



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 105319294 B

(45) 授权公告日 2021.03.30

(21) 申请号 201410394363.8

(22) 申请日 2014.08.12

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105319294 A

(43) 申请公布日 2016.02.10

(66) 本国优先权数据
201410279886.8 2014.06.20 CN

(73) 专利权人 重庆医药工业研究院有限责任公
司

地址 400061 重庆市南岸区涂山路565号

(72) 发明人 陈皓 刘泽荣 张道林 唐远富
付晓泰

(51) Int. Cl.
G01N 30/02 (2006.01)
G01N 30/06 (2006.01)

(56) 对比文件

- CN 103641822 A, 2014.03.19
- WO 2008069327 A1, 2008.06.12
- CN 101801371 A, 2010.08.11
- CN 103214471 A, 2013.07.24
- CN 103655539 A, 2014.03.26
- CN 103694230 A, 2014.04.02

审查员 淡美俊

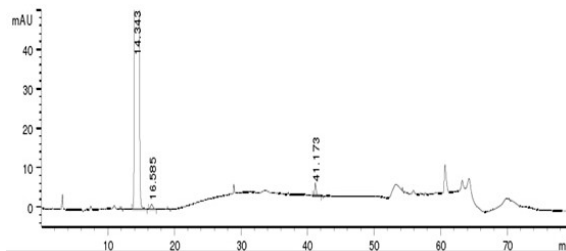
权利要求书1页 说明书15页 附图3页

(54) 发明名称

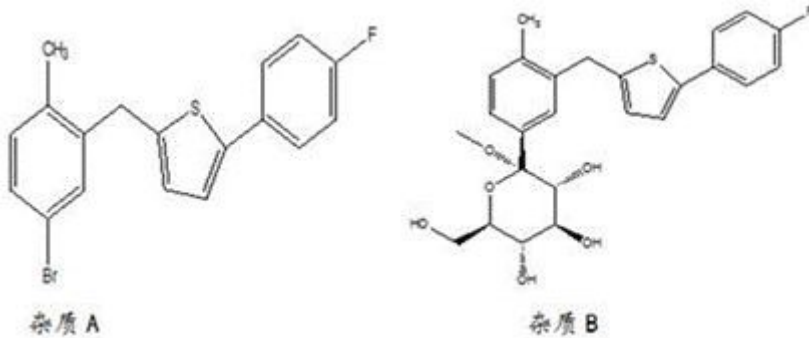
一种分离测定卡格列净及其有关物质的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种分离测定卡格列净及其有关物质的方法,该方法采用高效液相色谱法,以丁烷基硅烷键合硅胶填料为色谱柱,以磷酸溶液与乙腈组成流动相,进行梯度洗脱。该方法可以将卡格列净及其有关物质很好分离,检测的重现性好、灵敏度高、专属性强、操作简便,有助于控制卡格列净的质量和用药安全。



1. 一种分离测定卡格列净及其有关物质的方法,该方法包括采用高效液相色谱法,以丁烷基硅烷键合硅胶填料柱为色谱柱,以乙腈为有机相与以磷酸溶液或磷酸盐缓冲液为水相混合作为流动相,进行梯度洗脱,以紫外检测器进行检测,所述磷酸溶液或磷酸盐缓冲液的pH值为3.5,所述梯度洗脱包括:0min至第14~20min时,流动相中水相与有机相的体积比为55:45~65:35;第14~20min至第26~32min时,水相与有机相的体积比匀速变化至30:70~40:60;第26~32min至第33~39min时,水相与有机相的体积比匀速变化至25:75~35:65;第33~39min至第48~54min时水相与有机相的体积比保持比例不变;其中有关物质包含杂质A和杂质B,化学结构式如下:



2. 根据权利要求1所述的方法,所述磷酸盐缓冲液选自磷酸二氢钠、磷酸二氢钾和磷酸二氢铵,用磷酸溶液调节pH值。

3. 根据权利要求1所述的方法,水相中磷酸盐浓度为:0~0.005mol/L。

4. 根据权利要求1所述的方法,所述梯度洗脱包括:0min至第16min时,流动相中水相与有机相的体积比为60:40;第16min至第28min时,水相与有机相的体积比匀速变化到35:65;第28min至第35min时,水相与有机相的体积比匀速变化到30:70;第35min至第50min时水相与有机相的体积保持比例30:70不变。

5. 根据权利要求1所述的方法,进一步包括以下步骤:

(1) 取卡格列净原料药或其药物组合物,加70%乙腈溶液使卡格列净完全溶解并稀释定容,配制成每1ml溶液中含卡格列净0.3~0.7mg,滤过,作为供试品溶液;

(2) 以丁烷基硅烷键合硅胶色谱柱为色谱柱,流速为0.8~1.2ml/min,柱温为25~35℃,波长为210nm~215nm或287nm~297nm;

(3) 取供试品溶液10~30μl,注入高效液相色谱仪;

(4) 将水相pH3.5的磷酸溶液或磷酸盐缓冲液与有机相乙腈以60:40为初始体积比洗脱至主峰出来后,逐渐增大乙腈比例,至水相与有机相的体积比达到30:70并保持20分钟,完成卡格列净有关物质的测定;

(5) 采用加校正因子的卡格列净自身对照法以峰面积计算卡格列净的纯度及有关物质中各单一杂质含量及有关物质总量。

6. 根据权利要求5所述的方法,步骤(1)中,每1ml溶液中含卡格列净0.5mg,或步骤(2)中流速为1.0ml/min,柱温为25℃,波长为210nm,或步骤(3)中,取供试品溶液20μl,或步骤(4)中水相为pH3.5的磷酸溶液或磷酸盐缓冲液,水相与有机相的初始体积比为60:40,洗脱至主峰出来后,逐渐增大乙腈比例,至水相与有机相的体积比达到30:70。

一种分离测定卡格列净及其有关物质的方法

技术领域

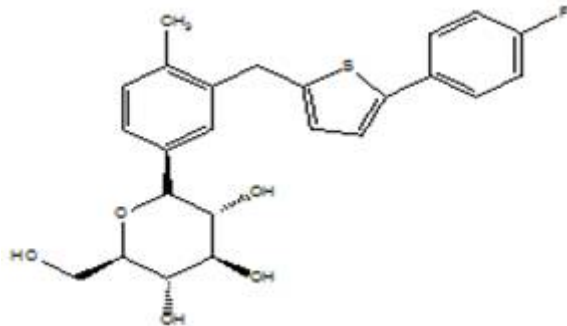
[0001] 本发明属于药物分析方法领域,具体涉及一种采用高效液相色谱法分离测定降糖药卡格列净及其有关物质的方法。

背景技术

[0002] 卡格列净为一种选择性钠-葡萄糖协同转运蛋白 (SGLT) 抑制剂,用于治疗成人II型糖尿病。卡格列净通过对钠-葡萄糖协同转运蛋白选择性抑制作用,限制了大部分葡萄糖在体内的重吸收,促使葡糖大量从尿中排出达到控制血糖水平的目的。由于尿糖增多,体内减少了热卡,因而有明显减重作用。由于排钠增加使收缩压稍降,但血钠无明显改变。

[0003] 卡格列净的化学结构式如下:

[0004]

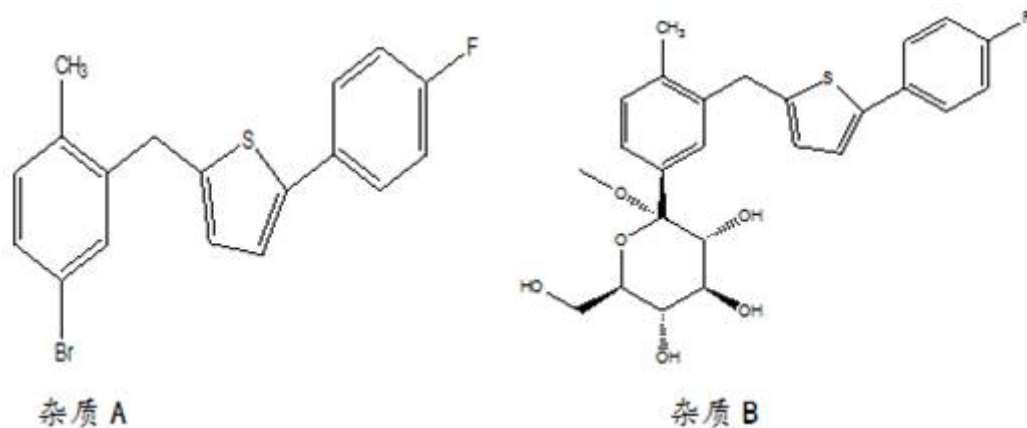


[0005] 其化学名为:(1S)-1,5-脱水-1-[3-[[5-(4-氟苯基)-2-噻吩基]甲基]-4-甲基苯基]-D-葡萄糖醇。

[0006] 卡格列净为全合成化学药,反应过程中可能产生的副产物或残留的中间体会影响其纯度和质量;在其储存过程中,也可能会因为温度、光照等环境因素而产生降解产物,也会影响其纯度和质量,这些残留的中间体、副反应产物、降解产物就是通常药物质量控制中所说的有关物质。

[0007] 卡格列净有两个结构已知有关物质,分别为杂质A和杂质B,它们的化学结构如下:

[0008]



[0009] 目前,有关卡格列净及其组合物的有关物质测定方法未见报道,为保证卡格列净原料药及其药物组合物的质量可控,以确保其有效性和安全性,亟需一种有效的检测方法,

能够分离测定卡格列净及其有关物质。本发明人经过大量的科学试验和测试条件的筛选，发现一种快速分离测定卡格列净及其有关物质的方法，该方法可以有效控制了卡格列净的工艺杂质和降解产物，保证了卡格列净原料药及其药物组合物的质量可控，从而完成了本发明。

[0010] 本发明人发现，已上市的卡格列净片剂，其药用辅料微晶纤维素、交联羧甲基纤维素钠、硬脂酸镁等在本发明的方法中不会干扰测定卡格列净及其有关物质的测定。

发明内容

[0011] 本发明的目的在于提供一种分离测定卡格列净及其有关物质的方法，该方法能将卡格列净与其有关物质有效分离，准确检测卡格列净原料药和其药物组合物中有关物质，从而保证卡格列净的质量控制，从而也确保了卡格列净药品的有效性和安全性。

[0012] 为实现本发明的目的，提供如下实施方案。

[0013] 在一实施方案中，本发明的一种分离测定卡格列净及其有关物质的方法，该方法包括采用高效液相色谱法，以丁烷基硅烷键合硅胶填料柱为色谱柱，以乙腈为有机相与以磷酸溶液或磷酸缓冲液为水相混合作为流动相，进行梯度洗脱，以紫外检测器进行检测。

[0014] 在上述实施方案中，本发明的方法，所述磷酸溶液或磷酸缓冲液的pH值为2~6，优选为3.5，其中，所述磷酸缓冲液为选自磷酸二氢钠、磷酸二氢钾和磷酸二氢铵中的磷酸盐，用磷酸溶液调节pH值，水相中磷酸盐浓度为0~0.005mol/L。

[0015] 在上述实施方案中，本发明的方法，水相与有机相的洗脱初始体积比为70:30~50:50，优选70:30，水相与有机相的洗脱终止体积比为30:70~15:85，优选30:70。

[0016] 在上述实施方案中，本发明的方法，紫外检测波长为210nm~215nm或287nm~297nm，优选为210 nm。

[0017] 在上述实施方案中，本发明的方法，进一步包括以下步骤：

[0018] (1) 取卡格列净原料药或其药物组合物，加70%乙腈溶液使卡格列净完全溶解并稀释定容，配制成每1ml溶液中含卡格列净0.3~0.7mg，优选0.5mg，滤过，作为供试品溶液；

[0019] (2) 以丁烷基硅烷键合硅胶色谱柱为色谱柱，流速为0.8~1.2ml/min，优选1.0 ml/min，柱温为25~35℃，优选25℃，波长为210nm~215nm或287nm~297nm，优选为210 nm；

[0020] (3) 取供试品溶液10~30μl，优选20μl，注入高效液相色谱仪；

[0021] (4) 将水相pH2~6的磷酸溶液或磷酸缓冲液与有机相乙腈以70:30~50:50为初始体积比洗脱至主峰出来后，逐渐增大乙腈比例，至水相与有机相的体积比达到 30:70~15:85并保持20分钟，完成卡格列净有关物质的测定；

[0022] 任选的，(5) 待有关物质完全洗脱后，提高乙腈比例至95%，升高流速为2ml/min冲洗色谱柱10分钟，再调整水相与乙腈比例为60:40，平衡色谱系统；

[0023] (6) 采用加校正因子的卡格列净自身对照法以峰面积计算卡格列净的纯度及有关物质中各单一杂质含量及有关物质总量。

[0024] 在上述实施方案中，本发明的方法，步骤(4)中水相为pH2.5的磷酸溶液或磷酸缓冲液；水相与有机相的初始体积比为60:40，洗脱至主峰出来后，逐渐增大乙腈比例，至水相与有机相的体积比达到30:70并保持20分钟，完成卡格列净有关物质的测定。

[0025] 在上述实施方案中，本发明的方法，所述梯度洗脱包括：0min至第14~20min时，流

动相中水相与有机相的体积比为55:45~65:35;第14~20min至第26~32min时,水相与有机相的体积比匀速变化至30:70~40:60;第26~32min至第33~39min时,水相与有机相的体积比匀速变化至25:75~35:65;第33~39min至第48~54min时水相与有机相的体积比保持比例不变。

[0026] 在上述实施方案中,本发明的方法,优选的,所述梯度洗脱包括:0min至第16min时,流动相中水相与有机相的体积比为60:40;第16min至第28min时,水相与有机相的体积比匀速变化到35:65;第28min至第35min时,水相与有机相的体积比匀速变化到30:70;第35min至第50min时水相与有机相的体积保持比例30:70不变。

[0027] 本发明所说的用高效液相色谱分离测定卡格列净及其有关物质的方法,具体其包括以下步骤:

[0028] (1)取卡格列净原料药或制剂,精密称定,加70%乙腈溶液适量使溶解,再用70%乙腈溶液稀释制成每1ml中含卡格列净0.5mg的溶液,必要时滤过,作为供试品溶液;另精密量取供试品溶液1ml,置100ml量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,作为对照溶液。

[0029] (2)取供试品溶液和对照溶液各20 μ l,注入高效液相色谱仪,进行梯度洗脱。色谱条件如下:选择以丁烷基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱,以磷酸溶液(取纯化水,用磷酸调pH值至2~6)或磷酸盐缓冲液(0.002mol/L磷酸二氢钠溶液,用磷酸调pH值至2~6)作为流动相A,乙腈作为流动相B,进行梯度洗脱,柱温为:25~35 $^{\circ}$ C;流速为0.8~1.2ml/min检测波长为210~215nm或287~297nm。洗脱条件如下:0min至第14~20min时,流动相中水相与有机相的体积比为55:45~65:35;第14~20min至第26~32min时,水相与有机相的体积比匀速变化至30:70~40:60;第26~32min至第33~39min时,水相与有机相的体积比匀速变化至25:75~35:65;第33~39min至第48~54min时水相与有机相的体积比保持比例不变。此时已完成有关物质测定,记录色谱图。

[0030] (3)为了连续进样,设置一段冲洗色谱柱和平衡色谱系统过程,即第48~54min至第60~66min时流动相A:B匀速变化60%:40%,再保持13min完成冲洗和平衡过程。

[0031] 上述本发明所说的用高效液相色谱分离测定卡格列净及其有关物质的方法,优选的,包括以下步骤:

[0032] (1)取卡格列净原料药或制剂,精密称定,加70%乙腈溶液适量使溶解,再用70%乙腈溶液稀释制成每1ml中含卡格列净0.5mg的溶液,必要时滤过,作为供试品溶液;另精密量取供试品溶液1ml,置100ml量瓶中,用流动相稀释至刻度,摇匀,作为对照溶液。

[0033] (2)以丁烷基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱(Inertsil-C4,4.6 \times 250mm,5 μ m),以磷酸溶液(取纯化水,用磷酸调pH值至3.5)作为流动相A,乙腈作为流动相B,进行梯度洗脱,柱温为:25 $^{\circ}$ C;流速为1.0ml/min检测波长为210nm。洗脱条件如下:0min至第16min时,流动相中水相与有机相的体积比为60:40;第16min至第28min时,水相与有机相的体积比匀速变化到35:65;第28min至第35min时,水相与有机相的体积比匀速变化到30:70;第35min至第50min时水相与有机相的体积保持比例30:70不变,记录色谱图。

[0034] 上述本发明的方法,所述“0min至第14~20min”表示:从0min开始,到第14~20min中任意时刻为止(将此时刻记为时刻A);“第14~20min至第26~32min时,动相中水相与有机相的体积匀速变化至30:70~40:60表示:从选择的第14~20min中的时刻A开始,到第26~32min中的任意时刻为止(将此时刻记为时刻B),在时刻B,经过梯度变化,动相中水相与

有机相的体积比变为30:70 ~40:60范围内的任意比例。关于梯度时间的表述以此类推。

[0035] 上述本发明的方法,杂质A相对于卡格列净的峰面积校正因子计为0.78,杂质B相对于卡格列净的峰面积校正因子计为1.18,各未知有关物质相对于卡格列净的峰面积校正因子计为1,按加校正因子的卡格列净自身对照法以峰面积计算有关物质中各单一杂质含量及有关物质总量。

[0036] 本发明的方法,有益效果或优势在于:

[0037] ①专属性强,不但能够提供卡格列净有关物质总量的检测方法,还提供了有关物质单一组分的检测方法,杂质之间不会相互干扰;

[0038] ②灵敏度高,本发明中卡格列净已知杂质A和杂质B最低检测浓度分别为0.009 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和0.011 $\mu\text{g}/\text{ml}$,能够保证微量杂质的检出;

[0039] ③实用性强,在检测完有关物质之后设计有冲洗色谱柱和平衡色谱系统过程,可以避免大量连续进样带来的基线噪音大、梯度系统峰多等不利影响,保证了检测结果能够良好重现;

[0040] ④耐用性好,色谱条件中流动相pH值、流动相比例、流速、柱温、波长等参数在本发明的范围内波动,不会对检测结果产生显著影响。

[0041] 总之,本发明的分离测定卡格列净及其有关物质的方法,可以实现卡格列净与其有关物质的分离分析,卡格列净峰及杂质峰峰形对称、理论板数高,各杂质刚好能够完全分离;采用合适的梯度洗脱能够保证较小的基线噪音,也能使小极性杂质全部洗脱,同时还避免了分析用时过长。因此,本发明的方法拥有较好的专属性、灵敏度和准确度等优点。

附图说明

[0042] 图1:溶剂空白的高效液相色谱图;

[0043] 图2:卡格列净原料药供试品溶液的高效液相色谱图;

[0044] 图3:检测波长为210nm时,卡格列净原料药粗品供试品溶液的高效液相色谱图;

[0045] 图4:混有杂质A、B的卡格列净原料药供试品溶液的高效液相色谱图;

[0046] 图5:不含卡格列净仅含辅料成分的组合物供试品溶液的高效液相色谱图;

[0047] 图6:含卡格列净的药物组合物供试品溶液的高效液相色谱图;

[0048] 图7:卡格列净原料药酸降解供试品溶液的高效液相色谱图。

具体实施方式

[0049] 下面结合实施例对本发明做进一步说明。

[0050] 实施例1

[0051] 仪器与条件

[0052] 高效液相色谱仪:Agilent 1260;

[0053] 色谱柱:丁烷基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱(Inertsil-C4,4.6 \times 250mm,5 μm);

[0054] 流动相A:水相磷酸溶液,取纯化水,用磷酸调节pH值为3.5,流动相B:有机相乙腈;

[0055] 按梯度洗脱表(见表1)洗脱(50min后为冲柱平衡系统阶段)。

表 1 按梯度洗脱流动相变化

时间 (min)	流速 (ml/min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	1	60	40
16	1	60	40
28	1	35	65
35	1	30	70
50	1	30	70
52	2	5	95
60	2	5	95
62	1	60	40
85	1	60	40

[0056]

[0057] 进样体积:20 μ l;[0058] 柱温:25 $^{\circ}$ C;

[0059] 检测波长:210nm。

[0060] 实验步骤

[0061] 取卡格列净原料药约25mg,精密称定,置50ml容量瓶中,加溶剂70%乙腈溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。取溶剂和供试品溶液,在上述色谱条件下进行高效液相色谱分析,记录色谱图,见图1、图2。结果表明溶剂不干扰卡格列净及其有关物质的检测,卡格列净与其杂质能良好分离,方法专属性好。

[0062] 实施例2

[0063] 仪器与条件

[0064] 高效液相色谱仪:Agilent 1260;

[0065] 色谱柱:丁烷基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱(Inertsil-C4,4.6 \times 250mm,5 μ m);

[0066] 流动相A:磷酸溶液,取纯化水,用磷酸调节pH值为3.5,流动相B:乙腈;

[0067] 按梯度洗脱表(见表2)洗脱(50min后为冲柱平衡系统阶段)。

表 2 梯度洗脱流动变化

时间 (min)	流速 (ml/min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	1	60	40
16	1	60	40
28	1	35	65
35	1	30	70
50	1	30	70
52	2	5	95
60	2	5	95
62	1	60	40
85	1	60	40

[0068]

[0069] 进样体积:20 μ l;[0070] 柱温:25 $^{\circ}$ C。

[0071] 实验步骤

[0072] 取卡格列净原料药粗品约25mg,精密称定,置50ml容量瓶中,加溶剂70%乙腈溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。取供试品溶液,在上述色谱条件下进行高效液相色谱分析,分别以210nm和292nm作为检测波长,记录色谱图,见图3。测试结果表明检测波长在210nm和292nm时,卡格列净粗品中带入的合成中间体、副反应产物都能被检测到,卡格列净与其杂质能良好分离,方法专属性好。

[0073] 实施例3

[0074] 仪器与条件

[0075] 高效液相色谱仪:Agilent 1260;

[0076] 色谱柱:丁烷基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱(Inertsil-C4,4.6 \times 250mm,5 μ m);

[0077] 一组流动相A:磷酸溶液,取纯化水,用磷酸调节pH值为2.0,另一组流动相A:磷酸溶液,取纯化水,用磷酸调节pH值为6.0,流动相B:乙腈;两组流动相A分别与流动相B组合按梯度洗脱表(见表3)各洗脱一次(50min后为冲柱平衡系统阶段)。

表3 梯度洗脱流动变化

时间 (min)	流速 (ml/min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	1	60	40
16	1	60	40
28	1	35	65
35	1	30	70
50	1	30	70
52	2	5	95
60	2	5	95
62	1	60	40
85	1	60	40

[0078]

[0079] 进样体积:20 μ l;[0080] 柱温:25 $^{\circ}$ C。

[0081] 实验步骤

[0082] 取卡格列净原料药粗品约25mg,精密称定,置50ml容量瓶中,加溶剂70%乙腈溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。取供试品溶液,以pH值2.0流动相和pH值6.0流动相,在上述色谱条件下分别进行高效液相色谱分析,记录色谱图。结果表明pH值2.0和6.0流动相与pH值3.5的检测的结果基本一致,本方法流动相的pH值适用范围广。

[0083] 实施例4

[0084] 仪器与条件

[0085] 高效液相色谱仪:Agilent 1260;

[0086] 色谱柱:丁烷基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱(Inertsil-C4,4.6 \times 250mm,5 μ m);

[0087] 流动相A:磷酸盐溶液,0.005mol/L NaH₂PO₄溶液,用磷酸调节pH值为2.0,流动相B:乙腈;

[0088] 按梯度洗脱表(见表4)洗脱(50min后为冲柱平衡系统阶段)

表 4 梯度洗脱流动变化

时间 (min)	流速 (ml/min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	1	60	40
16	1	60	40
28	1	35	65
35	1	30	70
50	1	30	70
52	2	5	95
60	2	5	95
62	1	60	40
85	1	60	40

[0089]

[0090] 进样体积:20 μ l;[0091] 柱温:25 $^{\circ}$ C。

[0092] 实验步骤

[0093] 取卡格列净原料药粗品约25mg,精密称定,置50ml容量瓶中,加溶剂70%乙腈溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。取供试品溶液,在上述色谱条件下进行高效液相色谱分析,记录色谱图。结果表明磷酸盐溶液作流动相的检测效果与磷酸溶液作流动相时基本一致。

[0094] 实施例5

[0095] 仪器与条件

[0096] 高效液相色谱仪:Agilent 1260;

[0097] 色谱柱:丁烷基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱(Inertsil-C4,4.6 \times 250mm,5 μ m);

[0098] 流动相A:磷酸溶液,取纯化水,用磷酸调节pH值为3.5,流动相B:乙腈;

[0099] 按梯度洗脱表(见表5)洗脱(50min后为冲柱平衡系统阶段)。

表5 按梯度洗脱流动变化

时间 (min)	流速 (ml/min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	1	70	30
16	1	70	30
28	1	40	60
[0100] 35	1	30	70
50	1	30	70
52	2	5	95
60	2	5	95
62	1	70	30
85	1	70	30

[0101] 进样体积:20 μ l;

[0102] 柱温:25 $^{\circ}$ C。

[0103] 实验步骤

[0104] 取卡格列净原料药粗品约25mg,精密称定,置50ml容量瓶中,加溶剂70%乙腈溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。取供试品溶液,在上述色谱条件下进行高效液相色谱分析,记录色谱图。结果表明适度减小流动相中有机相的初始比例,不会影响本方法的检测结果。

[0105] 实施例6

[0106] 仪器与条件

[0107] 高效液相色谱仪:Agilent 1260;

[0108] 色谱柱:丁烷基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱(Inertsil-C4,4.6 \times 250mm,5 μ m);

[0109] 流动相A:磷酸溶液,取纯化水,用磷酸调节pH值为3.5,流动相B:乙腈;

[0110] 按梯度洗脱表(见表6)洗脱(50min后为冲柱平衡系统阶段)。

表 6 梯度洗脱流动变化

时间 (min)	流速 (ml/min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	1	50	50
16	1	50	50
28	1	25	75
35	1	15	85
50	1	15	85
52	2	5	95
60	2	5	95
62	1	50	50
85	1	50	50

[0111]

[0112] 进样体积:20 μ l;[0113] 柱温:25 $^{\circ}$ C。

[0114] 实验步骤

[0115] 取卡格列净原料药粗品约25mg,精密称定,置50ml容量瓶中,加溶剂70%乙腈溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。取供试品溶液,在上述色谱条件下进行高效液相色谱分析,记录色谱图。结果表明适度增加流动相中有机相的初始比例和终止比例,不会影响本方法的检测结果。

[0116] 实施例7

[0117] 仪器与条件

[0118] 高效液相色谱仪:Agilent 1260;

[0119] 色谱柱:丁烷基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱(Inertsil-C4,4.6 \times 250mm,5 μ m);

[0120] 流动相A:磷酸溶液,取纯化水,用磷酸调节pH值为3.5,流动相B:乙腈;

[0121] 按梯度洗脱表(见表7)洗脱(50min后为冲柱平衡系统阶段)。

表7 梯度洗脱流动变化

时间 (min)	流速 (ml/min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	1	60	40
16	1	60	40
28	1	35	65
35	1	30	70
50	1	30	70
52	2	5	95
60	2	5	95
62	1	60	40
85	1	60	40

[0122]

[0123] 进样体积:20 μ l;[0124] 柱温:25 $^{\circ}$ C;

[0125] 检测波长:210nm。

[0126] 实验步骤

[0127] 取卡格列净原料药约25mg,精密称定,置50ml容量瓶中,加入含有杂质A、B浓度均为37.5 μ g/ml的溶液1ml,加溶剂70%乙腈溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。取供试品溶液,在上述色谱条件下进行高效液相色谱分析,记录色谱图,见图4。结果表明卡格列净杂质A、B都能被检测到,杂质响应高,卡格列净与其良好分离,方法专属性好,灵敏度高。

[0128] 实施例8

[0129] 仪器与条件

[0130] 高效液相色谱仪:Agilent 1260;

[0131] 色谱柱:丁烷基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱(Inertsil-C4,4.6 \times 250mm,5 μ m);

[0132] 流动相A:磷酸溶液,取纯化水,用磷酸调节pH值为3.5,流动相B:乙腈;

[0133] 按梯度洗脱表(见表8)洗脱(50min后为冲柱平衡系统阶段)。

表 8 梯度洗脱流动变化

时间 (min)	流速 (ml/min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	1	60	40
16	1	60	40
28	1	35	65
35	1	30	70
50	1	30	70
52	2	5	95
60	2	5	95
62	1	60	40
85	1	60	40

[0134]

[0135] 进样体积:20 μ l;[0136] 柱温:25 $^{\circ}$ C;

[0137] 检测波长:210nm。

[0138] 实验步骤

[0139] 取卡格列净药物组合物适量,含卡格列净25mg,精密称定,置50ml容量瓶中,加溶剂70%乙腈溶液,超声30分钟,使卡格列净完全溶解,再稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。另取等量的不含卡格列净只含辅料的组合物,精密称定,置50ml容量瓶中,加溶剂70%乙腈溶液超声30分钟,再稀释至刻度,摇匀,作为空白溶液。取空白溶液和供试品溶液,在上述色谱条件下进行高效液相色谱分析,记录色谱图,见图5、图6。结果表明空白组合物不干扰卡格列净及其有关物质的检测,方法专属性好。

[0140] 实施例9

[0141] 仪器与条件

[0142] 高效液相色谱仪:Agilent 1260;

[0143] 色谱柱:丁烷基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱(Inertsil-C4,4.6 \times 250mm,5 μ m);

[0144] 流动相A:磷酸溶液,取纯化水,用磷酸调节pH值为3.5,流动相B:乙腈;

[0145] 按梯度洗脱表(见表9)洗脱(50min后为冲柱平衡系统阶段)。

表 9 梯度洗脱流动变化

时间 (min)	流速 (ml/min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	1	60	40
16	1	60	40
28	1	35	65
35	1	30	70
50	1	30	70
52	2	5	95
60	2	5	95
62	1	60	40
85	1	60	40

[0146]

[0147] 进样体积:20 μ l;[0148] 柱温:25 $^{\circ}$ C;

[0149] 检测波长:210nm。

[0150] 实验步骤

[0151] 取卡格列净原料药约25mg,精密称定,置50ml容量瓶中,加入1mol/L盐酸溶液3ml和乙腈3ml,室温静置24h,用氢氧化钠溶液中和并放冷,加溶剂70%乙腈溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,作为酸降解供试品溶液。

[0152] 取卡格列净原料药约25mg,精密称定,置50ml容量瓶中,加入1mol/L氢氧化钠溶液3ml和乙腈3ml,室温静置24h,用盐酸溶液中和并放冷,加溶剂70%乙腈溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,作为碱降解供试品溶液。

[0153] 取卡格列净原料药约25mg,精密称定,置50ml容量瓶中,于105 $^{\circ}$ C加热30h,放冷,加溶剂70%乙腈溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,作为热降解供试品溶液。

[0154] 取卡格列净原料药约25mg,精密称定,置50ml白玻容量瓶中,于4500Lx \pm 500Lx,25 $^{\circ}$ C条件照射48h,加溶剂70%乙腈溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,作为光降解供试品溶液。

[0155] 取卡格列净原料药约25mg,精密称定,置50ml容量瓶中,加15%H₂O₂溶液3ml和乙腈3ml,室温静置24h,加溶剂70%乙腈溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,作为氧降解供试品溶液。

[0156] 取各供试品溶液,在上述色谱条件下进行高效液相色谱分析,记录色谱图,见图7。结果表明卡格列净强制降解(酸、碱、光、热、氧)产生的一系列有关物质都能被分离检测到,卡格列净与其杂质能良好分离,方法专属性好。

[0157] 实施例10

[0158] 仪器与条件

[0159] 高效液相色谱仪:Agilent 1260;

[0160] 色谱柱:丁烷基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱(Inertsil-C4,4.6 \times 250mm,5 μ m);

[0161] 流动相A:磷酸溶液,取纯化水,用磷酸调节pH值为3.5,流动相B:乙腈;

[0162] 按梯度洗脱表(见表10)洗脱(50min后为冲柱平衡系统阶段)。

表 10 梯度洗脱流动变化

时间 (min)	流速 (ml/min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	1	60	40
16	1	60	40
28	1	35	65
35	1	30	70
50	1	30	70
52	2	5	95
60	2	5	95
62	1	60	40
85	1	60	40

[0163] 进样体积:20 μ l;

[0164] 柱温:25 $^{\circ}$ C;

[0165] 检测波长:210nm。

[0166] 实验步骤

[0167] 取卡格列净原料药粗品约25mg,精密称定,置50ml容量瓶中,加溶剂70%乙腈溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。取供试品溶液,在上述色谱条件下进行高效液相色谱分析,记录色谱图,另将流动相pH值、流动相比比例、流速、柱温、波长等色谱仪参数在一定范围内变动,进行单因素考察,具体色谱条件见表11、结果见表12。结果表明色谱参数在一定范围内变动时,卡格列净有关物质的检出结果基本稳定,卡格列净主峰理论板数仍高,卡格列净与其杂质分离度均高于1.5,方法耐用性好。

表 11、卡格列净有关物质测定耐用性考察色谱条件

考察因素	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
流动相 pH 值	3.5	2.0	6.0	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
水相-有机相初始比例	60 : 40	60 : 40	60 : 40	50 : 50	70 : 30	60 : 40	60 : 40	60 : 40	60 : 40	60 : 40	60 : 40
水相-有机相终止比例 a	30 : 70	30 : 70	30 : 70	15 : 85	35 : 65	30 : 70	30 : 70	30 : 70	30 : 70	30 : 70	30 : 70
流速 (ml/min)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	0.8	1.2	1.0	1.0	1.0	1.0
柱温 (°C)	25	25	25	25	25	25	25	20	35	25	25
波长 (nm)	210	210	210	210	210	210	210	210	210	205	292

[0168]

a: 水相-有机相终止比例指保证杂质全部洗脱时的比例, 不涉及冲柱和平衡系统时的比例。

表 12、不同色谱条件下卡格列净有关物质测定结果

考察因素	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
总有关物质 (%)	1.63	1.56	1.55	1.55	1.56	1.57	1.62	1.61	1.61	1.66	1.62
最大单个杂质 (%)	0.77	0.74	0.72	0.76	0.79	0.76	0.76	0.77	0.74	0.79	0.77
主峰与相邻杂质分离度	2.18	2.27	2.02	1.91	1.81	2.07	2.03	2.16	2.03	2.19	2.14
主峰理论板数 b	6110	6218	6019	5520	5727	6020	5676	5636	5732	6075	5984

[0169]

[0170] b: 主峰指卡格列净峰。

[0171] 以上所述的实施例仅仅是对本发明的优选实施方式进行了描述, 并非对本发明的范围进行限定, 在不脱离本发明设计精神的前提下, 本领域普通技术人员对本发明的技术方案作出的各种变形和改进, 均应落入本发明权利要求书确定的保护范围内。

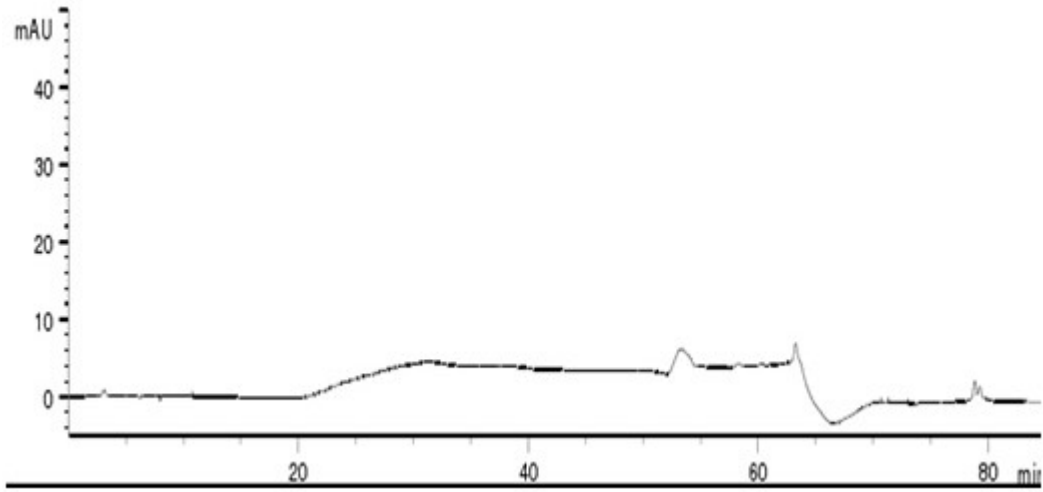


图1

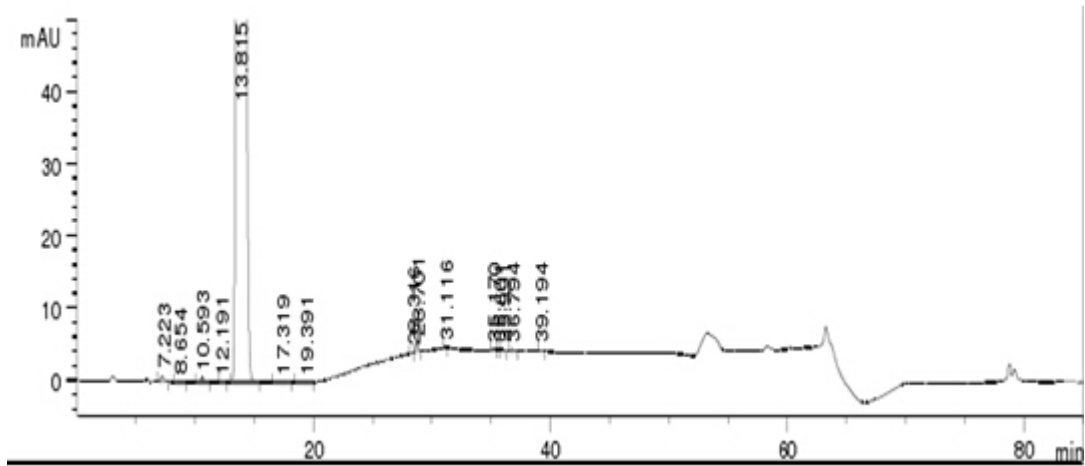


图2

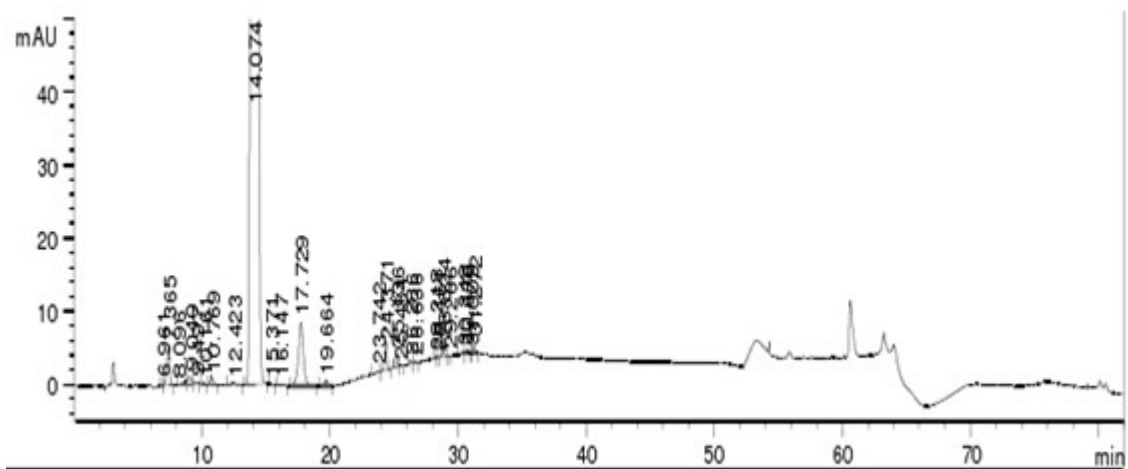


图3

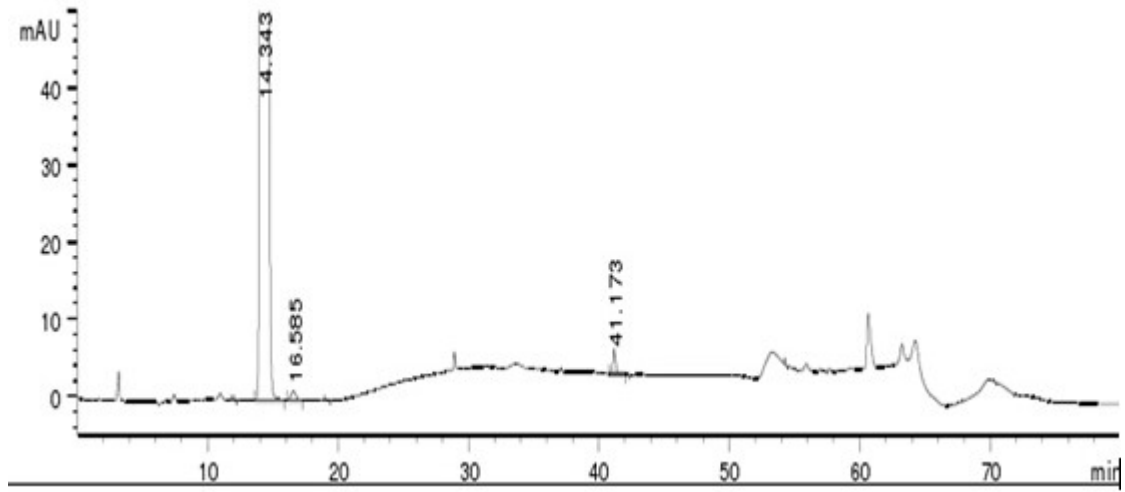


图4

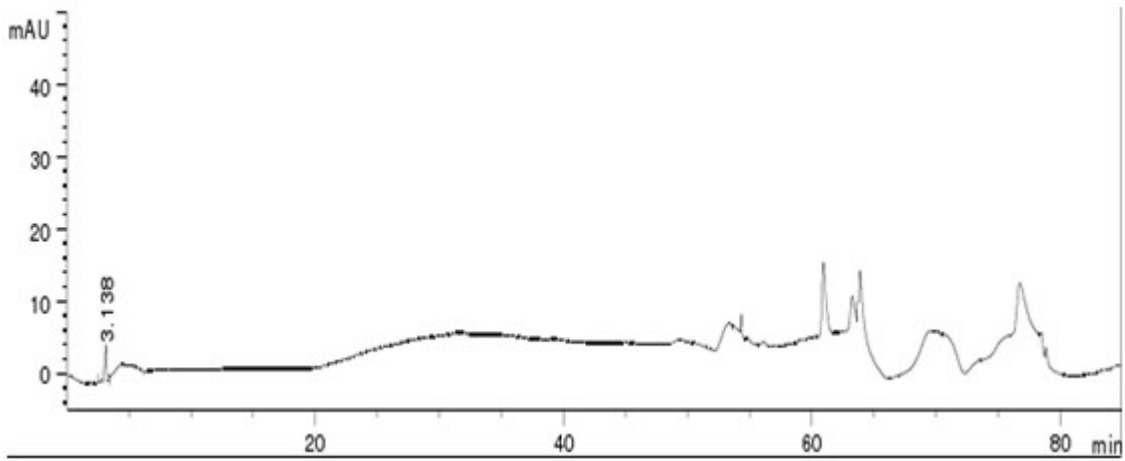


图5

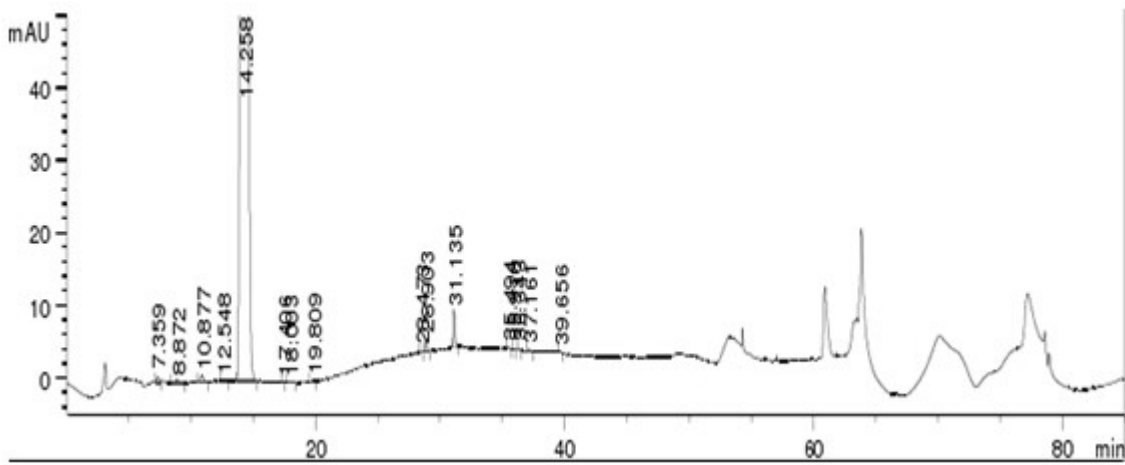


图6

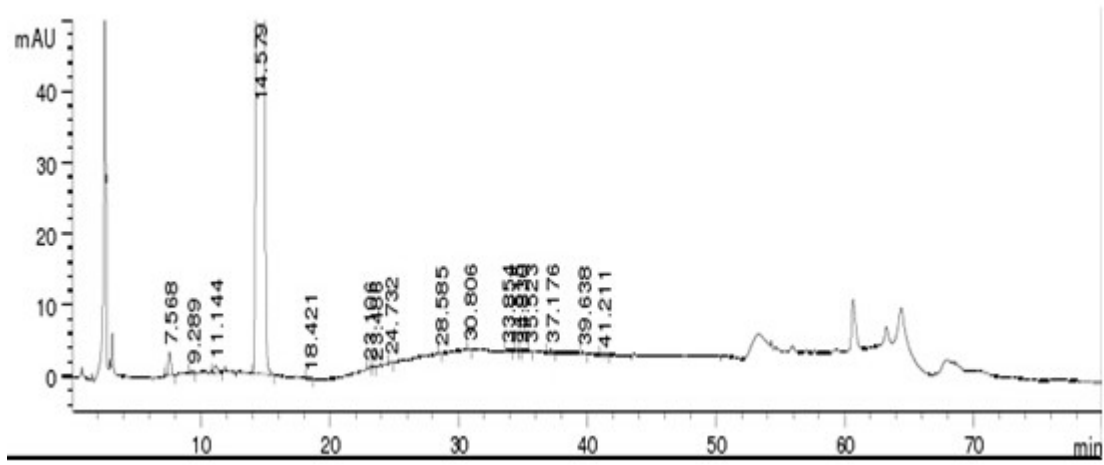


图7