

HPLC 测定赛利司他有关物质及降解产物

张立波^{1a,2}, 陈蓓^{1a,2}, 汤谷平^{1b*} (1.浙江大学药学院, a.药学院, b.化学生物和药物研究所, 杭州 310000; 2.杭州华东医药集团新药研究院有限公司, 杭州 310000)

摘要: 目的 建立 HPLC 测定赛利司他有关物质的方法。方法 采用 Agilent Phenyl 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以 5 mmol·L⁻¹ 磷酸二氢钾(用 10%磷酸调 pH 值至 4.0)-乙腈为流动相进行梯度洗脱, 流速为 1.0 mL·min⁻¹, 检测波长为 226 nm。结果 各杂质与主峰之间的分离度良好。开环杂质(杂质 A)、2-十七烷基氧-6-甲基-4 氢-3,1-苯并噁嗪-4-酮(杂质 B)、2-十八烷基氧-6-甲基-4 氢-3,1-苯并噁嗪-4-酮(杂质 C)浓度分别在 0.049 5~1.981 μg·mL⁻¹, 0.059 9~0.399 1 μg·mL⁻¹, 0.059 6~0.397 5 μg·mL⁻¹ 内与峰面积呈良好的线性关系, *r* 均为 0.999 9; 杂质 A、B、C 加样回收率的平均值分别为 104.2%, 107.0% 和 107.8%, RSD 分别为 2.09%, 1.77% 和 2.18%。结论 本方法简便、准确可靠, 适用于赛利司他中有关物质的控制。

关键词: 赛利司他; 高效液相色谱法; 有关物质

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2017)03-0399-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2017.03.021

Determination of the Related Substances of Cetilistat by HPLC

ZHANG Libo^{1a,2}, CHEN Bei^{1a,2}, TANG Guping^{1b*} (1.Zhejiang University, a.School of Pharmaceutical Sciences, b.Institute of Chemical Biology and Pharmaceutical Chemistry, Hangzhou 310000, China; 2.East China Pharmaceutical Group New Drug Institute Limited Co., Ltd., Hangzhou 310000, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for determining the contents of the related substances of cetilistat. **METHODS** The condition of detection were as follows: Agilent Phenyl column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the gradient mobile phase consisted of 5 mmol·L⁻¹ potassium dihydrogen phosphate (adjust with 10% phosphoric acid to pH 4.0) and acetonitrile with a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, the UV detection wavelength was 226 nm. **RESULTS** The resolution of cetilistat and related substances was good. The calibration curves were linear in the range of 0.049 5–1.981 0 μg·mL⁻¹ for impurity A (*r*=0.999 9); the calibration curves were linear in the range of 0.059 9–0.399 1 μg·mL⁻¹ for impurity B (*r*=0.999 9); the calibration curves were linear in the range of 0.059 6–0.397 5 μg·mL⁻¹ for impurity C (*r*=0.999 9). The average recoveries of impurity A, impurity B and impurity C were 104.2%, 107.0% and 107.8% respectively; the RSDs were 2.09%, 1.77% and 2.18%, respectively. **CONCLUSION** The method is simple, accurate, reliable and can be used for the quality control of the related substances of cetilistat.

KEY WORDS: cetilistat; HPLC; related substances

赛利司他是日本武田公司和英国 Alizyme 公司研发的一种新的胃肠道脂肪酶抑制剂, 用于治疗肥胖和 II 型糖尿病。它通过与胃和小肠腔内胃脂肪酶和胰脂肪酶的活性丝氨酸部位形成共价键使酶失活而发挥治疗作用, 失活的酶不能将食物中的脂肪水解为可吸收的游离脂肪酸和单酰基甘油。通过直接阻断人体对食物中脂肪的吸收, 摄入的热能和脂肪一旦小于消耗, 体内脂肪自然减少, 从而达到减重的目的^[1]。Norgin 公司于 2009 年从 Alizyme 公司购买了该产品的所有权, 与武田公司共同开发。该药于 2013 年 9 月在日本批准上市, 商品名 Oblean。Norgine 公司继续进行日本外的其他国家的 III 期临床研究。该药国内尚未上市, 国内外药典均未收载其标准, 本品的有关物质研究在国内外未见报道, 仅有其临床试验及药理作

用方面的研究文献^[2-4]。

根据赛利司他专属性试验可知, 酸降解、碱降解、氧化降解的主要降解产物为开环杂质(杂质 A); 由分子式与合成的机理^[5]确定, 赛利司他终产品中可能存在起始原料正十六烷醇中的正十七烷醇、正十八烷醇与另一起始原料 2-氨基-5-甲基苯甲酸反应的副产物 2-十七烷基氧-6-甲基-4 氢-3,1-苯并噁嗪-4-酮(杂质 B)、2-十八烷基氧-6-甲基-4 氢-3,1-苯并噁嗪-4-酮(杂质 C), 结构式见图 1。本研究建立了 HPLC 测定赛利司他的有关物质的方法, 为该药的质量控制提供技术支持。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1200 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); XS105 型电子分析天平(瑞士梅特勒公司)。

作者简介: 张立波, 女, 工程师 Tel: 13606619540 E-mail: shirleyzlb@163.com
(0571)88273284 E-mail: tangguping@zju.edu.cn

*通信作者: 汤谷平, 男, 博士, 教授 Tel:

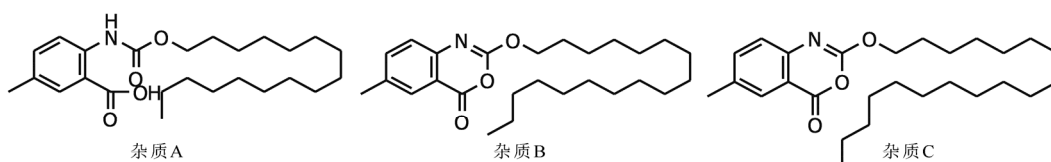


图1 杂质 A~C 的结构式

Fig. 1 Structural formula of impurity A~C

1.2 药品和试剂

赛利司他原料药(批号: 140501, 140502, 140503)、赛利司他对照品(批号: 140501-R, 纯度: 99.78%)、开环杂质对照品(杂质 A 对照品, 批号: 20140612, 纯度: 98.64%)、2-十七烷基氧-6-甲基-4-氢-3,1-苯并噁嗪-4-酮对照品(杂质 B 对照品, 批号: 140601, 纯度: 99.77%)、2-十八烷基氧-6-甲基-4-氢-3,1-苯并噁嗪-4-酮对照品(杂质 C 对照品, 批号: 140601, 纯度: 99.97%)均购自杭州华东医药集团新药研究院有限公司; 乙腈为色谱纯; 其他试剂均为分析纯。

2 方法和结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Agilent ZORBAX Eclipse XDB-Phenyl 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 流动相 A 为 5 mmol·L⁻¹ KH₂PO₄(用 10% H₃PO₄ 调 pH 至 4.0); 流动相 B 为乙腈; 梯度洗脱程序: 0 min 55%A; 3 min 55%A; 10 min 20%A; 38 min 20%A; 38.1 min 55%A; 45 min 55%A; 柱温: 20 °C; 检测波长: 226 nm; 流速: 1.0 mL·L⁻¹; 进样量: 20 μL(自动进样)。

2.2 溶液的制备

2.2.1 杂质对照品溶液的制备 取杂质 A、B、C 对照品适量, 加无水乙腈制成含杂质 A、B、C 浓度分别为 1, 0.2, 0.2 μg·mL⁻¹ 的混合溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密称取赛利司他原料药约 10 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加无水乙腈溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.2.3 0.1% 自身对照溶液的制备 精密量取“2.2.2”项下供试品溶液 1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加无水乙腈稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.3 专属性试验考察

2.3.1 已知杂质 A、B、C 与主峰的分度度试验 精密称取杂质 A、B、C 对照品和样品适量, 加无水乙腈制成分别含杂质 A、B、C 和样品 1, 0.2, 0.2, 100 μg·mL⁻¹ 的溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 样品与杂质峰分离度良好, 各成分色谱峰与相邻峰的分度度均>1.5, 色谱图见图 2。

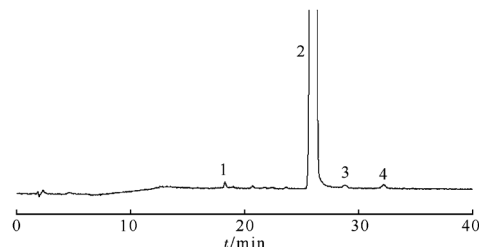


图2 分离度试验的 HPLC 图

1-杂质 A; 2-供试品溶液; 3-杂质 B; 4-杂质 C。

Fig. 2 HPLC chromatograms of resolution test

1-impurity A; 2-sample solution; 3-impurity B; 4-impurity C.

2.3.2 强制降解试验 分别精密称取 5 份赛利司他样品 10 mg, 置 100 mL 量瓶中。其中 3 份加 10 mL 无水乙腈, 再分别加 0.01 mol·L⁻¹ 盐酸 1 mL 放置 5 min、加 0.03 mol·L⁻¹ 氢氧化钠 1 mL 放置 10 min、加 30% 双氧水 1 mL 60 °C 水浴 2.5 h, 加无水乙腈稀释至刻度。另外 2 份分别置光照箱(5 000±500)lx 光照 29 h 和高温(105 °C)放置 3 h 后, 加无水乙腈稀释至刻度。将上述酸、碱、氧化、高温、光照样品溶液进样分析, 进样量为 20 μL。结果显示, 赛利司他在酸、碱、氧化条件下容易降解, 对光照与热破坏基本稳定。物料平衡因子依次为 0.934 8, 0.955 2, 0.946 9, 1.007 8, 0.981 5, 均在 0.9~1.1 之间, 物料守恒。结果表明, 用 HPLC 检查有关物质, 能分离酸、碱、氧化、光照、高温下破坏的降解物, 能有效控制赛利司他的质量, 见图 3。

2.4 线性关系考察

精密称取杂质 A、B、C 和赛利司他对照品适量, 加无水乙腈溶解配制制成贮备液; 精密量取上述溶液, 用无水乙腈稀释制成 0.049 5, 0.297 1, 0.594 2, 0.990 3, 1.486, 1.981 μg·mL⁻¹ 杂质 A 对照品溶液, 0.059 9, 0.119 7, 0.199 5, 0.299 3, 0.399 1 μg·mL⁻¹ 杂质 B 对照品溶液, 0.059 6, 0.119 2, 0.198 7, 0.298 1, 0.397 5 μg·mL⁻¹ 杂质 C 对照品溶液和 0.050 2, 0.301 4, 0.602 9, 1.005, 1.507, 2.010 μg·mL⁻¹ 赛利司他对照品溶液。精密量取上述溶液各 20 μL, 分别注入液相色谱仪, 按有关物质方法检测, 记录色谱图, 以浓度为 X 轴, 峰面积为 Y 轴, 进行

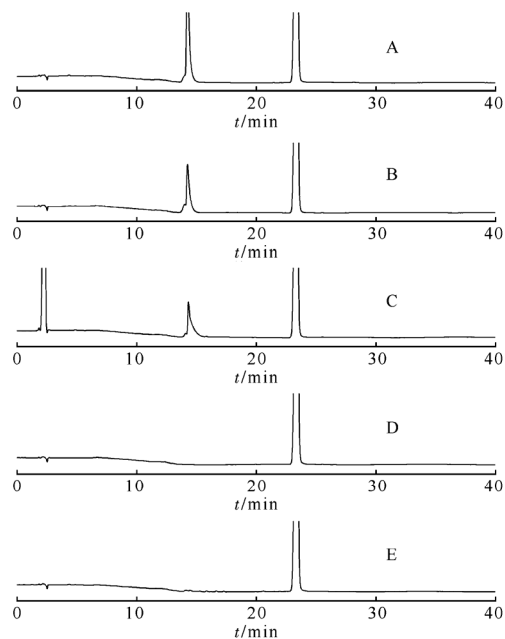


图3 强制降解试验

A-酸降解; B-碱降解; C-氧化降解; D-光照降解; E-高温降解。

Fig. 3 HPLC chromatograms of stress test

A-destroyed by acid; B-destroyed by alkali; C-destroyed by oxidation; D-destroyed by light; E-destroyed by high temperature.

线性回归, 杂质 A 线性方程为 $Y=70.999X+1.135$, $r=0.999\ 9$; 杂质 B 线性方程为 $Y=140.29X-0.118\ 0$, $r=0.999\ 9$; 杂质 C 线性方程为 $Y=130.74X+0.118\ 5$, $r=0.999\ 9$; 赛利司他线性方程为 $Y=149.52X+0.426\ 2$, $r=1.000$ 。杂质 A、B、C 和赛利司他分别在 $0.049\ 5\sim1.981\ 0\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $0.059\ 9\sim0.399\ 1\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $0.059\ 6\sim0.397\ 5\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $0.050\ 2\sim2.010\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内与峰面积线性关系良好。

用 2 台不同仪器对杂质进行相对响应因子的测定, 以各杂质线性方程中的斜率和赛利司他的斜率相除, 得各自的相对响应因子 k 。结果杂质的响应因子以赛利司他峰为参照, 均在 $0.2\sim5.0$ 之间, 重复性较好, 所以测定有关物质方法定为用杂质对照品溶液作为定位, 选用加响应因子的自身对照法作为已知杂质的计算。结果见表 1。

表 1 不同仪器中测得杂质的响应因子

Tab. 1 Response factors of impurities in different instruments

物质	仪器 1		仪器 2		平均响应因子
	k	相对响应因子	k	相对响应因子	
杂质 A	62.00	0.49	71.00	0.47	0.48
赛利司他	127.68	1.00	149.52	1.00	1.00
杂质 B	118.55	0.93	140.29	0.94	0.93
杂质 C	108.2	0.85	130.74	0.87	0.86

2.5 检测限和定量限

称取杂质 A、B、C 和赛利司他适量, 用无水乙腈超声溶解, 取溶液逐级稀释到一定浓度, 取

$20\ \mu\text{L}$ 进样, 记录色谱峰。以信噪比 $S/N\geq 3$ 计, 杂质 A、B、C 和赛利司他检测限分别为 15.28 , 14.85 , 12.84 , $11.63\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$; 以信噪比 $S/N\geq 10$ 计, 杂质 A、B、C 和赛利司他最低定量限分别为 $46.11\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($n=5$, $RSD=2.94\%$)、 $50.24\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($n=5$, $RSD=1.84\%$)、 $59.27\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($n=5$, $RSD=3.41\%$)、 $36.87\ \text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($n=5$, $RSD=3.63\%$)。

2.6 重复性试验

按照有关物质方法, 称取样品 6 份进行检测, 测得杂质 A 含量为 0.01% , RSD 为 0.00% ; 杂质 B 含量为 0.05% , RSD 为 0.00% ; 杂质 C 含量为 0.08% , RSD 为 9.94% ; 总杂质含量为 0.15% , RSD 为 5.32% 。结果表明, 有关物质测定重复性良好。

2.7 回收率试验

精密称取杂质 A、B、C 对照品各适量, 用无水乙腈制成浓度分别为 1 , 0.2 , $0.2\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合溶液, 作为贮备液; 精密称取赛利司他原料(样品批号: 140502) $10\ \text{mg}$ 于 $100\ \text{mL}$ 量瓶中, 精密量取上述贮备液 0.3 , 0.8 , 1.0 , $1.2\ \text{mL}$ 分别于上述 $100\ \text{mL}$ 量瓶中, 制成含各杂质的限度的 30% , 80% , 100% , 120% 的溶液。精密量取 $20\ \mu\text{L}$ 上述溶液注入液相色谱仪, 另取杂质对照品同法测定, 按外标法以峰面积计算, 结果杂质 A、B、C 平均回收率分别为 104.2% , 107.0% , 107.8% , RSD 分别为 2.09% , 1.77% , 2.18% , 结果见表 2。

2.8 稳定性试验

取一份供试品溶液, 在室温下放置 0 , 4 , 8 , $12\ \text{h}$ 后测定, 杂质 A、B、C 平均含量分别为 0.01% , 0.05% , 0.08% , RSD 均为 0.00% ; 总杂质含量为 0.15% , RSD 为 0.00% 。结果表明, 样品溶液在配制好后 $12\ \text{h}$ 内稳定。

2.9 样品测定

取本品, 按“2.2.2”项下方法制成供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件测定, 采用加校正因子的自身对照法测定有关物质, 结果见表 3 和图 4。

3 讨论

3.1 流动相的选择

本实验考察了水-乙腈、辛烷磺酸钠-乙腈、磷酸盐缓冲液-乙腈 3 种流动相系统。辛烷磺酸钠-乙腈系统基线太差, 在乙腈-磷酸盐缓冲液系统中, 主峰峰型较好, 理论板数高, 各杂质峰与主峰达到基线分离。通过进一步优化 pH 值和磷酸盐的浓度, 最终选择 $5\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\ \text{KH}_2\text{PO}_4$ (用 $10\%\ \text{H}_3\text{PO}_4$

表 2 回收率试验

Tab. 2 Results of recovery test

化合物	对照品加入量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
杂质 A	28.23	29.62	104.9	104.2	2.09
	28.23	30.57	108.3		
	28.23	28.51	101.0		
	75.28	78.83	104.7		
	75.28	79.75	105.9		
	75.28	79.62	105.8		
	94.10	99.44	105.7		
	94.10	97.91	104.0		
	94.10	98.14	104.3		
	112.9	115.5	102.3		
杂质 B	112.9	114.1	101.0	107.0	1.77
	112.9	115.7	102.4		
	6.369	6.863	107.8		
	6.369	6.916	108.6		
	6.369	6.576	103.2		
	16.98	17.89	105.3		
	16.98	18.14	106.8		
	16.98	18.29	107.7		
	21.23	23.18	109.2		
	21.23	23.35	110.0		
杂质 C	21.23	22.38	105.4	107.8	2.18
	25.48	27.20	106.8		
	25.48	26.87	105.5		
	25.48	27.40	107.5		
	7.270	7.625	104.9		
	7.270	7.456	102.6		
	7.270	7.990	109.9		
	19.39	21.19	109.3		
	19.39	20.92	107.9		
	19.39	21.17	109.2		

表 3 赛利司他有关物质检查

Tab. 3 Results of related substances of cetilistat

批号	杂质 A/%	杂质 B/%	杂质 C/%	总杂质/%
140501	0.01	0.05	0.08	0.15
140502	0.00	0.00	0.00	0.00
140503	0.00	0.00	0.00	0.00

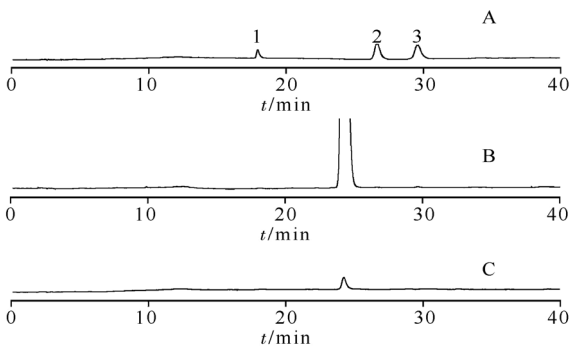


图 4 有关物质测定色谱图

A-杂质定位; B-供试品; C-0.1%自身对照; 1-杂质 A; 2-杂质 B; 3-杂质 C。

Fig. 4 HPLC chromatograms of related substances

A-impurities localization; B-sample; C-0.1% self-control; 1-impurity A; 2-impurity B; 3-impurity C.

调 pH 至 4.0)-乙腈作为流动相。由于起始原料与赛利司他的极性相差较大, 需使用梯度洗脱进行分析。

3.2 检测波长的选择

对样品在有关物质色谱条件下选用 DAD 检测, 三维图谱的结果表明, 样品在 226 nm 附近有最大吸收, 破坏试验样品均在 226 nm 处相应有较大吸收, 故选择 226 nm 作为有关物质检查的测定波长。

3.3 检验结果

对 3 批赛利司他原料药进行测定, 结果 3 个已知杂质含量均 $<0.1\%$, 总杂质含量均 $<0.2\%$ 。本实验建立了 HPLC 测定赛利司他有关物质的方法, 该方法准确、可靠, 可以有效评价赛利司他有关物质的情况。

REFERENCES

[1] YAN J Q, GAO R, XIE J P. Research and development and market trends of anti-obesity drugs such as cetilistat(ATL-962), rimonabant and xenical [J]. Chem Indust Times(化工时刊), 2008, 22(2): 72-73.

[2] PETER K, RERRIT de H G, AILA R, et al. Weight loss, HbA1c reduction, and tolerability of cetilistat in a randomized, placebo-controlled phase 2 trial in obese diabetics: comparison with Orlistat (Xenical) [J]. Obesity, 2010, 18(1): 108-115.

[3] KOPELMAN P, BRYSON A, HICKLING R, et al. Cetilistat (ATL-962), a novel lipase inhibitor: a 12-week randomized, placebo-controlled study of weight reduction in obese patients [J]. Int J Obesity, 2007, 31(3): 494-499.

[4] YAMADA Y, KATO T, OQINO H, et al. Cetilistat (ATL-962), a novel pancreatic lipase inhibitor, ameliorates body weight gain and improves lipid profiles in rats [J]. Hormone Metabolic Res, 2008, 40(8): 539-543.

[5] H-F·胡德森, R·唐恩哈姆, T·J·米歇尔, 等. 治疗肥胖症的 2-氧-4H-3,1-苯并噁嗪-4-酮: 中国, ZL00803622.5 [P]. 2007-05-16.

收稿日期: 2016-07-29

(本文责编: 蔡珊珊)