

中图分类号: R917; R977.1*5 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2025)03-0076-03
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2025.03.017



离子色谱法测定维格列汀片中基因毒性杂质氯乙酸含量*

母芹, 罗誓言, 姚诚, 杨俊芸, 罗东玲[△]

(四川省内江市食品药品检验检测中心·四川省药品监督管理局化学药品质量控制及评价重点实验室, 四川 内江 641100)

摘要:目的 建立测定维格列汀片中氯乙酸含量的离子色谱法。方法 分析柱为 Dionex IonPac AS11-HC 阴离子分离柱(250 mm × 4.6 mm), 保护柱为 Dionex IonPac AG11-HC 阴离子保护柱(50 mm × 4.0 mm), 淋洗液为 10 mmol/L 氢氧化钾溶液, 流速为 1.0 mL/min, 辅助气为 99.99% 氮气, 检测器为抑制电导检测器, 检测池温度为 35 °C, 进样量为 25 μL。结果 氯乙酸的质量浓度在 0.01 ~ 2.00 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($r = 0.9995, n = 7$); 检测限为 11.77 ng/g, 定量限为 62.77 ng/g; 精密性、稳定性试验结果的 RSD 均小于 3.0%; 平均加样回收率为 101.64%, RSD 为 4.60% ($n = 12$)。10 个厂家的 10 批样品中, 有 5 批检出氯乙酸杂质, 其含量为 0.0002% ~ 0.0007%, 均低于限度规定的 0.0015%。结论 该方法操作简便、灵敏度高、专属性强、高效快速, 可用于维格列汀片中氯乙酸的含量测定。

关键词: 离子色谱法; 维格列汀片; 氯乙酸; 基因毒性杂质; 含量测定

Content Determination of Genotoxic Impurities Chloroacetic Acid in Vildagliptin Tablets by Ion Chromatography

MU Qin, LUO Shiyan, YAO Cheng, YANG Junyun, LUO Dongling

(Neijiang Food and Drug Inspection and Testing Center · Sichuan Provincial Drug Administration Key Point of Chemical Quality Control and Evaluation, Neijiang, Sichuan, China 641100)

Abstract: Objective To establish an ion chromatography (IC) method for the content determination of chloroacetic acid in Vildagliptin Tablets. **Methods** The analysis column was Dionex IonPac AS11-HC anion separation column (250 mm × 4.6 mm), the protection column was Dionex IonPac AG11-HC anion protection column (50 mm × 4.0 mm), the eluent was 10 mmol/L suppressed conductivity detector, the flow rate was 1.0 mL/min, the auxiliary gas was 99.99% nitrogen, the detector was the inhibitory conductivity detector, the detection cell temperature was 35 °C, and the injection volume was 25 μL. **Results** The linear range of chloroacetic acid was 0.01 - 2.00 μg/mL ($r = 0.9995, n = 7$). The limit of detection was 11.77 ng/g and the limit of quantification was 62.77 ng/g. The RSDs of precision and stability test results were all lower than 3.0%. The average recovery rate of chloroacetic acid was 101.64% with an RSD of 4.60% ($n = 12$). Among ten batches of samples from ten manufacturers, impurities of chloroacetic acid were detected in five batches of samples, with the content ranging from 0.0002% to 0.0007%, and all were below the limit of 0.0015%. **Conclusion** The method is simple, highly sensitive, specific, efficient, and fast, which can be used for the content determination of chloroacetic acid in Vildagliptin Tablets.

Key words: ion chromatography; Vildagliptin Tablets; chloroacetic acid; genotoxic impurities; content determination

二肽基肽酶-IV (DPP-IV) 是一种广泛分布于人体中的膜相关肽酶, 生理条件下可发挥多种生物活性, 在氧化应激状态^[1]、凋亡状态^[2]和炎症状态^[3]中呈过表达, 与这些过程的发展高度相关。DPP-IV 抑制剂已被证明具有多种效应, 可通过刺激胰岛 B 细胞分泌胰岛素和胰高血糖素样肽-1 而发挥抗糖尿病作用, 主要用于治疗非胰岛素依赖型糖尿病^[4]。维格列汀为高选择性 DPP-IV 抑制剂^[5], 不仅可降低空腹及餐后血糖, 促进胰岛素效应, 增强 B 细胞敏感性, 也可控制糖尿病患者的体质量^[6]。因此, 维格列汀片在 2 型糖尿病治疗中的

临床应用较广。但维格列汀制备过程中极易残留氯乙酰氯杂质, 氯乙酰氯易水解生成氯乙酸^[7], 而氯乙酸为基因毒性杂质^[8], 故有必要对其进行质量风险控制。目前, 多采用比色法^[9]、拉曼光谱法^[10]、气相色谱 (GC) 法^[11] 及高效液相色谱 (HPLC) 法^[12] 测定药物中氯乙酸的含量, 但上述方法存在操作复杂、灵敏度低、重复性差等问题^[13-15]。离子色谱 (IC) 法的效率高、重复性好、定量更准确且操作简便, 故本研究中建立了测定维格列汀片中氯乙酸含量的 IC 法, 旨在更好地控制其中的基因毒性杂质的质量风险。现报道如下。

* 基金项目: 四川省药品监督管理局科技计划项目 [2023001]。

第一作者: 母芹, 女, 硕士研究生, 药师, 研究方向为药品标准与质量控制, (电子信箱) 1227237937@qq.com。

[△] 通信作者: 罗东玲, 女, 硕士研究生, 副主任中药师, 研究方向为药品标准与质量控制, (电子信箱) 25735503@qq.com。

1 仪器与试药

1.1 仪器

ICS-600型离子色谱仪(戴安<上海>分析仪器公司);XS205DU型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司,精度为0.01 mg);Molelement-1890v型超纯水机(上海摩勒科学仪器公司);Vortex-Genie2型涡旋振荡混合器(美国Scientific Industries公司)。

1.2 试药

氯乙酸对照品(中国食品药品检定研究院,批号为190184-202102,含量为99.6%);维格列汀片(编号为S1-S10,批号分别为BAVR9,220101,202211171,200201DA3,F012F,105221102,2201131,3622001,01220810,35211203,涉及10个厂家,规格均为每片50 mg);超纯水(电导率为18.2 MΩ·cm)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

分析柱:Dionex Ionpac AS11-HC阴离子分离柱(250 mm×4.6 mm);保护柱:Dionex Ionpac AG11-HC阴离子保护柱(50 mm×4.0 mm);辅助气:99.99%氮气;淋洗液:10 mmol/L氢氧化钾溶液;流速:1.0 mL/min;检测器:抑制性电导检测器;检测池温度:35℃;进样量:25 μL。

2.2 溶液制备

空白溶剂:以超纯水为空白溶剂。

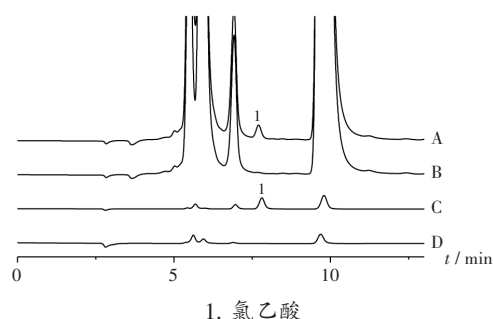
供试品溶液:取样品适量(约含维格列汀500 mg),精密称定,置25 mL容量瓶中,加适量超纯水使溶解,涡旋振荡15 s,再用超纯水定容,摇匀,即得。

对照品溶液:取氯乙酸对照品适量,精密称定,置容量瓶中,加超纯水稀释成氯乙酸质量浓度分别为0.5,3,10,30 μg/mL的对照品贮备液。取质量浓度为3 μg/mL的对照品贮备液,加超纯水稀释成每1 mL含0.3 μg氯乙酸的溶液,作为对照品溶液。

加标溶液:取样品适量(约含维格列汀200 mg),精密称定,置10 mL容量瓶中,加质量浓度为3 μg/mL的氯乙酸对照品贮备液1 mL,加超纯水9 mL,涡旋振荡15 s,制成每1 mL约含维格列汀20 mg、氯乙酸0.3 μg的溶液,作为加标溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验:分别取2.2项下空白溶剂、对照品溶液、供试品溶液、加标溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果空白溶剂及供试品溶液中其他杂质峰均不干扰目标峰的检测,目标峰分离完全,且分离度大于1.5,表明方法专属性良好。详见图1。



A. 加标溶液 B. 供试品溶液 C. 对照品溶液 D. 空白溶剂

图1 离子色谱图

1. Chloroacetic acid

A. Spiked solution B. Test solution C. Reference solution D. Blank solvent

Fig. 1 IC chromatograms

线性关系考察与检测限和定量限确定:取氯乙酸对照品适量,用超纯水稀释成质量浓度分别为0.01,0.05,0.10,0.30,0.50,1.00,2.00 μg/mL的系列对照品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,以对照品溶液质量浓度(X , μg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 0.1457X - 0.0023$ ($r = 0.9995, n = 7$)。结果表明,氯乙酸的质量浓度在0.01~2.00 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好。取质量浓度为0.01 μg/mL的氯乙酸对照品溶液,用超纯水稀释,按2.1项下色谱条件进样测定,分别以信噪比(S/N)为3:1和10:1时的响应值为检测限和定量限。结果氯乙酸的检测限为11.77 ng/g,定量限为62.77 ng/g。

精密度试验:取线性关系考察项下质量浓度为0.30 μg/mL的氯乙酸对照品溶液,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果峰面积的RSD为2.16% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取线性关系考察项下质量浓度为0.30 μg/mL的氯乙酸对照品溶液及2.2项下供试品溶液各适量,分别于室温条件下放置0,4,8,24,48 h时按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算含量。结果对照品溶液及供试品溶液中氯乙酸含量的RSD分别为1.41%,0.62% ($n = 5$),表明对照品溶液及供试品溶液室温下放置48 h内稳定性良好。

加样回收试验:取样品(编号为S4)适量(约含维格列汀200 mg),精密称定,置10 mL容量瓶中,分别加入质量浓度为0.5,3,10,30 μg/mL的氯乙酸对照品贮备液1 mL,加超纯水9 mL,涡旋振荡15 s,制成每1 mL含维格列汀20 mg及氯乙酸0.05,0.30,1.00,3.00 μg的溶液,按2.1项下色谱条件进样测定3次,记录峰面积,并计算回收率。结果平均回收率为101.64%,RSD为4.60% ($n = 12$),表明方法准确度良好。

耐用性试验:取2.2项下加标溶液和对照品溶液各

适量,分别调整检测池温度为34,36℃,流动相流速为0.9,1.1 mL/min,按2.1项下色谱条件进样测定。结果在较小范围内改变测定条件,空白溶剂对杂质峰的检测无干扰,加标溶液中氯乙酸含量仍为0.0015%,与原条件检测结果一致,表明方法耐用性良好。

2.4 样品含量测定

取样品(编号为S1-S10)各3份,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,按外标法计算含量。结果10批样品中,有5批检出氯乙酸杂质,其含量为0.0002%~0.0007%,均低于限度规定的0.0015%。

3 讨论

3.1 检测方法选择

根据维格列汀药品说明书,其每日最大使用剂量为100 mg。参考《人用药品注册技术要求国际协调会(ICH)M7遗传毒性杂质评估和控制指导原则》、2020年版《中国药典(四部)》通则9306遗传毒性杂质控制指导原则,以限度为1.5 μg/d计算,基因毒性杂质氯乙酸的限度为0.0015%,即15 μg/g。若采用普通直接进样法检测氯乙酸,限度浓度的氯乙酸几乎无响应。而先衍生化再检测,因衍生化步骤复杂,操作难度大,不便于大范围推广使用。故本研究中采用IC法检测,其检测灵敏度高,氯乙酸检测限为11.77 ng/g,定量限为62.77 ng/g,均满足维格列汀片中氯乙酸的检测需要。

3.2 淋洗液浓度选择

曾考察不同浓度(5,10,20 mmol/L)淋洗液对氯乙酸与溶剂及制剂中其他杂质的分离能力,同时兼顾氯乙酸与维格列汀的出峰时间。最终淋洗液选择10 mmol/L氢氧化钾溶液,在此条件下,IC图中氯乙酸峰的分离度大于1.5,氯乙酸及维格列汀的出峰时间均在15 min内。

3.3 分析柱选择

曾考察不同分析柱(Dionex IonPac AS11-HC阴离子分离柱、Dionex IonPac AS19柱)对氯乙酸峰形及灵敏度的影响。结果显示,使用前者时较易分析,色谱峰峰形更好,且灵敏度及重复性更优。故分析柱最终选择Dionex IonPac AS11-HC阴离子分离柱。

3.4 方法评价

本研究中建立的方法操作简便、灵敏度高、专属性强、高效快速,可用于维格列汀片中基因毒性杂质氯乙酸的含量测定,为该制剂的风险评定提供参考。

参考文献

[1] RIBEIRO - SILVA JC, MARQUES VB, DOS SANTOS L. Effects of dipeptidyl peptidase 4 inhibition on the endothelial control of the vascular tone [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2023,325:C972 - C980.

[2] MAHMOUD AMA, MANTAWY EM, WAHDAN SA, et al. Vildagliptin restores cognitive function and mitigates hippocampal neuronal apoptosis in cisplatin - induced chemo - brain: Imperative roles of AMPK / Akt / CREB / BDNF signaling cascades [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 159: 114238.

[3] MOSTAFA RE, MORSI AH, ASAAD GF. Anti - inflammatory effects of saxagliptin and vildagliptin against doxorubicin - induced nephrotoxicity in rats: attenuation of NLRP3 inflammasome up - regulation and tubulo - interstitial injury [J]. *Res Pharm Sci*, 2021, 16: 547 - 558.

[4] MAKINO Y, FUJITA Y, HANEDA M. Dipeptidyl peptidase - 4 inhibitors in progressive kidney disease [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2015, 24(1): 67 - 73.

[5] SHERIF IO, ALSHAALAN AA, AL - SHAALAN NH. Renoprotective effect of vildagliptin following hepatic ischemia / reperfusion injury [J]. *Ren Fail*, 2020, 42: 208 - 215.

[6] 薛颖妍,夏 曦. 维格列汀、格列美脲分别联合二甲双胍治疗T2MD的效果及对血糖波动、体重的影响 [J]. *中国医药科学*, 2019, 9(13): 39 - 41.

[7] 杨和军. 维格列汀合成工艺研究 [J]. *海峡药学*, 2019, 31(8): 77 - 79.

[8] MOURÃO AO, SILVA DF, RODRIGUEZ M, et al. Degradation of haloacetic acids with the Fenton - like and analysis by GC - MS: use of bioassays for monitoring of genotoxic, mutagenic and cytotoxic effects [J]. *Environ Monit Assess*, 2019, 191: 513.

[9] 黄作炎,姚秀清. 氯乙酸含量的测定方法 [J]. *氯碱工业*, 2015, 15(1): 30 - 34.

[10] 刘雅娇,安志成,孙海林,等. 利用拉曼光谱检测氯乙酸含量的方法: CN202011116470.6 [P]. 2023 - 11 - 15.

[11] 王 鹏,任 鸿,徐秋凉,等. 工作场所空气中氯乙酸硅烷化 - 气相色谱法 [J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2021, 39(4): 299 - 302.

[12] 张 军,杨秀全,周 媛,等. 高效液相色谱法测定醇醚羧酸盐中羧基乙酸、一氯乙酸和二氯乙酸的含量 [J]. *日用化学工业: 中英文*, 2022, 52(10): 1135 - 1139.

[13] 於香湘,缪建军. 衍生化顶空气相色谱法测定水中的氯乙酸 [J]. *干旱环境监测*, 2017, 31(4): 154 - 156.

[14] GHASSEMPOUR A, CHALAVI S, ABDOLLAHPOUR A, et al. Determination of mono - and dichloroacetic acids in betaine media by liquid chromatography [J]. *Talanta*, 2006, 68(4): 1396 - 1400.

[15] HOU DS, FAN JJ, HAN LF, et al. Determination of small halogenated carboxylic acid residues in drug substances by high performance liquid chromatography - diode array detection following derivatization with nitro - substituted phenylhydrazines [J]. *Journal of Chromatography A*, 2016, 1438: 46 - 56.

(收稿日期:2023 - 12 - 05;修回日期:2024 - 07 - 29)