



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 115561367 B

(45) 授权公告日 2023.06.30

(21) 申请号 202211398592.8

(22) 申请日 2022.11.09

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 115561367 A

(43) 申请公布日 2023.01.03

(73) 专利权人 山东海雅医药科技有限公司
地址 255000 山东省淄博市高新区鲁泰大道51号高分子材料产业创新园A座7层

(72) 发明人 马国栋 蒋小芳 肖扬帆 李贵千
侣营营 高梦 华威 魏玉民
曹烁久

(74) 专利代理机构 青岛发思特专利商标代理有限公司 37212
专利代理师 耿霞

(51) Int.Cl.

G01N 30/02 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 109870528 A, 2019.06.11
CN 113009029 A, 2021.06.22
WO 2022011727 A1, 2022.01.20
WO 2022116972 A1, 2022.06.09
CN 115097023 A, 2022.09.23
WO 2022116972 A1, 2022.06.09

审查员 马蕊

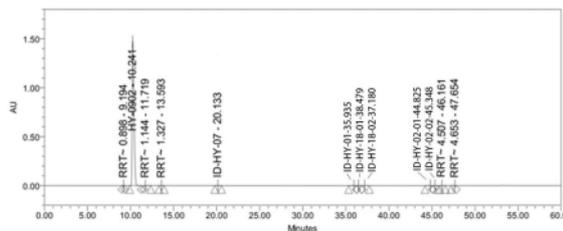
权利要求书3页 说明书8页 附图1页

(54) 发明名称

痛风药物有关物质的高效液相色谱检测方法

(57) 摘要

本发明属于医药检测技术领域,具体涉及痛风药物有关物质的高效液相色谱检测方法。所述痛风药物有关物质的高效液相色谱检测方法,采用高效液相色谱法,色谱柱以十八烷基硅烷键合硅胶为填料,检测波长220nm,柱温40℃,以20mM磷酸氢二钾溶液为流动相A,以乙腈为流动相B,梯度洗脱。本发明的高效液相色谱检测方法,方便简洁,灵敏度高,能有效检测痛风药物中的多种杂质,且能根据其响应值准确检测各杂质含量,提高药品的安全性,有效的控制痛风药物的产品质量,为制定痛风药物的质量标准提供依据。



1. 一种痛风药物有关物质的高效液相色谱检测方法,其特征在于:采用高效液相色谱法,色谱柱为Waters XBridge C₁₈,规格4.6mm×150mm,3.5μm,色谱柱以十八烷基硅烷键合硅胶为填料,检测波长220nm,柱温40℃,以20mM磷酸氢二钾溶液为流动相A,以乙腈为流动相B,流动相流速为1.0ml/min,进样量为5μl,梯度洗脱;

梯度洗脱条件为:

第一梯度洗脱时间0min,流动相A占比70%,流动相B占比30%;

第二梯度洗脱时间3min,流动相A占比70%,流动相B占比30%;

第三梯度洗脱时间25min,流动相A占比55%,流动相B占比45%;

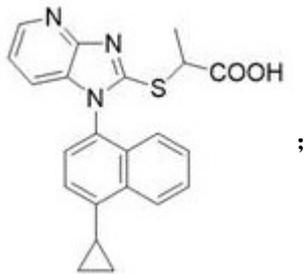
第四梯度洗脱时间40min,流动相A占比55%,流动相B占比45%;

第五梯度洗脱时间50min,流动相A占比25%,流动相B占比75%;

第六梯度洗脱时间50.1min,流动相A占比70%,流动相B占比30%;

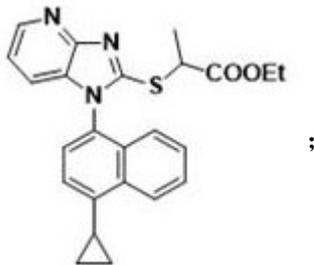
第七梯度洗脱时间60min,流动相A占比70%,流动相B占比30%;

所述痛风药物记为HY-0902,结构式如下:

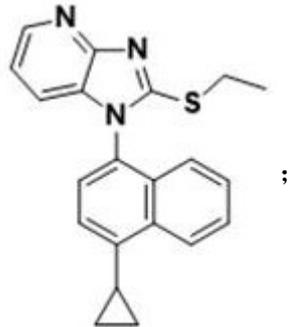


所述痛风药物有关物质包括杂质HY-02、杂质HY-01、杂质HY-07、杂质HY-18;

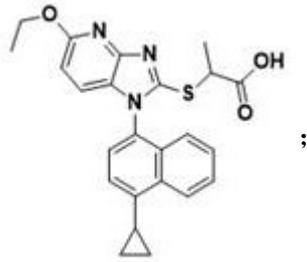
其中,杂质HY-02结构式为:



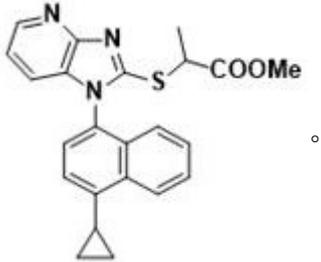
杂质HY-01结构式为:



杂质HY-07结构式为:



杂质HY-18结构式为：



2. 根据权利要求1所述的痛风药物有关物质的高效液相色谱检测方法,其特征在于:包括如下步骤:

1) 供试品溶液制备:

取痛风药物HY-0902供试品,精密称定,加稀释剂超声溶解并定量稀释制成每1ml含0.5mg痛风药物HY-0902供试品的溶液,作为供试品溶液;

2) 对照品溶液制备:

精密移取供试品溶液,加稀释剂稀释1000倍,作为对照品溶液;

3) 分离度溶液制备:

称取12.5mg的HY-02对照品,置10ml量瓶中,加稀释剂溶解并稀释至刻度,摇匀,作为HY-02储备溶液;

称取12.5mg的HY-01对照品,置10ml量瓶中,加稀释剂溶解并稀释至刻度,摇匀,作为HY-01储备溶液;

称取12.5mg的HY-07对照品,置10ml量瓶中,加稀释剂溶解并稀释至刻度,摇匀,作为HY-07储备溶液;

称取12.5mg的HY-18对照品,置10ml量瓶中,加稀释剂溶解并稀释至刻度,摇匀,作为HY-18储备溶液;

分别精密移取HY-01储备溶液、HY-07储备溶液、HY-02储备溶液、HY-18储备溶液各1.0ml置于10ml容量瓶中,加稀释剂至刻度,摇匀,作为杂质混合溶液;

称取25mg痛风药物HY-0902供试品,置50ml量瓶中,加入适量稀释剂超声溶解后,精密加入杂质混合溶液0.3ml,加稀释剂稀释至刻度,摇匀,作为分离度溶液;

4) 检测:

分别精密量取供试品溶液、对照溶液、分离度溶液,注入液相色谱仪,记录色谱图,并分离痛风药物HY-0902及其有关物质。

3. 根据权利要求2所述的痛风药物有关物质的高效液相色谱检测方法,其特征在于:供试品溶液色谱图中,确定所得供试品溶液中如有与有关物质保留时间一致的色谱峰,按外标法以峰面积计算,杂质HY-02、杂质HY-01、杂质HY-07、杂质HY-18,分别按校正后的峰面积

计算,杂质HY-02不得过0.15%,杂质HY-01不得过0.15%,杂质HY-07不得过0.15%,杂质HY-18不得过0.15%,其他单个杂质不得过0.10%,总杂不得过1.0%。

4.根据权利要求2所述的痛风药物有关物质的高效液相色谱检测方法,其特征在于:稀释剂为体积比8:2的乙腈和水的混合液。

痛风药物有关物质的高效液相色谱检测方法

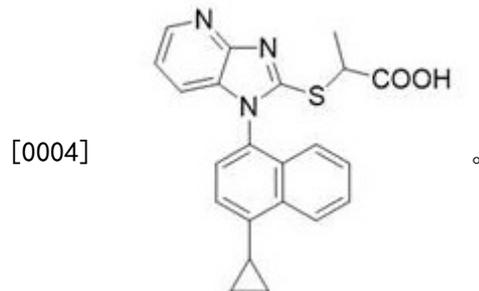
技术领域

[0001] 本发明属于医药检测技术领域,具体涉及痛风药物有关物质的高效液相色谱检测方法。

背景技术

[0002] 痛风是一种由于嘌呤生物合成代谢增加,尿酸产生过多或因尿酸排泄不良而致血中尿酸升高,尿酸盐结晶沉积在关节滑膜、滑囊、软骨及其他组织中引起的反复发作性炎性疾病。随着人们生活水平的提高,高蛋白、高脂肪、高热量食品在饮食结构中的比重逐渐增加,血尿酸升高的人越来越多,其直接后果就是痛风已经开始向更广泛更年轻的人群进军。因此,开发疗效好、安全高的治疗高尿酸血症药物为临床亟需。

[0003] 针对治疗痛风的药物,研发人员在雷西那德的基础上进一步进行结构筛选和优化,通过探索和发现更好的二芳基甲烷主链的结构-活性关系,采用基于配体的骨架跃迁的药物设计,用类嘌呤片段及不同长度的取代基对硫代侧链进行修饰,并通过改变芳香取代基的类型,增加结构的多样性,得到新一代的URAT1抑制剂,即HY-0902。HY-0902是一种安全性更好,毒副作用更低,有效性明确的抗痛风类新型化合物,其具有更好的构效关系和对尿酸转运蛋白1 (URAT1)的抑制作用。其中,痛风药物HY-0902结构式如下:



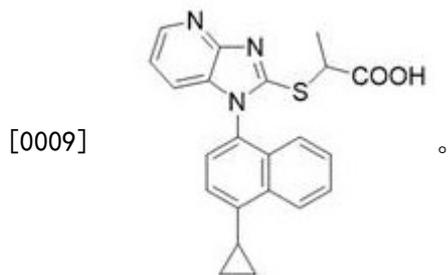
[0005] 为了进一步保证药品质量,防范用药安全,需要对痛风药物HY-0902的相关杂质进行研究,开发一种快速、简单且准确检测痛风药物HY-0902相关杂质的方法。

发明内容

[0006] 本发明要解决的技术问题是:提供一种痛风药物有关物质的高效液相色谱检测方法,方便简洁,灵敏度高,能有效检测痛风药物中的多种杂质,且能根据其响应值准确检测各杂质含量,提高药品的安全性,有效的控制痛风药物的产品质量,为制定痛风药物的质量标准提供依据。

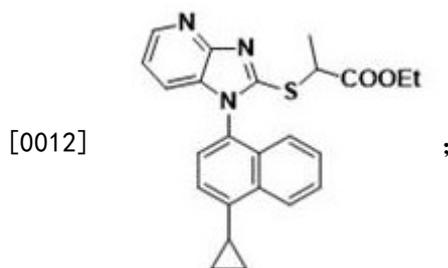
[0007] 本发明所述的痛风药物有关物质的高效液相色谱检测方法,采用高效液相色谱法,色谱柱以十八烷基硅烷键合硅胶为填料,检测波长220nm,柱温40℃,以20mM磷酸氢二钾溶液为流动相A,以乙腈为流动相B,梯度洗脱;

[0008] 所述痛风药物记为HY-0902,结构式如下:

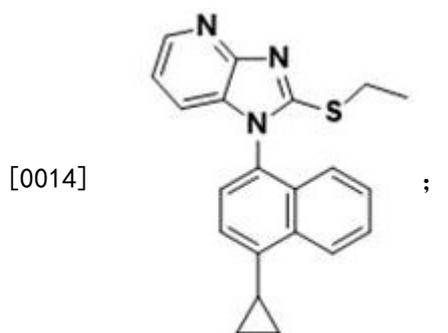


[0010] 所述痛风药物有关物质包括杂质HY-02、杂质HY-01、杂质HY-07、杂质HY-18;

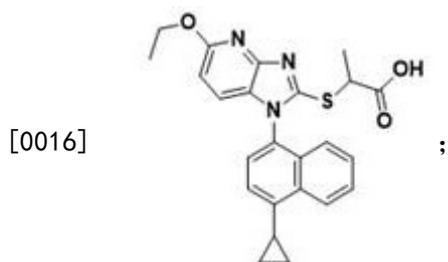
[0011] 其中,杂质HY-02结构式为:



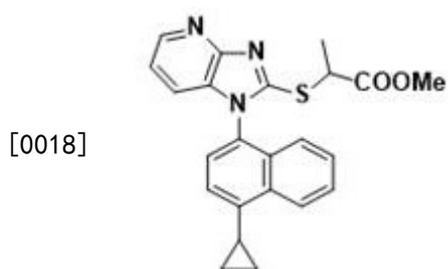
[0013] 杂质HY-01结构式为:



[0015] 杂质HY-07结构式为:



[0017] 杂质HY-18结构式为:



[0019] 优选的,梯度洗脱条件为:

[0020] 第一梯度洗脱时间0min,流动相A占比70%,流动相B占比30%;

- [0021] 第二梯度洗脱时间3min,流动相A占比70%,流动相B占比30%;
- [0022] 第三梯度洗脱时间25min,流动相A占比55%,流动相B占比45%;
- [0023] 第四梯度洗脱时间40min,流动相A占比55%,流动相B占比45%;
- [0024] 第五梯度洗脱时间50min,流动相A占比25%,流动相B占比75%;
- [0025] 第六梯度洗脱时间50.1min,流动相A占比70%,流动相B占比30%;
- [0026] 第七梯度洗脱时间60min,流动相A占比70%,流动相B占比30%。
- [0027] 本发明中,色谱柱为Waters XBridge C₁₈,规格4.6mm×150mm,3.5 μ m。
- [0028] 本发明中,流动相流速为1.0ml/min。
- [0029] 本发明中,进样量为5 μ l。
- [0030] 优选的,所述检测方法包括如下步骤:
- [0031] 1) 供试品溶液制备:
- [0032] 取痛风药物HY-0902供试品,精密称定,加稀释剂超声溶解并定量稀释制成每1ml含0.5mg痛风药物HY-0902供试品的溶液,作为供试品溶液;
- [0033] 2) 对照品溶液制备:
- [0034] 精密移取供试品溶液,加稀释剂稀释1000倍,作为对照品溶液;
- [0035] 3) 分离度溶液制备:
- [0036] 称取12.5mg的HY-02对照品,置10ml量瓶中,加稀释剂溶解并稀释至刻度,摇匀,作为HY-02储备溶液;
- [0037] 称取12.5mg的HY-01对照品,置10ml量瓶中,加稀释剂溶解并稀释至刻度,摇匀,作为HY-01储备溶液;
- [0038] 称取12.5mg的HY-07对照品,置10ml量瓶中,加稀释剂溶解并稀释至刻度,摇匀,作为HY-07储备溶液;
- [0039] 称取12.5mg的HY-18对照品,置10ml量瓶中,加稀释剂溶解并稀释至刻度,摇匀,作为HY-18储备溶液;
- [0040] 分别精密移取HY-01储备溶液、HY-07储备溶液、HY-02储备溶液、HY-18储备溶液各1.0ml置于10ml容量瓶中,加稀释剂至刻度,摇匀,作为杂质混合溶液;
- [0041] 称取25mg痛风药物HY-0902供试品,置50ml量瓶中,加入适量稀释剂超声溶解后,精密加入杂质混合溶液0.3ml,加稀释剂稀释至刻度,摇匀,作为分离度溶液;
- [0042] 4) 检测:
- [0043] 分别精密量取供试品溶液、对照溶液、分离度溶液,注入液相色谱仪,记录色谱图,并分离痛风药物HY-0902及其有关物质(杂质HY-02、杂质HY-01、杂质HY-07、杂质HY-18);
- [0044] 供试品溶液色谱图中,确定所得供试品溶液中如有与有关物质保留时间一致的色谱峰,按外标法以峰面积计算,杂质HY-02、杂质HY-01、杂质HY-07、杂质HY-18,分别按校正后的峰面积计算,杂质HY-02不得过0.15%,杂质HY-01不得过0.15%,杂质HY-07不得过0.15%,杂质HY-18不得过0.15%,其他单个杂质不得过0.10%,总杂不得过1.0%。
- [0045] 优选的,稀释剂为体积比8:2的乙腈和水的混合液。
- [0046] 与现有技术相比,本发明的有益效果如下:
- [0047] 本发明建立了一种用于测定痛风药物HY-0-0902有关物质的高效液相色谱检测方法,方便简洁,灵敏度高,能有效检测痛风药物HY-0902中的多种杂质,且能根据其响应值准

确检测各杂质含量,提高药品的安全性,有效的控制痛风药物HY-0902的产品质量,为制定痛风药物HY-0902的质量标准提供依据。

附图说明

[0048] 图1为对照溶液的HPLC图;

[0049] 图2为检测痛风药物HY-0902中杂质含量的HPLC图。

具体实施方式

[0050] 下面结合实施例对本发明作进一步说明。

[0051] 实施例中所使用的原料,如无特别说明,均为市售常规原料;实施例中所使用的工艺方法,如无特别说明,均为本领域常规方法。

[0052] 在以下实施例中,高效液相色谱条件如下:

[0053] 色谱柱:十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱(Waters XBridge C₁₈,150×4.6mm,3.5μm);

[0054] 检测波长:220nm;

[0055] 柱温:40℃;

[0056] 流速:1.0ml/min;

[0057] 进样量:5μl;

[0058] 流动相:流动相A为20mM磷酸氢二钾水溶液,流动相B为乙腈,梯度洗脱;

[0059] 梯度洗脱条件:

[0060] 第一梯度洗脱时间0min,流动相A占比70%,流动相B占比30%;

[0061] 第二梯度洗脱时间3min,流动相A占比70%,流动相B占比30%;

[0062] 第三梯度洗脱时间25min,流动相A占比55%,流动相B占比45%;

[0063] 第四梯度洗脱时间40min,流动相A占比55%,流动相B占比45%;

[0064] 第五梯度洗脱时间50min,流动相A占比25%,流动相B占比75%;

[0065] 第六梯度洗脱时间50.1min,流动相A占比70%,流动相B占比30%;

[0066] 第七梯度洗脱时间60min,流动相A占比70%,流动相B占比30%。

[0067] 溶液的配制方法如下:

[0068] (1)HY-02储备溶液的配制:

[0069] 精密称取12.5mg的HY-02,置10ml容量瓶中,加稀释剂溶解并稀释至刻度,摇匀,即得;

[0070] (2)HY-01储备溶液的配制:

[0071] 精密称取12.5mg的HY-01,置10ml容量瓶中,加稀释剂溶解并稀释至刻度,摇匀,即得;

[0072] (3)HY-07储备溶液的配制:

[0073] 精密称取12.5mg的HY-07,置10ml容量瓶中,加稀释剂溶解并稀释至刻度,摇匀,即得;

[0074] (4)HY-18储备溶液的配制:

[0075] 精密称取12.5mg的HY-18,置10ml容量瓶中,加稀释剂溶解并稀释至刻度,摇匀,即得;

得；

[0076] (5)分离度溶液的配制：

[0077] 精密称取痛风药物25mg的HY-0902，置50ml容量瓶中，加入适量稀释剂超声溶解后，分别精密加入各杂质储备溶液0.03ml，加稀释剂稀释至刻度，摇匀，即得；

[0078] (6)供试品溶液的配制：

[0079] 精密称取痛风药物HY-090225mg，置50ml容量瓶中，加入稀释剂超声溶解并稀释至刻度，摇匀，即得；

[0080] (7)对照品溶液的配制：

[0081] 精密移取供试品溶液0.1ml，置100ml容量瓶中，加稀释剂稀释至刻度，摇匀，即得。

[0082] 溶液配制时所用稀释剂为体积比8:2的乙腈和水的混合液。

[0083] 检测方法如下：

[0084] (1)取空白溶液(即稀释剂)5 μ l注入液相色谱仪，记录图谱；

[0085] (2)取对照品溶液5 μ l注入液相色谱仪，重复6次，记录图谱，要求6次测定峰面积的RSD \leq 5.0%，各峰保留时间的RSD \leq 1.0%；

[0086] (3)取分离度溶液、供试品溶液各5 μ l注入液相色谱仪，记录图谱，记录峰面积。

[0087] 实施例1

[0088] 系统适用性实验：

[0089] (1)供试品溶液的配制：

[0090] 精密称取痛风药物25mg的HY-0902，置50ml容量瓶中，加入稀释剂超声溶解并稀释至刻度，摇匀，即得。

[0091] (2)对照溶液的配制：

[0092] 精密移取供试品溶液0.1ml，置100ml容量瓶中，加稀释剂稀释至刻度，摇匀，即得。

[0093] (3)将对照溶液按照本发明检测方法进行检测，图1为对照溶液的HPLC图，系统适用性实验测定结果见表1。

[0094] 表1系统适用性测试结果

| | 进样次数 | 保留时间(tR, min) | RSD (%) | 峰面积 A | RSD (%) |
|--------------|------|---------------|---------|-------|---------|
| [0095] 对照品溶液 | 1 | 10.525 | 0.3 | 20924 | 0.4 |
| | 2 | 10.528 | | 21014 | |
| | 3 | 10.520 | | 20806 | |
| | 4 | 10.486 | | 20991 | |
| | 5 | 10.477 | | 20863 | |
| | 6 | 10.455 | | 20954 | |

[0096] 实施例2

[0097] 准确度实验：

[0098] 准确度是通过在供试品中加入各杂质限度浓度的50%、100%、150%三个不同浓度杂质测得的回收率所得。通过加入已知量的杂质，测定加样样品中杂质的含量，再扣除样品中原有杂质含量，所得测定结果和实际加入量之间的比值(回收率)，以百分率(%)表达，要求回收率在80%~120%之间，以证实该方法具有良好的准确度。

[0099] 测试结果见表2-5。

[0100] 表2 HY-02回收率测试结果

| 样品溶液 | 加入量 ($\mu\text{g/ml}$) | 峰面积 | 检测值 ($\mu\text{g/ml}$) | 回收率 (%) | 平均回收率 (%) | RSD (%) |
|------|-----------------------------|-------|-----------------------------|------------|--------------|------------|
| 50% | 0.365 | 15949 | 0.398 | 96.39 | 104.72 | 3.5% |
| | | 15236 | 0.380 | 95.18 | | |
| | | 14709 | 0.367 | 97.59 | | |
| 100% | 0.729 | 29617 | 0.734 | 100.00 | 99.00 | |
| | | 29237 | 0.724 | 99.68 | | |
| | | 28518 | 0.707 | 100.64 | | |
| 150% | 1.094 | 45199 | 1.117 | 100.80 | 100.85 | |
| | | 44332 | 1.096 | 99.20 | | |
| | | 44343 | 1.096 | 99.20 | | |

[0102] 表3 HY-18回收率测试结果

| 样品溶液 | 加入量 ($\mu\text{g/ml}$) | 峰面积 | 检测值 ($\mu\text{g/ml}$) | 回收率 (%) | 平均回收率 (%) | RSD (%) |
|------|-----------------------------|-------|-----------------------------|------------|--------------|------------|
| 50% | 0.378 | 16568 | 0.412 | 108.86 | 106.71 | 3.6% |
| | | 16115 | 0.400 | 105.81 | | |
| | | 16063 | 0.399 | 105.46 | | |
| 100% | 0.756 | 29421 | 0.739 | 97.72 | 98.81 | |
| | | 29824 | 0.749 | 99.07 | | |
| | | 29990 | 0.753 | 99.63 | | |
| 150% | 1.134 | 46381 | 1.171 | 103.22 | 102.34 | |
| | | 45957 | 1.160 | 102.27 | | |
| | | 45620 | 1.151 | 101.51 | | |

[0104] 表4 HY-07回收率测试结果

| 样品溶液 | 加入量 ($\mu\text{g/ml}$) | 峰面积 | 检测值 ($\mu\text{g/ml}$) | 回收率 (%) | 平均回收率 (%) | RSD (%) |
|------|-----------------------------|-------|-----------------------------|------------|--------------|------------|
| 50% | 0.366 | 12547 | 0.355 | 96.98 | 96.46 | 2.3% |
| | | 12608 | 0.357 | 97.46 | | |
| | | 12289 | 0.347 | 94.96 | | |
| 100% | 0.732 | 24660 | 0.702 | 95.91 | 97.34 | |
| | | 24875 | 0.708 | 96.76 | | |
| | | 25535 | 0.727 | 99.34 | | |
| 150% | 1.097 | 38653 | 1.103 | 100.47 | 100.21 | |
| | | 39064 | 1.114 | 101.54 | | |
| | | 37944 | 1.082 | 98.62 | | |

[0106] 表5 HY-01回收率测试结果

| 样品溶液 | 加入量 ($\mu\text{g/ml}$) | 峰面积 | 检测值 ($\mu\text{g/ml}$) | 回收率 (%) | 平均回收率 (%) | RSD (%) |
|------|-----------------------------|-------|-----------------------------|------------|--------------|------------|
| 50% | 0.376 | 19459 | 0.409 | 108.77 | 108.04 | 3.3% |
| | | 19180 | 0.403 | 107.23 | | |
| | | 19339 | 0.407 | 108.11 | | |
| 100% | 0.752 | 35980 | 0.753 | 100.08 | 100.95 | |
| | | 36576 | 0.765 | 101.73 | | |
| | | 36321 | 0.760 | 101.03 | | |
| 150% | 1.128 | 55337 | 1.156 | 102.42 | 101.98 | |
| | | 55085 | 1.150 | 101.95 | | |
| | | 54880 | 1.146 | 101.58 | | |

[0108] 结论:3个浓度下, HY-02回收率在95.18%~100.80%之间, HY-18回收率在97.72%~108.86%之间, HY-07回收率在94.96%~101.54%之间, HY-01回收率在100.08%~108.77%之间, 均符合验证方案要求(80%~120%), 证实了该方法准确度良好。

[0109] 实施例3

[0110] 以主成分自身对照法检测HY-0902(批号:HY-0902-20210301)中杂质含量:

[0111] (1) 供试品溶液的配制:

[0112] 精密称取25mg的HY-0902, 置50ml容量瓶中, 加入稀释剂超声溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得。

[0113] (2) 对照品溶液的配制:

[0114] 精密移取供试品溶液0.1ml, 置100ml容量瓶中, 加稀释剂稀释至刻度, 摇匀, 即得。

[0115] (3) 按照本发明的检测方法进行检测, 结果见表6, 图谱见图2。

[0116] 表6 异构体样品检测结果

[0117]

| 杂质编号 | 峰面积 | 自身对照峰面积 | 含量% |
|-----------|-------|---------|-------|
| RRT-0.898 | 9849 | 20608 | 0.05% |
| RRT-1.144 | 6940 | | 0.03% |
| HY-07 | 31548 | | 0.19% |
| HY-01 | 35980 | | 0.16% |
| HY-18 | 34842 | | 0.17% |
| HY-02 | 35649 | | 0.17% |
| RRT-4.507 | 10608 | | 0.05% |
| RRT-4.653 | 8131 | | 0.04% |

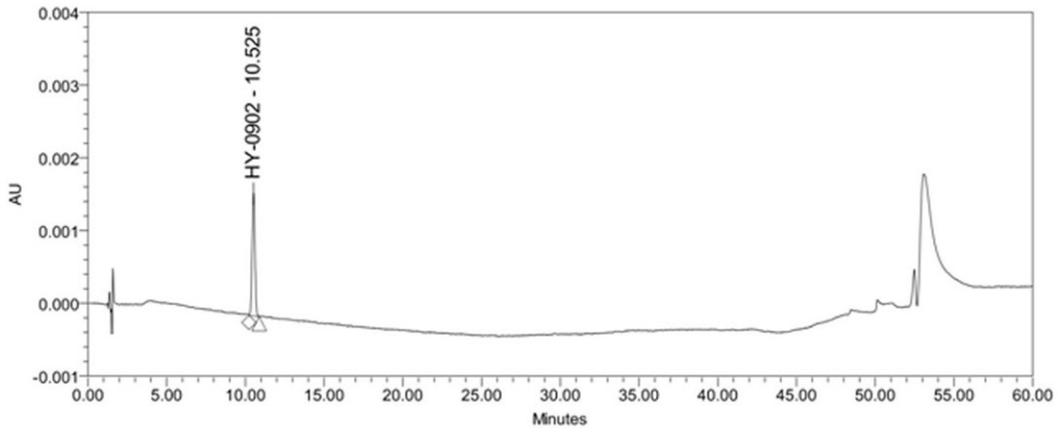


图1

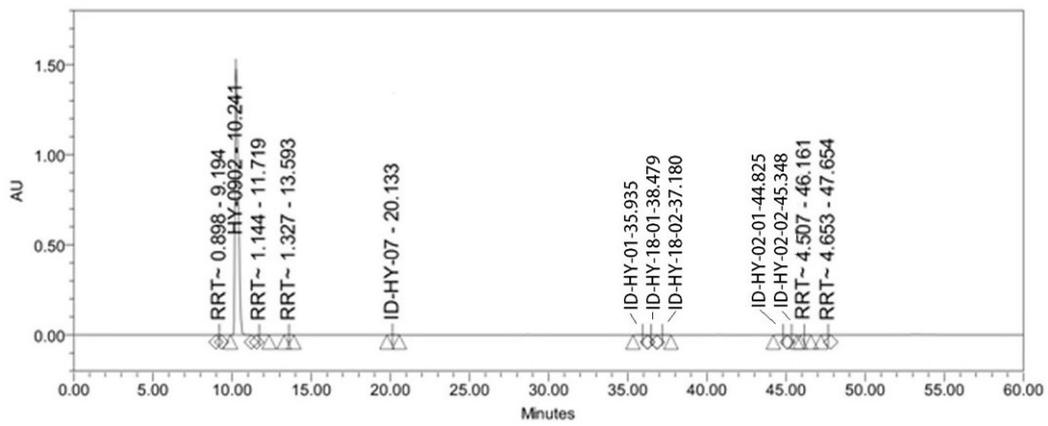


图2