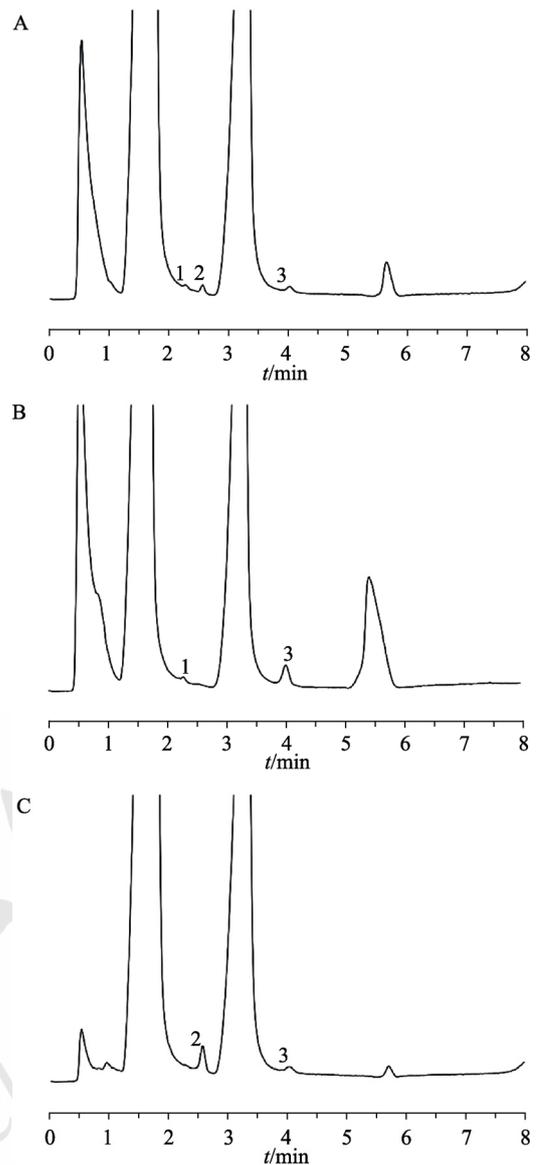


图 5 A、B、C 厂家的片剂有关物质质谱图

1-H₂PO₄⁻; 2-H₂PO₃⁻; 3-4-氨基丁酸离子。

Fig. 5 Related substances chromatograms of tablets of manufacturers A, B and C

1-H₂PO₄⁻; 2-H₂PO₃⁻; 3-4-aminobutyric acid ion.

4 讨论

Acclaim Trinity P2 柱是一款具有亲水作用/强阴离子交换/弱阳离子交换功能的三相新型混合模式色谱柱,它基于纳米聚合物-二氧化硅杂化(NSH)技术,由采用带电纳米聚合物颗粒涂层的高纯度多孔球形二氧化硅颗粒组成,二氧化硅颗粒的内孔区被共价键合的亲水层改性,而外表面则被阴离子交换纳米聚合物颗粒改性^[7],内部构造图见图 6。NSH 技术确保阴离子交换区和阳离子交换区在空间上实现分离,可使 2 种机制同时发挥作用且互不影响;而常规的混合模式色谱柱如 ZIC-pHILIC 柱的阴离子和阳离子交换基团趋于接近,

可能会导致阴离子和阳离子交换作用力相互影响,所以 P2 柱的选择性分离能力更高。此外,它采用的这种极性改性技术,通过引入亲水基团,增大了内孔表面的水浸润性,从而可有效地避免在全水相体系下“柱塌陷”情况的发生。Acclaim Trinity P2 色谱柱的这些特性是它可在全水相体系中高效地分离阿仑膦酸钠及其杂质(磷酸盐、亚磷酸盐、4-氨基丁酸)的前提条件。

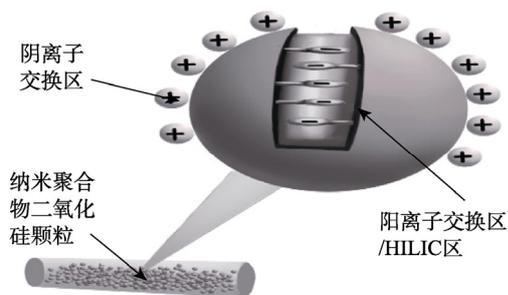


图 6 Acclaim Trinity P2 柱的内部构造图
Fig. 6 Internal structure of Acclaim Trinity P2 column

该款混合模式色谱柱可以通过离子交换相互作用分离阴离子和阳离子,而不是将离子保留为盐,即使阿仑膦酸与其平衡离子 Na^+ 分离开。以阿仑膦酸峰面积测定主药含量时,免受剂中如交联羧甲基纤维素钠等含钠离子的辅料的影响,说明该方法受干扰小。而原国家药品标准采用钼蓝比色法显色后采用紫外分光光度法测定易受辅料影响^[8]造成含量测定结果有偏差。

磷酸、亚磷酸在水溶液中存在多级电离现象,有文献^[9]指出磷酸第 1 级解离出的 H_2PO_4^- 在与阴离子交换树脂交换基进行离子交换的过程中,树脂交换基和淋洗离子的电荷相互作用促使一部分 H_2PO_4^- 进行第 2 级解离,同时出现另外一处峰 HPO_4^{2-} 。本研究色谱图(图 3)中磷酸和亚磷酸没有“双峰”现象出现,表明采用 Acclaim Trinity P2 柱结合 pH 3.3 的甲酸铵溶液洗脱,对照品成分磷酸和亚磷酸都只进行了第 1 级解离,以 H_2PO_4^- 、 H_2PO_3^- 的形式存在;有研究^[10]也证明在该酸性环境中,磷酸盐、亚磷酸盐的主要存在形式也分别是 H_2PO_4^- 、 H_2PO_3^- 。所以磷酸、亚磷酸的 1 级解离有利于杂质(酸盐、亚磷酸盐)准确定位与定量。

CAD 是一款质量敏感性检测器,它是通过加热洗脱液对分析物进行雾化,形成的气溶胶液滴与带正电荷的氮气颗粒相撞,电荷转移到分析物颗粒上,分析物颗粒再转移到收集器,随之高灵

敏度的静电检测器产生响应值,该响应值与溶质质量成正比关系^[11],它的原理决定它对不含发色团的非挥发性和部分半挥发性物质也会产生响应;本研究流动相中甲酸铵的存在可使离子形成不挥发盐颗粒,提高其在 CAD 中的响应^[12],所以在一个实验中 CAD 可以同时检测无紫外吸收的阴阳离子。同为质量敏感性检测器的蒸发光散射检测器(evaporative light-scattering detector, ELSD),其响应值与被测物质的浓度成复杂的非线性关系或线性响应范围较窄,而 CAD 可以提供一种线性校准功能^[13],无需复杂的优化,就可提高检测器的线性响应,检出限也平均比 ELSD 高一个数量级,鉴于此,本研究选定 CAD 与 Acclaim Trinity P2 色谱柱相联用。

影响检测器响应信号的 3 个因素是雾化温度、采样频率和过滤常数^[14]。探究发现雾化温度的高低对本研究中不挥发盐颗粒的响应信号无显著性影响,所以为了降低高浓度缓冲盐($100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲酸铵)带来的背景噪音,采用较高的雾化温度 50°C ,随着采样频率的增加和过滤常数的减小,会导致基线毛刺较多,实验结果表明在采样频率 5 Hz 和过滤常数 3.5 s 下,获得的色谱图较为平滑,且色谱峰采样点数量充足。

本研究筛选了流动相不同 pH 值、不同梯度洗脱条件对可离子化分析物阿仑膦酸钠及其杂质(磷酸盐、亚磷酸盐、4-氨基丁酸)色谱行为的影响,在此基础上,采用水- $100 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲酸铵(pH 为 3.3)全水相体系,建立了一种结合混合模式色谱柱和 CAD 在 8 min 内同时测定阿仑膦酸钠片中阿仑膦酸含量及有关物质的 HPLC 方法,与各国药典标准相比,该方法操作简便且全面。方法学结果显示杂质磷酸盐、亚磷酸盐、4-氨基丁酸的分离度 >1.5 ,且定量限浓度各自约为阿仑膦酸钠浓度的 0.05%,表明该方法专属性强且灵敏度较高,这一 Acclaim Trinity P2 柱和 CAD 的联用实例可为其他双磷酸盐类或可离子化分析物的质量控制提供参考。

REFERENCES

- [1] HU H J, LU T L, CHEN T. Analysis of alendronate[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2009, 26(3): 198-203.
- [2] 陈丹龙, 徐承智, 汤建拓, 等. 阿仑膦酸钠的合成与工艺研究[J]. 生物技术世界, 2015(12): 181.
- [3] NIU T, XU B, CHEN H, et al. Determination of

- monosaccharide and disaccharide in tanshinon extract by HPLC-ELSD[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2013, 30(2): 183-186.
- [4] SHAO T S, GUO L, ZHOU C M. Determination of methionine sulfoxide in Compound amino acid injection by HPLC with OPA pre-column derivatization[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2018, 35(4): 497-500.
- [5] BAI J M, SHI Z Q, YANG Y F, et al. Research on the quality standard for Jiexin Huatan Tongqiao cataplasm[J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2017, 34(8): 1122-1126.
- [6] 郭晓红, 张国霞, 李青, 等. 离子色谱-液体阴极辉光放电光谱应用于无机阴离子的检测[C]//第21届全国色谱学术报告会及仪器展览会论文集. 兰州, 2017: 336-337.
- [7] KUBICA P, NAMIEŚNIK J, WASIK A. Comparison of hydrophilic interaction and reversed phase liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry for the determination of eight artificial sweeteners and common steviol glycosides in popular beverages[J]. J Pharm Biomed Anal, 2016(127): 184-192.
- [8] LONG M L, HUANG H L, YAN F, et al. Determination of alendronate sodium in Compound Alendronate Sodium tablets by the molybdenum blue colorimetry[J]. Pharm J Chin PLA(解放军药学报), 2006, 22(6): 434-436.
- [9] DING M Y, CHEN P R. Retention mechanism of phosphate anion on an anion exchange column[J]. Chin J Chromatogr(色谱), 1998, 16(6): 517-519.
- [10] GUO X M, CHISWELL B. Separation and determination of phosphite and phosphate in the electrodes plating of nickel by ion-exchange HPLC[J]. Guizhou Sci(贵州科学), 1996, 14(2): 22, 23-26.
- [11] LONG Z, JIN Y, LIU X D, et al. Quantitative analysis of five antiviral drugs by hydrophilic interaction liquid chromatography-charged aerosol detection[J]. Chin J Chromatogr(色谱), 2015, 33(9): 938-942.
- [12] LIU L, GAO X, YANG Y J. Application of HPLC-charged aerosol detection[J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 2012, 43(3): 227-231.
- [13] ECKARDT M, KUBICOVA M, SIMAT T J. Universal response quantification approach using a Corona charged aerosol detector(CAD)-application on linear and cyclic oligomers extractable from polycondensate plastics polyesters, polyamides and polyarylsulfones[J]. J Chromatogr A, 2018 (1572): 187-202.
- [14] SUN Y F, ZHAO X, ZHANG M, et al. Determination of lactose and its related substances by HPLC-CAD[J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2018, 38(5): 894-901.

收稿日期: 2020-05-25

(本文责编: 曹粤锋)