

# 离子色谱法测定伊班膦酸钠注射液主成分的方法探讨

黄进宝<sup>1</sup>, 葛高飞<sup>2\*</sup>, 吴涛<sup>3</sup>

(1. 安徽农业大学茶与食品科技学院, 合肥 230036; 2. 安徽农业大学生物技术中心, 合肥 230036;  
3. 兆科药业(合肥)有限公司, 合肥 230036)

**摘要:** 为建立一种药物伊班膦酸钠注射液主成分-伊班膦酸的离子色谱分析方法, 采用 Ion Pac AS18 阴离子交换色谱柱, 利用在线淋洗液发生器自动产生氢氧化钾梯度淋洗液 (12~70 mmol·L<sup>-1</sup>, 时间程序为 17 min), 并使用自动再生抑制型电导检测。结果表明, 伊班膦酸浓度在 0~75.25 μg·mL<sup>-1</sup> 范围内, 线性相关系数  $R^2=0.9995$ , 呈现显著的线性相关关系; 供试液重复进样 5 次, 峰面积 RSD 为 0.21%, 保留时间 RSD 为 0.01%, 理论板数均大于 50 000, 方法系统适用性良好; 5 份供试样品溶液伊班膦酸含量的 RSD 值为 0.80%, 小于等于 2.0%, 方法重复性良好; 供试样品 3 个浓度水平的回收率均在 99%~101% 之间, 加标回收率试验的 RSD 均小于 1.00%, 符合药品规定要求。该方法稳定、重复性好且回收率高, 可满足伊班膦酸钠注射液中主成分含量的测定要求。

**关键词:** 伊班膦酸钠注射液; 伊班膦酸; 离子色谱; 电导

中图分类号: O657.75

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2017)04-0744-05

## Determination of the main components in ibandronate sodium injection by ion chromatography

HUANG Jinbao<sup>1</sup>, GE Gaoifei<sup>2</sup>, WU Tao<sup>3</sup>

(1. School of Tea & Food Science and Technology, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;  
2. Biotechnology Center, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;  
3. Zhaoke (Hefei) Pharmaceutical Co., Ltd, Hefei 230036)

**Abstract:** A method for determination of ibandronate in ibandronate sodium injection using ion chromatography was established in this study. Ion Pac AS18 was used as anion exchange column. The analysis was conducted with an online eluent generator that automatically generated a gradient of potassium hydroxide (12-70 mmol·L<sup>-1</sup>, time program was 25 minutes), and an automatic regeneration suppressor was used to detect the conductivity. Our results showed that a good linear relationship ( $R^2=0.9995$ ) was obtained in the measurement of ibandronic acid at a concentration range from 0 to 75.25 μg·mL<sup>-1</sup>. As for the determination of the product solution, after being repeated five times, the RSD value of the peak area and retention time was 0.21% and 0.01%, respectively, and the theoretical plate number was more than 50 000, which suggested a good applicability of this method. The RSD value of the ibandronic acid content was 0.80% that was less than 2.0%, which indicated a good repeatability of this method. Recovery rates of the tested samples at three concentrations were between 99%-101%, and RSD of the recovery rate was smaller than 1.00%, which was in line with the requirements of pharmaceutical regulations. This assay method is proved to be satisfactory for determination of ibandronic acid in ibandronate sodium injection with good repeatability, high recovery rate, which can meet the requirements for determination of the main components in ibandronate sodium injection.

**Key words:** ibandronate sodium injection; ibandronic acid; ion chromatography; conductance

收稿日期: 2017-04-27

基金项目: 安徽省自然科学基金面上项目 (1608085MC54)、安徽省高校自然科学基金科学研究项目重点项目 (KJ2015A060)、安徽农业大学青年自然科学基金重点项目 (2014zr009) 和安徽农业大学引进与稳定人才基金项目 (yj2015-19) 共同资助。

作者简介: 黄进宝, 博士, 讲师。E-mail: jinbaohuang@ahau.edu.cn

\* 通信作者: 葛高飞, 博士, 副研究员。E-mail: gegaofei@ahau.edu.cn

双膦酸盐药物是近 20 年发展起来的一类治疗代谢性骨骼疾病的药物。伊班磷酸 (IB) 是第 3 代双膦酸盐药物, 广泛应用于肿瘤骨转移的治疗中。国内外许多研究表明, 第 3 代双膦酸盐药物除了能有效减少肿瘤骨相关事件的发生, 缓解骨疼痛外, 还具有潜在的直接抗肿瘤作用<sup>[1-3]</sup>, 并且与化疗药物合用具有协同作用<sup>[4-5]</sup>。随着该药临床应用的增多, 建立一种便捷、灵敏的检测方法, 用于药品质量检测、血药浓度监测及为开展临床药学研究提供技术支持显得尤为重要。目前, 文献报道的双膦酸盐药物的分析方法很多, 有滴定分析法、比色分析法、气相色谱法和高效液相色谱法<sup>[6-9]</sup>。因伊班磷酸分子结构中无生色基团 (见图 1), 所含叔胺基团也不易形成可被紫外线或荧光发射检测到的衍生物, 并且药物极性高、易电离, 给分离、检测带来一定的困难。与此同时, 离子色谱法在该类药物分析方面的应用多以检测药物中的杂质成分亚磷酸根和磷酸根为主, 还没有一种快速有效的方法用来检测伊班磷酸注射液中的主成分—伊班磷酸的含量<sup>[10-11]</sup>。为此, 在前人研究的基础上, 本研究建立了一种离子色谱—抑制电导检测方法, 用于准确快速地测定伊班磷酸钠注射液中伊班磷酸的含量。

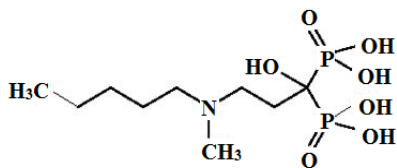


图 1 伊班磷酸的化学结构式  
Figure 1 Structural formula of ibandronic acid

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

ICS-3000 (美国戴安), 分析柱: IonPac AS18, 7.5  $\mu\text{m}$ , 250 mm $\times$ 4 mm (P/N:060549); 保护柱: IonPac AG18, 13  $\mu\text{m}$ , 50 mm $\times$ 4 mm (P/N:060551); 淋洗液发生器 (EG); 检测器箱 (DC); 自动进样器 (AS-40), Chromeleon 工作站。

伊班磷酸钠标准品 (USP, 批号 GOL114, 纯度 99.9%), 所有样品溶液均由超纯水 (18.25M $\Omega$ ) 配制, 试剂均基准级; 供试样品为某品牌伊班磷酸注射液。

### 1.2 溶液的配制

**1.2.1 对照品溶液制备** 精确称取伊班磷酸钠标准对照品 21.000 mg, 去离子水溶解并稀释至 200 mL, 摇匀。取 5 mL 溶液到 10 mL 容量瓶中去离子水

稀释至刻度, 摇匀即得对照品溶液。

**1.2.2 供试样品溶液制备** 精确量取伊班磷酸注射液 1 mL 到 20 mL 容量瓶, 加去离子水稀释至刻度, 摇匀即得供试样品溶液。

表 1 伊班磷酸的洗脱程序

Table 1 The elution program of ibandronic acid		
时间/min Time	Eluent A/% (H <sub>2</sub> O)	Eluent B/% (100 mmol·L <sup>-1</sup> KOH)
0	88	12
7.0	88	12
7.1	30	70
12.0	30	70
12.1	88	12
17.0	88	12

### 1.3 色谱条件

ICS-3000 系统; 柱温: 30 $^{\circ}\text{C}$ ; 淋洗液: 氢氧化钾梯度淋洗 (A 为去离子水, B 为 100 mmol·L<sup>-1</sup> KOH), 洗脱程序见表 1; 流速: 1.00 mL·min<sup>-1</sup>; 进样量: 25  $\mu\text{L}$ ; 检测方式: 抑制型电导检测, 阴离子自动电解连续再生微膜抑制器 ASRS 300 4 mm (P/N: 064554), 自循环模式, 抑制电流 124 mA。

## 2 结果与分析

### 2.1 测定方法的建立

本研究在实验室前期检测伊班磷酸注射液中杂质含量的方法基础上, 通过加标试验分别确定了亚磷酸、磷酸和伊班磷酸的出峰顺序和时间 (见图 2); 并进一步对试验方法进行优化, 以期得到伊班磷酸的快速检测方法。具体方法优化过程如下。

**2.1.1 试验方法 A** 依据上述方法, 将伊班磷酸注射液稀释 20 倍作为供试样品溶液, 定量环精密吸取 25  $\mu\text{L}$ , 进样测定。淋洗液程序为 0 min 开始 12 mmol·L<sup>-1</sup> KOH, 保持 20 min; 20~25 min, 50 mmol·L<sup>-1</sup> KOH, 保持 10 min; 35.0~35.1 min, 12 mmol·L<sup>-1</sup> KOH, 保持到 40 min。

由图 3A 可知, 该方法伊班磷酸峰型不好, 理论板数 7 659, 拖尾因子 1.74。伊班磷酸注射液中的磷酸根和盐磷酸根没有出峰, 说明注射液中的磷酸根和亚磷酸根均在检测限以下。本方法不适合测定伊班磷酸注射液的主成分含量。

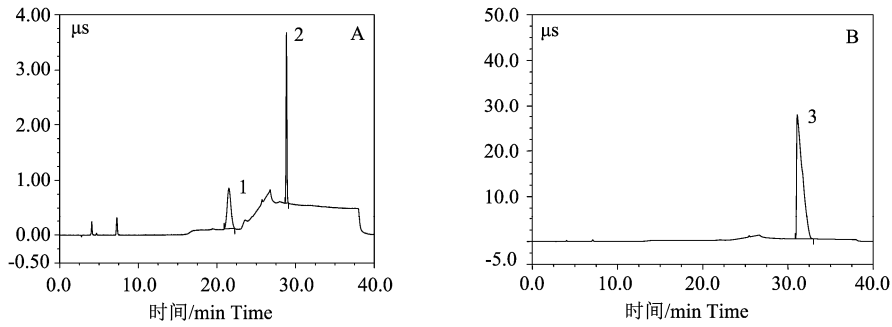
**2.1.2 试验方法 B** 改变试验方法 A 的洗脱程序, 缩短最大浓度 (50 mmol·L<sup>-1</sup> KOH 不保持) 的洗脱时间。将伊班磷酸注射液稀释 20 倍作为供试样品溶液, 定量环精密吸取 25  $\mu\text{L}$ , 进样测定。由试验结

果(图3B)可知,本法伊班膦酸未出峰,本方法不适合测定伊班膦酸注射液的主成分含量。

**2.1.3 试验方法 C** 改变试验方法 A 的洗脱程序,减少 12 mmol·L<sup>-1</sup> KOH 的保持时间,增加 50 mmol·L<sup>-1</sup> KOH 的保持时间。将伊班膦酸注射液稀释 20 倍作为供试样品溶液,定量环精密吸取 25 μL,进样测定。从图 3 C 图可以看出,本法伊班膦酸保留时间 19.253 min,峰型较好,理论板数 15 729,拖尾因子 1.43。本方法可用于测定伊班膦

酸注射液的主成分含量,拟继续优化方法以缩短分析时间。

**2.1.4 试验方法 D** 将试验 C 的洗脱程序改为等度恒流,40 mmol·L<sup>-1</sup> KOH 流动相 20 min。将伊班膦酸注射液稀释 20 倍作为供试样品溶液,定量环精密吸取 25 μL,进样测定。由试验结果(图 3 D)可知,本法伊班膦酸保留时间 15.827 min,峰型不好,理论板数 1 906,拖尾因子 1.87。本方法不适合测定伊班膦酸注射液主成分的含量。



1.亚磷酸; 2.磷酸; 3.伊班膦酸 1.phosphorous acid; 2. phosphoric acid; 3 ibandronic acid  
图 2 亚磷酸、磷酸和伊班膦酸标品的离子色谱图谱

Figure 2 The ICS-chromatogram of phosphorous acid, phosphoric acid and ibandronic acid standard compounds

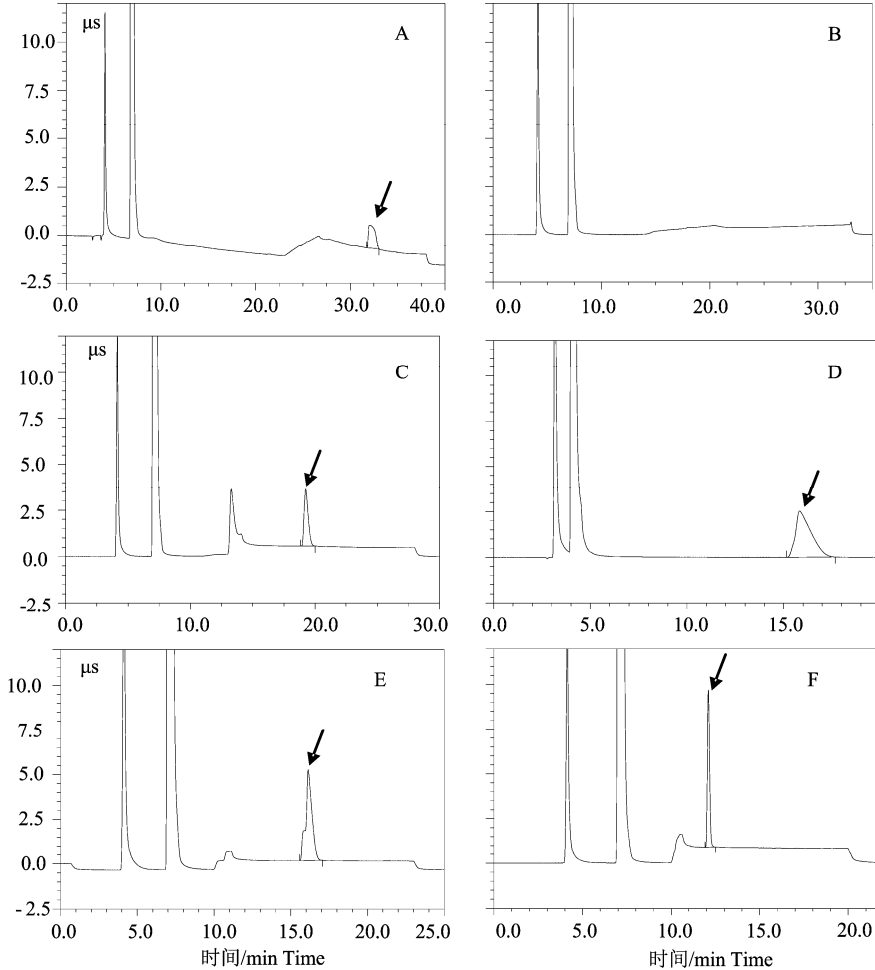


图 3 不同柱条件测定伊班膦酸的方法图谱

Figure 3 The ICS-chromatogram of ibandronic acid under different column condition

**2.1.5 试验方法 E** 采用试验方法 A 中的洗脱程序, 减少  $12 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  KOH 的保持时间, 增加  $50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  KOH 的保持时间。将伊班磷酸注射液稀释 10 倍作为供试样品溶液, 定量环精密吸取  $25 \mu\text{L}$ , 进样测定。由图 3 E 可知, 本法伊班磷酸峰型不好, 理论板数 7 659, 拖尾因子 1.74。本方法不适合测定伊班磷酸注射液的主成分含量。

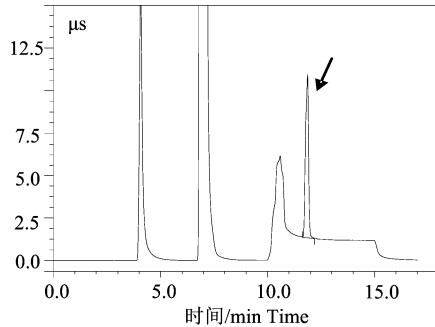


图 4 伊班磷酸的检测图谱

Figure 4 The ICS-chromatogram of ibandronic acid

**2.1.6 试验方法 F** 改变方法 E 梯度程序, 把最高洗脱浓度增加到  $70 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  KOH。将伊班磷酸注射液稀释 20 倍作为供试样品溶液, 定量环精密吸取  $25 \mu\text{L}$ , 进样测定。图 3 F 的试验结果表明, 本方法柱效高 (理论板数 45 487), 拖尾因子小 (1.26), 可满足本品的含测要求。由图谱的保留时间可知,

可以缩短分析时间。

**2.1.7 试验方法 G** 改变方法 F, 缩短  $70 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  KOH 的保持时间。将伊班磷酸注射液稀释 20 倍作为供试样品溶液, 定量环精密吸取  $25 \mu\text{L}$ , 进样测定。由结果 (图 4) 可知, 本方法分析时间短, 柱效高 (理论板数 52 022), 拖尾因子小 (1.20), 可满足伊班磷酸注射液中的主成分含量测定要求。

## 2.2 方法学验证

**2.2.1 线性范围与定量限** 精确称取伊班磷酸钠标准对照品适量, 加去离子水溶解并稀释至 100 mL, 摇匀, 得伊班磷酸对照品母液。分别精确量取不同体积的母液到 10 mL 容量量瓶中去加去离子水至刻度, 摇匀, 得一系列浓度的对照品溶液 (0、12.54、25.08、40.14、50.17、60.20 和  $75.25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 作为线性测试液。定量环定量吸取  $25 \mu\text{L}$  标准对照品进样测定, 由溶液浓度 ( $x$ ) 对伊班磷酸峰面积 ( $y$ ) 进行线性回归, 得回归方程  $y = 1.5493x - 2.4747$ , 相关系数 ( $R^2$ ) 为 0.9995 ( $n=7$ ), 呈现良好的线性关系。按 10 倍的信噪比计算伊班磷酸的定量限为  $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

**2.2.2 系统适用性** 把伊班磷酸注射液精确稀释 20 倍, 得供试样品溶液。定量环定量吸取  $25 \mu\text{L}$ , 进样测定, 记录色谱图, 重复进样 5 次, 考察峰面积及保留时间变异情况。

表 2 含量测定系统适用性试验

Table 2 The applicability test of the content determination system

参数 Parameter	1	2	3	4	5	Average	RSD / %
时间 Time/min	11.875	11.877	11.876	11.878	11.879	11.878	0.01
峰面积 Peak area	74.006	74.945	74.024	74.312	74.415	74.162	0.47
理论塔板数 Theoretical plates	51 922	51 369	51 832	52 002	51 666	—	—

表 3 伊班磷酸测定回收率试验结果

Table 3 Test results for recovery of IB

处理 Treatment	添加量/mg Adding quantity of ibandronic acid	测定值/mg Measured value of ibandronic acid	回收率/% Recovery rate	Average/%	RSD / %
80%-1	79.23	79.14	99.87		
80%-2	80.02	78.56	98.17	99.06	0.71
80%-3	80.31	79.62	99.14		
100%-1	100.02	100.51	100.49		
100%-2	100.34	101.02	100.68	100.85	0.37
100%-3	100.19	101.56	101.37		
120%-1	120.25	119.65	99.50		
120%-2	120.36	122.43	101.72	100.68	0.91
120%-3	120.08	121.78	100.81		

注: 1 mg 伊班磷酸钠相当于 0.93 mg 伊班磷酸。Note: 1 mg ibandronate is the equal of 0.93 mg ibandronic acid.

由表2可以看出, 供试液重复进样5次, 峰面积RSD为0.47%(小于2%), 保留时间RSD为0.01%(小于1%), 理论板数均大于50 000, 本方法系统适用性良好。

**2.2.3 精密性** 精密量取伊班膦酸注射液1 mL至20 mL定量瓶, 加去离子水稀释至刻度, 作为供试样品溶液; 称取伊班膦酸钠标准对照品22.000 mg, 加去离子水制成每1 mL含伊班膦酸约50  $\mu\text{g}$ 的溶液, 作为对照品溶液。定量环分别定量吸取25  $\mu\text{L}$ 供试样品和对照品, 进样测定, 记录色谱图。按外标法以峰面积计算伊班膦酸含量, 比较6份样品间含量差异。6份样品的含量分别为98.29%、100.28%、99.97%、99.02%、98.10%和100.59%, RSD值为1.06%, 不大于2.0%, 说明本方法重复性良好。

**2.2.4 回收率** 取辅料和伊班膦酸钠标准品, 配制含不同浓度伊班膦酸的注射液样品, 浓度比例分别为80%, 100%和120%, 按上述方法测定, 计算伊班膦酸的含量, 并计算回收率。

由表3可知, 配制样品3个浓度水平的加标回收率分别为99.06%、100.85%和100.68%, 而且加标回收率试验的RSD均小于1.00%, 说明此测定方法稳定、可靠。

**2.2.5 耐用性** 取伊班膦酸注射液样品, 分别调整不同试验条件测定含量, 考察含量变化情况。将柱温由30  $^{\circ}\text{C}$ 分别调整到28和32  $^{\circ}\text{C}$ , 测定结果含量分别为100.98%和100.02%。将流速由1.0  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 调整为0.9和1.1  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ , 依法测定, 结果含量分别为100.86%和100.12%。测定结果平均值为100.50%, 相对标准偏差RSD为0.49%。

### 3 结论

改进了离子色谱-电导抑制器测定伊班膦酸含量的方法。该方法简便、重现性好、适用性强, 为伊班膦酸药物主成分含量的检测提供了实用的技术

手段, 对于监测双膦酸盐药物的使用情况具有重要的理论指导意义。

**致谢:** 本试验得到了赛默飞世尔公司工程师韩春霞的技术支持, 在此表示感谢!

### 参考文献:

- [1] HIRATA J, KIKUCHI Y, KUDOH K, et al. Inhibitory effects of bisphosphonates on the proliferation of human ovarian cancer cell lines and the mechanism [J]. *Med Chem*, 2006, 2(3): 223-226.
- [2] PANDHA H, BIRCHALL L, MEYER B, et al. Antitumor effects of aminobisphosphonates on renal cell carcinoma cell lines [J]. *J Urol*, 2006, 176(5): 2255-2261.
- [3] SATO K, YUASA T, NOGAWA M, et al. A third-generation bisphosphonate, minodronic acid (YM529), successfully prevented the growth of bladder cancer in vitro and in vivo [J]. *Br J Cancer*, 2006, 95(10): 1354-1361.
- [4] OZTURK O H, BOZCUK H, BURGUCU D, et al. Cisplatin cytotoxicity is enhanced with zoledronic acid in A549 lung cancer cell line: preliminary results of an in vitro study [J]. *Cell Biol Int*, 2007, 31(9): 1069-1071.
- [5] BENASSI M S, CHIECHI A, PONTICELLI F, et al. Growth inhibition and sensitization to cisplatin by zoledronic acid in osteosarcoma cells [J]. *Cancer Lett*, 2007, 250(2): 194-205.
- [6] 方洪壮, 孙长海. 依替膦酸钠的电位滴定[J]. *中国医药工业杂志*, 1998, 29(4): 174-176.
- [7] 邵青, 李士敏, 郑琦, 等. 血浆中羟乙膦酸钠含量测定方法研究[J]. *中国药科大学学报*, 1997, 28(4): 222-224.
- [8] BAUSS F, LALLA S, ENDELE R, et al. Effects of treatment with ibandronate on bone mass, architecture, biomechanical properties, and bone concentration of ibandronate in ovariectomized aged rats [J]. *J Rheumatol*, 2002, 29(10): 2200-2208.
- [9] 蒋晔, 张晓青, 徐智儒. 高效液相色谱法测定唑来膦酸及其制剂含量[J]. *药物分析杂志*, 2005, 25(4): 406-408.
- [10] 马郑, 唐玮, 董建峰, 等. 离子色谱法测定伊班膦酸钠注射液中的亚磷酸根和磷酸根的含量[J]. *沈阳药科大学学报*, 2013, 30(6): 446-449.
- [11] 胡晓敏, 宋周虎, 张培敏, 等. 离子色谱-抑制电导检测同时测定伊班膦酸和有关物质磷酸根离子[J]. *卫生职业教育*, 2007, 25(16): 113-114.