

替格瑞洛中异构体杂质的控制

霍立茹¹, 薛晓婷², 赵卿^{1*}, 张慧¹

(1. 南京济群医药科技有限公司, 南京 210000; 2. 中国药科大学, 南京 211198)

摘要 目的: 建立手性拆分的正相高效液相色谱方法检测替格瑞洛中的异构体。**方法:** 采用硅胶表面涂布直链淀粉-三(3,5-二甲苯基氨基甲酸酯)为填充剂的手性色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm, Chiralpak AD-H 色谱柱); 以正己烷-无水乙醇-异丙醇-三氟乙酸(90:5:5:0.1)为流动相; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 柱温: 40 °C; 检测波长: 245 nm。**结果:** 替格瑞洛与各异构体在该色谱条件下专属性及分离度良好; 方法进样精密度良好; 色谱条件发生细微变化时对主成分与异构体的分离无显著影响, 方法的耐用性良好; 替格瑞洛、非对映异构体 I、非对映异构体 II、对映异构体的定量限分别为 0.21、0.49、0.26、0.38 μg·mL⁻¹; 检测限分别为 0.053、0.024、0.07、0.01 μg·mL⁻¹, 均能达到检测灵敏度要求; 重复性良好; 在相应的线性范围内, 线性关系均良好, 相关系数均在 0.999 以上; 加样回收率分别为 99.1%、100.5%、101.4%, RSD 分别为 1.5%、1.6%、1.3%, 均符合标准, 说明该方法准确度良好。替格瑞洛溶液于室温、室内散光条件下放置 8 h, 均未检出异构体, 且主成分无明显变化, 说明溶液稳定性良好。**结论:** 建立的替格瑞洛异构体的检查方法专属性强、检测灵敏度高、准确度高, 可用于替格瑞洛异构体的检测。

关键词: 抗血小板药物; 替格瑞洛; 异构体; 高效液相色谱; 手性拆分; 正相色谱

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2017)11-2006-07

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.11.13

Determination of isomers in ticagrelor

HUO Li-ru¹, XUE Xiao-ting², ZHAO Qing^{1*}, ZHANG Hui¹

(1. Nanjing Gritpharma, Nanjing 210000, China; 2. China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China)

Abstract Objective: To establish a chiral normal phase high performance liquid chromatography (HPLC) method for the detection of ticagrelor and its isomers. **Methods:** The chromatographic separation was on Chiralpak AD-H column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of hexane-ethanol-isopropanol-trifluoroacetic acid (90:5:5:0.1) at the flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. The column temperature was 40 °C and the detection wavelength was 245 nm. **Results:** Both of ticagrelor and its isomers could be separated completely and had good specificity in the chromatographic conditions. The resolution had no great changes when chromatographic conditions changed slightly. It indicated the good tolerance. The limits of quantitation of ticagrelor, diastereoisomer I, diastereoisomer II, enantiomer were 0.21, 0.49, 0.26, 0.38 μg·mL⁻¹, respectively; and the detection limits were 0.053, 0.024, 0.07, 0.01 μg·mL⁻¹, respectively. It indicated that the method had good linear relationship

* 通信作者 Tel:(025)83326929; E-mail: zhaoqing@gritpharma.com

第一作者 Tel:(025)83326929; E-mail: huoliru@gritpharma.com

between the linear ranges with the correlation coefficient more than 0.999. The recoveries of the isomers were 99.1%, 100.5%, 101.4%, respectively and RSD_s were 1.5%, 1.6% and 1.3%, respectively. It indicated that the method had great accuracy. The isomers were not detected when ticagrelor was placed at room temperature and indoor astigmatism for 8 hours without significant change of the peak area of ticagrelor simultaneously. It proved the solution of ticagrelor was stable. **Conclusion:** The method is specific, sensitive and accurate and can be used to determine ticagrelor and its isomers.

Keywords: antiplatelet drugs; ticagrelor; isomers; HPLC; chiral separation; normal phase chromatography


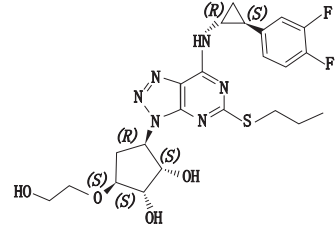
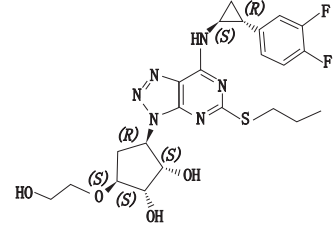
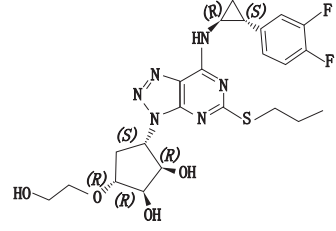
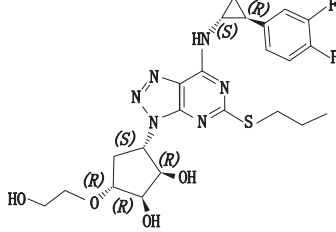
替格瑞洛一种新型具有选择性的治疗急性冠状动脉综合征 (acute coronary syndrome, ACS) 的小分子抗凝血药物^[1], 该药物属于新型环戊基三唑啉类 (cyclopentyl triazole, CPTP) 可逆性^[2]P2Y₁₂ 受体拮抗剂

^[3], 通过抑制新血凝块的形成^[4], 有效抑制动脉粥样硬化血栓的形成。美国心脏病学院基金会和美国心脏协会已经将替格瑞洛作为重要的抗血小板药物推荐应用^[5]。

替格瑞洛的分子结构式见表 1, 化学名为 (1*S*,

表 1 替格瑞洛及其相关异构体的化学结构式

Tab. 1 Chemical structural formula of the ticagrelor and related isomers

反应原料 (material)	 <p style="text-align: center;">C5 C3</p>
替格瑞洛 (ticagrelor)	 <p style="text-align: right;">C3 部分构型: 1<i>R</i>, 2<i>S</i> (C3's configuration: 1<i>R</i>, 2<i>S</i>) C5 部分构型: 1<i>S</i>, 2<i>S</i>, 3<i>R</i>, 5<i>S</i> (C5's configuration: 1<i>S</i>, 2<i>S</i>, 3<i>R</i>, 5<i>S</i>)</p>
非对映异构体 I (diastereoisomer I)	 <p style="text-align: right;">C3 部分错误立体构型 (C3's wrong stereo configuration)</p>
非对映异构体 II (diastereoisomer II)	 <p style="text-align: right;">C5 部分错误立体构型 (C5's wrong stereo configuration)</p>
对映异构体 enantiomer	 <p style="text-align: right;">C5 部分、C3 部分均为错误的立体构型 (C5's and C3's wrong stereo configuration)</p>

2*S*, 3*R*, 5*S*)-3-[7-[(1*R*, 2*S*)-2-(3,4-二氟苯基)环丙基]氨基]-5-(丙硫基)-3*H*-[1,2,3]三唑并[4,5-*d*]嘧啶-3-基]-5-(2-羟乙氧基)环戊烷-1,2-二醇, 由 C5 部分(含 4 个手性中心)与 C3 (含 2 个手性中心)构成。C5 中异构体产生的机理

如图 1 所示,从理论上分析,最后可能存在于 C5 成品中的异构体只有其对映异构体。

C3 中异构体产生的机理如图 2 所示,从理论上分析,最后可能存在于 C3 成品中的异构体只有其对映异构体。

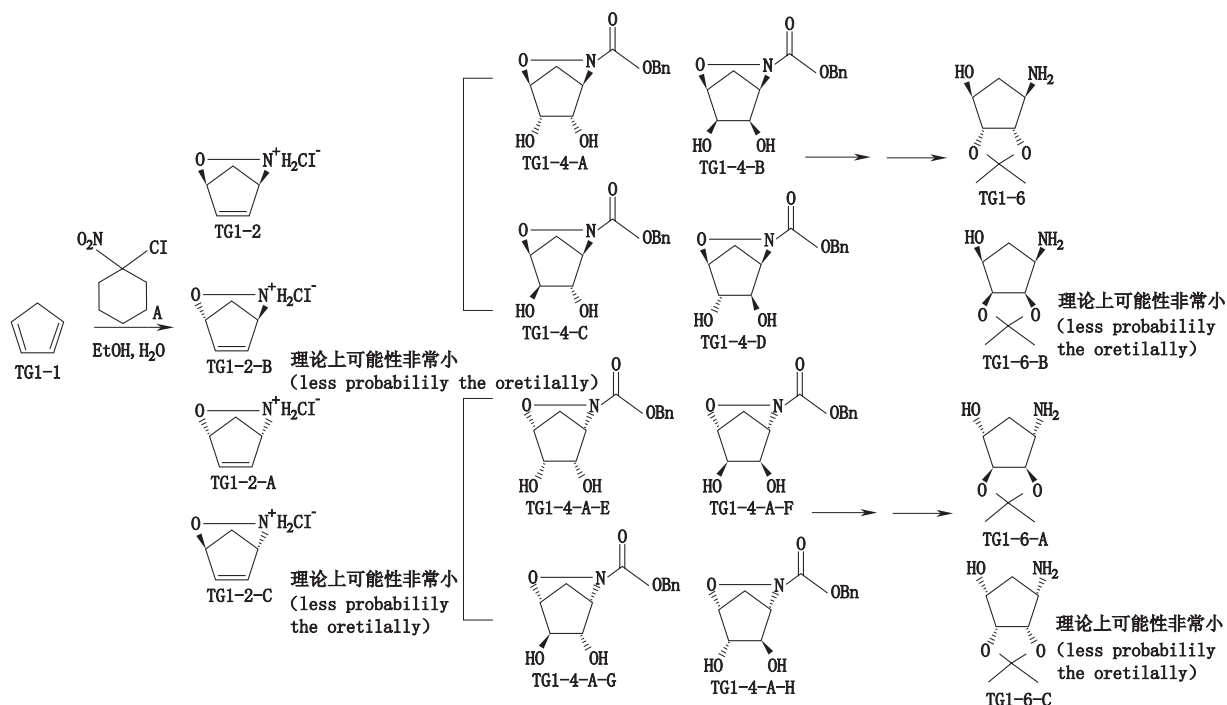


图 1 C5 的对映异构体产生机理

Fig. 1 Mechanism of production of C5's enantiomers

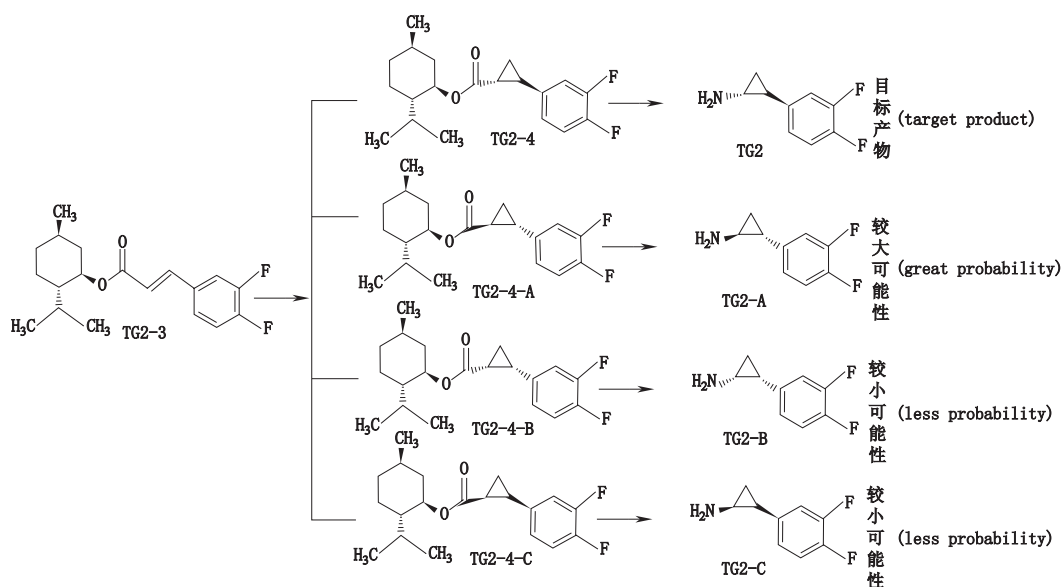


图 2 C3 的对映异构体产生机理

Fig. 2 Mechanism of production of C3's enantiomers

综上所述,虽然替格瑞洛从分子结构上分析含有6个手性中心,但其手性中心来自C5和C3,而C5和C3中只有可能存在其各自的对映异构体,纳入错误的C3对映异构体或C5对映异构体才可能会导致产生替格瑞洛异构体,即非对映异构体I、非对映异构体II、对映异构体,见表1。药物对映体在体内多数情况下,会呈现出明显的差异,这种差异性主要表现在代谢途径、药理活性以及毒副作用等许多方面。主要包括以下4种情况:对映体之一具有活性,另外一种无显著的药理作用;对映体之一有活性,另外一种具有等同或者相近的药理活性;2个对映体具有完全不同的生理活性;对映体之一有活性,另外一个不但没有活性,反而有很强的毒副作用或者拮抗作用^[6]。因此,建立灵敏度高、专属性好、手性分析方法对控制本品的质量具有重要意义^[7]。替格瑞洛与异构体的分离属于手性拆分,手性拆分的方法包括直接结晶拆分法、化学拆分法、动力学拆分法(包括酶拆分法^[8])、色谱拆分法以及手性膜拆分法^[9]。近年来色谱拆分的方法应用越来越广泛,主要包括液相色谱法^[10]、毛细管电泳色谱法^[11]、超临界流体色谱法^[12]、薄层色谱法^[8,13]等。应用于手性化合物分离的正相高效液相色谱已成为异构体拆分的重要手段之一^[9]。因此,本文建立了用于手性拆分的正相高效液相色谱法对替格瑞洛中的异构体进行分离,并进行了详细的方法学验证。

1 仪器与试剂

仪器:岛津LC-20A高效液相色谱仪;试剂及试药:替格瑞洛(TG7-140401R,纯度99.9%;自制);非对映异构体I(TG-Isomer1-20131125,纯度98.67%;自制);非对映异构体II(TG-Isomer2-20140228S7D005,纯度99.8%;自制);对映异构体(TG-E-20131125,纯度98.68%;自制);正己烷(色谱级,美国TEDIA);批号13100080);无水乙醇(色谱级;美国ROE;批号2H1472);异丙醇(色谱级;阿拉丁);三氟乙酸(色谱级;阿拉丁)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:硅胶表面涂布直链淀粉-三(3,5-二甲苯基氨基甲酸酯)为填充剂的手性色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm, 推荐使用Chiralpak AD-H色谱柱或同等效力色谱柱);流动相:正己烷-无水

乙醇-异丙醇-三氟乙酸(90:5:5:0.1);流速:1.0 mL · min⁻¹;柱温:40 °C;检测波长:245 nm;进样体积:10 μL。

2.2 专属性与系统适用性试验

取非对映异构体I、非对映异构体II、对映异构体、替格瑞洛各适量,分别用无水乙醇配制成各杂质的储备液,即得各杂质的定位溶液。称取替格瑞洛样品约25 mg,置25 mL量瓶中,分别加入适量非对映异构体I、非对映异构体II及对映异构体储备液,加无水乙醇稀释至刻度,摇匀,作为系统分离度考察溶液。

分别量取无水乙醇(空白溶剂)、各杂质储备液及系统分离度考察溶液各10 μL,注入液相色谱仪,记录色谱图,见图1。由色谱图可知,空白溶剂不干扰主峰和异构体的测定且各异构体峰和主峰均能有效分离。

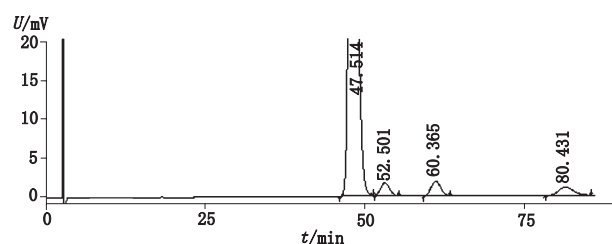


图1 替格瑞洛与异构体分离情况色谱图

Fig. 1 Chromatogram of the ticagrelor and its isomers on the base of their separation

2.3 进样精密度

取“2.2”项下的系统分离度考察溶液,连续进样6针,考察该条件下的进样精密度。结果替格瑞洛及各异构体的峰面积RSD符合要求,表明进样精密度良好。

2.4 耐用性试验

取“2.2”项下的系统分离度考察溶液,在一定范围内改变乙醇的浓度、检测波长、流速及柱温,考察色谱条件的改变对系统适应性的影响。结果显示异构体检查色谱条件的细微变化,对系统分离度考察溶液的分离度、各峰的柱效、保留时间等无显著影响。

2.5 定量限与检测限

分别取替格瑞洛及各异构体杂质适量,精密称定,加无水乙醇溶解并逐级稀释成合适浓度的溶液,精密量取10 μL,注入液相色谱仪,记录色谱图,按信噪比S/N=10确立为定量限,S/N=3确立为检测限。替

替格瑞洛、非对映异构体 I、非对映异构体 II 及对映异构体的定量限分别为: 0.21、0.49、0.26、0.38 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 检测限分别为: 0.053、0.024、0.07、0.01 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 并将各定量限溶液连续进样 6 针, 其各峰面积 RSD 为 2.2%、3.3%、0.85%、1.5%, 说明定量限溶液的进样精密度良好。

2.6 线性和范围

分别量取替格瑞洛及各异构体杂质储备液系列体积, 置相应体积的量瓶中, 分别加无水乙醇稀释至

刻度, 摇匀, 配制成 6 个浓度的线性溶液, 分别量取各待测液 10 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 以浓度 (X , $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 为横坐标轴, 峰面积 Y 为纵坐标轴, 作线性回归, 并计算校正因子, 结果见表 2。由此说明, 替格瑞洛、非对映异构体 II、非对映异构体 I 及对映异构体在相应的线性范围内, 线性关系均良好; 以替格瑞洛为参照, 各异构体的校正因子均在 0.9~1.1 之间, 故采用不加校正因子的峰面积归一化法。

表 2 替格瑞洛及其异构体的线性结果

Tab. 2 Linear results of ticagrelor and its isomers

成分 (component)	线性方程 (linear equation)	r	线性范围 (linear range) / ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	校正因子 (correctin factor)
替格瑞洛 (ticagrelor)	$Y=11\ 002X+2646$	0.999 6	0.981 2~39.25	
非对映异构体 I (diastereoisomer I)	$Y=11\ 563 X+236.6$	0.999 9	0.494 1~9.882	0.95
非对映异构体 II (diastereoisomer II)	$Y=11\ 807 X-1\ 779$	0.999 9	1.092~43.69	0.93
对映异构体 (enantiomer)	$Y=11\ 095 X-120.0$	0.999 6	1.009~40.35	0.99

2.7 重复性试验

称取替格瑞洛约 10 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加无水乙醇溶解并稀至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液, 平行配制 6 份。在替格瑞洛异构体检查的色谱条件下, 精密量取供试品溶液 10 μL , 注入液相色谱仪, 记录数据图谱。结果 6 份供试品中均未检出异构体。

2.8 加样回收率

分别取替格瑞洛各异构体适量于同一量瓶中, 定容, 即得杂质混合储备液。取本品 9 份, 各约 10 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 分成 3 组, 分别加异构体混合储备液适量, 用无水乙醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 配成含各异构体 0.05%、0.1%、0.15% 的加样回收率溶液, 在替格瑞洛异构体检查的色谱条件下进样, 采集数据图谱, 按峰面积归一化法计算各异构体的测得量, 根据测得量减去原有量与加入量的比值, 计算回收率; 结果表明在供试品中加入各杂质, 非对映异构体 I、非对映异构体 II 及对映异构体回收率分别为 99.1%、100.5%、101.4%, RSD 分别为 1.5%、1.6%、1.3%, 均符合标准, 说明该方法准确度

良好。

2.8 溶液稳定性

取本品约 10 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加无水乙醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 于室温室内散光条件下放置, 分别于 0、2、4、6、8 h 精密量取溶液 10 μL , 在异构体检查的色谱条件下, 注入液相色谱仪, 记录数据图谱, 实验数据显示溶液在 8 h 内其主峰峰面积 RSD 为 0.1%, 且没有异构体峰出现, 表明在 8 h 内供试品溶液稳定。

3 讨论

3.1 色谱柱的选择

替格瑞洛与异构体的分离属于手性拆分, 在 HPLC 中拆分对映体时通常有 3 种方法: ①利用手性试剂与被拆分物进行衍生化反应生成非对映异构体, 从而可被传统的非手性 HPLC 所拆分; ②在流动相中加入手性添加剂, 利用非手性固定相 HPLC 进行拆分; ③利用手性固定相的 HPLC 进行拆分。其中最有效的方法是手性固定相法^[9], 于海云等^[14]利用手性固定相对焦谷氨酸对映异构体实现分离; 赵静等^[15]利用手性固定相正相高效液相色谱法拆分了普萘洛

尔对映体;韩小茜等^[16]利用纤维素-三(3,5-二甲苯基氨基甲酸酯)手性固定相高效液相色谱法使氟环唑外消旋体得到分离,因此在替格瑞洛异构体分离时采用硅胶表面涂布直链淀粉-三(3,5-二甲苯基氨基甲酸酯)为填充剂的 Chiralpak AD-H 色谱柱,在分离时,异构体与手性固定相会生成不稳定的复合物,使之在色谱柱的保留时间不同,从而实现分离。

3.2 流动相的选择

由于采用正相色谱,流动相一般采用非极性的溶剂(如己烷、庚烷等烃类溶剂)加入少量极性调节剂溶剂(如乙腈、三乙胺、三氟乙酸等),以调节流动相的洗脱强度,同时由于这些调节剂极性较强,随流动相进入色谱柱后,可立即占据固定相表面的活性位点形成均匀吸附面,从而提高样品的保留重现性,进而使色谱峰形得到改善^[17],所以在替格瑞洛异构体检测时,同时考虑替格瑞洛的分子结构,其结构中含有-OH,选择加入三氟乙酸作为调节剂,流动相采用正己烷-无水乙醇-异丙醇-三氟乙酸的混合溶剂系统。

3.3 三氟乙酸含量的优化

在替格瑞洛异构体检测中,考察流动相中调节剂的含量对色谱峰的影响,调节三氟乙酸的含量分别为0.05%、0.1%、0.15%、0.2%、0.3%,结果表明在三氟乙酸含量为0.05%时,色谱峰拖尾严重,峰形扁塌,增加三氟乙酸至0.1%,色谱峰不再拖尾,峰形良好,继续增加三氟乙酸含量,色谱峰无明显变化,峰形依旧良好,所以在替格瑞洛异构体检查中将流动相中三氟乙酸的含量设置为0.1%。

3.4 检测波长

通过对替格瑞洛、非对映异构体 I、非对映异构体 II、对映异构体进行紫外全波长扫描,结果显示在245 nm处,4种成分的吸收度及响应灵敏度均良好,因此将检测波长设定为245 nm。

3.5 柱温的优化

以正己烷-无水乙醇-异丙醇-三氟乙酸(90:5:5:0.1)为流动相,在流速1.0 mL·min⁻¹的条件下,测定在25、30、35、40、45下替格瑞洛与异构体的分离,结果表明在40℃条件下,色谱峰的分离度、灵敏度及峰形良好。因此将40℃设置为检测温度。

参考文献

- [1] 缪世峰, 蒯宇, 张海波, 等. 新型抗凝血药替格瑞洛的合成[J]. 海峡药学, 2015, 27(4): 249
MIAO SF, LIN Y, ZHANG HB, *et al.* Synthesis of novel anticoagulant ticagrelor[J]. Strait Pharm J, 2015, 27(4): 249
- [2] ZHANG H, LIU J, ZHANG LY, *et al.* Synthesis and biological evaluation of ticagrelor derivatives as novel antiplatelet agents[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2012(22): 3598
- [3] 李慕鹏, 熊艳, 陈小平. 抗血小板药物替格瑞洛药代药动力学及遗传药理学研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2014, 19(2): 214
LI MP, XIONG Y, CHEN XP. Research progress in pharmacodynamics and pharmacogenetics of antiplatelet Ticagrelor[J]. Chin J Clin Pharmacol Ther, 2014, 19(2): 214
- [4] 王仙, 朱慧, 胡燕, 等. 抗血小板聚集新药-替格瑞洛[J]. 医院药学杂志, 2013, 33(11): 900
WANG X, ZHU H, HU Y, *et al.* The novel antiplatelet drug-Ticagrelor[J]. Chin Hosp Pharm J, 2013, 33(11): 900
- [5] 马文涛, 颜红兵. 新型的口抗血小板药物替格瑞洛[J]. 中华老年心脑血管病杂志 2012, 14(11): 1217
MA WT, TAN HB. Novel oral antiplatelet drug-Ticagrelor[J]. Chin J Geriatr Heart Brain Vessel Dis, 2012, 14(11): 1217
- [6] 张金彦, 吉绍长. 药物的手性拆分[J]. 化学通报, 2013, 76(8): 725
ZHANG JY, JI SC. Chiral separation of medicines[J]. Chem Bull, 2013, 76(8): 725
- [7] 杨庆云, 王志鹏, 邓愉凤, 等. 正相高效液相色谱法拆分普拉克索对映异构[J]. 药物分析杂志, 2014, 34(11): 2005
YANG QY, WANG ZP, DENG YF, *et al.* Chiral separation of pramipexole enantiomers by normal phase high performance liquid chromatography[J]. Chin J Pharm Anal, 2014, 34(11): 2005
- [8] 苏镜娉, 郑义森. 对映异构体光学拆分法的进展[J]. 药学报, 1985, 20(9): 710
SU JY, ZHENG YS. Enantiomer progress of optical resolution method[J]. Acta Pharm Sin, 1985, 20(9): 710
- [9] 黄蓓, 杨立荣, 吴坚平. 手性拆分技术的工业应用[J]. 化工进展, 2002, 21(6): 375
HUANG B, YANG LR, WU JP. Chiral resolution techniques in industrial practice[J]. Chem Ind Eng Prog, 2002, 21(6): 375
- [10] 翁文, 姚碧霞, 陈秀琴, 等. 液相色谱手性拆分机理的热力学方法研究[J]. 化学进展, 2006, 18(7/8): 1056
WENG W, YAO BX, CHEN XQ, *et al.* Thermodynamic studies on mechanism of chiral resolution by liquid chromatography[J]. Prog Chem, 2006, 18(7/8): 1056
- [11] 朱晓峰, 林炳承. 毛细管电泳的手性拆分[J]. 色谱, 1999, 17(2): 153
ZHU XF, LIN RC. Chiral resolution of capillary electrophoresis[J]. Chin J Chromgr, 1999, 17(2): 153

- [12] 李根荣,李志良. 手性药物拆分技术研究进展[J]. 中国新药杂志, 2005, 14(8): 969
LI GR, LI ZL. Advances in the chiral drug resolutions[J]. *Chin J New Drugs*, 2005, 14(8): 969
- [13] 王林. 对映异构体的薄层色谱直接拆分法[J]. 国外医学药学分册, 1992, 19(4): 205
WANG L. Enantiomorphism isomers TLC separation method directly[J]. *Foreign Med Sci Sec Pharm*, 1992, 19(4): 205
- [14] 于海云,宋俊梅,陈志从. 利用手性固定相高效液相色谱法对焦谷氨酸对映异构体的分离[J]. 中国现代药物应用, 2011, 5(21):83
YU HY, SONG JM, CHEN ZC. The separation of glutamic acid enantiomorphism isomers by chiral stationary phase high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Mod Drug Appl*, 2011, 5(21):83
- [15] 赵静,邹卫,赵华,等. 手性固定相正相高效液相色谱法拆分普萘洛尔对映体[J]. 光谱实验室, 2011, 28(1):7
ZHAO J, ZOU W, ZHAO H, *et al.* The separation of propranolol enantiomers by Chiral stationary phase normal high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Spectr Lab*, 2011, 28(1):7
- [16] 韩小茜,魏燕,刘艳华,等. 氟环唑外消旋体在纤维素-三(3,5-二甲苯基氨基甲酸酯)手性固定相上的高效液相色谱法拆分[J]. 色谱, 2008, 9: 631
HAN XQ, WEI Y, LIU YH, *et al.* Chiral separation of racemic epoxiconazole cellulose tris(3,5-dimethyl phenyl carbamate) chiral stationary phase using high performance liquid chromatography [J]. *Chin J Chromgr*, 2008, 9: 631
- [17] 丁黎. 药物色谱分析[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 162
DING L. *Chromatographic Analysis of Drugs* [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2008: 162

(本文于2016年9月27日收到)

《药物分析杂志》编辑部声明

本刊采用在线投稿系统,作者稿件一经本刊审核通过,确定录用,可优先数字出版,同时被中国学术期刊网络出版总库等数据库收录,进入因特网提供信息服务,并通过本刊在线系统等实现全文查询。本刊所付稿酬包含刊物内容上网服务报酬,不再另付。

本刊未委托其他任何机构或个人代理征收稿件,所有稿件须登录本刊网站(<http://www.ywfxzz.cn>)在线投稿,并须提交加盖公章的单位介绍信。

本刊未委托其他任何机构或个人代收任何费用,所有收费按本刊缴费通知办理。