



# (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114660214 B

(45) 授权公告日 2024.04.05

(21) 申请号 202210152353.8

US 2021252111 A1,2021.08.19

(22) 申请日 2022.02.18

WO 2020190757 A1,2020.09.24

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 114660214 A

Merugu Manasa 等.Stability Indicating Method Development and Validation of Semaglutide by RP-HPLC in Pharmaceutical substance and Pharmaceutical

(43) 申请公布日 2022.06.24

Product.Research J. Pharm. and Tech.2021, 第14卷(第03期),第1385-1389页.

(73) 专利权人 兰州积石药业有限公司

地址 730000 甘肃省兰州市榆中县兰州高新技术产业开发区定连园区金科路西  
侧兰州国家生物医药基地4号楼1单元

Jinhua Zhang 等.Efficient synthesis of Aib8-Arg34-GLP-1 (7-37) by liquid-phase fragment condensation.Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society.2022,第28卷(第09期),第e3407页.

(72) 发明人 付信 张凌云 樊淑宏 王宇恩  
马亚平

SUBHA HARIKA PENMETSA 等.METHOD

(74) 专利代理机构 北京市诚辉律师事务所  
11430

专利代理师 范盈 李玉娜

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF RP-UPLC METHOD FOR THE DETERMINATION OF SEMAGLUTIDE IN BULK AND PHARMACEUTICAL

(51) Int.Cl.

G01N 30/34 (2006.01)

G01N 30/74 (2006.01)

DOSAGE FORM.International Journal of Research and Analytical Reviews.2018,第05卷(第04期),第i534-i543页.

(56) 对比文件

CN 109456401 A,2019.03.12

CN 111050750 A,2020.04.21

CN 112912100 A,2021.06.04

审查员 袁琳

权利要求书1页 说明书5页 附图2页

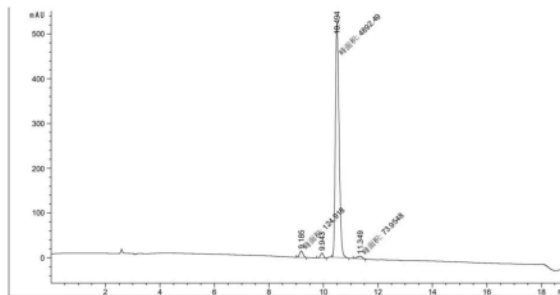
(54) 发明名称

一种司美格鲁肽的液相色谱检测方法及其应用

都比较高,大部分达到1.5。

(57) 摘要

一种司美格鲁肽的液相色谱检测方法及其应用,属于药物化学技术领域。本发明提供一种司美格鲁肽的液相色谱检测方法:以磷酸盐缓冲液作为流动相A,以有机溶剂和水的混合溶液作为流动相B,以单根色谱柱为固定相,检测器为紫外检测器,采用高效液相色谱梯度洗脱司美格鲁肽。还提供了本发明液相色谱检测方法在检测鉴定司美格鲁肽在生产或存放过程中产生的杂质中的应用。本发明方法仅需要使用普通液相色谱,只需要一根色谱柱即可完成司美格鲁肽的液相色谱检测,并且检测的个数不但多而且分离度



CN 114660214 B

1. 一种司美格鲁肽的液相色谱检测方法,其特征在于以磷酸盐缓冲液作为流动相A,以有机试剂和水的混合溶液作为流动相B,以单根色谱柱为固定相,检测器为紫外检测器,采用高效液相色谱梯度洗脱司美格鲁肽;

所述磷酸盐缓冲液包括磷酸三乙胺、磷酸二氢铵、磷酸氢二钾、磷酸氢二钠中的至少一种;

所述有机试剂为乙腈或甲醇;

所述色谱柱包括C18反相色谱柱或C8反相色谱柱;

所述有机试剂和水的混合溶液中有机试剂与水的体积比为7:3~9:1;

所述梯度洗脱的过程中柱温为25~35 °C,流速为0.4~0.8 mL/min;

所述紫外检测器的波长为220 nm;

所述液相色谱检测方法用于检测司美格鲁肽及其中的D-His<sup>1</sup>消旋杂质、Des-Aib<sup>2</sup>缺损杂质、Plus-Gly<sup>4</sup>杂质;

所述梯度洗脱的条件为:

时间 (min)	流动相A比例 (%)	流动相B比例 (%)	曲线 (Curve)
0	60	40	6
5	50	50	6
35	47	53	6
36	60	40	6
46	60	40	6

2. 如权利要求1所述的一种司美格鲁肽的液相色谱检测方法,其特征在于所述色谱柱为C8反相色谱柱。

3. 如权利要求1所述的一种司美格鲁肽的液相色谱检测方法,其特征在于所述色谱柱的填充粒径为3.5~10 μm。

4. 如权利要求1所述的一种司美格鲁肽的液相色谱检测方法,其特征在于所述色谱柱的填充粒径为3.5 μm。

5. 如权利要求1所述的一种司美格鲁肽的液相色谱检测方法,其特征在于,所述磷酸盐缓冲液为磷酸三乙胺,所述有机试剂为乙腈。

6. 如权利要求1所述的一种司美格鲁肽的液相色谱检测方法,其特征在于所述有机试剂和水的混合溶液中有机试剂与水的体积比为8:2。

7. 如权利要求1所述的一种司美格鲁肽的液相色谱检测方法,其特征在于所述梯度洗脱的过程中柱温为30 °C,流速为0.7 mL/min。

8. 如权利要求1-7任一所述的司美格鲁肽的液相色谱检测方法在检测鉴定司美格鲁肽在生产或存放过程中产生的杂质中的应用。

## 一种司美格鲁肽的液相色谱检测方法及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于药物化学技术领域,具体涉及一种司美格鲁肽的液相色谱检测方法及其应用。

### 背景技术

[0002] 司美格鲁肽(Semaglutide,CAS号为900463-68-2)是由诺和诺德公司研制开发的新一代长效GLP-1类似物,用于治疗II型糖尿病,司美格鲁肽除降低血糖之外还有减肥和保护心血管的功效,是目前GLP-1药物中降糖及减肥效果最好的药。

[0003] 多肽在生产和存放过程中,会产生一系列杂质,比如司美格鲁肽在生产和存放过程中就容易产生以下杂质:D-His<sup>1</sup>消旋杂质、Des-Aib<sup>2</sup>缺损杂质、Plus-Gly<sup>4</sup>杂质。这些杂质的存在会危害患者的使用,所以必须建立一种简单快速可行的检测方法来检测司美格鲁肽的质量。

[0004] 目前关于司美格鲁肽检测的公开技术,如CN201910685612公开了一种索玛鲁肽的超高效液相色谱分析方法。但是现有检测方法对仪器设备和色谱柱要求特别高,流动相配置复杂繁琐,并且该检测方法对杂质和主峰以及杂质和杂质之间的分离度都很低。

### 发明内容

[0005] 针对上述现有技术中存在的问题,本发明的目的在于设计提供一种司美格鲁肽的液相色谱检测方法及其应用。本发明针对司美格鲁肽的理化特征,提供了一种分离效果很好、可操作性强同时又对仪器设备和色谱柱要求较低的司美格鲁肽检测方法。

[0006] 为实现上述目的,本发明采取以下技术方案:

[0007] 一种司美格鲁肽的液相色谱检测方法,其特征在于以磷酸盐缓冲液作为流动相A,以有机试剂和水的混合溶液作为流动相B,以单根色谱柱为固定相,检测器为紫外检测器,采用高效液相色谱梯度洗脱司美格鲁肽。

[0008] 所述的一种司美格鲁肽的液相色谱检测方法,其特征在于所述色谱柱包括C18反相色谱柱或C8反相色谱柱,优选C8反相色谱柱。

[0009] 所述的一种司美格鲁肽的液相色谱检测方法,其特征在于所述色谱柱的填充粒径为3.5~10 $\mu\text{m}$ ,优选填充粒径为3.5 $\mu\text{m}$ 。

[0010] 所述的一种司美格鲁肽的液相色谱检测方法,其特征在于所述磷酸盐缓冲液包括磷酸三乙胺、磷酸二氢铵、磷酸氢二钾、磷酸氢二钠中的至少一种,优选磷酸盐缓冲液为磷酸三乙胺,所述流动相B中有机试剂为乙腈、甲醇、乙醇、异丙醇中的至少一种,优选乙腈。

[0011] 所述的一种司美格鲁肽的液相色谱检测方法,其特征在于所述有机试剂和水的混合溶液中有有机试剂与水的体积比为7:3~9:1,所述有机试剂与水的体积比优选为8:2。

[0012] 所述的一种司美格鲁肽的液相色谱检测方法,其特征在于所述流动相B的梯度范围为40~65%。

[0013] 所述的一种司美格鲁肽的液相色谱检测方法,其特征在于所述梯度洗脱的过程中

柱温为25~35℃,优选柱温为30℃,流速为0.4~0.8mL/min,优选流速为0.7mL/min。

[0014] 所述的一种司美格鲁肽的液相色谱检测方法,其特征在于所述紫外检测器的波长为220nm。

[0015] 任一所述的司美格鲁肽的液相色谱检测方法在检测鉴定司美格鲁肽在生产或存放过程中产生的杂质中的应用。

[0016] 所述的应用,其特征在于所述杂质包括D-His<sup>1</sup>消旋杂质、Des-Aib<sup>2</sup>缺损杂质、Plus-Gly<sup>4</sup>杂质。

[0017] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:

[0018] 1、现有技术需要使用超高液相法,本发明方法仅需要使用普通液相色谱。

[0019] 2、现有技术需要使用色谱柱联用,本发明方法只需要一根色谱柱。

[0020] 3、现有技术能检测出的杂质个数有限,且分离度都不高,本方法检测的个数不但多而且分离度都比较高,大部分达到1.5。

### 附图说明

[0021] 图1为实施例1应用本方法检测包含D-His<sup>1</sup>和Plus-Gly<sup>4</sup>两个杂质的司美格鲁肽样品的色谱图;

[0022] 图2为实施例2应用本方法检测包含D-His<sup>1</sup>、Des-Aib<sup>2</sup>和Plus-Gly<sup>4</sup>三个杂质的司美格鲁肽样品的色谱图;

[0023] 图3为对比例1现有方法检测包含D-His<sup>1</sup>和Plus-Gly<sup>4</sup>两个杂质的司美格鲁肽样品的色谱图。

### 具体实施方式

[0024] 为了使本发明的上述目的、特征和优点能够更加明显易懂,下面对本发明的具体实施方式做详细的说明,但不能理解为对本发明的可实施范围的限定。

[0025] 实施例1:

[0026] 色谱条件:

[0027] (a) 仪器:安捷伦1260高效液相色谱仪。

[0028] (b) 色谱柱:安捷伦C18色谱柱,4.6mm×150mm,3.5μm。

[0029] (c) 检测波长:220nm。

[0030] (d) 流速:0.7mL/min。

[0031] (e) 进样量:20μL。

[0032] (f) 柱温:30℃。

[0033] (g) 采集时间:46min。

[0034] (i) 流动相A:50mmol/L磷酸三乙胺(pH4.5);流动相B:甲醇:水=9:1。

[0035] (j) 洗脱条件:如下表1。

[0036] 表1梯度洗脱

时间(min)	流速(mL/min)	流动相 A 比例 (%)	流动相 B 比例 (%)	曲线(Curve)
0	0.7	60	40	6
5	0.7	50	50	6
35	0.7	47	53	6
36	0.7	60	40	6
46	0.7	60	40	6

[0037] 分离效果:如图1和表2所示,分离出3个杂质,且分离度都大于1.5。其中,保留时间为9.185min时分离得到的是D-His<sup>1</sup>消旋杂质,保留时间为11.349min时分离得到的是Plus-Gly<sup>4</sup>杂质。

[0039] 表2实施例1高效液相色谱检测结果

峰	保留时间 [min]	峰宽 [min]	峰面积 [mAU*s]	峰高 [mAU]	分离度	峰面积 %
1	9.185	0.1462	124.91847	14.23745		2.4148
2	9.943	0.1168	81.75460	10.98798	3.49	1.5804
3	10.494	0.158	4892.49316	523.27081	2.48	94.5753
4	11.349	0.2129	73.95485	5.79011	2.82	1.4296

[0041] 实施例2:

[0042] 色谱条件:

[0043] (a) 仪器:安捷伦1260高效液相色谱仪。

[0044] (b) 色谱柱:安捷伦C8色谱柱,4.6mm×150mm,3.5μm。

[0045] (c) 检测波长:220nm。

[0046] (d) 流速:0.7mL/min。

[0047] (e) 进样量:20μL。

[0048] (f) 柱温:30℃。

[0049] (g) 采集时间:46min。

[0050] (i) 流动相A:50mmol/L磷酸三乙胺(pH4.5);流动相B:乙腈:水=8:2。

[0051] (j) 洗脱条件:如下表3。

[0052] 表3梯度洗脱

时间(time)	流速(mL/min)	流动相 A 比例(%)	流动相 B 比例 (%)	曲线(Curve)
0	0.7	60	40	6
5	0.7	50	50	6
35	0.7	47	53	6
36	0.7	60	40	6
46	0.7	60	40	6

[0054] 分离效果:如图2和表4所示,分离出4个杂质,且分离度都大于1.5。其中,保留时间为9.178min时分离得到的是D-His<sup>1</sup>消旋杂质,保留时间为10.557min时分离得到的是Des-Aib<sup>2</sup>缺损杂质,保留时间为12.269min时分离得到的是Plus-Gly<sup>4</sup>杂质。

[0055] 表4实施例2高效液相色谱检测结果

峰	保留时间 [min]	峰宽 [min]	峰面积 [mAU*s]	峰高 [mAU]	分离度	峰面积 %
1	9.178	0.1452	87.57484	10.05207		1.4831
2	9.952	0.1209	40.43988	5.24834	3.47	0.6849
3	10.557	0.1313	139.3465	16.53164	2.78	2.3599
4	11.237	0.2458	5619.29395	380.96915	3.2	95.1659
5	12.269	0.1277	18.08165	2.36006	3.38	0.3062

[0057] 对比例1:

[0058] 色谱条件:

[0059] (a) 仪器:ACQUITY CLASS-H(Wterse)。

[0060] (b) 色谱柱:C8柱和C4柱串联。

[0061] (c) 检测波长:214nm。

[0062] (d) 流速:0.3mL/min。

[0063] (e) 进样量:20 $\mu$ L。

[0064] (f) 柱温:50 $^{\circ}$ C。

[0065] (g) 采集时间:120min。

[0066] (i) 流动相A:10mmol/L高氯酸钠和1mmol/L六氟磷酸钾的混合水溶液,用高氯酸调pH至3.0;流动相B:乙腈。

[0067] (j) 洗脱条件:如下表5。

[0068] 表5梯度洗脱

	时间(time)	流速(mL/min)	流动相 A 比例(%)	流动相 B 比例 (%)	曲线(Curve)
[0069]	0	0.3	65	35	6
[0070]	120	0.3	55	45	6

[0071] 分离效果:如图3和表6所示,分离出3个杂质,且分离度都小于1.5。其中,保留时间为18.759min时分离得到的是D-His<sup>1</sup>消旋杂质,保留时间为20.832min时分离得到的是Des-Aib<sup>2</sup>缺损杂质,保留时间为23.582min时分离得到的是Plus-Gly<sup>4</sup>杂质。

[0072] 表6对比例1高效液相色谱检测结果

	峰	保留时间 [min]	峰宽 [min]	峰面积 [mAU*s]	峰高 [mAU]	分离度	峰面积 %
[0073]	1	18.759	0.5187	157.17046	4.46441		1.3007
	2	19.627	0.4231	1.16331e4	397.92929	0.96	96.2705
	3	20.832	0.3910	180.59525	6.32693	0.91	1.4945
	4	23.582	0.2755	112.89933	6.22790	3.32	0.9343

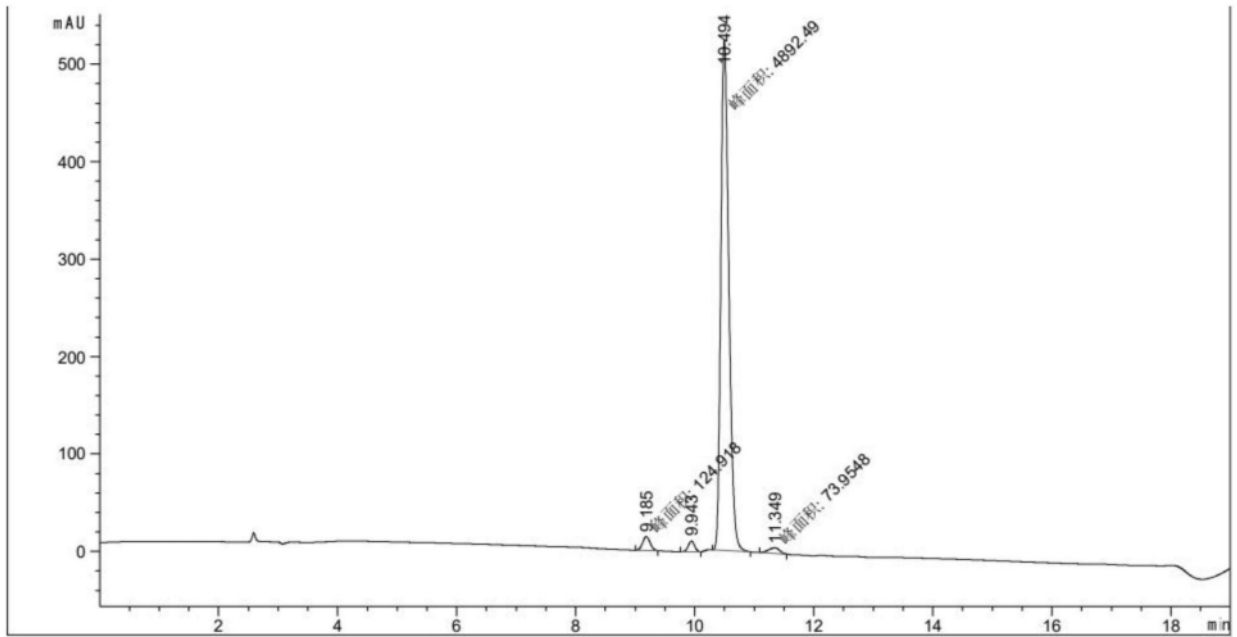


图1

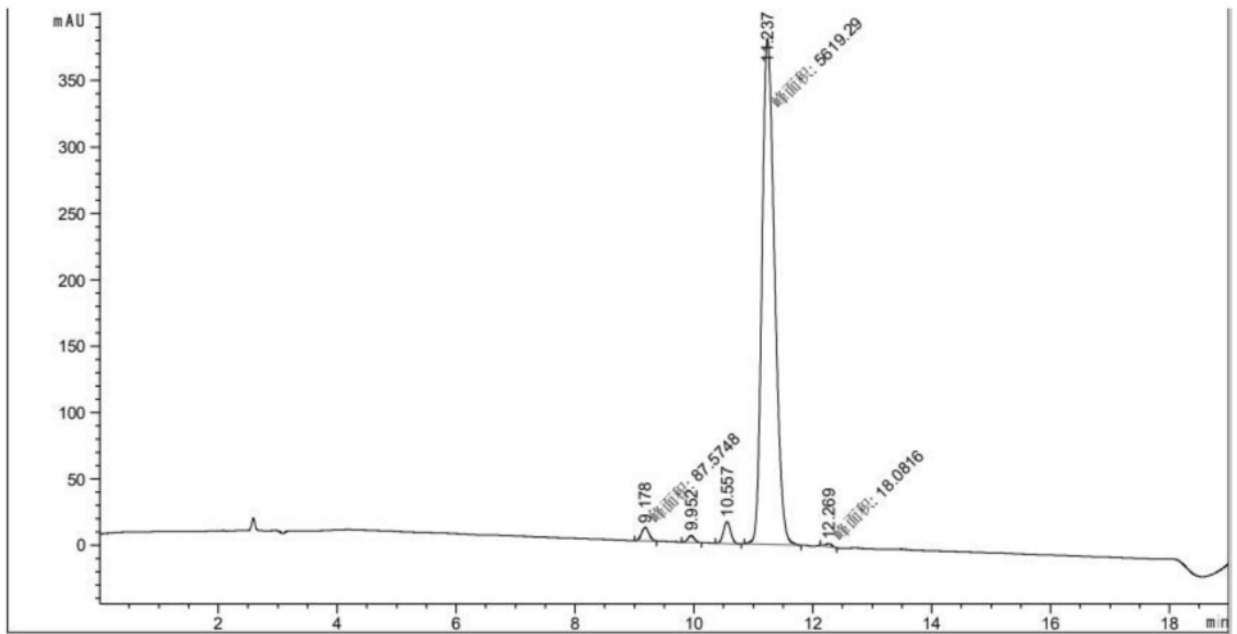


图2



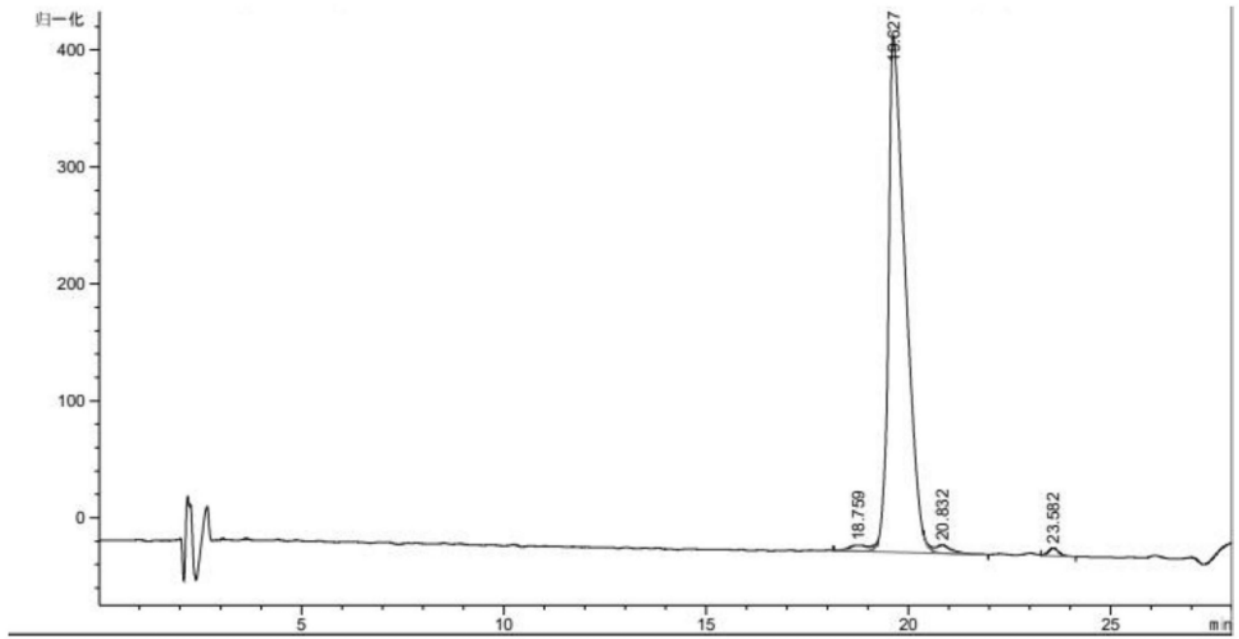


图3