

## 气相色谱法测定氢溴酸替格列汀中溴乙烷残留量

邬方宁<sup>1</sup>, 孙颖倩<sup>2</sup>

1. 天津市药品审评中心, 天津 300191
2. 天津市汉康医药生物技术有限公司, 天津 300409

**摘要:** 目的 建立氢溴酸替格列汀中遗传毒性杂质溴乙烷残留量的气相色谱 (GC) 检测方法。方法 采用迪马 DM-624 色谱柱 (30 m×0.53 mm×3.0 μm); 电子捕获检测器 (ECD); 程序升温: 初始柱温 40 °C, 保持 3 min, 以 20 °C/min 升温至 200 °C, 保持 5 min; 进样口温度: 210 °C; 检测器温度: 210 °C; 载气: 氮气; 分流比: 3:1; 进样量 1 μL。结果 溴乙烷在 0.75~6.75 μg/mL 与峰面积呈良好的线性关系 ( $r=0.9997$ ), 最低检测限为 0.26 μg/mL。平均回收率为 99.4%, RSD 值为 0.3% ( $n=9$ )。3 批氢溴酸替格列汀样品中均未检测出溴乙烷。结论 该方法简便、准确, 重复性好, 适用于氢溴酸替格列汀中溴乙烷残留量的控制。

**关键词:** 氢溴酸替格列汀; 溴乙烷; 残留量; 气相色谱

中图分类号: R927.1 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2014)10-1109-03

DOI:10.7501/j.issn.1674-5515.2014.10.008

## Determination of bromoethane residues in teneligliptin hydrobromide by gas chromatography

WU Fang-ning<sup>1</sup>, SUN Ying-qian<sup>2</sup>

1. Tianjin Center for Drug Evaluation, Tianjin 300191, China
2. Tianjin Hankong Medicine & Biotechnology Company, Tianjin 300409, China

**Abstract: Objective** To establish a gas chromatography (GC) method for the determination of bromoethane residues in teneligliptin hydrobromide. **Methods** The determination was carried out on Dikma DM-624 chromatographic column (30 m × 0.53 mm, 3.0 μm) with ECD detector. The column temperature was raised from 40 °C (kept for 3 min) to 200 °C (then kept for 5 min) by program at the rate of 20 °C/min. The injector temperature was 210 °C, and the detector temperature was 210 °C. Nitrogen was used as carrier gas. The injection volume was 1 μL with 3:1 as split ratio. **Results** The linearity range of bromoethane was 0.75 — 6.75 μg/mL ( $r = 0.9997$ ). The minimum detectable limit was 0.26 μg/mL. The average recovery was 99.4% with RSD value of 0.3% ( $n = 9$ ). Bromoethanes in three batches of teneligliptin hydrobromide samples were not detected. **Conclusion** The method is sample, accurate, reproducible, and applicable to the residues control of bromoethane in teneligliptin hydrobromide.

**Key words:** teneligliptin hydrobromide; bromoethane; residues; gas chromatography

氢溴酸替格列汀是一种新型的二肽基肽酶 4 (DPP-4) 抑制剂, 通过抑制 DPP-4 活性而减少胰高血糖素样肽-1 (GLP-1) 在体内的失活, 增加 GLP-1 在体内的水平, 而 GLP-1 能以葡萄糖浓度相关的方式增强胰岛素分泌, 并抑制胰高血糖素分泌, 与同类药物相比, 能够更加平稳、有效的控制血糖<sup>[1-2]</sup>。氢溴酸替格列汀由田边三菱制药株式会社研发, 2012 年 6 月在日本获批上市销售, 目前在我国仍处

于研发阶段, 但由于本品的治疗机制不仅具有胰岛素分泌作用, 而且还具有减少低血糖发生率以及不增加体质量的优点而备受关注。在本品的合成中发现替格列汀在与氢溴酸成盐过程中 (图 1), 其反应通常会以低级醇为溶剂<sup>[3]</sup>, 在反应过程中, 氢溴酸可能会与乙醇反应产生副产物溴乙烷, 而溴乙烷属于卤代烷烃, 卤代烷烃通常是带有潜在危险的烷基化剂, 且溴化物较氯化物烷基化能力更强。据报道

收稿日期: 2014-08-18

作者简介: 邬方宁 (1967—), 女, 副主任药师, 主要从事新药注册与审评。Tel: (022)60255269 E-mail: 2315979144@qq.com

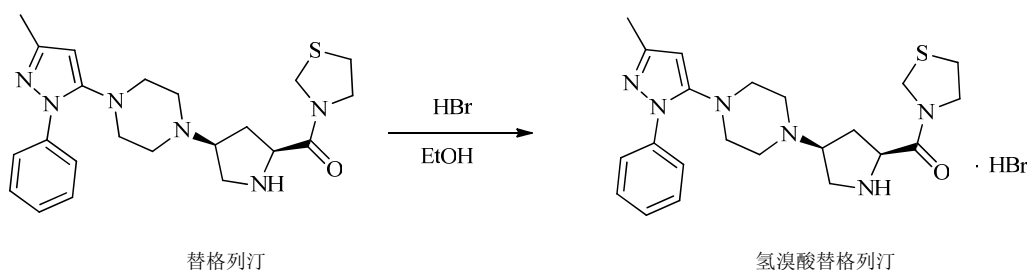


图 1 氢溴酸替格列汀的合成路线

Fig. 1 Synthetic route of teneligliptin hydrobromide

溴乙烷已被美国加州列入致癌物质和生殖毒性物质,因此需高度关注。根据欧洲医药评价署(EMEA)关于《遗传毒性杂质限度指导原则》,此类物质通常需控制在  $1 \times 10^{-6}$  级,因此对该物质的检测难度很大。本实验建立气相色谱法测定氢溴酸替格列汀中溴乙烷的残留量,以更好地控制产品的质量。

## 1 仪器与试剂

岛津 GC 2010 高效气相色谱仪, GC-Solution 工作站, AE100 万分之一天平。

溴乙烷对照品(百灵威科技有限公司,质量分数 99%,产品编号 502347),二甲亚砜(色谱纯,天津市风船化学试剂科技有限公司),氢溴酸替格列汀原料(天津市汉康医药生物技术有限公司,批号 140601、140602、140603,质量分数均  $\geq 99\%$ )。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

迪马 DM-624 色谱柱 (30 m  $\times$  0.53 mm  $\times$  3.0  $\mu$ m); 电子捕获检测器 (ECD); 程序升温: 初始柱温 40  $^{\circ}$ C, 保持 3 min, 以 20  $^{\circ}$ C/min 升温至 200  $^{\circ}$ C, 保持 5 min; 进样口温度: 210  $^{\circ}$ C; 检测器温度: 210  $^{\circ}$ C; 载气: 氮气; 分流比: 3 : 1; 进样量 1  $\mu$ L。

### 2.2 溶液的制备

**2.2.1 样品溶液的配制** 精密称取氢溴酸替格列汀原料样品 1 g, 置 10 mL 量瓶中, 加二甲基亚砜适量使溶解, 并稀释至刻度, 即得。

**2.2.2 对照品溶液的配制** 取溴乙烷对照品 37.5 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加二甲基亚砜溶解并稀释至刻度, 摇匀。精密量取 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加二甲基亚砜稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品储备液。再精密量取 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加二甲基亚砜稀释至刻度, 摇匀, 即得。

**2.2.3 空白溶剂的配制** 量取空白溶剂二甲基亚砜溶液 1  $\mu$ L, 即得。

### 2.3 标准曲线的绘制

精密量取溴乙烷对照品储备液稀释制成 0.75、2.25、3.75、5.25、6.75  $\mu$ g/mL 溶液, 进样测定, 记录色谱图。以峰面积为横坐标, 质量浓度为纵坐标, 进行线性回归, 其回归方程为  $Y=473.3 X+285.9$  ( $r=0.9997$ )。结果表明溴乙烷在 0.75~6.75  $\mu$ g/mL 与峰面积呈良好的线性关系。

### 2.4 最低检测限的测定

溴乙烷对照品溶液逐步稀释进样, 记录峰高为 3 倍噪音时, 溴乙烷的最低检测限为 0.26  $\mu$ g/mL。

### 2.5 精密度试验

精密量取溴乙烷对照品溶液 1  $\mu$ L, 重复进样 6 次, 测定峰面积值, 结果其 RSD 值为 1.1%。

### 2.6 回收率试验

取氢溴酸替格列汀原料样品 1 g, 共 10 份, 1 份作为空白溶液, 精密称定, 分别置 10 mL 量瓶中, 精密量取溴乙烷对照品储备液 0.8、1.0、1.2 mL 各 3 份, 分别加入 10 mL 量瓶中, 加二甲基亚砜稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。分别量取供试品溶液、空白溶液和溴乙烷对照品溶液 1  $\mu$ L, 分别进样, 按外标法计算回收率。结果溴乙烷的平均回收率为 99.4%, RSD 值为 0.3% ( $n=9$ )。

### 2.7 样品测定

取氢溴酸替格列汀原料样品 1 g, 置 10 mL 量瓶中, 加二甲基亚砜适量使溶解并稀释至刻度, 作为供试品溶液; 另取溴乙烷对照品 37.5 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加二甲基亚砜溶解并稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加二甲基亚砜稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 1 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加二甲基亚砜稀释至刻度, 摇匀, 作为对照溶液。取供试品溶液和对照溶液分别进样, 按外标法以峰面积计算, 结果见图 2。结果批号 140601、140602、140603 样品中均未检出溴乙烷。

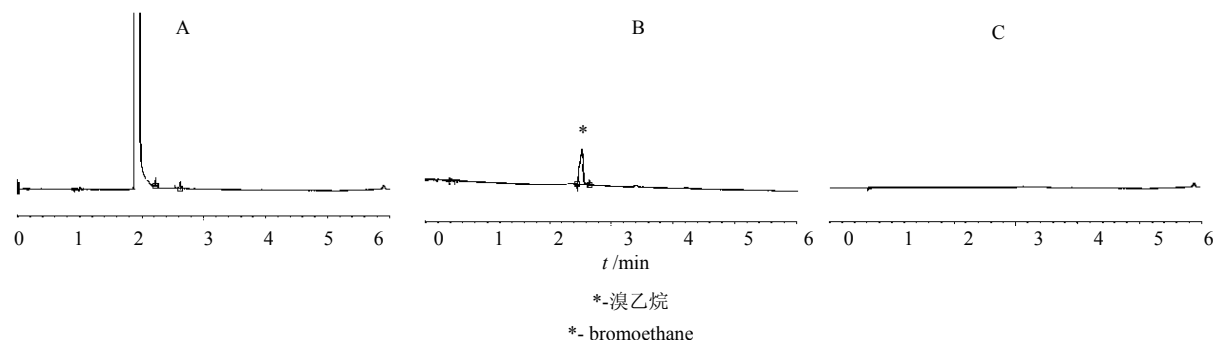


图2 氢溴酸替格列汀(A)、溴乙烷对照品(B)和空白溶剂二甲亚砜(C)的气相色谱图

Fig. 2 GC chromatograms teneligliptin hydrobromide samples (A), bromoethane reference substance (B), and blank solvent dimethyl sulfoxide (C)

### 3 讨论

遗传毒性杂质的毒性是近年来人用药物注册技术要求国际协调会议(ICH)、EMA以及FDA开始密切关注的问题。根据EMA颁布的《遗传毒性杂质限度指导原则》，以毒理学担忧阈值(TTC)来确定任何未研究化合物不引起显著致癌或其他毒性作用风险的通常暴露水平，该TTC值估计为 $1.5 \mu\text{g}/(\text{人}\cdot\text{d})^{[4]}$ ，按氢溴酸替格列汀片的日最大服用剂量计算，其中含有的溴乙烷的限度应为 $3.75 \times 10^{-5}$ 。

本实验对氢溴酸替格列汀中遗传毒性杂质溴乙烷的检测手段进行了研究，该检测方法通过试验证明可以实现氢溴酸替格列汀中溴乙烷的准确检测，检测的灵敏度能达到 $2.6 \times 10^{-6}$ ，且在测定的浓度范围内线性关系良好，因此本方法应用于氢溴酸替格列汀中溴乙烷的测定准确、可信，而且该方法也可

应用于其他药物的溴乙烷的检测中。

### 参考文献

- [1] 刘永贵, 田红, 解学星, 等. 治疗2型糖尿病的非胰岛素类药物的研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(2): 108-113.
- [2] 王小彦, 王玉丽, 徐为人. 近几年治疗糖尿病热点靶点的研究进展 [J]. 药物评价研究, 2012, 35(1): 42-45.
- [3] Yoshida T, Akahoshi F, Sakashita H, *et al.* Discovery and preclinical profile of teneligliptin (3-[(2S, 4S)-4-[4-(3-methyl-1-phenyl-1H-pyrazol-5-yl)piperazin-1-yl] pyrrolidin-2-ylcarbonyl] thiazolidine): a highly potent, selective, long-lasting and orally active dipeptidyl peptidase IV inhibitor for the treatment of type 2 diabetes [J]. *Bioorg Med Chem*, 2012, 20: 5705-5719.
- [4] European Medicines Agency. Guideline on the limits of genotoxic impurities [S]. 2006.