

HPLC法检查苯甲酸阿格列汀原料药的有关物质

孙著叶^{1*}, 乔世琴¹, 罗兆亮²(1.日照市中医医院, 山东日照 276800; 2.鲁南制药集团股份有限公司科研部, 山东临沂 276005)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)33-3141-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.33.22

摘要 目的:建立检查苯甲酸阿格列汀原料药中有关物质的方法。方法:采用高效液相色谱梯度洗脱法。色谱柱为C₁₈,流动相A为0.2%磷酸溶液(pH 3.0),流动相B为乙腈,以1.0 ml/min流速进行梯度洗脱,检测波长为225 nm,进样量为20 μl。采用不加校正因子主成分自身对照法检查特定杂质F-1的量。结果:苯甲酸阿格列汀与F-1及其他未知杂质均分离良好,前二者检查质量浓度线性范围分别为0.187 2~0.748 8、0.184 5~0.738 0 μg/ml($r=0.999 7, 0.999 9$);F-1的检测限和定量限分别为2.5、7.5 ng,平均回收率为100.9%(RSD=1.10%, $n=3$);3批样品中F-1量均≤0.06%。结论:建立的方法灵敏快速、结果准确可靠,可作为苯甲酸阿格列汀原料药的有关物质检查方法。

关键词 苯甲酸阿格列汀;高效液相色谱法;梯度洗脱;有关物质

Determination of Related Substances in Alogliptin Benzoate Raw Materials by HPLC

SUN Zhu-ye¹, QIAO Shi-qin¹, LUO Zhao-liang²(1.Rizhao Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shandong Rizhao 276800, China; 2.Research Department, Lunan Pharmaceutical Group Corporation, Shandong Linyi 276005, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determination of related substances in Alogliptin benzoate (AB) raw materials. METHODS: HPLC-gradient elution method was adopted. The determination was performed on C₁₈ column with mobile phase A consisted of 0.2% phosphoric acid solution (pH adjusted to 3.0) and mobile phase B consisted of acetonitrile at the flow rate of 1.0 ml/min (gradient elution). The detection wavelength was set at 225 nm and sample size was 20 μl. The content of impurity F-1 was determined by the self-control method without correction factor. RESULTS: AB, F-1 and other impurities were completely separated. The linear range was 0.187 2-0.748 8 μg/ml for AB and 0.184 5-0.738 0 μg/ml for F-1 ($r=0.999 7, 0.999 9$). The limits of detection and quantification were 2.5 ng and 7.5 ng for F-1. The average recovery was 100.9% (RSD=1.10%, $n=3$); the content of F-1 in 3 batches of samples were ≤0.06%. CONCLUSIONS: The method is sensitive, rapid, accurate and reliable, and can be used for the determination of related substance in AB raw materials.

KEYWORDS Alogliptin benzoate; HPLC; Gradient elution; Related substances

苯甲酸阿格列汀(Alogliptin benzoate, AB),化学名为2-[[6-[(3R)-3-氨基-1-哌啶基]-3-甲基-2,4-二氧-3,4-二氢-1(2H)嘧啶]甲基]苯甲腈苯甲酸盐,是日本武田公司研发的治疗2型糖尿病的新药,2010年4月经日本厚生劳动省(MHLW)批准上市^[1];2013年1月获美国FDA批准上市,商品名为Nesina^[2];2013年7月我国食品药品监督管理局批准进口AB片,商品名为尼欣那^[3]。AB是一种丝氨酸蛋白二肽基肽酶IV(DPP-IV)抑制剂,其能维持体内类胰高血糖素肽1(GLP-1)和葡萄糖依赖性促胰岛素肽(GIP)水平,增加胰岛素的分泌,从而发挥降糖作用。临床研究表明,患者对该药耐受性良好,不良反应轻微^[4-6]。

本文根据AB合成工艺路线及结构确证结果,确定其终产品中可能存在反应副产物F-1。为更好地控制AB原料药的有关物质,笔者采用高效液相色谱(HPLC)法梯度洗脱及不加校

正因子自身对照法,重点对AB合成工艺副产物即杂质F-1进行了相关研究,建立了有关物质检查方法。

F-1结构式见图1。

1 材料

1.1 仪器

1200型HPLC仪,包括四元泵、Chemstation化学工作站(美国Agilent公司);XS105电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司)。

1.2 药品与试剂

6-氯尿嘧啶(起始原料S-1,批号:S1-0701,纯度:98.3%)、2-氰基苄溴(起始原料S-2,批号:S2-0701,纯度:98.0%)、苯甲酸(起始原料S-3,批号:S3-0701,纯度:≥98.1%)、2-[(6-氯-2,4-二氧-3,4-二氢-2H-嘧啶-1-基)甲基]苯甲腈(中间体IM-1,批

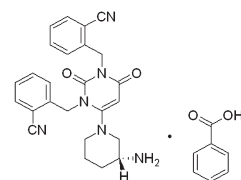


图1 杂质F-1化学结构式
Fig 1 Chemical structure of the impurity F-1

* 主管药师。研究方向:医院药学。电话:0633-8290907。E-mail:pharm_2012@126.com

号:M1-0701,纯度:≥98.4%)、2-[(6-氯-3-甲基-2,4-二氧-3,4-二氢-2H-嘧啶-1-基)甲基]苯甲腈(中间体IM-2,批号:M2-0701,纯度:≥98.5%)、N-[3-(2-氰基苄基)-1-甲基-2,6-二氧-1,2,3,6-四氢嘧啶-4-基]哌啶-(3R)-3-氨基甲酸叔丁酯(中间体IM-3,批号:M3-0701,纯度:98.8%)、2-[[6-[(3R)-3-氨基哌啶-1-基]-3-甲基-2,4-二氧-3,4-二氢嘧啶-1(2H)基]甲基]苯甲腈(中间体IM-4,批号:M4-0701,纯度:99.4%)、1,3-二(2-氰基苄基)-6-(R-3-氨基哌啶)尿嘧啶苯甲酸盐(杂质F-1,批号:F131101,纯度:99.6%)及AB精制品(批号:130701,纯度:99.9%)、AB原料药样品(批号:H131001、H131002、H131003,纯度:99.85%、99.86%、99.83%)均由鲁南制药集团科研部合成实验室提供;乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:C₁₈(150 mm×4.6 mm, 5.0 μm);流动相:流动相A为0.2%磷酸溶液(用0.3%三乙胺试液调pH至3.0),流动相B为乙腈,流速:1.0 ml/min;检测波长:225 nm;进样量:20 μl。梯度洗脱程序见表1。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 The program of gradient elution

时间, min	流动相A, %	流动相B, %
0	75	25
10	75	25
20	55	45
30	55	45
31	80	20
40	80	20

2.2 强制降解试验

取样品(批号:H131001)分别进行不同条件(酸、碱、氧化、光照、高温)破坏后,考察破坏产生的各杂质与成品的分离情况。

未破坏样品制备:取AB原料药约10 mg,用溶剂[流动相A-流动相B(75:25)]溶解并稀释至20 ml,摇匀,滤过,即得。

各破坏样品制备:取AB原料药约10 mg 5份,加少量溶剂使溶解,分别进行以下操作:(1)酸破坏:加1.0 mol/L盐酸溶液2 ml,室温放置3 h,用1.0 mol/L氢氧化钠溶液调pH至中性;(2)碱破坏:加0.1 mol/L氢氧化钠溶液2 ml,室温放置3 h,用0.1 mol/L盐酸溶液调pH至中性;(3)光照破坏:在紫外灯(254 nm)下照射3 h后,滤过,即得;(4)高温破坏:在100℃下破坏3 h;(5)氧化破坏:加30%双氧水2 ml破坏3 h。其中(1)、(2)、(4)、(5)降解处理后的溶液再用溶剂稀释至20 ml,摇匀,滤过,即得。

同法平行制备各破坏条件的空白样品。精密量取上述各溶液20 μl注入液相色谱仪,记录色谱图,见图2。

试验结果表明,本品在酸、碱、高温、光照、氧化破坏下均有降解产物产生,各新增降解产物与主峰均能达到较好分离。空白样品对杂质检出未见干扰。

2.3 系统适用性试验

取合成工艺路线中的各起始原料、各步反应中间体、杂质

F-1以及AB精制品适量,用溶剂配制成一定质量浓度的混合溶液,在上述色谱条件下进样记录色谱图,以进一步考察上述流动相条件,结果见图3。

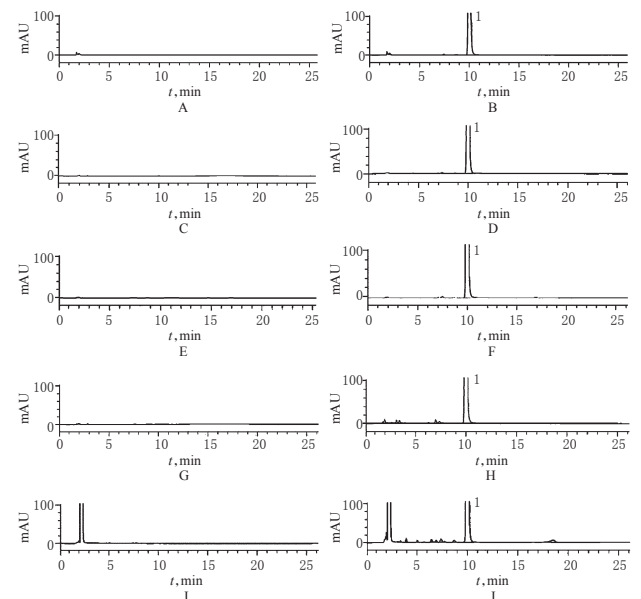


图2 强制降解试验高效液相色谱图

A. 酸破坏空白样品; B. 酸破坏样品; C. 碱破坏空白样品; D. 碱破坏样品; E. 高温破坏空白样品; F. 高温破坏样品; G. 光照破坏空白样品; H. 光照破坏样品; I. 氧化破坏空白样品; J. 氧化破坏样品; 1. AB

Fig 2 HPLC chromatograms of forced degradation test

A. blank sample destroyed by acid; B. sample destroyed by acid; C. blank sample destroyed by base; D. sample destroyed by base; E. blank sample destroyed by high temperature; F. sample destroyed by high temperature; G. blank sample destroyed by light; H. sample destroyed by light; I. blank sample destroyed by oxidation; J. sample destroyed by oxidation; 1. AB

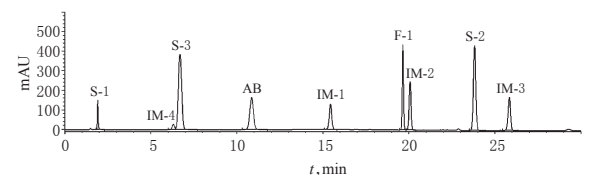


图3 系统适用性试验高效液相色谱图

Fig 3 HPLC chromatogram of system suitability test

图3结果表明,起始原料、各步反应中间体、杂质F-1与主成分峰间均分离良好。

2.4 含量测定方法学研究

2.4.1 线性关系试验。精密量取杂质F-1及AB精制品溶液0.3、0.6、0.8、1.0、1.2 ml,分别置于10 ml量瓶中,用溶剂定容至刻度,摇匀,精密吸取各梯度的溶液各20 μl,由低到高质量浓度依次进样,记录色谱图,以质量浓度(c , μg/ml)为横坐标、峰面积(A)为纵坐标,绘制标准曲线,进行线性回归。结果AB、F-1的线性方程分别为 $A=4769.2c-16.467$ ($r=0.9997$)、 $A=5170.3c-14.176$ ($r=0.9999$),检测质量浓度线性范围分别为0.1872~0.7488、0.1845~0.7380 μg/ml,且F-1的相对响应因子为0.92(AB与F-1线性方程斜率之比)。

2.4.2 溶液稳定性试验。取“2.4.1”项下杂质F-1溶液(0.492

μg/ml)及AB溶液(0.499 2 μg/ml)于室温下放置,在不同时间点(0、2、4、6、8 h)分别进样测定,测得二者峰面积的RSD分别为0.96%、0.84%(n=5),表明供试品溶液室温下放置8 h内基本稳定。

2.4.3 检测限和定量限试验。取AB溶液及F-1溶液用溶剂分别逐级稀释,再精密量取各稀释液,记录色谱图。根据信噪比为3、10时分别计算检测限及定量限,结果AB分别为4.7、13.8 ng,F-1分别为2.5、7.5 ng。

2.4.4 精密性试验。取“2.4.1”项下F-1溶液(0.492 μg/ml)及AB溶液(0.499 2 μg/ml),分别连续进样6次,记录峰面积并计算RSD,结果F-1和AB的RSD分别为0.82%、0.52%(n=6)。

2.4.5 回收率试验。分别精密量取F-1溶液及AB溶液适量,同置于10 ml量瓶中,加溶剂稀释至刻度,将F-1溶液稀释为低、中、高质量浓度溶液,每个质量浓度下各配制3份。分别取溶液各20 μl进样,记录色谱图,计算回收率,结果见表2。

表2 F-1回收率试验结果(n=3)

Tab 2 Results of recovery tests of F-1(n=3)

加入量, μg	测得量, μg	回收率, %	平均回收率, %	RSD, %
4.92	4.86	98.7	100.9	1.10
	4.95	100.7		
	5.01	101.9		
9.84	9.93	100.9	100.9	1.10
	9.81	99.7		
	10.02	101.8		
14.76	15.07	102.1	100.9	1.10
	14.86	100.7		
	14.96	101.3		

2.4.6 样品有关物质检查。分别称取3批AB原料药约10 mg,用溶剂溶解并稀释至20 ml,摇匀,滤过,作为供试品溶液;另精密量取供试品溶液0.1 ml至100 ml量瓶中,加溶剂稀释至刻度,摇匀,作为对照溶液。按照“2.1”项下色谱条件进样,记录色谱图,以不加校正因子主成分自身对照法计算原料药样品中的有关物质,结果见表3。

表3 3批样品有关物质检查结果(%)

Tab 3 Results of related substances in 3 batches of samples (%)

批号	杂质F-1量	最大未知杂质质量	总杂质质量
H121001	0.06	0.04	0.15
H121002	0.05	0.05	0.14
H121003	0.06	0.07	0.17

3 讨论

前期试验根据合成工艺中起始原料、中间体、杂质F-1、AB原料药的紫外扫描图及原料药的强降解试验中的降解产物的光电二极管阵列检测器(PDA)光谱图结果,选择225 nm波长进行检测,可将工艺杂质及降解杂质有效检出。本文将杂质

F-1作为已知杂质进行研究,从相对响应因子值可知,其定量方法可选用不加校正因子主成分自身对照法控制原料药中含量;工艺杂质及降解杂质作为未知杂质进行控制。

与已有文献^[7](采用等度洗脱)测定主成分含量的内容相比,本文主要是对AB的工艺杂质及降解杂质进行了控制,重点是合成工艺中的副产物F-1的控制。笔者参考文献^[7-9],采用其中甲醇-0.1%高氯酸水溶液(32:68, pH约为2.0)为流动相时,主峰的理论板数约2 362,拖尾因子约1.9。为改善峰形质量,在流动相中添加了0.3%三乙胺,结果发现峰形对称、理论板数升高,但中间体IM-3在80 min内仍未出峰,表明在以上色谱条件、等度洗脱条件下IM-3不易被洗脱。故采用梯度洗脱法,并将甲醇由洗脱能力更强的乙腈代替,同时调节乙腈比例,结果色谱图主峰峰形良好,理论板数较高。与文献^[7]相比,本文采用梯度洗脱,保证了各个杂质的检出专属性及灵敏度。另文献^[7]中供试品质量浓度为0.1 mg/ml,本文为0.5 mg/ml,此质量浓度下可以保证各个杂质能够被有效检出。因此,本文不但建立了AB原料药中有关物质的检查方法并对其进行了验证,同时该方法还能严格控制特定杂质F-1,从而为保证产品质量提供了重要依据。

综上,本试验建立的方法灵敏快速、结果准确可靠,可作为AB的有关物质检查方法。

参考文献

- [1] 张淑芳.治疗糖尿病的新药NESINA获批在日本上市[J].中国执业药师,2010,12(6):54.
- [2] 张建忠.2013年1月FDA批准新药概况[J].上海医药,2013,34(5):59.
- [3] 国家食品药品监督管理总局.苯甲酸阿格列汀:进口药品[EB/OL].(2013-07-16)[2013-11-20].<http://www.sfda.gov.cn/WS01/CL0001/>.
- [4] Pratley RE. Alogliptin: a new, highly selective dipeptidyl peptidase-4 inhibitor for the treatment of type 2 diabetes [J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2009, 10(3):503.
- [5] Ludescher J, Wieser J, Laus G, et al. *Process for the preparation of alogliptin and its benzoate salts*: WO, 2010072680[P].2010-07-01.
- [6] 安富荣,崔岚,王勤.治疗2型糖尿病新药二肽基肽酶-4抑制剂阿格列汀[J].中国药师,2012,15(1):116.
- [7] 时春娟,赵春才,陆超,等.HPLC法测定苯甲酸阿格列汀片的含量[J].中国药房,2013,24(37):3 521.
- [8] 汤瑶,李响,闻镍,等.反相高效液相色谱法测定磷酸西他列汀的含量[J].药物分析杂志,2009,29(8):1 370.

(收稿日期:2014-02-24 修回日期:2014-04-27)

《中国药房》杂志——《化学文摘》(CA)收录期刊,欢迎投稿、订阅