

HPLC 法测定恩格列净有关物质的方法学验证

韩继永^{1,2}, 赵砚荣², 周学敏^{1*}

(¹南京医科大学药学院, 江苏 南京 211166; ²江苏奥赛康药业股份有限公司, 江苏 南京 211112)

[摘要] 目的: 建立恩格列净原料药纯度及所含杂质的测定方法。方法: 采用高效液相色谱(HPLC)法, 用 Waters symmetry C18 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以 0.01%(V/V)三氟乙酸溶液为流动相 A, 乙腈为流动相 B, 线性梯度洗脱: 0~10 min, 流动相 B 32%; 10~50 min, 流动相 B 32%~95%; 检测波长 225 nm, 流速 1.0 mL/min, 柱温 45℃。结果: 恩格列净与各杂质的分离度均>1.5, 检出限均<9 ng/mL, 线性范围满足定量分析要求; 重复性试验相对标准差(RSD)均<5%; 供试品溶液和对照溶液在 8 h 内稳定性良好; 各杂质的回收率为 88.6%~106.1%, RSD 均<10%。结论: 本研究建立的方法检测灵敏度高, 精密度好, 可作为恩格列净原料药有关物质的控制方法。

[关键词] 恩格列净; 有关物质; 高效液相色谱法; 测定

[中图分类号] R917

[文献标志码] B

[文章编号] 1007-4368(2017)01-0121-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20170130

Validation of HPLC method for the determination of related substances in empagliflozin

Han Jiyong^{1,2}, Zhao Yanrong², Zhou Xuemin^{1*}

(¹College of Pharmacy, NJMU, Nanjing 211166; ²Jiangsu Aosaikang Pharmaceutical CO., LTD, Nanjing 211112, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method for determination assay of empagliflozin and related substance. **Methods:** HPLC method was adopted. The determination was carried out on Waters symmetry C18 column(250 mm×4.6 mm, 5 μm). The mobile phase A was 0.01%(V/V) trifluoroacetic acid solution, the mobile phase B was acetonitrile, linearity gradient elution was as follows: 0~10 min, mobile B 32%; 10~50min, mobile B 32%~95%, at a flow rate of 1.0 mL/min. The detective wavelength was set at 225 nm, and the column temperature was at 45℃. **Results:** The separation between empagliflozin and its related substances was not less than 1.5. The LOQ was less than 9 ng/mL, and linear range were suitable for determination. The RSD of repeatability was less than 5.0%. The test solution and reference solution had a good stability in 8 h, the recovery of the impurities was 88.6%~106.1%, and RSD was less than 10%. **Conclusion:** The method is sensitive and accurate, and is effective for quality control in empagliflozin.

[Key words] empagliflozin; related substance; HPLC; determination

[Acta Univ Med Nanjing, 2017, 37(01): -]

恩格列净(empagliflozin)由美国礼来公司和德国勃林格殷格翰公司合作研发, 是钠-葡萄糖共转运蛋白 2(SGLT2)抑制药, 用于改善 2 型糖尿病成年患者的血糖。化学名为: (1S)-1,5-脱水-1-C-(4-氯-3-((4-(((3S)-四氢-3-咪喃基) 氧基) 苯基) 甲基) 苯基)-D-葡萄糖醇。欧盟委员会于 2014 年 5 月 3 日首次批准上市, 2014 年 8 月 1 日获得美国食品药品监督管理局(FDA)的批准, 是 FDA

[基金项目] 国家自然科学基金(81572081)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: xueminzhou@njmu.edu.cn

继 2013 年 3 月 29 日批准强生制药公司的卡格列净(canagliflozin, Invokana)和 2014 年 1 月 8 日批准阿斯利康公司的达格列净(dapagliflozin, Farxiga)之后, 第 3 个具有抑制 SGLT 2 新作用机制的治疗糖尿病新药^[1-5]。经过文献检索, 针对恩格列净有关物质检测方法的报道较少, 截至投稿, 国内外仅有 1 篇针对恩格列净片的有关物质检测方法公开发表^[6], 但所述方法检测的杂质种类较少。根据本品的合成路线及文献报道的合成途径^[7-8], 原料可能存在 A~L, 共计 12 个已知杂质, 化学结构式见图 1。本实验建立了恩格列净原料药中上述已知杂

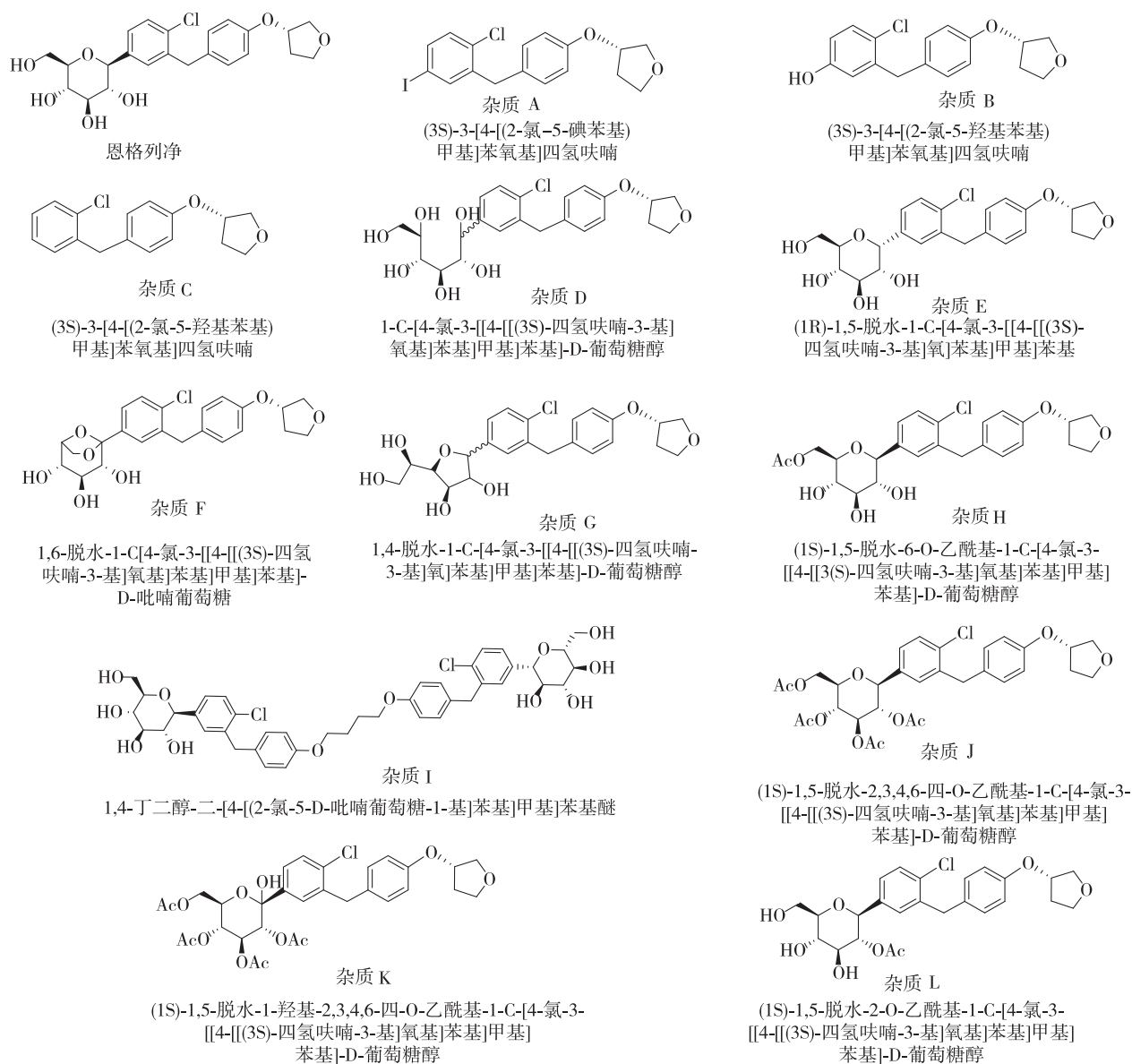


图 1 恩格列净及有关物质的化学结构

Figure 1 Chemical structures of empagliflozin and its related substances

质和未知杂质的梯度高效液相色谱(HPLC)检测方法,结果表明该方法灵敏度高、重复性好、专属性强,可以作为恩格列净原料药生产工艺及质量的评价方法。

1 材料和方法

1.1 材料

恩格列净对照品(批号:S13110801,纯度99.8%)、杂质A(批号:S13101701,纯度:99.6%)、杂质B(批号:S13082201,纯度:98.0%)、杂质C(批号:S13072701,纯度:99.5%)、杂质D(批号:S14081501,纯度:94.3%)、杂质E(批号:S13071801,纯度:99.8%)、杂质F(批号:S13071801,纯度:

96.7%)、杂质G(批号:S13071801,纯度:99.5%)、杂质H(批号:S13082001,纯度:96.6%)、杂质I(批号:S13082001,纯度:96.5%)、杂质J(批号:S13080702,纯度:99.6%)、杂质K(批号:S13090501,纯度:96.2%)、杂质L(批号:S13082001,纯度:83.0%);恩格列净原料药(批号:140301、140302、140303),以上对照品及供试品均由江苏奥赛康药业有限公司药物研究院提供。乙腈、甲醇为色谱纯,三氟乙酸为分析纯,水为纯化水,其他试剂均为分析纯。

Shimadzu LC-20A 高效液相色谱仪(岛津公司,日本);Thermo Ultimate 3000 高效液相色谱仪(戴安仪器公司,美国);CPA225D 电子分析天平(赛多利斯公司,德国)。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件

Waters symmetry C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 为色谱柱,以 0.01%(V/V) 三氟乙酸溶液为流动相 A,乙腈为流动相 B,梯度洗脱程序为 0~10 min,流动相 B 32%;10~50 min,流动相 B 32%~95%;检测波长为 225 nm,流速 1.0 mL/min,柱温 45℃。

1.2.2 溶液的制备

对照品储备液:取恩格列净对照品及杂质 A~杂质 L 各 20 mg,精密称定,分别置 20 mL 量瓶,加 50%(V/V)甲醇溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。对照溶液:精密量取供试品溶液 1 mL,置 100 mL 量瓶中,用 50%(V/V)甲醇溶液稀释至刻度,摇匀,即得。供试品溶液:取恩格列净原料药 20 mg,精密称定,置 20 mL 量瓶,加 50%(V/V)甲醇溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

1.2.3 系统适用性试验

取恩格列净原料药约 100 mg,精密称定,置 100 mL 量瓶中,分别加杂质对照品储备液各 1 mL,用 50%(V/V)甲醇溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,作为系统适用性试验溶液。精密量取 10 μL,注入液相色谱仪,记录色谱图。

1.2.4 专属性

取恩格列净约 20 mg,置 20 mL 量瓶中,分别加入 1 mol/L 盐酸溶液 2 mL,1 mol/L 氢氧化钠 2 mL,置 85℃水浴加热 8 h,取出冷却,调至中性,用 50%(V/V)甲醇溶液稀释至刻度,摇匀,即得酸、碱降解样品;取恩格列净原料药约 20 mg,置 20 mL 量瓶中,加 30%过氧化氢溶液 2 mL,室温放置 10 h,用 50%(V/V) 甲醇溶液溶解并稀释至刻度,即得氧化降解样品;取恩格列净原料药约 20 mg,加 50%(V/V)甲醇溶解后,置光照度为(4 500±500)lux 的环境下放置 72 h,并稀释至刻度,摇匀,即得光照降解样品;另取恩格列净原料药约 20 mg,置 105℃烘箱中加热 20 h,取出放冷,加 50%(V/V)甲醇溶液溶解并稀释至 20 mL,摇匀,即得高温降解样品。量取上述溶液及供试品溶液各 10 μL,分别进样测定。

1.2.5 检出限与定量限

取恩格列净对照品、杂质对照品溶液储备液,分别用 50%(V/V)甲醇溶液逐渐稀释至色谱峰信噪比(S/N)约为 10:1 和 3:1,所得溶液即为定量限溶液及检出限溶液。

1.2.6 线性关系考察

取恩格列净及杂质 A~K 对照品贮备液,用 50%

(V/V) 甲醇溶液逐步定量稀释成 0.3~3.0 μg/mL 不同浓度的系列对照品混合溶液。精密量取 10 μL,分别进样分析,记录色谱图。以峰面积为纵坐标(Y),浓度为横坐标(X),进行线性回归,得回归方程,并根据标准曲线的斜率计算各已知杂质相对恩格列净的校正因子。

1.2.7 稳定性试验

取供试品溶液及对照溶液,在室温下放置 0、2、4、6、8 h 后,分别精密量取 10 μL 测定,考察对照溶液主峰面积及供试品溶液各杂质峰面积的变化。

1.2.8 重复性试验

取恩格列净(批号:S13110801)适量,平行制备 6 份供试品溶液和对照溶液,分别进样测定,如色谱图中存在上述已知杂质峰,按加校正因子的自身对照法计算,未知杂质峰按不加校正因子的自身对照法计算。

1.2.9 加样回收率试验

分别精密量取杂质对照品贮备液各 1 mL,置 100 mL 量瓶中,用 50%(V/V) 甲醇溶液稀释至刻度,摇匀,作为已知杂质对照品混合溶液。取恩格列净(批号:S13110801)10 mg,精密称定,置 10 mL 量瓶,平行 9 份,3 份为 1 组,每组中分别加已知杂质对照品混合溶液 0.8、1.0 和 1.2 mL,加 50%(V/V)甲醇溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,作为加样后的供试品溶液;再精密量上述取供试品溶液各 1 mL,分别置 100 mL 量瓶中,用 50%(V/V)甲醇溶液稀释至刻度,摇匀,作为对照溶液。分别精密量取 10 μL,注入液相色谱仪,记录色谱图。按加校正因子的自身对照法计算各已知杂质的回收率。

1.2.10 样品测定

取本品(批号:140301、140302、140303)适量配制成供试品溶液及对照溶液,分别精密量取 10 μL,进样测定。按加校正因子的自身对照法计算各已知杂质的含量,按不加校正因子的自身对照法计算未知杂质的含量。

2 结果

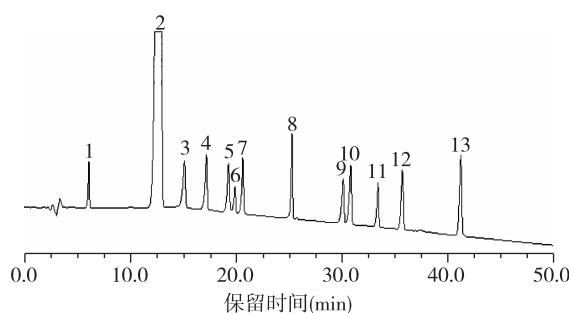
2.1 系统适用性

各杂质峰分离度均>1.5,理论塔板数均大于 2 000,符合系统适用性要求,结果见图 2。

2.2 专属性

本品在强酸、强碱、强光、强氧化剂及高温条件下,均有较好的化学稳定性,产生的降解产物均较少。各降解产物峰和恩格列净主峰能完全分离。采用二极管阵列检测器,对各降解条件下的主峰进行峰纯度测定,纯度因子均>0.999,表明本色谱条件下

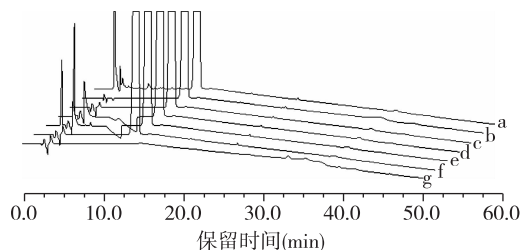
主峰为单一峰,各已知杂质与主成份可有效分离。色谱图见图 3。



1: 杂质 D; 2: 恩格列净; 3: 杂质 E; 4: 杂质 G; 5: 杂质 F; 6: 杂质 L; 7: 杂质 H; 8: 杂质 I; 9: 杂质 K; 10: 杂质 B; 11: 杂质 J; 12: 杂质 C; 13: 杂质 A。

图 2 恩格列净有关物质检查系统适用性试验色谱图

Figure 2 Chromatograph of system suitable test of related substances in empagliflozin



a: 氧化降解样品; b: 高温降解样品; c: 光照降解样品; d: 碱降解样品; e: 酸降解样品; f: 未破坏样品; g: 空白溶剂(blank solvent)。

图 3 破坏性试验色谱图

Figure 3 Chromatogram of forced degradation test

2.3 其他验证结果

检出限与定量限: 本法用于检测上述已知杂质的灵敏度良好(表 1), 各杂质的检出限均 < 9 ng/mL, 定量限均 < 28 ng/mL。线性关系见表 1。稳定性结果表明, 在 8 h 内, 各色谱峰面积均未发生显著变化,

表 1 恩格列净及已知杂质的线性关系及灵敏度测定结果

Table 1 Linearity and sensitivity of empagliflozin and its impurity

名称	回归方程	相关系数 r	范围(μg/mL)	定量限(μg/mL)	检出限(μg/mL)	校正因子
恩格列净	$Y=42\ 022X-77$	0.999 5	0.30~3.02	0.010 0	0.003 0	-
杂质 A	$Y=56\ 258X-1\ 240$	0.999 8	0.32~3.22	0.021 5	0.006 4	0.75
杂质 B	$Y=68\ 179X-325$	0.999 6	0.29~2.88	0.011 5	0.003 5	0.62
杂质 C	$Y=54\ 519X+1\ 403$	0.999 6	0.33~3.31	0.011 0	0.003 3	0.77
杂质 D	$Y=0.309\ 6X+0.008\ 5$	0.999 8	0.50~2.50	0.010 0	0.003 0	1.05
杂质 E	$Y=48\ 923X-577$	0.999 6	0.37~3.70	0.021 3	0.006 4	0.86
杂质 F	$Y=52\ 915X-446$	0.999 5	0.29~2.93	0.019 5	0.005 9	0.79
杂质 G	$Y=48\ 897X+113$	0.999 5	0.33~3.33	0.024 5	0.007 4	0.86
杂质 H	$Y=47\ 118X+505$	0.999 5	0.30~3.00	0.020 0	0.006 0	0.89
杂质 I	$Y=43\ 327X+172$	0.999 5	0.32~3.16	0.019 6	0.005 9	0.97
杂质 J	$Y=39\ 185X-68$	0.999 8	0.30~2.97	0.019 8	0.005 9	1.07
杂质 K	$Y=25\ 969X-264$	0.999 8	0.33~3.29	0.027 4	0.008 2	1.62

供试品溶液和对照溶液的稳定性良好。重复性试验结果表明各杂质含量的相对标准差(RSD)均 < 5.0%, 表明本法精密度良好。加样回收率结果表明各已知杂质的回收率范围均在 88.6%~106.1%, RSD 均 < 10%, 准确度良好。

2.4 样品测定结果

样品测定见表 2, 3 批样品中有关物质的已知杂质限度均 < 质控限(0.15%), 未知杂质均小于鉴定限(0.1%)。

3 讨论

经过检索国内外文献, 尚未发现有关本品的物质测定方法的报道, 我们对比了甲醇-水、乙腈-水体系, 并添加三氟乙酸改善峰形。采用梯度洗脱法提高杂质间的分离效果。在确定色谱条件下对各杂

表 2 恩格列净原料药中有关物质的测定结果

Table 2 Determination of related substances in empagliflozin (%)

批号	140301	140302	140303
杂质 A	低于检出限	低于检出限	低于检出限
杂质 B	低于检出限	低于检出限	低于检出限
杂质 C	低于检出限	低于检出限	低于检出限
杂质 D	低于检出限	低于检出限	低于检出限
杂质 E	低于检出限	低于检出限	低于检出限
杂质 F	低于检出限	低于检出限	低于检出限
杂质 G	低于检出限	低于检出限	低于检出限
杂质 H	0.004	0.002	0.003
杂质 I	0.023	0.016	0.020
杂质 J	低于检出限	低于检出限	低于检出限
杂质 K	低于检出限	低于检出限	低于检出限
杂质 L	低于检出限	低于检出限	低于检出限
其他单杂	0.025	0.024	0.025
总杂质	0.076	0.058	0.067

质和恩格列净峰进行二极管阵列检测器扫描,结果表明杂质及主成份在 223~227 nm 范围内均有最大吸收峰,因此选择 225 nm 作为测定波长。

由于杂质 L 对照品较难获得高纯度的对照品,本试验所用对照品纯度为 83.0%,仅适用于作为杂质定位使用,无法用于定量计算,故未对杂质 L 进行线性范围、校正因子及回收率研究。杂质 L 化学结构与恩格列净结构相似,推测应具有相近的吸收系数,可采用不加校正因子的自身对照法计算含量。样品检测结果表明,各批恩格列净原料药中杂质 L 均未检出,不影响结果的判断。

以上研究表明,所建立的方法适用于本品的有关物质测定。经过对 3 批样品的有关物质杂质谱进行对比研究,发现产品中仅有杂质 H 和杂质 I 被检出,其他已知杂质均未检出,表明本品的生产工艺对其他已知杂质有较好的去除效果。参照 ICH 对原料药已知杂质控制的指导原则^[9],建议将杂质 H 和杂质 I 作为已知杂质订入质量标准,质控限度为 0.15%,其他已知杂质在本色谱条件下均可检出,可与未知杂质一并按自身对照法 0.1% 的限度进行控制。

[参考文献]

[1] 陈本川. 治疗 2 型糖尿病新药——恩格列净 (empagliflozin)[J]. 医药导报,2015,34(2):284-292
[2] Scheen AJ. Drug-drug interactions with sodium-glucose

cotransporters type 2 (SGLT2)inhibitors,new oral glucoselowering agents for the management of type 2 diabetes mellitus [J]. Clin Pharmacokinet,2014,53(4):295-304
[3] Scheen AJ. Pharmacokinetic and pharmacodynamic profile of empagliflozin, a sodium glucose co-transporter 2 inhibitor[J]. Clin Pharmacokinet,2014,53(3):213-225
[4] 邹健,张艺,李晓苗. 钠-葡萄糖协同转运蛋白 2 抑制剂治疗 2 型糖尿病研究进展[J]. 山东医药,2016,56(12):104-107
[5] Baker WL, Smyth LR, Riche DM, et al. Effects of sodium-glucose co-transporter 2 inhibitors on blood pressure: A systematic review and meta-analysis[J]. J Am Soc Hypertens,2014,8(4):262-275
[6] 郝文静,张涛,黄华,等. HPLC 法测定恩格列净片的有关物质[J]. 药物分析杂志,2016,36(5):902-910
[7] Joseph CC, Regeling H, Zwanenburg B, et al. Syntheses of (3R,4R,5R,6R)-tetrahydrozazepane (1,6-dideoxy-1,6-imino-D-mannitol) and (3S,4R,5R,6R)-tetrahydrozazepane (1,6-dideoxy-1,6-imino-D-glucitol) [J]. Tetrahedron,2002,58(34):6907-6911
[8] 宋金芝,王玉丽,徐为人. 新型钠-葡萄糖协同转运蛋白 2 抑制剂 empagliflozin [J]. 现代药物与临床,2013,28(5):791-795
[9] ICH Harmonized Tripartite Guideline: Impurities in new drug substances.Q3A[Z]. 2002

[收稿日期] 2016-06-01

(上接第 87 页)

[8] Qin B, Cao YZ, Yang H, et al. MicroRNA-221/222 regulate ox-LDL-induced endothelial apoptosis via Ets-1/p21 inhibition [J]. Mol Cell Biochem,2015,405(1/2):115-124
[9] Suo J, Zhao L, Wang J, et al. Influenza virus aggravates the ox-LDL-induced apoptosis of human endothelial cells via promoting p53 signaling[J]. J Med Virol,2015,87(7):1113-1123
[10] Zhang Q, Ma A, Wang C, et al. Nifedipine inhibits ox-LDL-induced lipid accumulation in human blood-derived macrophages[J]. Biochem Biophys Res Commun,2015,457(3):440-444
[11] Zhang Y, Ge C, Wang L, et al. Induction of DKK1 by ox-

LDL negatively regulates intracellular lipid accumulation in macrophages[J]. FEBS Lett,2015,589(1):52-58
[12] Xu L, Wang SJ, Li BY, et al. A protective role of ciglitazone in ox-LDL-induced rat microvascular endothelial cells via modulating PPAR gamma-dependent AMPK/eNOS pathway [J]. J Cell Mol Med,2015,19(1):92-102
[13] Narasimhulu CA, Selvarajan K, Brown M, et al. Cationic peptides neutralize ox-LDL, prevent its uptake by macrophages, and attenuate inflammatory response [J]. Atherosclerosis,2014,236(1):133-141

[收稿日期] 2016-03-15