

HPLC 测定奥格列汀中基因毒性杂质残留量

郑飞, 华国栋* (北京中医药大学东方医院药学部, 北京 100078)

摘要:目的 建立奥格列汀原料药中基因毒性杂质的 HPLC 测定方法。方法 采用 Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 进样量: 20 μL; 流动相为 0.1% 乙酸水-乙腈(65:35); 流速为 1 mL·min⁻¹; 紫外检测器, 检测波长为 220 nm; 柱温为 25 °C, 色谱乙腈为溶剂。结果 该方法专属性良好, 测得苯磺酸异丙酯在 4~60 μg·mL⁻¹ 内线性关系良好, 平均回收率为 98.56%(n=9, RSD=3.78%), 溶液在 8 h 内稳定。结论 该法操作简便, 重复性好, 结果准确可靠, 可用于奥格列汀原料药中基因毒性杂质的测定。

关键词: 奥格列汀; 原料药; 基因毒性杂质; 苯磺酸异丙酯; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2017)03-0396-03

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.03.020

Determination of Genotoxic Impurities in Omarigliptin by HPLC

ZHENG Fei, HUA Guodong* (Department of Pharmacy, Dongfang Hospital of Beijing University of TCM, Beijing 100078, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method to determine genotoxic impurities in omarigliptin bulk drug. **METHODS** The HPLC was carried out with Zorbax SB-C₁₈ column with the column temperature of 25 °C. The injection volume was 20 μL. The mobile phase was 0.1% acetic acid water solution-acetonitrile (65:35) with the flow rate of 1 mL·min⁻¹. The detector was UVD with the detection wave of 220 nm. Acetonitrile was used as solvent for omarigliptin. **RESULTS** Isopropyl benzenesulfonate could be separated completely with good linear relationship in 4~60 μg·mL⁻¹. The average recovery of isopropyl benzenesulfonate was 98.56%(n=9, RSD=3.78%). **CONCLUSION** This method is simple, reproducible and accurate for determination of genotoxic impurities in omarigliptin bulk drug.

KEY WORDS: omarigliptin; bulk drug; genotoxic impurities; isopropyl benzenesulfonate; HPLC

奥格列汀为超长效二肽基肽酶-4(DPP-4)抑制剂, 其作用机制是通过抑制体内 DPP-4 酶对胰高血糖素样肽-1(GLP-1)的降解作用, 从而延长 GLP-1 的作用时间, 提高血液中内源性 GLP-1 和 GIP 的浓度, 并最终改善血糖控制^[1]。奥格列汀合成工艺使用了苯磺酸盐作为原料和乙酸异丙酯作为溶剂, 苯磺酸盐在反应中可能与乙酸异丙酯发生反应得到苯磺酸异丙酯。苯磺酸异丙酯为潜在基因毒性杂质^[2], 为严格控制产品质量, 本研究参考文献[3]采用 HPLC 对苯磺酸异丙酯进行控制。

1 仪器与试剂

Agilent 1200 高效液相色谱仪, 配有紫外检测器, 自动进样器(美国 Agilent 公司); Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(美国安捷伦公司); Mettler Toledo XS5 分析天平(瑞士梅特勒公司)。

奥格列汀(原料药, 北京康悦药业, 纯度>99.5%, 批号: 20150129, 20150407, 20150921);

有关物质杂质 Y01、Y02(北京康悦药业, 批号分别为 140725 和 140702, 纯度均>98%); 乙腈(Merck 公司)、苯磺酸异丙酯(百灵威公司, 批号: LUA0039, 纯度: 99%)均为色谱纯; 纯化水由 Milli-Q 纯水机制备。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 进样量: 20 μL; 流动相: 0.1%乙酸水-乙腈(65:35); 流速: 1 mL·min⁻¹; 检测器为紫外检测器, 检测波长为 220 nm; 柱温为 25 °C。

2.2 系列对照品溶液的配制

精密称取苯磺酸异丙酯对照品 10.02 mg, 置于 50 mL 量瓶中, 加乙腈溶解并稀释至刻度得苯磺酸异丙酯浓度为 0.20 mg·mL⁻¹ 的对照品储备液。

精密量取对照品储备液 1, 3, 5, 8, 10, 15 mL,

作者简介: 郑飞, 女, 主管药师 Tel: 13621231026 E-mail: zhengfei071@126.com
(010)67638124 E-mail: zhaojhuagd@126.com

*通信作者: 华国栋, 男, 硕士, 主任药师 Tel:

分别置 50 mL 量瓶中,用乙腈稀释至刻度,摇匀,作为 4, 12, 20, 32, 40, 60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的系列对照品溶液。

2.3 供试品溶液的配制

取奥格列汀供试品 2 000 mg,精密称定,置于 10 mL 量瓶中,用乙腈溶解并稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。

2.4 系统适用性试验

精密量取 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 对照品溶液 20 μL ,注入液相色谱仪,按“2.1”项下色谱条件进行测定,记录色谱图,按苯磺酸异丙酯计算理论板数 $>5\,000$ 。对照品色谱图见图 1B。

2.5 专属性试验

取同苯磺酸异丙酯保留时间接近的有关物质杂质 Y01、Y02 和苯磺酸异丙酯适量,配制成含有有关物质杂质 Y01、Y02、苯磺酸异丙酯浓度均为 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液,按“2.1”项下色谱条件进行测定,记录色谱图,考察苯磺酸异丙酯和极性相近的杂质的分离度,见图 1E。结果显示,苯磺酸异丙酯和有关物质杂质 Y01 和 Y02 可达到基线分离,表明该方法专属性良好。

2.6 线性关系考察

分别取“2.2”项下系列对照品溶液适量,按

“2.1”项下色谱条件进行测定,以苯磺酸异丙酯的峰面积为纵坐标(Y),浓度为横坐标(X),进行线性回归,苯磺酸异丙酯线性方程为 $Y=52.1X-8.19$ ($r=0.999\,3$),在 4~60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内峰面积与浓度呈良好的线性关系。

2.7 回收率试验

精密称取批号为 20150129 的奥格列汀供试品 2 000 mg,置于 10 mL 量瓶中,再分别精密量取“2.2”项下对照品储备液 0.8, 1, 1.2 mL 至量瓶中,用乙腈稀释至刻度,摇匀,得 80%, 100%, 120%的加样回收测定溶液,按“2.1”项下色谱条件进行测定,苯磺酸异丙酯平均回收率为 98.56% ($n=9$, $\text{RSD}=3.78\%$),色谱图见图 1C。

2.8 仪器精密度试验

精密量取 100%苯磺酸异丙酯对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件,同一溶液重复进行测定 6 次,记录色谱图,计算得到苯磺酸异丙酯峰面积 RSD 为 0.35%。

2.9 重复性试验

精密称取批号为 20150129 的供试品 2 000 mg,按“2.3”项下方法处理 6 份,按“2.1”项下色谱条件进行测定,记录色谱图,均未检出苯磺酸异丙酯。

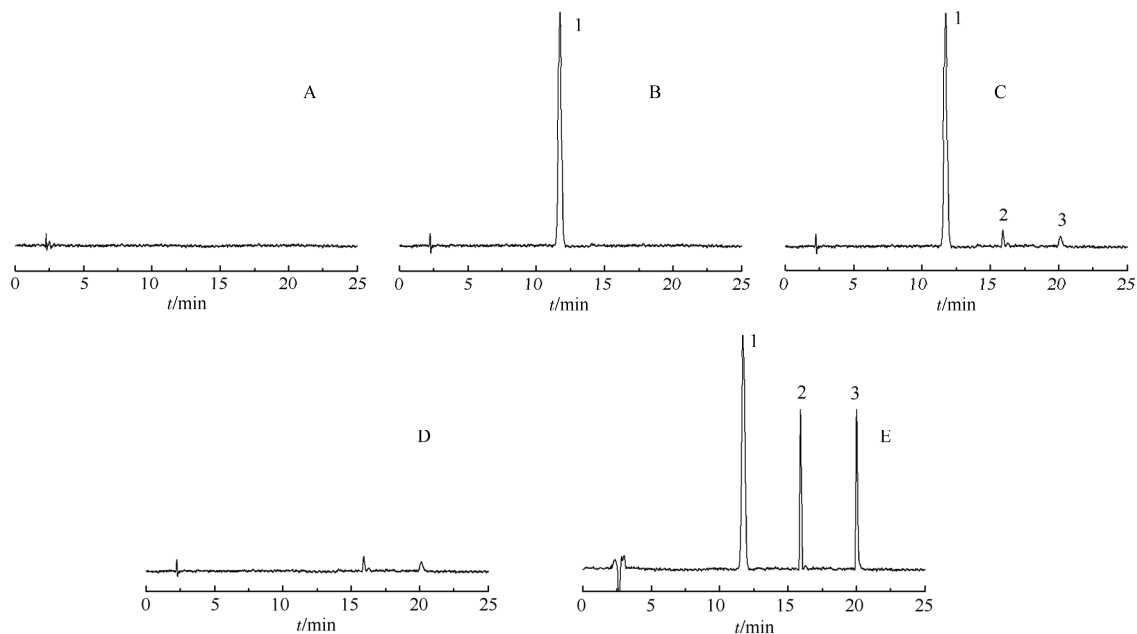


图 1 高效液相色谱图

A-空白溶液; B-对照品溶液; C-回收率试验溶液; D-供试品溶液; E-专属性验证溶液; 1-苯磺酸异丙酯; 2-有关物质杂质 Y01; 3-有关物质杂质 Y02。

Fig. 1 HPLC chromatograms

A-blank solution; B-standard solution; C-recovery validation solution; D-sample solution; E-specificity validation solution; 1-isopropyl benzenesulfonate; 2-impurity Y01; 3-impurity Y02.

2.10 检测限和定量限

取 $20\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 对照品溶液, 用乙腈逐级稀释, 并加入奥格列汀, 制成含奥格列汀 $200\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液, 进样, 按“2.1”项下色谱条件检测。记录色谱图, 当 S/N 约为 10 时, 为定量限, 当 S/N 约为 3 时, 为检测限。当信噪比为 3:1 时的样品浓度为检测限, 此时浓度为 $0.33\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。当信噪比为 10:1 时的样品浓度为定量限, 此时苯磺酸异丙酯浓度为 $1\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.11 溶液稳定性

精密量取 $20\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 对照品溶液适量, 按“2.1”项下色谱条件, 分别在 0, 1, 2, 4, 6, 8 h 进样测定同一溶液。计算得到苯磺酸异丙酯峰面积 RSD 为 0.68%, 表明苯磺酸异丙酯在 8 h 内稳定。

2.12 样品测定

取 3 批样品各 2 000 mg, 精密称定, 按“2.3”项下供试品溶液制备方法处理, 按“2.1”项下色谱条件检测, 色谱图见图 1D。按照外标法计算苯磺酸异丙酯的含量, 3 批样品中均无苯磺酸异丙酯检出。

3 讨论

3.1 液相色谱条件的选择和优化

由于需测定的苯磺酸异丙酯毒性杂质在甲醇中易发生酯交换, 因此未采用甲醇作为溶剂。经过筛选发现, 奥格列汀和苯磺酸异丙酯均可以很

好地溶解于乙腈中, 且苯磺酸异丙酯在乙腈中较甲醇中稳定, 因此选择乙腈作为溶剂。

由于苯磺酸异丙酯沸点较高, 挥发较差, 无法采用气相色谱法进行测定, 因此采用 HPLC 进行测定。苯磺酸异丙酯含有苯环, 紫外光谱末端有吸收, 测定其最大吸收波长为 220 nm, 因此采用 220 nm 作为测定波长。

3.2 基因毒性杂质限度的确定

在遗传毒性杂质限度制定中常用的方法为 TTC 法(无阈值效应的遗传毒性杂质)。企业参考 EMA 遗传毒性杂质研究指导原则的规定^[3], 取 TTC 值为 $1.5\ \mu\text{g}\cdot\text{d}^{-1}$ 。在对奥格列汀的研究中, 按奥格列汀片的最大日剂量计算控制限度, 本品初步计划申报规格为 12.5 mg, 同时在中试放大时平均片重约为 12.0~13.0 mg, 取 1 片的最大日剂量为 15 mg, 因此杂质苯磺酸异丙酯控制限度为 0.01%。

REFERENCES

- [1] TESFAYE B, RANABIR S R, PING C, et al. Omarigliptin (MK-3102): a novel long-acting DPP-4 inhibitor for once-weekly treatment of type 2 diabetes [J]. J Med Chem, 2014, 57(8): 3205-3212.
- [2] EMEA. Guideline on the limits of genotoxic impurities (EMA/CHMP/QWP/251344/2006) [S]. EMEA, 2006.
- [3] WANG Z H, YIN J. Methodology research of determination of ethyl benzenesulphonate in amlodipine besylate [J]. Mod Med J China(中国现代医药杂志), 2015, 17(1): 56-59.

收稿日期: 2016-05-20

(本文责编: 蔡珊珊)