

## · 论著 ·

## 利塞膦酸钠片有关物质的方法学研究

张秀立,张宇佳,王璐璐,方夏琴,陈少华,郑稳生(中国医学科学院北京协和医学院药物研究所药物传输技术及新型制剂北京市重点实验室,北京 100050)

**[摘要]** **目的** 建立测定利塞膦酸钠片有关物质的高效液相色谱法。**方法** 采用 ODS C<sub>18</sub> 色谱柱(5 μm, 150 mm×4.6 mm),以缓冲液(取四丁基溴化铵 3.22 g 加入 1 000 ml 0.05 mol/L 氯化铵缓冲液中,用氨水调 pH 至 7.8±0.05)-甲醇-乙腈(250:50:25)为流动相;柱温:室温;流速:1.0 ml/min;检测波长:254 nm。**结果** 在高温、酸、碱、氧化、强光降解下用 HPLC 测定,各杂质峰和主峰均有较好的分离效果,线性关系为  $Y=1.28 \times 10^7 X-1.62 \times 10^5$  ( $r=0.9999$ ),线性良好,稳定性良好。**结论** 该方法测定快速、简单、准确,灵敏度高,适用于利塞膦酸钠片有关物质的测定。

**[关键词]** 利塞膦酸钠;有关物质;高效液相色谱法

**[中图分类号]** R927 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2015)01-0040-04

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2015.01.010

## Determination method of related substances in risedronate sodium tablets

ZHANG Xiuli, ZHANG Yujia, WANG Lulu, FANG Xiaqin, CHEN Shaohua, ZHENG Wensheng (Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Novel Formulations of Beijing, Institute of Materia Medica, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China)

**[Abstract]** **Objective** To establish a HPLC method for determination of related substances of risedronate sodium tablets. **Methods** The C<sub>18</sub> column, 5 μm, 150 mm×4.6 mm, the buffer solution (3.22 g tetrabutyl ammonium bromide was added to a buffer solution of 1 000 ml 0.05 mol/L ammonium chloride, then adjusted pH to 7.8±0.05 by ammonia) -methanol-acetonitrile = 250 : 50 : 25 as mobile phase, column temperature: room temperature, flow rate: 1.0 ml/min, detection length: 254 nm. **Results** Determined by HPLC at high temperature, acid, alkali degradation, the main peak and the impurity peaks were separated well, and the peaks had a linear relationship,  $Y=1.28 \times 10^7 X-1.62 \times 10^5$  ( $r=0.9999$ ). **Conclusion** The method was rapid, simple, accurate and sensitive, and suitable for determination of risedronate sodium tablets related substances.

**[Key words]** risedronate sodium; related substances; HPLC

利塞膦酸钠(risedronate sodium),化学名为 2-(3-吡啶基)-1-羟基乙烷-1,1-双膦酸单钠盐,是一种吡啶二膦酸盐类骨吸收抑制剂。主要通过降低血清中的钙浓度来保护骨的吸收从而抑制骨的转化,最终增强骨的骨质坚固能力。该药口服吸收迅速,不同部位肌内注射给药吸收差异不大。体内消除时间为 6~8 h,大部分从尿中排泄。临床主要用于骨质疏松症的治疗。1998 年首次在美国上市,临床用于治疗变形性骨炎,其后又获 FDA 许可用于预防和绝经后妇女的骨质疏松症<sup>[1,2]</sup>。我国目前对利塞膦酸钠片进行有关物质方法学的研究较少。

为了更加深入准确地控制利塞膦酸钠片的质量与稳定性,参考有关文献<sup>[3~7]</sup>,通过试验确定简单可行的方法来控制利塞膦酸钠片的有关物质。

## 1 材料与仪器

利塞膦酸钠原料、片及对照品(中国医学科学院药物研究所研制)。惠普 8453 紫外分光光度计(美国惠普公司);HPLC 仪,泵:Waters 515(美国 Waters 公司)、Waters 2487(美国 Waters 公司);ODS C<sub>18</sub> 色谱柱(5 μm, 150 mm×4.6 mm)、Thermo BDS Hypersil C<sub>18</sub> 色谱柱(5 μm, 250 mm×4.6 mm)、Acclaim120 C<sub>18</sub> 色谱柱(5 μm, 250 mm×4.6 mm)。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** ODS C<sub>18</sub> 色谱柱,流动相:缓冲液(取四丁基溴化铵 3.22 g 加入 1 000 ml 0.05 mol/L 氯化铵缓冲液中,用氨水调 pH 至 7.8±0.05)-甲醇-乙腈(250:50:25);柱温:室温;流速:

**[基金项目]** 十一五国家科技重大专项“重大新药创制”项目(2009ZX09301003-008-001)

**[作者简介]** 张秀立,实习研究员。研究方向:药物传输技术与新剂型。Tel:15910202937;E-mail:zgrzhangxiuli@163.com

**[通讯作者]** 郑稳生,研究员,硕士生导师。研究方向:药物传输技术与新剂型。Tel:(010)63165233;E-mail:zhengwensheng@imm.ac.cn

1.0 ml/min;检测波长:254 nm。

## 2.2 溶液的制备

**2.2.1 供试品溶液** 取本品3批,每批10片,研成细粉,称取约相当于10 mg的利塞膦酸钠,置10 ml容量瓶中,加水溶解,并稀释至刻度,滤过,取续滤液作为供试品溶液。

**2.2.2 对照品溶液** 取适量利塞膦酸钠对照品,制成1.0 mg/ml的对照品溶液,其制备方法同供试品溶液。

**2.2.3 空白溶液** 按处方比例制备不含利塞膦酸钠的空白辅料溶液适量,以水为溶剂,配制成相当于含利塞膦酸钠1.0 mg/ml的溶液,即得空白溶液。见图1(A)。

**2.3 有关物质测定** 精密量取对照溶液20  $\mu$ l注入液相色谱仪,调节检测灵敏度,使主成分色谱峰的峰高为满量程的20%~25%;再精密量取供试品溶液和对照溶液各20  $\mu$ l,分别注入液相色谱仪,记录色谱图至主成分峰保留时间的2倍。供试品杂质峰面积之和与总的峰面积比较,不得大于1.0%。

## 2.4 专属性

**2.4.1 与原料及中间体的分离情况** 取利塞膦酸钠对照品,按“2.2.2”项下配制,再取中间体吡啶乙酸适量,加流动相制成每1 ml含50  $\mu$ g溶液。

**2.4.2 与降解物的分离情况** ①高温降解试验:取利塞膦酸钠片适量,置150~180  $^{\circ}$ C烘箱中,于2.5 h

取样,制成0.5 mg/ml溶液。②酸降解试验:取利塞膦酸钠片适量,加入0.1 mol/L盐酸,制成1.0 mg/ml供试液,置85~90  $^{\circ}$ C水浴中加热1 h,取出,再加入0.1 mol/L NaOH溶液调pH值至7.8。③碱降解试验:取利塞膦酸钠片适量,加入0.1 mol/L NaOH溶液,制成1.0 mg/ml供试液,置85~90  $^{\circ}$ C水浴中加热1 h,取出,再加0.1 mol/L盐酸溶液调pH值至7.8。④氧化试验:取利塞膦酸钠片适量,加3%双氧水1 ml,于60  $^{\circ}$ C放置6 h后。放冷至室温,用流动相稀释制成1.0 mg/ml供试液。⑤强光试验:取在照射度(4500 $\pm$ 500) lx的强光下放置10 d的利塞膦酸钠片适量,用流动相溶解并稀释制成1.0 mg/ml的供试液。

精密量取利塞膦酸钠供试品溶液以及上述溶液各20  $\mu$ l,按“2.1”项下的色谱条件分别进样,记录色谱图。结果表明,利塞膦酸钠在高温、光照下较稳定,在酸、碱、氧化等化学反应条件下均产生明显的降解产物,具体见图1、2。在所建立的色谱条件下原料、中间体及各降解产物均能与利塞膦酸钠完全分离,表明本方法具有很好的专属性。

**2.5 线性及精密度试验** ①供试品配制:精密称取利塞膦酸钠适量,加水溶解并稀释至1.5 mg/ml,精密移取此液适量,分别制成浓度约为0.015、0.375、0.750、1.125 mg/ml四梯度溶液,过滤备用。②测定方法:取上述4种不同浓度的溶液各20  $\mu$ l,进样,

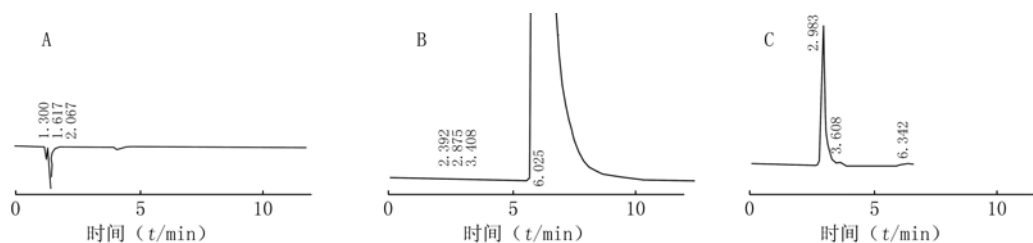


图1 利塞膦酸钠 HPLC 色谱图

A. 空白辅料;B. 对照品;C. 中间体吡啶乙酸

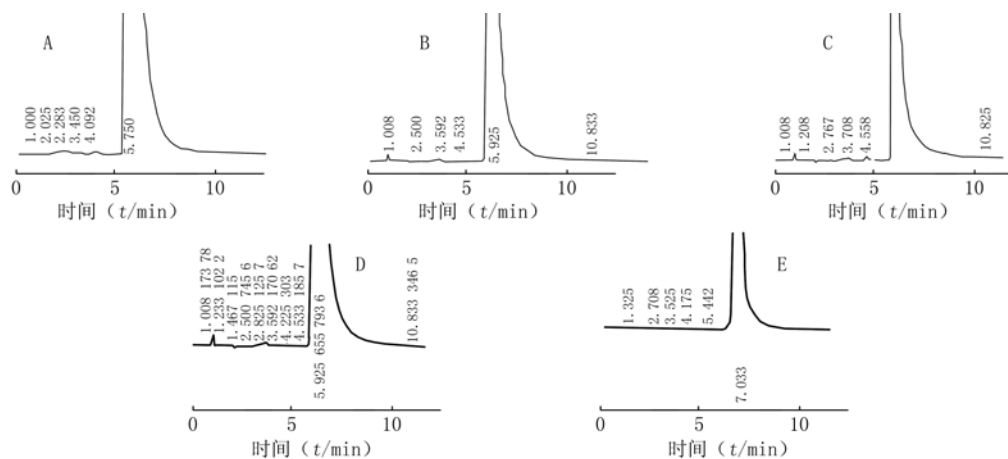


图2 利塞膦酸钠片专属性试验色谱图

A. 高温破坏;B. 酸破坏;C. 碱破坏;D. 氧化破坏;E. 强光破坏

并分别记录色谱图;每隔 2 h 重复进样一次,共 5 次,考察日内差的大小。对最终结果进行处理。

从实验结果可知,色谱方法精密性试验良好,供

试液稳定,日内差 RSD(%)均不大于 2%,在浓度为 0.015~1.5 mg/ml 范围内进样 20  $\mu$ l,线性良好, $r$  为 0.999 9( $n=5$ ),结果见表 1。

表 1 利塞膦酸钠线性及精密性(日内差)试验结果

样品浓度 ( $\mu$ g/ml)	进样量 ( $\mu$ l)	进样量 (mg)	S1	S2	S3	S4	S5	S	RSD (%)
0.015	20	0.015	78 806	80 554	79 205	80 386	77 149	79 220	1.56
0.375	20	0.375	4 583 210	4 562 338	4 560 334	4 488 094	4 468 629	4 532 521	1.00
0.750	20	0.75	9 271 442	9 428 144	9 487 618	9 491 892	9 467 502	9 429 320	0.87
1.125	20	1.25	14 368 310	14 199 041	14 307 304	14 355 172	14 307 304	14 307 426	0.42
1.5	20	1.5	19 259 634	18 695 468	18 689 540	19 008 374	19 171 384	18 964 880	1.25
回归方程	$Y=1.28 \times 10^7 X - 1.62 \times 10^5$		$r=0.999 9$						

2.6 最低检测限 取利塞膦酸钠约 100 mg,精密称定,加流动相溶解并稀释成 1.0 mg/ml,移取 1 ml 稀释至 100 ml(10  $\mu$ g/ml),再移取此液分别配制浓度为 5.0、2.5、1.0  $\mu$ g/ml 的 A、B、C 3 种溶液,过滤

(0.45  $\mu$ m)备用。调试色谱仪,待基线平稳后进样 20  $\mu$ l,并记录色谱图。从色谱图可知:A、B 液能检出主峰,也能积分;C 液则不能检出主峰(图 3)。本品检测限按信噪比 3:1 计为 50 ng。

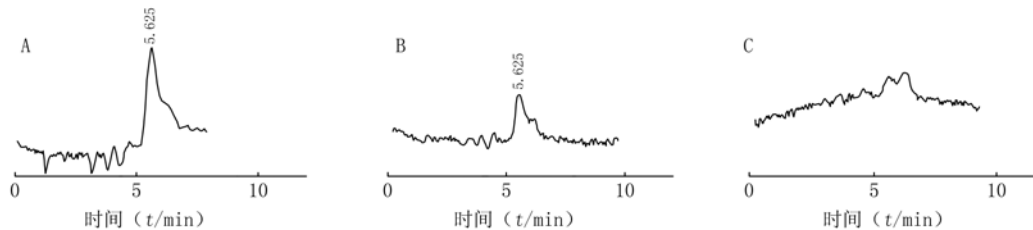


图 3 利塞膦酸钠最低检测限试验 HPLC 图谱

2.7 重复性试验 按“2.2.1”项方法配制取同批共 5 份供试品溶液,重复测定,RSD 为 1.25%( $n=5$ ),重复性良好。

2.8 耐用性试验 取同一样品,依照“2.2”项下制成供试品溶液及对照溶液,使用 ODS  $C_{18}$  色谱柱、Thermo BDS Hypersil  $C_{18}$  色谱柱、Acclaim120  $C_{18}$  色谱柱 3 根不同品牌的  $C_{18}$  柱,按“2.1”项下方法测定,进行耐用性试验。试验结果表明,使用不同品牌的色谱柱对样品进行分析,其分离效果、检出的杂质峰个数及有关物质检查结果(测得的总杂质归一化含量)基本一致,表明本方法的耐用性较好。

2.9 有关物质测定 分别精密量取供试品溶液 20  $\mu$ l,注入液相色谱仪,记录峰面积,用归一化法分别以峰面积计算,即得利塞膦酸钠的有关物质含量,见表 2。

表 2 利塞膦酸钠片的有关物质测定结果

批号	有关物质含量(%)
000202	0.62
000203	0.61
000204	0.61

### 3 讨论

3.1 最佳检测波长的选择 取利塞膦酸钠适量,用流动相配制成浓度为 1.0 mg/ml 供试品溶液,采取光电二极管阵列检测器,进行全波长扫描,发现本品的最佳检测波长为 254 nm。

3.2 流动相的筛选 本实验研究了 3 个不同系统的流动相,即纯水、甲醇-水系统、磷酸盐缓冲液-甲醇-乙腈系统。纯水系统:试验发现主峰出峰时间太快,约 1.8 min,无法与杂质分离;甲醇-水系统:试验发现主峰出峰时间 2.0 min 左右,仍不能有效分离;磷酸盐缓冲液-甲醇-乙腈系统:试验中采取调整缓冲液 pH 值、调整系统比例等方法,均未取得良好的分离效果。

利塞膦酸钠为吡啶乙酸与二个磷酸相连,既有吡啶环的碱性,又有磷酸基团的酸性(且为多元酸),极性很大,因此采用上述常规方法,试验结果不够理想,故本试验考虑采取离子对试剂,经试验筛选,以四丁基溴化铵作为离子对试剂、缓冲液的 pH 值为 7.80  $\pm$  0.05,具体方法为取四丁基溴化铵 3.22 g 加入 1 000 ml 0.05 mol/L 氯化铵缓冲液中,用氨水调 pH 至 7.80  $\pm$

0.05, 流动相比例为缓冲液-甲醇-乙腈=250:50:25。

### 【参考文献】

- [1] 杜蕾, 马培奇. 第三代双磷酸盐类药物利塞膦酸钠[J]. 中国医药情报, 2000, 6(3): 1-4.
- [2] 郑珩. 治疗骨质疏松症新药: risedronate sodium[J]. 药学进展, 1999, 23(3): 181-182.
- [3] 王婷, 张静霞, 程海祺, 等. 高效液相色谱法测定利福拉齐的有关物质[J]. 中国抗生素杂志, 2012, 37(4): 284-319.
- [4] 刘明洁, 孙华. HPLC法测定利塞膦酸钠的含量[J]. 中国药事, 2003, 17(3): 178-179.

- [5] 郝卫强, 刘文英, 狄斌, 等. 高效液相色谱法测定利塞膦酸钠片的含量[J]. 中国药科大学学报, 2001, 32(4): 286-289.
- [6] 印平, 姚勇, 崔丽华, 等. 利塞膦酸钠对非骨水泥型全膝关节置换术后早期股骨假体周围骨密度的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2013, 19(7): 732-736.
- [7] 李蔚, 马嘉, 张妍, 等. 利塞膦酸钠与羟磷酸盐联合应用治疗绝经后骨质疏松症的实验研究[J]. 西北药学杂志, 2012, 27(5): 474-475.

[收稿日期] 2013-12-11 [修回日期] 2014-06-30

[本文编辑] 顾文华

(上接第39页)

降低。在研究中发现, 由于盐霉素钠为脂溶性药物, 低胆固醇的脂质组成更易于包载盐霉素钠。原因可能有两点: 一是盐霉素钠与胆固醇均为脂溶性物质, 对于脂质体的脂质双分子层的疏水空间具有竞争性; 二是高比例的胆固醇脂质组成使得脂质中的烃链流动性降低, 从而干扰盐霉素钠进入脂质双分子层<sup>[14]</sup>。③ 磷脂是生物膜的主要结构成分, 选择氢化大豆卵磷脂 HSPC 作为脂质体的磷脂膜材是由于其较高的相变温度 ( $T_m = 55^\circ\text{C}$ ), 在常温下可以保持脂质体的稳定性。长循环脂质体的制备可以通过在脂质体双分子层中加入 PEG 化脂质, 或者用嵌段共聚物对囊泡的表面进行修饰。因此, 在脂质体中掺入一定比例的 DSPE-PEG-2K 以期增加脂质体的稳定性, 延长脂质体的循环时间。由于 DSPE-PEG-2K 是一种表面活性剂, 其比例超过 40% 有可能破坏脂质体结构<sup>[15]</sup>, 形成胶束结构。因此, 本实验在脂质体中只掺入 5% DSPE-PEG-2K。

文献中盐霉素钠的测定方法多为柱前衍生化法<sup>[16]</sup>, 该方法操作复杂、稳定性差。为解决这些问题, 本实验中盐霉素钠采用 HPLC-DAD 的测定方法, 该方法操作简单, 测定方法的准确度和稳定性能满足体外盐霉素钠的定量要求。

综上, 本实验得到了粒径大小在 100 nm 左右, 形态均一, 包封率和载药量较高的盐霉素钠纳米脂质体, 为进一步测定其杀伤肿瘤活性奠定了坚实的制剂学基础。

### 【参考文献】

- [1] Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells[J]. Nature, 2001, 414(6859): 105-111.
- [2] Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance[J]. Nat Rev Cancer, 2005, 5(4): 275-284.
- [3] Gupta PB, Onder TT, Jiang G, et al. Identification of selective inhibitors of cancer stem cells by high-throughput screening[J]. Cell, 2009, 138(4): 645-659.

- [4] Naujokat C, Steinhart R. Salinomycin as a drug for targeting human cancer stem cells[J]. Biomed Res Int, 2012, 2012: 1-17.
- [5] Huczynski A. Salinomycin: a new cancer drug candidate[J]. Chem Biol Drug Des, 2012, 79(3): 235-238.
- [6] Liu Y, Miyoshi H, Nakamura M. Nanomedicine for drug delivery and imaging: a promising avenue for cancer therapy and diagnosis using targeted functional nanoparticles[J]. Int J Cancer, 2007, 120(12): 2527-2537.
- [7] Chang H, Yeh M. Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy[J]. Int J Nanomed, 2012, 7: 49-60.
- [8] Barenholz YC. Doxil -the first FDA-approved nano-drug: lessons learned[J]. J Control Release, 2012, 160(2): 117-134.
- [9] Farokhzad OC, Langer R. Nanomedicine: developing smarter therapeutic and diagnostic modalities[J]. Adv Drug Deliver Rev, 2006, 58(14): 1456-1459.
- [10] Mayer LD, Hope MJ, Cullis PR. Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure[J]. BBA-Biomembranes 1986, 858(1): 161-168.
- [11] Mayer LD, Harasym TO, Tardi PG, et al. Ratiometric dosing of anticancer drug combinations: controlling drug ratios after systemic administration regulates therapeutic activity in tumor-bearing mice[J]. Mol Cancer Ther, 2006, 5(7): 1854-1863.
- [12] Damen J, Regts J, Scherphof G. Transfer and exchange of phospholipid between small unilamellar liposomes and rat plasma high density lipoproteins Dependence on cholesterol content and phospholipid composition[J]. Biochim Biophys Acta, 1981, 665(3): 538-545.
- [13] 朱会琴, 逢涣欢, 胡昌勤, 等. 浊度法测定两性霉素 B 及其脂质体的效价[J]. 中国抗生素杂志, 2006, 30(12): 752-755.
- [14] Wong M, Chiu GN. Simultaneous liposomal delivery of quercetin and vincristine for enhanced estrogen-receptor-negative breast cancer treatment[J]. Anticancer Drugs, 2010, 21(4): 401-410.
- [15] Lasic DD, Woodle MC, Martin FJ, et al. Phase-behavior of stealth-lipid-lecithin mixtures[J]. Period Biol, 1991, 93(2): 287-290.
- [16] Dusi G, Gamba V. Liquid chromatography with ultraviolet detection of lasalocid, monensin, salinomycin and narasin in poultry feeds using pre-column derivatization[J]. J Chromatogr A, 1999, 835(1-2): 243-246.

[收稿日期] 2014-09-27 [修回日期] 2014-11-16

[本文编辑] 顾文华