

外标法快速测定盐酸沙格雷酯中 BP-984 的含量

王子元, 王念, 乔洲, 沈文斌, 宋喆, 刘剑锋

(中国药科大学 分析测试中心, 南京 210000)

摘要: BP-984 作为沙格雷酯生产过程中的一个杂质, 其化学性质、制备方法和市场供应情况都有较为详细的记录。在药物研发和生产中, 对 BP-984 的控制是确保沙格雷酯质量和稳定性的一个重要方面。通过高效液相色谱仪对沙格雷酯原料药中 BP-984 杂质的含量分析进行了方法学验证, 其在 4-100 ng 范围内线性良好 ($r^2=0.9997$), 重复性相对标准偏差为 2.12%, 检出限为 2.01 ng, 定量限为 4.02 ng。此方法专属性强, 线性适用范围相对较宽, 稳定性好, 检测结果较为准确, 能够较好地分析盐酸沙格雷酯中杂质 BP-984 的准确含量, 可有效提升该品种的质量标准。

关键词: 盐酸沙格雷酯; BP-984; 含量; 方法学

Rapid Determination of BP-984 Content in Sarpogrelate

Hydrochloride by External Standard Method

WANG Ziyuan, WANG Nian, Qiao Zhou, Shen Wenbin, Song Zhe, Liu Jianfeng

(Center for Analysis and Testing, China Pharmaceutical University, Nanjing, China)

Abstract: BP-984, as an impurity in the production process of sarpogrelate hydrochloride, has detailed records of its chemical properties, preparation methods, and market supply. In drug development and production, controlling BP-984 is an important aspect to ensure the quality and stability of sarpogrelate hydrochloride. The methodological validation of the content analysis of BP-984 impurity in the raw material of sarpogrelate hydrochloride was carried out by high-performance liquid chromatography. The linearity was good in the range of 4-100 ng ($r^2=0.9997$), the relative standard deviation of repeatability was 2.12%, the detection limit was 2.01 ng, and the quantification limit was 4.02 ng. This method has strong specificity, a relatively wide linear applicability range, good stability, and accurate detection results. It can effectively analyze the accurate content of impurity BP-984 in sarpogrelate hydrochloride and improve the quality standards of this variety.

Keywords: Sarpogrelate hydrochloride; BP-984; Content; Method validation

盐酸沙格雷酯分子式： $C_{24}H_{31}NO_6HCl$ ；分子量：466.02，见图 1。 [1-3]

盐酸沙格雷酯为 5-羟色胺受体拮抗剂，可以使血小板的凝血作用增强，通过对血小板膜上的 5-羟色胺 S₂ 受体的竞争性和选择性的对抗作用，而抑制因 5-羟色胺而增加的血小板聚集。体外实验中，盐酸沙格雷酯也能够抑制胶原蛋白诱导的血小板聚集体因肾上腺素及 ADP 导致的血小板的二次聚集。此外，盐酸沙格雷酯还具有改善血液流变性和红细胞变形能力，并能抑制血管平滑肌的收缩产生的 5-羟色胺。因此，盐酸沙格雷酯具有改善外周循环及慢性动脉闭塞性疾病的各种缺血引起的症状。商品名“安步乐克”。 [4-8]

由于该药物具有较好的经济性和便捷性，为了对现有药物进行更全面的安全性评价，有必要对该品种的质量标准方法学验证开展研究，论证其安全使用范围，以实现现有药物的最大化利用。本文沿用该品种现行标准中的色谱条件，使用高效液相色谱仪开展盐酸沙格雷酯中 BP-984 的含量方法学验证实验，研究该杂质的专属性、稳定性以及线性范围，加标回收率、重复性以及精密度等实验，全面论证该杂质的质量分析方法以及检查项下的含量检测分析方法，为该品种的质量分析标准提升工作打下坚实的基础。

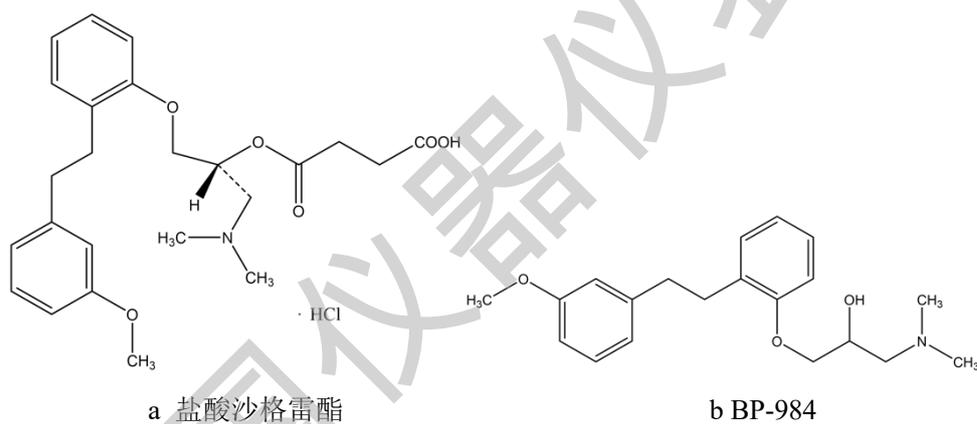


图 1 盐酸沙格雷酯(a)和 BP-984(b)的分子结构

1 仪器、试药和方法

1.1 仪器

悟空 K2025 高效液相色谱仪 (DAD 检测器)，Wookinglab 色谱工作站，METTLER 电子分析天平 (XPR2)，Sartorius (BT 125D)。

1.2 试药

乙腈 (批号：I1222930232，Merck 试剂公司)、三氟乙酸 (C15533059，Macklin 试剂公司) 超纯水，BP-984 对照品 (批号：1272-075A1，纯度 99.9%，TLC PHARMACEUTICAL

STANDSRDS），盐酸沙格雷酯（批号：2106161，20231006，202311108；天津红日药业股份有限公司）。

1.3 方法

1.3.1 高效液相色谱条件

色谱柱：SHIMADZU Shim-pack GIS C18 柱（150 mm×4.6 mm，5 mm）；流动相：水-乙腈-三氟乙酸（65：35：0.05）；检测波长：272 nm；柱温：40 °C；流速：1.1 mL/min；进样量：10 µl；运行时间：12 min。

1.3.2 溶液的制备

BP-984 储备溶液：称取 BP-984 对照品约 20 mg，精密称定，置 10 mL 量瓶中，加空白溶液溶解并稀释至刻度，摇匀；

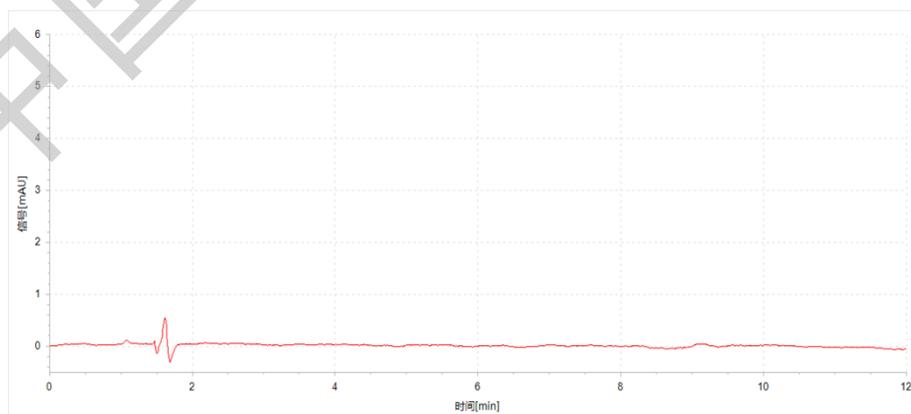
BP-984 工作溶液：精密量取 BP-984 储备溶液 1mL，置于 10 mL 量瓶中，用空白溶液稀释至刻度，摇匀；

供试品溶液：称取供试品约 20 mg，精密称定，置 10 mL 量瓶中，加空白溶液溶解并稀释至刻度，摇匀。

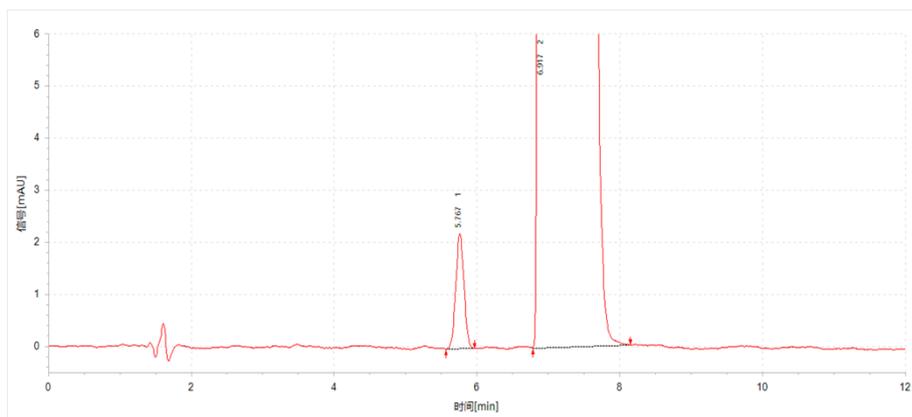
2 结果与分析

2.1 专属性实验

空白溶液：取 650 mL 水、350 mL 乙腈和 0.5 mL 三氟乙酸，混匀；供试品溶液：称取供试品（2106161 批）约 20 mg，精密称定，置 10 mL 量瓶中，加空白溶液适量超声使溶解并稀释至刻度，摇匀，即得。按 1.3.1 项下色谱条件检测,在图 2 中，空白溶液在待测峰处无干扰，供试品溶液中 BP-984 峰的保留时间为 5.767 min，和其他组分峰分离良好。



a 空白溶液



b 供试品溶液

图2 盐酸沙格雷酯中 BP-984 的专属性液相色谱图

2.2 标准曲线

精密量取 BP-984 工作溶液 0.040、0.200、0.300、0.400、0.500 mL 分别置于 10 mL 量瓶中，用空白溶液稀释至刻度，摇匀，制成线性溶液。以峰面积和 BP-984 浓度计算线性范围。结果表明杂质在 0.402-10.050 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好，相关系数 $r^2=0.9997$ 。结果见图 3。

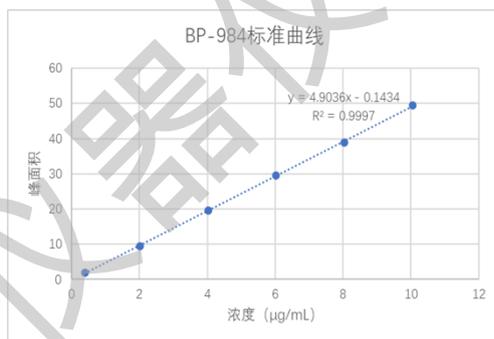
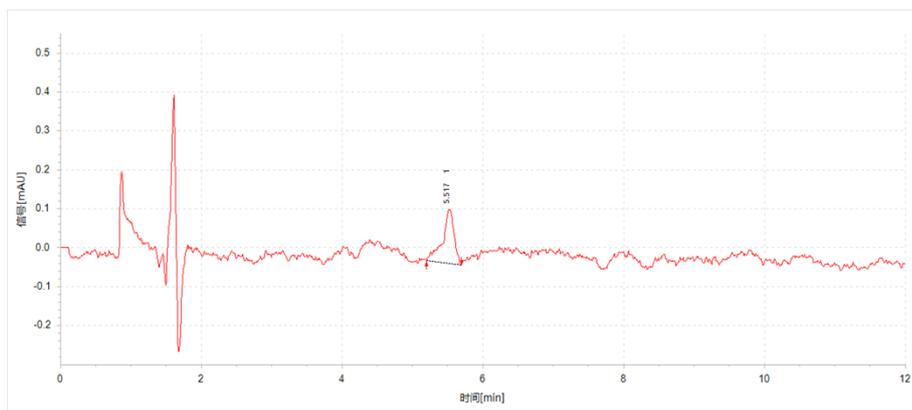


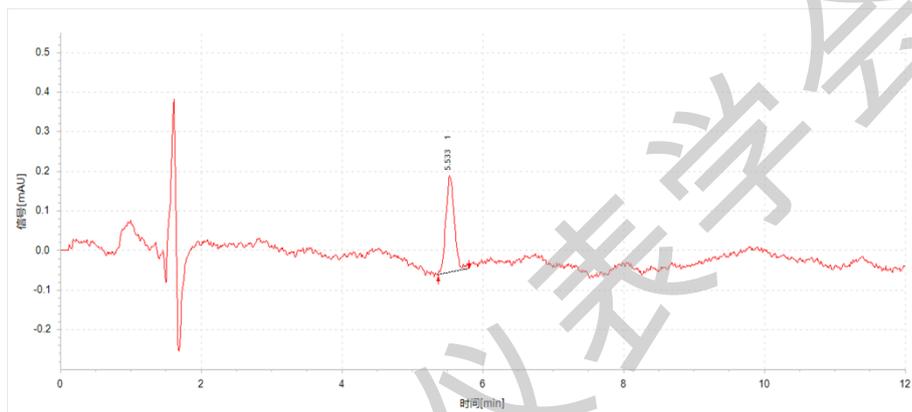
图3 盐酸沙格雷酯中 BP-984 的标准曲线

2.3 检测限和定量限

按 1.3.1 项下色谱条件检测,根据响应信号调整稀释倍数。BP-984 的检测限浓度和定量限浓度分别为 0.201 $\mu\text{g/mL}$ 和 0.402 $\mu\text{g/mL}$ 。



a 检测限



b 定量限

图4 BP-984 的检测限和定量限

2.4 重复性实验

取 BP-984 按 1.3.2 项下制备 6 份供试液，按 1.3.1 项下的色谱条件测定,结果 BP-984 峰面积平均为 10.05，相对标准偏差为 2.12%重复性良好。

表1 重复性实验杂质含量

样品序号	BP-984 峰 (mAU*s)	峰面积 RSD (%)
第 1 份	10.37	2.12
第 2 份	10.12	
第 3 份	10.19	
第 4 份	9.78	
第 5 份	9.96	
第 6 份	9.91	

2.5 准确度实验

称取供试品（2307111批）约 20 mg，精密称定，置 10 mL 量瓶中，平行称量 9 份，编号分别为 1#~9#。精密量取“检测限/定量限”项下“BP-984 储备溶液”0.5 mL 置 10 mL 量瓶中，用空白溶液定量稀释制成每 1 mL 中含 100 μg 的 BP-984 杂质对照品溶液。回收率溶液配制过程如下：

空白溶液：同本验证“专属性”项下“空白溶液”；

50%回收率供试品溶液：精密加入 21.2 mL 的 BP-984 杂质对照品溶液，加空白溶液稀释至刻度，摇匀，临用现配，平行配制 3 份；

100%回收率供试品溶液：精密加入 220.3 mL 的 BP-984 杂质对照品溶液，加空白溶液稀释至刻度，摇匀，临用现配，平行配制 3 份；

150%回收率供试品溶液：精密加入 419.3 mL 的 BP-984 杂质对照品溶液，加空白溶液稀释至刻度，摇匀，临用现配，平行配制 3 份。

表 2 BP-984 准确度结果

溶液水平	本底的量 (μg)	峰面积 (mAU *s)	加入量 (μg)	测得量 (μg)	回收率 (%)	平均值 (%)	9份平均回收率 (%)	9份平均回收率 RSD (%)
50%	17.87	9.77	2.13	20.23	110.79	109.39	106.78	3.83
	17.87	9.71		20.09	104.23			
	17.87	9.80		20.28	113.14			
100%	17.87	20.01	22.15	41.11	104.94	107.73	106.78	3.83
	17.87	20.21		41.52	106.79			
	17.87	20.72		42.55	111.44			
150%	17.87	29.95	42.13	61.36	103.24	103.23	106.78	3.83
	17.87	30.35		62.18	105.19			
	17.87	29.53		60.52	101.25			

结论 50%、100%和 150%浓度下，9 份供试品溶液中加标回收率的平均值为 106.78%，RSD 为 3.83%，符合要求。

2.6 精密度实验

空白溶液：同本验证“专属性”项下“空白溶液”；取 BP-984 按 1.3.2 项下制备 6 份供试液，按 1.3.1 项下的色谱条件测定，分别精密量取空白溶液和供试液溶液各 10 μ l 注入液相色谱仪中，连续进样 6 次，记录色谱图，测量峰面积。

表 3 精密度实验杂质峰面积

序号	1	2	3	4	5	6
峰面积 /uAU	9.577	9.712	9.791	9.505	10.109	9.471

2.7 耐用性实验

各耐用性条件下与正常色谱条件下的检测结果相比，对柱温、流速、流动相比例和检测波长色谱参数进行微小调整后，BP-984 峰面积的 RSD 为 6.83%，说明方法耐用性较好，结果见表 4。

表 4 耐用性结果

色谱条件	保留时间 (min)	峰面积 (mAU*s)	峰面积 RSD (%)
正常条件	7.10	9.60	
柱温 35°C	7.33	10.19	
柱温 45°C	6.53	9.14	
流速 1.0 mL/min	7.37	10.82	
流速 1.2 mL/min	6.10	8.79	
流动相比例: 水-乙腈-三氟乙酸 (67: 33: 0.05)	8.53	10.07	6.83
流动相比例: 水-乙腈-三氟乙酸 (63: 37: 0.05)	4.93	9.61	
检测波长 268 nm	6.11	8.86	
检测波长 276 nm	5.93	9.60	

2.8 稳定性实验

供试品溶液在室温条件下放置 12 h，检测结果与 0 h 检测结果相比，其峰面积超过 0 h 的 95.0%~105.0%，BP-984 的最大偏差绝对值相对限度值为 27.08%，供试品溶液在室温条件下不稳定，具体结果详见表 5。

表 5 稳定性实验杂质峰面积

	0h	1h	2h	4h	6h	8h	12h
峰面积 (mAU*s)	18.50	17.77	18.00	19.82	20.00	21.66	23.08

2.9 样品测试结果

检测同一企业生产的 3 批次样品，按照相同的处理方法及色谱条件进行检测，其结果如表 6 所示。

表 6 不同批次的药品检测结果

	批次 1	批次 2	批次 3
BP-984 含量(%)	0.21	0.19	0.03

3 结论

参考《中国药典》中关于药品相关杂质研究的指导原则^[9]，结合化药杂质研究方法和部分文献报道，开展了盐酸沙格雷酯中相关杂质的方法学验证研究。其专属性实验结果表明，该杂质的保留时间为 5.767 min，能够与样品中的相关杂质信号对应，并且保留时间附近没有其他杂质信号，与主峰之间的分离度明显，能达到中国药典相关规定，专属性强。

在检出限实验中，该杂质的检出限与其他化合物的数值较一致，经计算其检出限为 0.201 ng，信噪比为 6.9，该结果显示 BP-984 的信号特征较为明显，其实验结果与其他研究中的检出限数值相当，表明本方法能够较好地通过 HPLC 分析仪器来检测该化合物的特征信号和分析其最低有效含量。同时，该线性方程相关系数 r^2 大于 0.999，可以在此线性范围内有效地对该杂质含量进行准确计算。重复性、回收率以及精密度等分项实验结果表明，该杂质在原标准中的色谱条件下能够被较好地分析并检测，在特定色谱条件下能够有效反映出该化合物的专属信号，并且能够较好地重现分析验证结果，体现了该杂质适用方法的普适性。在稳定性实验中，该杂质溶液在室温下不稳定。最后，通过该色谱条件和检测方法分析了 3

批次该品种的 BP-984 含量，表明该方法能够有效地检测并准确分析 BP-984 的含量，也能准确区分 BP-984 与其他未知杂质，具有较强的专属性以及范围相对较广的适用性。

本方法简单、便捷、准确且高效，能够有力支撑原标准的提升工作，因此，后续拟对该部颁标准进行修订，增加有关物质项下杂质控制的种类及含量，并可开展该 BP-984 的遗传毒性实验，以充分论证对该杂质限制的论据和限度。

参考文献:

- [1] 曹高忠,傅红兴,张福志,等.盐酸沙格雷酯渗透泵控释片的研制[J].中国医院药学杂志, 2008, 28(13):4.DOI:10.3321/j.issn:1001-5213.2008.13.003.
- [2] 高伟,王芳,刘关键,等.盐酸沙格雷酯治疗周围动脉疾病疗效与安全性的系统评价[J].中国循证医学杂志, 2012, 12(3):6.DOI:10.3969/j.issn.1672-2531.2012.03.016.
- [3] 王晓芳,李海燕,梁宇光,等.国产与进口盐酸沙格雷酯片在健康人体的生物等效性[J].中国临床药理学杂志, 2010(6):4.DOI:10.3969/j.issn.1001-6821.2010.06.009.
- [4] Yamamoto S , Ara T .Sarpogrelate versus aspirin in secondary prevention of cerebral infarction: differential efficacy in diabetes? Subgroup analysis from S-ACCESS.[J].Stroke, 2009, 40(8):2862-2865.DOI:10.1211/ijpp.17.02.0006.
- [5] Uchiyama S , Ozaki Y , Satoh K ,et al.Effect of Sarpogrelate, a 5-HT_{2A} Antagonist, on Platelet Aggregation in Patients with Ischemic Stroke: Clinical-Pharmacological Dose-Response Study[J].Cerebrovascular Diseases, 2007, 24(2-3):264.DOI:10.1159/000105135.
- [6] Doggrell S A .Sarpogrelate: Cardiovascular and renal clinical potential[J].Expert Opinion on Investigational Drugs, 2004, 13(7):865-874.DOI:10.1517/13543784.13.7.865.
- [7] Nakamura K , Kariyazono H , Moriyama Y ,et al.Effects of sarpogrelate hydrochloride on platelet aggregation, and its relation to the release of serotonin and P-selectin[J].Blood Coagulation & Fibrinolysis An International Journal in Haemostasis & Thrombosis, 1999, 10(8):513.DOI:10.1097/00001721-199912000-00009.
- [8] 王佐广,彭晓云,温绍君.盐酸沙格雷酯对血管系统作用的研究进展[J].中国新药杂志, 2005, 14(4):4.DOI:10.3321/j.issn:1003-3734.2005.04.032.
- [9] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].北京:中国医药科技出版社,2020:480-485.