

依替膦酸钠及其有关物质的反相离子对色谱分析

张晓青, 蒋 晔, 徐智儒

(河北医科大学 药学院, 河北 石家庄 050017)

摘要: 建立用于依替膦酸钠含量测定及有关物质检查的分析方法。采用反相离子对高效液相色谱法, 蒸发光散射检测器检测。以 Hypersil C₈ BDS 柱为固定相, 流动相为甲醇 - 含 8 mmol/L 正戊胺的 5 mmol/L 乙酸铵缓冲液(用乙酸调节 pH 至 7.0) (体积比为 5 : 95), 流速为 1.0 mL/min, 柱温为室温。方法的线性范围为 110 ~ 994 $\mu\text{g/mL}$, 回归方程为 $\lg A = 2.105 \lg C + 1.972$ ($r = 0.9999$)。方法的回收率为 99% ~ 102%, RSD 为 0.70% ($n = 9$)。在该色谱条件下, 依替膦酸钠与其有关物质(包括残留的合成原料亚磷酸及氧化分解产物磷酸盐)的分离良好。本法不需特殊的样品处理过程, 快速, 特异性好, 适用于依替膦酸钠的常规检测, 为该药的质量控制提供了新的可靠的分析手段。

关键词: 高效液相色谱法; 蒸发光散射检测器; 有关物质; 依替膦酸钠

中图分类号: O657.72; R971.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004 - 4957(2005)04 - 0105 - 03

An Assay of Etidronate and Its Related Metabolites by Ion-pair RP- HPLC

ZHANG Xiao-qing, JIANG Ye, XU Zhi-ru

(School of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract: An analytical method for determination of etidronate and related metabolites was developed, based on ion-pair reverse-phase high performance liquid chromatography (ion-pair RP- HPLC) coupled with evaporative light-scattering detection (ELSD). The ion-pair RP- HPLC was performed on a BDS C₈ column (5 μm , 4.6 mm \times 150 mm) at room temperature, using the mobile phase of methanol buffer solution (5 mmol/L ammonium acetate and 8 mmol/L amylamine, adjusted to pH 7.0 with acetic acid) (5 : 95 by volume), at a flow rate of 1.0 mL/min. The linearity range was 110 - 994 $\mu\text{g/mL}$ ($r = 0.9999$, $n = 5$). The recovery was 99% - 102% with RSD of 0.70% ($n = 9$). The active ingredient etidronate was successfully separated from its related metabolites, including residual phosphoric acid during the synthesis of etidronate and other possible impurities from oxidation and decomposition such as phosphate. The method was rapid, simple, accurate and reproducible. It was successfully employed for the assay of etidronate in bulk material and pharmaceutical dosage form, as well as for the determination of its related metabolites. It provides a new and reliable means for quality control of etidronate.

Key words: HPLC; ELSD; Related metabolites; Etidronate

依替膦酸钠(etidronate)为第一代双膦类药物,临床上主要用于防治骨质疏松症。其现有的含量测定方法有重量分析法^[1]、络合滴定法^[2]、酸碱滴定法^[3,4]以及光谱分析法^[5,6]等,这些方法的特异性较差。用于依替膦酸钠质量控制的色谱分析方法未见报道。依替膦酸钠结构中具有强极性的双膦酸基团,在反相色谱柱上不保留,且其结构中无可检测的生色基团。依替膦酸钠合成过程中残余的原料亚磷酸和分解产物磷酸盐等有可能影响药物临床用药的安全有效性,因此应该予以控制。美国药典^[7]采用碘量法对亚磷酸盐进行限量检查,操作步骤繁琐,取样量大(3.5 g),而有关磷酸盐的检查方法未见文献报道。本文利用离子对反相高效液相色谱-蒸发光散射检测器分离依替膦酸钠及其有关物质(亚磷酸、磷酸盐等),并测定了依替膦酸钠原料药及其片剂含量,为依替膦酸钠的质量控制提供了有效可靠、特异性强的分析手段。

收稿日期: 2004-07-30; 修回日期: 2005-03-26

基金项目: 河北省自然科学基金资助项目(2004000562)

作者简介: 张晓青(1980-),女,山西介休人,硕士研究生;蒋晔,联系人, Tel: 0311-6266069,

E-mail: jiangye@hebm.edu.cn

1 实验部分

1.1 试剂

依替磷酸钠对照品(纯度 99.5%)、依替磷酸钠原料药 3 批(批号: 020824, 020825, 020826)由河北医科大学药学院提供; 依替磷酸钠片(商品名: 邦得林)3 批(批号: 021115, 021116, 021117; 规格 200 mg/片)由成都化学制药厂生产; 亚磷酸由河北医科大学生物医学工程中心提供; 正戊胺、乙酸铵、磷酸二氢钾均为分析纯, 试验用水均使用二次重蒸水, 甲醇为色谱纯。

1.2 仪器

液相色谱仪系统包括 LC-10ATyp 型输液泵(日本岛津), Alltech 2000 型蒸发光散射检测器(美国奥泰), Tj-912 色谱工作站(太极计算机公司分析仪器部)。

1.3 色谱条件

色谱柱: Hypersil C₈ BDS 柱(5 μm, 4.6 mm × 150 mm, 大连依利特科学仪器有限公司); 流动相: 甲醇-含 8 mmol/L 正戊胺的 5 mmol/L 乙酸铵缓冲液(用乙酸调节 pH 至 7.0)(体积比 5:95); 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 室温; 进样量: 20 μL。

蒸发光散射检测器的漂移管温度: 113 °C; 雾化气体 N₂ 流量: 3.1 L/min; 撞击器位置: 关; 增益: 16。

1.4 样品测定

1.4.1 对照溶液的制备 精密称取依替磷酸钠对照品适量, 加流动相制成 300 μg/mL 和 500 μg/mL 的对照溶液。

1.4.2 依替磷酸钠原料药的测定 精密称取依替磷酸钠原料药适量, 加流动相制成 400 μg/mL 的供试品溶液。

1.4.3 依替磷酸钠片的测定 取 3 个批号的依替磷酸钠片各 10 片, 精密称定, 研细, 精密称取适量(约相当于依替磷酸钠 200 mg), 置 100 mL 量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 过滤, 精密量取续滤液 2 mL 置 10 mL 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。

2 结果与讨论

2.1 系统适用性试验

在上述色谱条件下, 分别测定了依替磷酸钠对照品、原料药、片剂、片剂辅料、有关物质包括依替磷酸钠合成过程中残留的原料亚磷酸与分解产物磷酸盐。依替磷酸钠对照品与有关物质混合物的色谱图见图 1。依替磷酸钠的保留时间约为 6.5 min, 色谱柱的理论塔板数以依替磷酸峰计约为 4 500, 拖尾因子为 1.07。依替磷酸色谱峰与最近杂质色谱峰的分离度大于 2.0。

2.2 线性试验

精密称取依替磷酸钠对照品约 55 mg 于 50 mL 容量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 作为贮备液。再用流动相稀释成 110、331、552、773、994 μg/mL 的系列对照品溶液。取 20 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图。以峰面积(A)对数值 lg A 对依替磷酸质量浓度(μg/mL)对数值 lg 进行回归计算, 得回归方程为: $\lg A = 2.105 \lg C + 1.972$, $r = 0.9999$ ($n = 5$)。表明在所测质量浓度范围内(110~994 μg/mL), 依替磷酸钠质量浓度对数值与峰面积对数值的线性关系良好。

2.3 精密度及稳定性试验

取 400 μg/mL 的依替磷酸钠供试品溶液, 连续进样 5 次, 测定峰面积, 计算得峰面积的 RSD 为 0.23%。

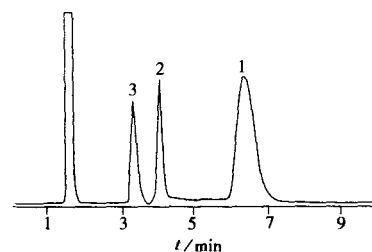


图 1 依替磷酸钠对照品与有关物质混合物色谱图

Fig. 1 Chromatograms of mixture of etidronate reference substance and related metabolites
1. etidronate; 2. phosphoric acid; 3. phosphate

取 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的依替磷酸钠供试品溶液, 分别于 0、1、2、4、6、8 h 测定, 所得峰面积的 RSD 为 0.51%, 说明依替磷酸钠溶液在 8 h 内稳定。

2.4 回收率试验

按依替磷酸钠片剂处方, 分别加入不同量的依替磷酸钠对照品, 同时加入处方比例的空白辅料。在上述色谱条件下分别按实验方法测定, 回收率为 99% ~ 102%, RSD 为 0.70%。数据见表 1。

2.5 样品测定

按 1.4 方法测定了 3 批依替磷酸钠原料药及 3 批依替磷酸钠片的含量, 结果见表 2。

2.6 讨论

2.6.1 色谱条件的优化 分别考察了流动相的 pH 值在 4.0 ~ 7.5 范围内, 正戊胺浓度在 4 ~ 14 mmol/L 范围内, 甲醇含量在 0 ~ 9% 范围及缓冲液乙酸铵浓度为 5 ~ 50 mmol/L 范围内对依替磷酸钠及其有关物质[主要考察亚磷酸和磷酸盐(磷酸二氢钾)]色谱行为的影响。

结果表明, 当流动相组成为甲醇 - 含 8 mmol/L 正戊胺的 5 mmol/L 乙酸铵缓冲液(用乙酸调节 pH 至 7.0)(体积比 5 : 95)时, 依替磷酸钠与其有关物质有合适的保留时间并有较好的分离。亚磷酸和磷酸二氢钾的保留时间分别约为 3.8 min 和 3.2 min。

2.6.2 检测器的选择 依替磷酸钠及其有关物质分子结构中均无可检测的生色团, 不能采用紫外或荧光检测器直接测定, 并且由于磷酸盐、亚磷酸无可衍生的基团, 因此无法经柱前衍生后采用紫外或荧光检测器间接测定。蒸发光散射检测器(ELSD)是通用型质量检测器, 对所有在检测室当中的非挥发性化合物都有响应, 且蒸发光散射检测(ELSD)的响应不依赖于样品的光学特征, 因此对于无生色团的依替磷酸钠及磷酸盐、亚磷酸等有关物质可同时检测, 样品不需预处理, 避免了衍生等步骤给分析带来的不便, 简化了药品常规分析中的操作。

采用离子对反相高效液相色谱 - 蒸发光散射检测器检测法来控制依替磷酸钠的质量, 解决了依替磷酸钠及其有关物质难以在反相色谱柱上保留的问题, 同时也解决了无生色团难以检测的问题。为其质量控制, 并保证其临床用药的安全有效性提供了有效可靠、特异性好的色谱分析手段。

表 1 依替磷酸钠的回收率实验数据

Table 1 Recovery results for etidronate

Added $A/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	Found $F/(\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1})$	Recovery $R/\%$	Average recovery $R/\%$	RSD $s_r/\%$
317.2	315.2	99	100	0.81
324.4	326.3	101		
321.2	324.1	101		
371.8	373.3	100	100	0.72
399.6	398.6	100		
425.6	430.7	101		
480.8	485.1	101	101	0.79
483.2	490.4	102		
475.4	475.0	100		

表 2 样品测定结果 ($n=3$)

Table 2 Results of sample analysis ($n=3$)

Sample	Lot No.	Content $\bar{w}/\%$	RSD $s_r/\%$
Bulk drug	020824	98.97	0.86
	020825	99.23	0.97
	020826	99.16	0.89
Tablet	021115	99.76	1.0
	021116	99.57	0.98
	021117	100.1	1.2

参考文献:

- [1] XING Yuren, LIU Jinrong. [J]. Shandong Journal of Pharmaceuticals(邢玉仁, 刘金荣. [J]. 山东医药工业), 1997, 16(2): 17.
- [2] XU Jihong, CHEN Weimin. [J]. Pharm J of PLA(徐继红, 陈卫民. [J]. 解放军药学报), 1999, 15(4): 56-57.
- [3] FANG Hongzhuang, SUN Changhai. [J]. Chinese Journal of Pharmaceuticals(方洪壮, 孙长海. [J]. 中国医药工业杂志), 1998, 29(4): 174-176.
- [4] WANG Xiuwen, ZHANG Jihong, LIU Suyan, et al. [J]. Chinese Journal of Pharmaceuticals(王秀文, 张继红, 刘素艳, 等. [J]. 中国医药工业杂志), 2002, 33(3): 140-141.
- [5] SHAO Qing, LI Shimin, ZHENG Qi, et al. [J]. J Chin Pharm Univ(邵青, 李士敏, 郑琦, 等. [J]. 中国药科大学学报), 1997, 28(4): 222-224.
- [6] SHAO Qing, LI Shimin, ZENG Su, et al. [J]. J Chin Pharm(邵青, 李士敏, 曾苏, 等. [J]. 中国药学报), 2000, 35(3): 177-179.
- [7] The United States Pharmacopeia, ed 26. [M]. Washington D. C: United States Pharmacopeia, Inc., 2003. 767-768.