

高效液相色谱法检测甲磺酸达比加群酯及有关物质

薛晓楠^{1,2}, 张正进², 邹强², 闫超^{1*}(¹上海交通大学药学院, 上海 200240; ²上海现代制药股份有限公司, 上海 200137)

摘要 为了研究甲磺酸达比加群酯的有关物质, 本研究合成了 7 个有关化合物, 建立了相关的 HPLC 检测方法(以 XBridge C₁₈ 为色谱柱, 甲醇-0.01 mol/L 磷酸二氢钾为流动相梯度洗脱, 检测波长为 310 nm), 并对样品的溶解溶剂和进样体积进行了筛选。结果显示, 所建立的 HPLC 分析方法能使达比加群酯和 7 个化合物达到完全分离, 且重复性好, 准确度高, 适用于甲磺酸达比加群酯有关物质的检测。

关键词 甲磺酸达比加群酯; 有关物质; HPLC; 含量测定

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2017)06-0711-04

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20170612

引用本文 薛晓楠, 张正进, 邹强, 等. 高效液相色谱法检测甲磺酸达比加群酯及有关物质[J]. 中国药科大学学报, 2017, 48(6): 711–714.
Cite this article as: XUE Xiaonan, ZHANG Zhengjin, ZOU Qiang, et al. Determination of dabigatran etexilate mesylate and related substances by HPLC[J]. J China Pharm Univ, 2017, 48(6): 711–714.

Determination of dabigatran etexilate mesylate and related substances by HPLC

XUE Xiaonan^{1,2}, ZHANG Zhengjin², ZOU Qiang², YAN Chao^{1*}¹School of Pharmacy, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 2002401;²Shanghai Shyndec Pharmaceutical Co., Ltd., Shanghai 200137, China

Abstract In order to research the related substances of dabigatran etexilate mesylate, seven related compounds were synthesized and the related detection methods were established (Using XBridge C₁₈ as the column, methanol-0.01 mol/L potassium dihydrogen phosphate as the mobile phase Gradient elution, detection wavelength of 310 nm). The solvents and the injection volume were also screened. Results showed that the established method could separate the dabigatran etexilate mesylate and seven compounds completely, and the reproducibility was good and the accuracy was high, which was suitable for the detection of the related substances of dabigatran etexilate mesylate.

Key words dabigatran etexilate mesylate; related substances; HPLC; determination of content

甲磺酸达比加群酯是新一代口服凝血酶抑制剂(DTIs), 用于预防非瓣膜性房颤患者的卒中和全身性栓塞。德国 Boehringer Ingelheim 公司开发的凝血酶抑制剂达比加群酯胶囊(dabigatran etexilate mesylate, 商品名 Pradaxa)于 2008 年 4 月首先在德国和英国上市, 2010 年 10 月 19 日又获得美国 FDA 批准, 用于预防人工关节置换术后并发深静脉血栓形成和肺动脉栓塞。达比加群酯是 50 年来继华法林之后首个上市的全新口服抗凝血

药物^[1]。

关于甲磺酸达比加群酯有关物质的检测, 仅有 UPLC 检测方法的报道^[2]。基于目前 UPLC 使用的局限性, 本研究采用 HPLC 对甲磺酸达比加群酯的有关物质进行了研究。

1 材料

1.1 试剂

甲醇(色谱纯, 美国 Merck 公司); 无水乙醇、

磷酸二氢钾、磷酸(色谱纯,美国 ACS 公司);甲磺酸达比加群酯杂质 A~G 对照品、甲磺酸达比加群酯对照品(自制,上海现代制药股份有限公司);水为娃哈哈纯净水。

1.2 仪器

Waters e2695 高效液相色谱仪、Waters 2489 紫外检测器、Waters 2998 紫外检测器(美国沃特世公司);XS205 型天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

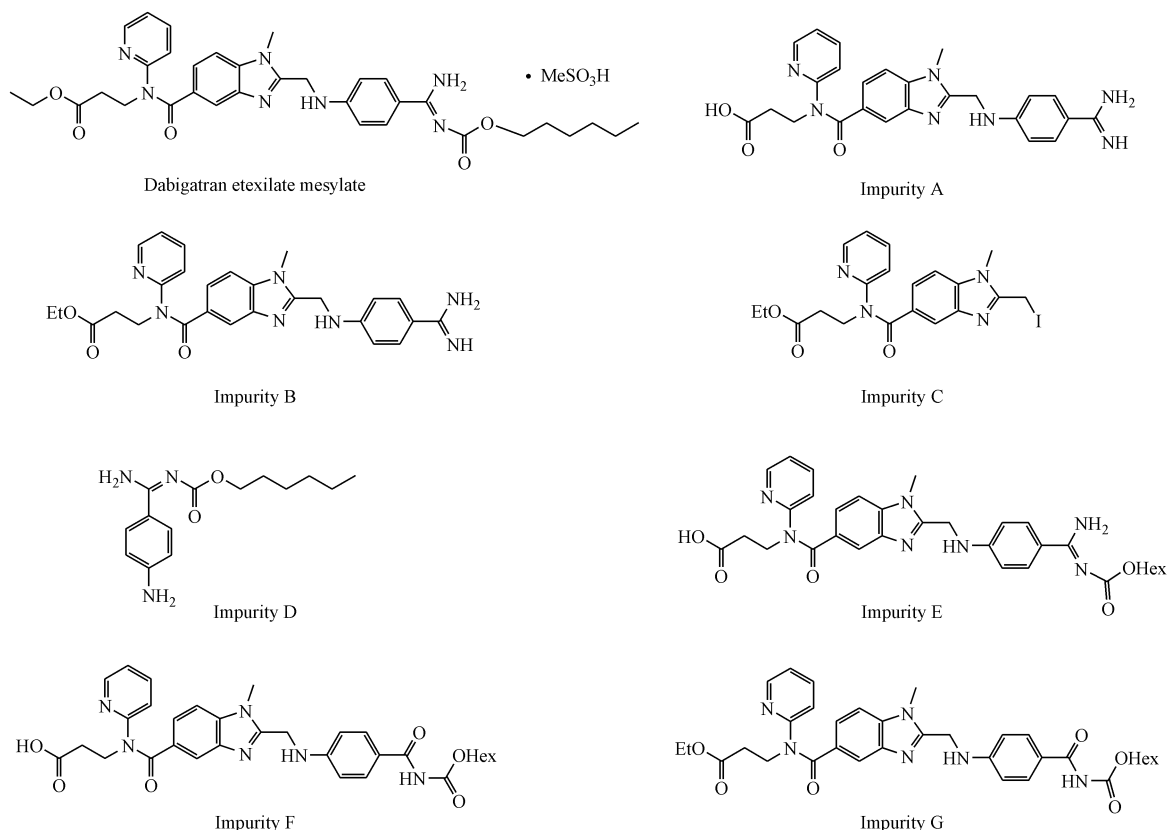


Figure 1 Chemical structures of dabigatran etexilate mesylate and its A-G impurities

2.2 色谱条件

色谱柱: XBridge C₁₈ (4.6 mm × 250 mm, 5 μm);流动相 A: 0.01 mol/L 磷酸二氢钾缓冲液(pH 3.5)[取磷酸二氢钾 1.36 g,加水至 1 000 mL,用磷酸调节 pH 至 3.5],流动相 B: 甲醇;线性梯度洗脱: 0 min→15 min→40 min,流动相 A: B 比例为 75: 25→40: 60→25: 75;流速为 1.0 mL/min;检测波长为 310 nm,柱温为 40 °C;进样量为 5 μL。

2.3 系统适用性

精密称取甲磺酸达比加群酯对照品及杂质 A~G 对照品适量,加纯甲醇溶解并稀释制成每毫升中含杂质 A 2 μg、杂质 B 2 μg、杂质 C 2 μg、杂质

2 方法

2.1 杂质分析

在研究甲磺酸达比加群酯过程中,根据文献[3]报道,结合自身工艺与降解途径,共制定出 7 种已知杂质 A~G,并进行了结构确证,见图 1。杂质 A、杂质 D 为反应中间体,属于工艺杂质;杂质 B、杂质 C、杂质 E、杂质 F、杂质 G 均为可能的降解杂质。

D 4 μg、杂质 E 2 μg、杂质 F 2 μg、杂质 G 6 μg、甲磺酸达比加群酯 2 mg 的溶液,5 μL 进液相,记录色谱图,出峰顺序依次为杂质 A、杂质 B、杂质 C、杂质 D、杂质 E、杂质 F、达比加群酯、杂质 G,杂质 F、杂质 G 与主峰之间分离度应不小于 2.0,各杂质之间的分离度应不小于 2.0;理论塔板数按达比加群酯计算应不小于 5 000。

2.4 样品配制

精密称取甲磺酸达比加群酯样品适量,加甲醇溶解并稀释制成每毫升中含甲磺酸达比加群酯 2 mg 的溶液。

3 结果与分析

3.1 专属性

精密称取甲磺酸达比加群酯对照品及杂质 A~G 对照品适量,加纯甲醇溶解并稀释制成每 1 毫升中含杂质 A 0.02 mg、杂质 B 0.02 mg、杂质 C 0.02 mg、杂质 D 0.04 mg、杂质 E 0.02 mg、杂质 F 0.02 mg、杂质 G 0.06 mg、甲磺酸达比加群酯 2 mg 的溶液,5 μ L 进液相,在“2.2”色谱条件下进行测试,并平行进样 5 μ L 的空白溶剂甲醇。结果表明空白溶剂甲醇对各杂质测定均无影响;7 种杂质与主峰的分离度符合规定,且各杂质之间的分离度也符合规定(图 2)。

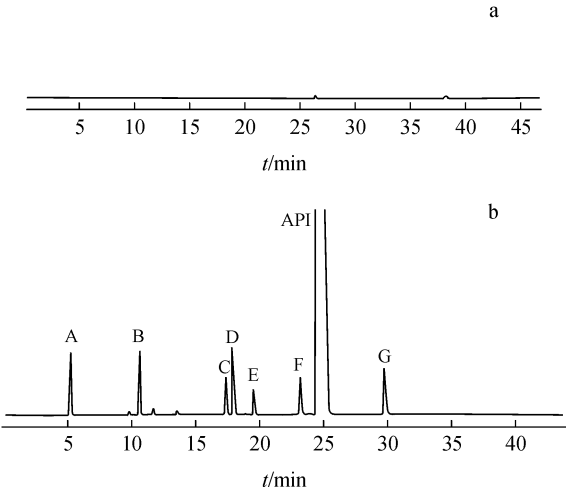


Figure 2 HPLC chromatograms of diluent (a), chromatogram of system suitability test of mixture of dabigatran etexilate mesylate and its impurities A-G (b)

3.2 线性范围

精密称取甲磺酸达比加群酯杂质 A 对照品 20 mg、杂质 B 对照品 20 mg、杂质 C 对照品 20 mg、杂质 D 对照品 40 mg、杂质 E 对照品 20 mg、杂质 F 对照品 20 mg、杂质 G 对照品 60 mg 置 10 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀作为杂质对照品母液;精密量取各杂质对照品母液 1 mL,置 100 mL 量瓶中,甲醇稀释定容,摇匀作为浓度

为 1 000% 的线性溶液(限度浓度为 100%),依次稀释成 200%、100%、75%、50%、20% 浓度溶液,分别进样 5 μ L,以质量浓度 c (μ g/mL) 对峰面积 A 进行线性回归,得标准曲线方程,结果见表 1。

Table 1 Linear results of dabigatran etexilate mesylate

Impurity	Standard curve range/ (μ g/mL)	Typical standard curve	r
Imp. A	0.000 4-0.02	$A = 12\,437c - 784.6$	1.000 0
Imp. B	0.000 4-0.02	$A = 11\,699c - 2038.9$	1.000 0
Imp. C	0.000 4-0.02	$A = 4\,514c + 23.0$	1.000 0
Imp. D	0.000 8-0.04	$A = 12\,766c - 880.5$	0.999 9
Imp. E	0.000 4-0.02	$A = 5\,234c - 1455.1$	0.999 9
Imp. F	0.000 4-0.02	$A = 9\,832c + 298.5$	1.000 0
Imp. G	0.001 2-0.06	$A = 11\,318c - 703.8$	1.000 0

3.3 精密度(重复性)

精密称取甲磺酸达比加群酯样品 20 mg 置 10 mL 量瓶中,加入“3.2”项下线性范围下浓度为 1 000% 的溶液 1 mL,甲醇溶解并定容至刻度,平行配制 6 份,进样 5 μ L,甲磺酸达比加群酯杂质 A~G 峰面积 RSD (%) 分别为 1.73、0.86、2.34、1.58、0.94、2.32 和 1.13。

3.4 准确度

精密称取甲磺酸达比加群酯样品 20 mg 置 10 mL 量瓶中,分别加入“3.2”项线性范围下浓度为 1 000% 的线性溶液 0.5、1.0、1.5 mL,加甲醇溶解定容至刻度,配制成 50%、100%、150% 浓度的溶液(限度浓度为 100%),每个浓度平行配制 3 份,作为回收率溶液;另取 1 000% 的线性溶液 1.0 mL 置 10 mL 量瓶中,加甲醇稀释定容,作为杂质混合对照溶液。按外标法进行回收率测定,甲磺酸达比加群酯杂质 A~G 的回收率 (%) 分别为 97.58 (RSD = 3.12%)、97.78 (RSD = 3.31%)、101.41 (RSD = 2.75%)、96.75 (RSD = 3.37%)、101.29 (RSD = 3.21%)、97.57 (RSD = 3.32%)、97.46 (RSD = 3.56%)。

3.5 样品检测

按照“2.2”项下色谱条件,取 3 批样品测定有关物质,结果见表 2。

Table 2 Determination of relative substances of dabigatran etexilate mesylate by HPLC

Batch No.	Imp. A/%	Imp. B/%	Imp. C/%	Imp. D/%	Imp. E/%	Imp. F/%	Imp. G/%	Max. imp/%	Total. imp/%
1506001	ND	0.03	ND	0.12	ND	ND	0.14	0.04	0.46
1507001	ND	0.04	ND	0.06	ND	ND	0.15	0.05	0.38
1507002	ND	0.03	ND	0.04	ND	ND	0.12	0.05	0.35

ND: Not detected

4 讨论

4.1 溶解溶剂和进样体积的选择

在甲磺酸达比加群酯有关物质检测方法建立的初期,由于甲磺酸达比加群酯在水和甲醇中均不稳定,短时间内会生成降解杂质,故初步选择无水乙醇作为溶解溶剂配制杂质溶液。在“2.2”项下色谱条件,色谱图中保留时间最靠前的 2 个杂质峰:杂质 A、杂质 B 色谱峰均发生分裂,直接影响杂质之间的分离度及含量测定,色谱图见图 3。

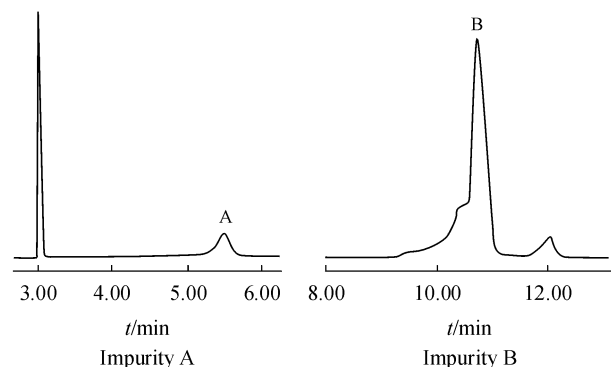


Figure 3 Chromatogram of impurity A, B sample solution dissolved in ethyl alcohol absolute

经文献查阅,出现裂峰的情况有可能是溶剂选择不当引起的。文献指出,在反相色谱系统里,溶剂强度由小到大顺序依次为:水、甲醇、乙腈、乙醇、四氢呋喃、丙醇、二氯甲烷^[4]。如果样品溶剂的洗脱强度比流动相强时,可能会造成色谱峰的展宽或分叉。之后将溶解溶剂换为甲醇,杂质 B 峰型正常,但杂质 A 峰仍然峰型不佳,色谱图见图 4。

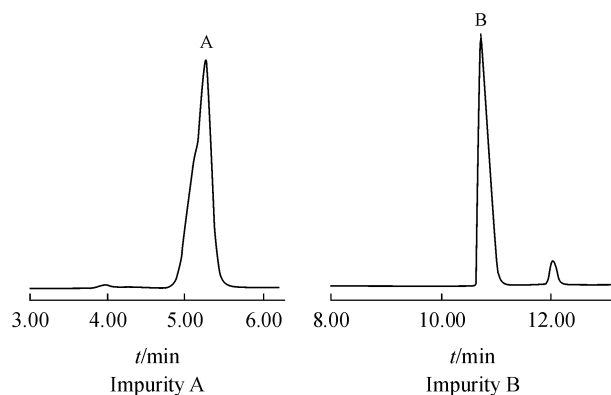


Figure 4 Chromatogram of impurity A, B sample solution dissolved in methanol

文献中亦提到,进样体积较大时强溶剂的影响更为明显^[5]。后将纯甲醇溶解的杂质 A 溶液进样

体积降为 5 μL ,其他色谱条件均不改变,与进样体积为 20 μL 时的色谱图进行对比,结果表明进样体积为 20 μL 时,杂质 A 峰型不佳,而进样体积为 5 μL 时,峰型正常,色谱图见图 5。

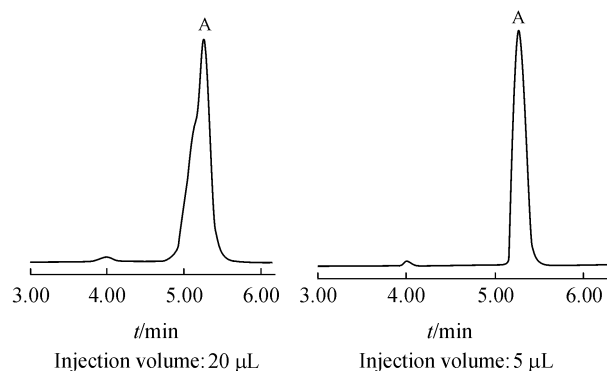


Figure 5 Chromatogram of impurity A with injection volume

试验证明,杂质 A、杂质 B 在最初的色谱条件下出现裂峰和峰型不佳的情况确实是因为溶剂选择不当引起的。经过重新筛选合适的溶剂和缩小进样体积,可使产生溶剂效应的峰的峰型和柱效均达到最佳。

4.2 结论

本研究采用 HPLC 法建立了甲磺酸达比加群酯有关物质的检测方法,通过方法学验证,所有的杂质与达比加群酯均达到基线分离,方法重复性好、准确度高、能正确检测甲磺酸达比加群酯的有关物质。相比于文献报道的 UPLC 方法^[2],本文的 HPLC 检测方法更具有通用性,且在研究过程中发现,UPLC 方法采用乙腈系统进行梯度洗脱容易在主峰处产生残留,影响检测结果。本实验采用甲醇系统,可解决主药在进样系统中容易残留的问题。

参考文献

- [1] Zhang MD, Hu C. Dabigatran etexilate mesylate[J]. *Chin J Med Chem* (中国药物化学杂志), 2011(2): 165.
- [2] Chang XH, Wang HB, Xie H, et al. Determination of related substances in dabigatran etexilate methanesulfonate bulk drug by UPLC[J]. *Chin J Pharm* (中国医药工业杂志), 2017, 48(3): 422–426.
- [3] Gu HL, Wu TZ, Jin LY, et al. Synthesis of related substances of dabigatran etexilate mesylate[J]. *Chin J Pharm* (中国医药工业杂志), 2015, 46(4): 336–342.
- [4] Schneider LR, Gladik JL. *Establishment of Practical High Performance Liquid Chromatography* (实用高效液相色谱法的建立)[M]. 2nd ed. Beijing: Science Press, 1998: 253–253.
- [5] Wang L, Shen LH, Chen GQ. Effect of sample solvent on high performance liquid chromatography[J]. *Chin Pharm Aff* (中国药事), 2013, 27(2): 163–166.