



(21) 申请号 202011172849.9

(22) 申请日 2020.10.28

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112305138 A

(43) 申请公布日 2021.02.02

(73) 专利权人 蚌埠丰原医药科技发展有限公司
地址 233000 安徽省蚌埠市东海大道6288号

(72) 发明人 杨廷 徐正秀 杨科 王军
孟庆前

(74) 专利代理机构 北京睿阳联合知识产权代理有限公司 11758
专利代理师 王莹 郭奥博

(51) Int. Cl.

G01N 30/34 (2006.01)

G01N 30/74 (2006.01)

G01N 30/30 (2006.01)

G01N 30/32 (2006.01)

G01N 30/16 (2006.01)

G01N 30/02 (2006.01)

B01D 15/22 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 102841151 A, 2012.12.26

CN 111505151 A, 2020.08.07

Shams A. Nadhum等. A Modified Version of Generalized Standard Addition Method as Quantitative Determination of Lysineacetyl salicylate-Glycine Complex. 《Journal of Global Pharma Technology》. 2019,

范润珍等. 用高效液相色谱法测定长蛇肌蛋白氨基酸. 《大连水产学院学报》. 2004, 第19卷(第4期),

覃柳琼等. 甘氨酸的反相高效液相色谱分析方法的研究. 《上海化工》. 2011,

赵威等. 高效液相色谱法测定过瘤胃赖氨酸盐. 《中国奶牛》. 2020,

汪秋兰等. 应用亲水作用色谱技术同时测定赖氨酸口服液中两有效成分的含量. 《中国医院药学杂志》. 2017, (第07期),

童颖等. 高效液相色谱法测定复方赖氨酸颗粒中盐酸赖氨酸含量. 《医药导报》. 2018, (第07期),

审查员 高树娟

权利要求书1页 说明书7页 附图2页

(54) 发明名称

一种同时测定赖氨酸和甘氨酸含量的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种同时测定赖氨酸和甘氨酸含量的高效液相色谱检测方法,以含庚烷磺酸钠溶液和乙腈的混合溶液作为流动相,能够准确检测注射用赖氨匹林中赖氨酸和甘氨酸的含量。本发明的方法不仅专属性强,准确度高,重复性、中间精密度、线性和范围、耐用性良好,而且操作简便、快速,节省了检测时间,降低了检测成本,能够更好地应用于注射用赖氨匹林的商业化生产中。

1. 一种同时测定注射用赖氨匹林中赖氨酸和甘氨酸的方法,其特征在于,采用以含庚烷磺酸钠溶液和乙腈的混合溶液作为流动相的高效液相色谱法测定;

其中,与乙腈混合前,所述庚烷磺酸钠溶液的浓度为0.5-0.7g/L,pH为2.5-3.0;

所述高效液相色谱的色谱条件为:以氨基十六烷基硅烷键合硅胶为填充剂,以体积比80:20的所述庚烷磺酸钠溶液:乙腈的混合溶液为流动相;检测波长为205nm-215nm,柱温为30°C-40°C。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述庚烷磺酸钠溶液的浓度为0.6g/L。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述庚烷磺酸钠溶液的pH为2.8。

4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述庚烷磺酸钠溶液的pH采用磷酸调节。

5. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述流动相的洗脱方式为等度洗脱。

6. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述检测波长为212nm。

7. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,柱温为35°C。

8. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述高效液相色谱的色谱条件中,流速为1.0-1.5ml/min,和/或,所述高效液相色谱的色谱条件中,进样体积为10-20 μ l。

9. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于,流速为1.2ml/min。

10. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述测定包括以下步骤:

取含有赖氨酸和甘氨酸的供试品,精密称定,加乙腈溶解并稀释,摇匀,作为供试品溶液,注入液相色谱仪进行测定,记录色谱图;另分别取盐酸赖氨酸、甘氨酸对照品,同法测定;按外标法以峰面积分别计算赖氨酸和甘氨酸的含量,即得;

其中,所述供试品为注射用赖氨匹林。

一种同时测定赖氨酸和甘氨酸含量的方法

技术领域

[0001] 本发明属于化学分析技术领域,具体涉及一种采用高效液相色谱法同时测定药品中赖氨酸和甘氨酸含量的方法及其应用。

背景技术

[0002] 赖氨匹林是赖氨酸和阿司匹林组成的复盐,临床上主要用于发热及轻至中度疼痛的治疗,也用于急性冠状动脉综合征和心肌梗死的治疗。目前,赖氨匹林上市剂型以粉针剂、散剂为主,上市国家主要有欧盟和中国。赖氨匹林对湿、热高度敏感,长期存放易降解产生游离水杨酸,严重危害患者健康,因此在做成制剂过程中通常会加入适量的甘氨酸作为稳定剂,抑制水杨酸的生成,同时起到减轻注射刺激的作用。据药品说明书和文献报道, Sanofi Aventis France生产的注射用赖氨匹林(商品名 **Aspegic[®]**)以及Bayer Vital GmbH生产的注射用赖氨匹林(商品名 **Aspirin[®] i.v.**)中均添加了约10%的甘氨酸。

[0003] 氨基酸的检测方法主要有液相柱前衍生化法、氨基酸分析仪法、电位滴定法、凯氏定氮法等。上述几种方法常用于药品中单个氨基酸含量的检测,操作相对复杂,成本相对较高,而对于药品中含有两种或两种以上氨基酸不适用,容易产生干扰,影响检测的准确度。注射用赖氨匹林中同时含有赖氨酸和甘氨酸两种氨基酸,采用现有检测方法无法实现准确定量。

[0004] 因此,开发一种操作简便且能同时准确定量注射用赖氨匹林中赖氨酸和甘氨酸含量的方法,具有非常重要的意义。

发明内容

[0005] 为了解决上述技术问题,本发明提供一种同时测定赖氨酸和甘氨酸含量的方法。

[0006] 本发明提供一种同时测定赖氨酸和甘氨酸的方法,采用以含庚烷磺酸钠溶液和乙腈的混合溶液作为流动相的高效液相色谱法测定。

[0007] 本发明所述庚烷磺酸钠溶液是指庚烷磺酸钠的水溶液。

[0008] 在一些实施方案中,与乙腈混合前,所述庚烷磺酸钠溶液的浓度为0.5-0.7g/L,优选的浓度为0.6g/L。

[0009] 在一些实施方案中,与乙腈混合前,所述庚烷磺酸钠溶液的pH为2.5-3.0,优选的pH为2.8;进一步优选地,使用磷酸调节所述庚烷磺酸钠溶液的pH。

[0010] 在一些实施方案中,所述庚烷磺酸钠溶液与乙腈以体积比(75-85):(15-25)混合;优选地,所述庚烷磺酸钠溶液与乙腈以体积比80:20混合。

[0011] 在一些实施方案中,所述流动相的洗脱方式为等度洗脱。

[0012] 在一些实施方案中,所述高效液相色谱的色谱条件中,色谱柱以氨基十六烷基硅烷键合硅胶为填充剂。

[0013] 在一些实施方案中,所述高效液相色谱的色谱条件中,检测波长为205nm-215nm,优选地,所述高效液相色谱的检测波长为212nm。

[0014] 在一些实施方案中,所述高效液相色谱的色谱条件中,色谱柱的柱温为30℃-40℃,优选地,所述色谱柱的柱温为35℃。

[0015] 在一些实施方案中,所述高效液相色谱的色谱条件中,流速为1.0-1.5ml/min,优选的流速为1.2ml/min。

[0016] 在一些实施方案中,所述高效液相色谱的色谱条件中,样品的进样体积为10-20 μ l。

[0017] 在一些实施方案中,所述测定包括以下步骤:

[0018] 取含有赖氨酸和甘氨酸的供试品,精密称定,加乙腈溶解并稀释,摇匀,作为供试品溶液,注入液相色谱仪进行测定,记录色谱图;另分别取盐酸赖氨酸、甘氨酸对照品,同法测定;按外标法以峰面积分别计算赖氨酸和甘氨酸的含量,即得。

[0019] 在一些实施方案中,所述供试品或者同时含有赖氨酸和甘氨酸的样品为注射用赖氨匹林。

[0020] 作为优选的技术方案,本发明提供一种采用高效液相色谱法同时测定注射用赖氨匹林中赖氨酸和甘氨酸含量的方法,色谱条件为:以氨基十六烷基硅烷键合硅胶为填充剂,以含庚烷磺酸钠溶液和乙腈(体积比为(75-85):(15-25))的混合溶液为流动相,检测波长为205nm-215nm,柱温为30℃-40℃。

[0021] 作为进一步优选的技术方案,本发明所述的测定方法包括以下步骤:

[0022] 色谱条件与系统适用性试验:以氨基十六烷基硅烷键合硅胶为填充剂,以0.6g/L庚烷磺酸钠溶液(用磷酸调节pH至2.8):乙腈(80:20)为流动相,检测波长为212nm,柱温为35℃,流速为1.2ml/min。理论塔板数分别按赖氨酸和甘氨酸计算,均不低于3000。

[0023] 测定法:取注射用赖氨匹林供试品,精密称定,加65%乙腈溶解并稀释制成每1ml中约含赖氨酸2mg、甘氨酸0.4mg的溶液,摇匀,作为供试品溶液,精密量取20 μ l,注入液相色谱仪,记录色谱图;另分别取盐酸赖氨酸、甘氨酸对照品适量,同法测定。按外标法以峰面积分别计算赖氨酸和甘氨酸的含量,即得。

[0024] 本发明的有益效果如下:

[0025] 本发明提供了一种能够同时准确测定注射用赖氨匹林中赖氨酸、甘氨酸含量的高效液相色谱方法,不仅专属性强,准确度高,重复性、中间精密度、线性和范围、耐用性良好,能同时检测两种氨基酸,且不会产生干扰;而且操作简便、快速,节省了检测时间和成本,对药品注射用赖氨匹林生产过程中的质量控制和成品检验具有非常重要的意义。

附图说明

[0026] 图1:实施例2中赖氨酸含量测定线性图。

[0027] 图2:实施例2中甘氨酸含量测定线性图。

[0028] 图3:实施例7中盐酸赖氨酸对照品溶液色谱图。

[0029] 图4:实施例7中甘氨酸对照品溶液色谱图。

[0030] 图5:实施例7中191205批供试品溶液色谱图。

[0031] 图6:实施例7中GY302批供试品溶液色谱图。

具体实施方式

[0032] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。

[0033] 1. 色谱条件

[0034] 以氨基十六烷基硅烷键合硅胶为填充剂,以0.6g/L庚烷磺酸钠溶液(用磷酸调节pH至2.8):乙腈(80:20)为流动相,检测波长为212nm,柱温为35℃,流速为1.2ml/min。

[0035] 2. 供试品

[0036] 注射用赖氨匹林:规格0.9g(以赖氨匹林计),批号:191205、191206、191207,蚌埠丰原涂山制药有限公司生产。

[0037] 注射用赖氨匹林:规格0.5g(以阿司匹林计),批号:GY302, Sanofi Aventis France生产。

[0038] 3. 对照品

[0039] 盐酸赖氨酸:批号140673-201509,含量99.8%,来自中国食品药品检定研究院。

[0040] 甘氨酸:批号140689-201605,含量100.0%,来自中国食品药品检定研究院。

[0041] 实施例1:系统适用性试验

[0042] 分别取盐酸赖氨酸、甘氨酸对照品适量,精密称定,加65%乙腈溶解并稀释制成每1ml中约含赖氨酸2mg、甘氨酸0.4mg的溶液,摇匀,作为系统适用性溶液。精密量取20 μ l,注入液相色谱仪,连续进样6次,记录色谱图。结果表明,赖氨酸、甘氨酸峰面积及保留时间RSD均小于1.0%;理论塔板数均大于3000,说明本方法系统适用性良好。试验结果见表1。

[0043] 表1系统适用性试验结果

组分名称	比较项目	进样次数						RSD (%)
		1	2	3	4	5	6	
[0044] 赖氨酸	保留时间(min)	32.045	32.421	32.361	31.985	32.129	32.281	0.55
	峰面积	789.33	798.47	797.21	786.69	793.55	794.90	0.58
	理论塔板数	4525.8	4436.1	4626.3	4226.5	4089.9	4248.5	/
甘氨酸	保留时间(min)	11.608	11.527	11.684	11.556	11.594	11.582	0.47
	峰面积	250.64	252.48	251.98	249.70	254.33	249.96	0.71
	理论塔板数	4099.1	4233.8	3920.5	4875.7	4333.6	3927.2	/

[0045] 实施例2:线性试验和范围

[0046] 对照品储备液:分别取盐酸赖氨酸对照品约250mg、甘氨酸对照品约40mg,置于50ml量瓶中,加65%乙腈溶解并稀释至刻度,配制成每1ml中约含赖氨酸4mg、甘氨酸0.8mg的溶液,摇匀。

[0047] 系列线性溶液:精密量取对照品储备液3ml、4ml、5ml、6ml、7ml分别置于10ml量瓶中,加65%乙腈溶解并稀释至刻度,摇匀,分别配制成浓度级别为60%浓度、80%浓度、100%浓度、120%浓度、140%浓度的系列线性溶液。

[0048] 精密量取上述系列线性溶液各20 μ l,注入液相色谱仪,记录色谱图。以进样浓度为x轴,峰面积为y轴,作线性回归。结果表明,赖氨酸在1.1784mg/ml-2.7496mg/ml、甘氨酸在0.2407mg/ml-0.5617mg/ml的浓度范围内线性关系良好。试验结果见表2,线性回归曲线见图1、图2。

[0049] 表2线性试验结果

组分名称	比较项目	浓度级别				
		60%	80%	100%	120%	140%
[0050] 赖氨酸	浓度 (mg/ml)	1.1784	1.5712	1.9640	2.3568	2.7496
	峰面积	450.15	624.39	781.22	935.74	1088.33
	线性方程	$y = 398.05x - 4.8349$ ($R^2 = 0.9997$)				
[0051] 甘氨酸	浓度 (mg/ml)	0.2407	0.3210	0.4012	0.4812	0.5617
	峰面积	155.26	213.74	262.14	316.69	370.11
	线性方程	$y = 659.21x - 0.74$ ($R^2 = 0.9998$)				

[0052] 实施例3:准确度试验

[0053] 对照品溶液:分别取盐酸赖氨酸对照品约125mg、甘氨酸对照品约20mg,置50ml量瓶中,加65%乙腈溶解并稀释制成每1ml中约含赖氨酸2mg、甘氨酸0.4mg的溶液,摇匀。

[0054] 供试品储备液:精密称取注射用赖氨匹林(批号191205)1.0g,置100ml量瓶中,加65%乙腈溶解并稀释至刻度,摇匀。

[0055] 供试品溶液:精密量取供试品储备液2ml,置10ml量瓶中,加65%乙腈溶解并稀释至刻度,摇匀。

[0056] 回收率溶液:精密量取供试品储备液1ml,置10ml量瓶中,精密加入对照品溶液3ml,用65%乙腈溶解并稀释至刻度,摇匀,平行配制3份,作为低浓度回收率溶液。同法配制中浓度、高浓度回收率溶液各3份(仅对照品溶液加入量分别为5ml、7ml,其它不变)。

[0057] 分别取上述对照品溶液、供试品溶液、回收率溶液各20 μ l,注入液相色谱仪,记录色谱图,按外标法计算含量和加样回收率。试验表明,本方法准确度较高。结果见表3。

[0058] 表3回收率试验结果

组分名称	浓度组别	本底量 (mg)	加入量 (mg)	实测量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
[0059] 赖氨酸	低浓度	9.2621	5.9478	15.2312	100.36	99.66	0.54
		9.2621	5.9478	15.2035	99.89		
		9.2621	5.9478	15.2164	100.11		
	中浓度	9.2621	9.9130	19.0817	99.06		
		9.2621	9.9130	19.2013	100.26		
		9.2621	9.9130	19.1090	99.33		
	高浓度	9.2621	13.8782	23.0546	99.38		
		9.2621	13.8782	22.9875	98.90		
		9.2621	13.8782	23.0849	99.60		
[0060] 甘氨酸	低浓度	1.0842	1.2066	2.3012	100.86	99.81	0.65
		1.0842	1.2066	2.2847	99.49		
		1.0842	1.2066	2.2903	99.96		
[0061]	中浓度	1.0842	2.0110	3.0861	99.55		
		1.0842	2.0110	3.1055	100.51		
		1.0842	2.0110	3.0979	100.13		
	高浓度	1.0842	2.8154	3.8804	99.32		
		1.0842	2.8154	3.8925	99.75		
		1.0842	2.8154	3.8630	98.70		

[0061] 实施例4:重复性试验

[0062] 对照品溶液:取准确度试验的对照品溶液。

[0063] 供试品溶液:精密称取注射用赖氨匹林(批号191205)0.1g,置50ml量瓶中,加65%乙腈溶解并稀释至刻度,摇匀。平行配制6份。

[0064] 分别取上述对照品溶液、供试品溶液各20 μ l,注入液相色谱仪,记录色谱图,按外标法计算含量。试验表明,本方法重复性良好。结果见表4。

[0065] 表4重复性试验结果

组分名称	样品含量 (%)						RSD (%)
	样品1	样品2	样品3	样品4	样品5	样品6	
赖氨酸	39.51	39.65	40.13	39.82	39.94	40.09	0.62
甘氨酸	10.45	10.32	10.57	10.29	10.18	10.37	1.31

[0067] 实施例5:中间精密度试验

[0068] 试验由另一位分析人员,使用不同的仪器,在不同时间进行。

[0069] 对照品溶液:取准确度试验的对照品溶液。

[0070] 供试品溶液:精密称取注射用赖氨匹林(批号191205)0.1g,置50ml量瓶中,加65%乙腈溶解并稀释至刻度,摇匀。平行配制6份。

[0071] 分别取上述对照品溶液、供试品溶液各20 μ l,注入液相色谱仪,记录色谱图,按外标法计算含量。与实施例4中重复性试验6次测定结果汇总计算RSD。试验表明,本方法中间精密度良好。结果见表5。

[0072] 表5重复性试验结果

组分名称	分析员 仪器	样品含量 (%)						RSD (%)
		样品1	样品2	样品3	样品4	样品5	样品6	
赖氨酸	分析员A 仪器1	39.51	39.65	40.13	39.82	39.94	40.09	0.72
	分析员B 仪器2	40.11	40.26	39.66	40.19	39.39	39.90	
甘氨酸	分析员A 仪器1	10.45	10.32	10.57	10.29	10.18	10.37	1.36
	分析员B 仪器2	10.07	10.29	10.32	10.44	10.53	10.38	

[0074] 实施例6:耐用性试验

[0075] 试验分别选择柱温30 $^{\circ}$ C、35 $^{\circ}$ C、40 $^{\circ}$ C;流动相体积比例分别为75:25、80:20、85:15;流速分别为1.0ml/min、1.2ml/min、1.4ml/min,其它相应的色谱条件不变。

[0076] 对照品溶液:取准确度试验的对照品溶液。

[0077] 供试品溶液:精密称取注射用赖氨匹林(批号191205)0.1g,置50ml量瓶中,加65%乙腈溶解并稀释至刻度,摇匀。

[0078] 取上述对照品溶液、供试品溶液各20 μ l,注入液相色谱仪,记录色谱图,按外标法计算含量。试验表明,本方法耐用性良好。结果见表6和表7。

[0079] 表6赖氨酸含量测定耐用性试验结果

改变条件	实际值	样品含量 (%)	平均值 (%)	RSD (%)
[0080] 柱温	30°C	39.95	40.26	0.78
		39.88		
	35°C	40.19		
		40.53		
	40°C	40.66		
		40.35		
流动相比例	75:25	39.97	40.09	0.76
		39.85		
	80:20	40.33		
		40.52		
	85:15	39.71		
		40.16		

[0081] 流速	1.0ml/min	40.35	40.72	0.65
		40.89		
	1.2ml/min	41.07		
		40.51		
	1.4ml/min	40.69		
		40.84		

[0082] 表7甘氨酸含量测定耐用性试验结果

改变条件	实际值	样品含量 (%)	平均值 (%)	RSD (%)
[0083] 柱温	30°C	9.97	10.07	1.07
		10.08		
	35°C	10.24		
		10.02		
	40°C	9.96		
		10.13		
流动相比例	75:25	10.44	10.35	1.01
		10.29		
	80:20	10.35		
		10.46		
	85:15	10.18		
		10.39		
流速	1.0ml/min	9.88	10.04	1.27
		10.14		
	1.2ml/min	9.93		
		9.98		
	1.4ml/min	10.21		
		10.07		

[0084] 实施例7:样品测定

[0085] 按照上述高效液相色谱检测方法,分别测定不同厂家批号分别为191205、191206、191207、GY302批注射用赖氨匹林中赖氨酸和甘氨酸的含量,结果见表8。对照品和供试品色谱图见图3-图6。

[0086] 表8样品检测结果

[0087]	样品批号	生产厂家	赖氨酸含量 (%)	甘氨酸含量 (%)
	191205	蚌埠丰原涂山制药有限公司	40.33	9.97
	191206	蚌埠丰原涂山制药有限公司	39.84	10.15

[0088]	191207	蚌埠丰原涂山制药有限公司	40.41	9.90
	GY302	Sanofi Aventis France	40.46	10.22

[0089] 试验表明,本发明的方法能同时准确测定注射用赖氨匹林赖氨酸和甘氨酸含量,专属性强,准确度高,重复性、中间精密度、线性和范围、耐用性良好。本发明的方法操作简便、快速,节省了检测时间和成本,对药品注射用赖氨匹林生产过程中的质量控制和成品检验具有非常重要的意义。

[0090] 比较例1:

[0091] 色谱条件:以氨基十六烷基硅烷键合硅胶为填充剂,以0.6g/L庚烷磺酸钠溶液(用磷酸调节pH至2.8):乙腈(65:35)为流动相,检测波长为212nm,柱温为35℃,流速为1.2ml/min。

[0092] 系统适用性试验:分别取盐酸赖氨酸、甘氨酸对照品适量,精密称定,加65%乙腈溶解并稀释制成每1ml中约含赖氨酸2mg、甘氨酸0.4mg的溶液,摇匀,作为系统适用性溶液。精密量取20 μ l,注入液相色谱仪,连续进样6次,记录色谱图。系统适用性试验结果见表9。

[0093] 表9系统适用性试验结果

组分名称	比较项目	进样次数						RSD (%)
		1	2	3	4	5	6	
[0094] 赖氨酸	保留时间(min)	51.810	51.649	52.774	52.042	51.959	52.917	1.01
	峰面积	808.67	801.22	798.63	802.75	810.86	790.44	0.92
	理论塔板数	2795.5	2878.3	2837.6	2855.7	2772.4	2846.2	/
甘氨酸	保留时间(min)	15.034	14.892	14.933	15.148	15.127	15.276	0.96
	峰面积	256.45	259.66	262.14	255.87	259.23	264.04	1.22
	理论塔板数	2633.5	2741.9	2693.2	2971.4	2866.6	2917.8	/

[0095] 由以上数据可知,将流动相中0.6g/L庚烷磺酸钠溶液(用磷酸调节pH至2.8)和乙腈的体积比调整为65:35时,赖氨酸、甘氨酸峰面积及保留时间的RSD与实施例1相比均有明显升高;赖氨酸峰的保留时间与实施例1相比有明显延长;赖氨酸、甘氨酸峰理论塔板数均低于3000,达不到系统适用性要求。

[0096] 虽然,上文中已经用一般性说明、具体实施方式及试验,对本发明作了详尽描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范畴。

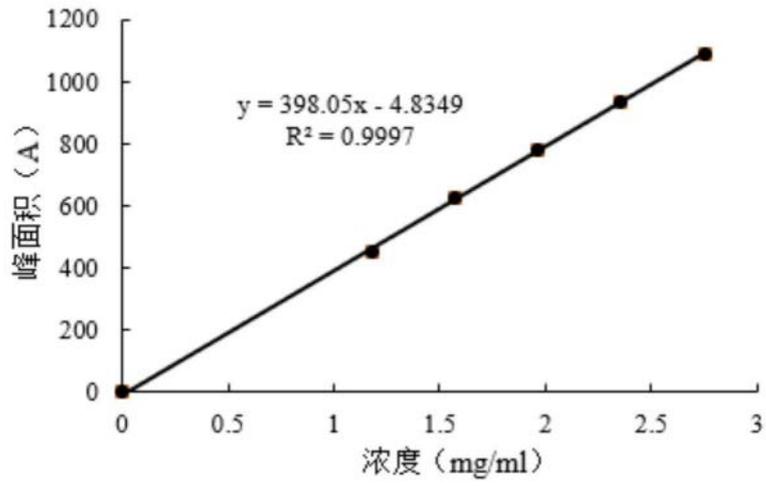


图1

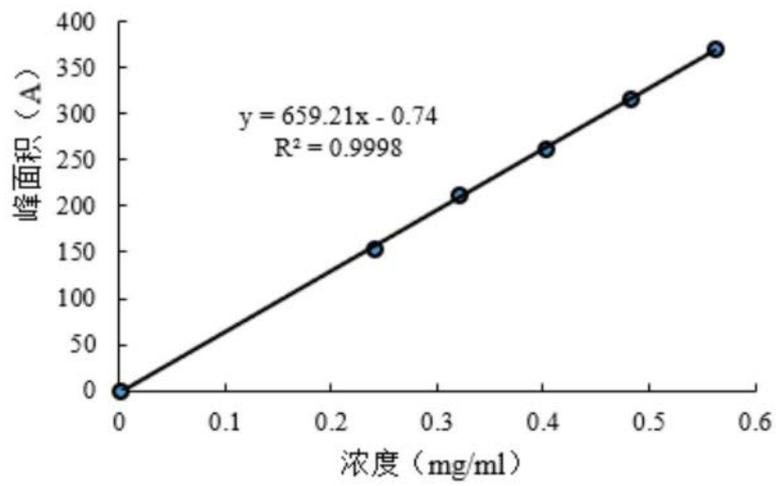


图2

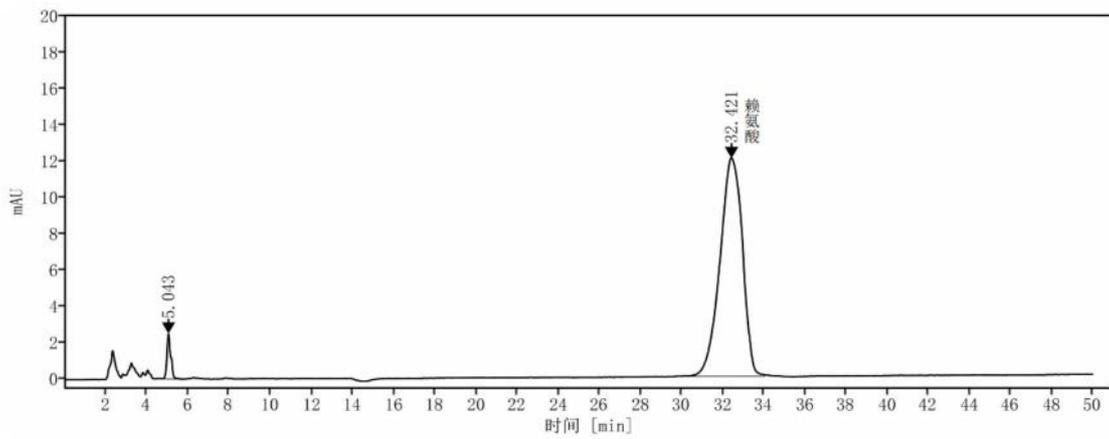


图3

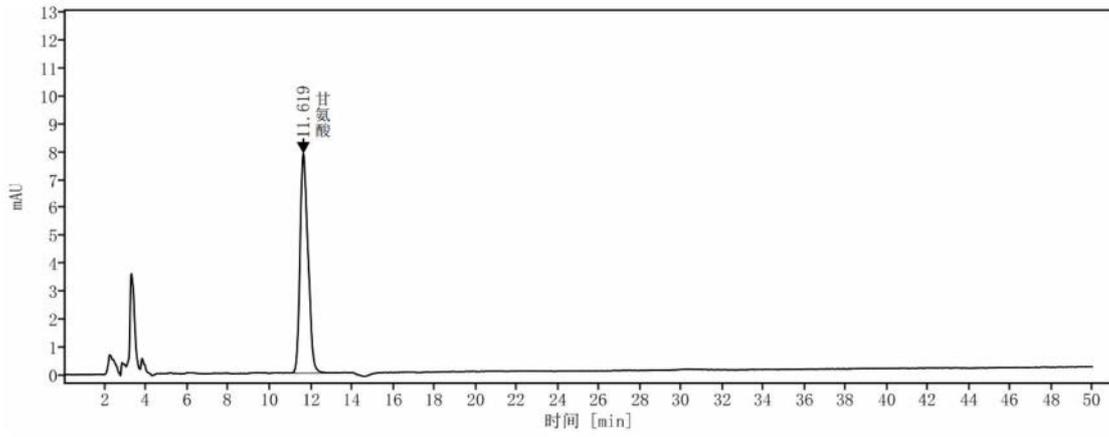


图4

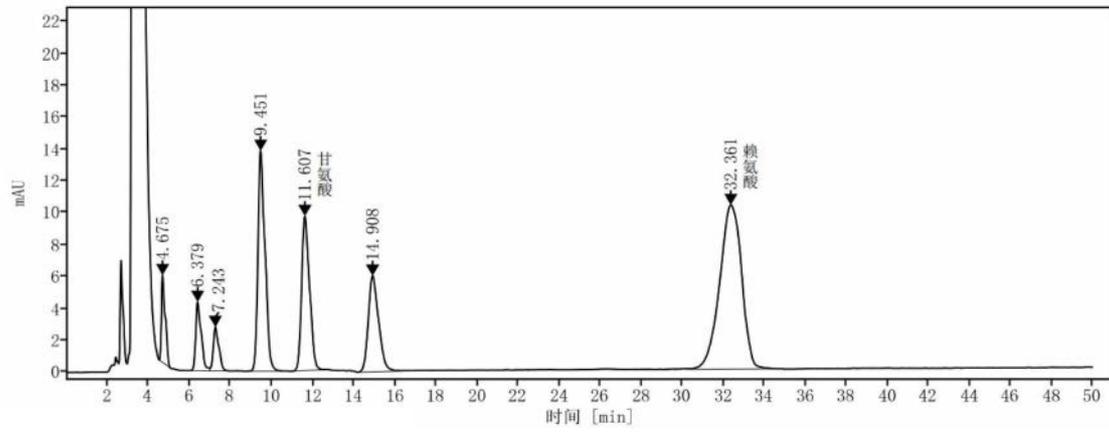


图5

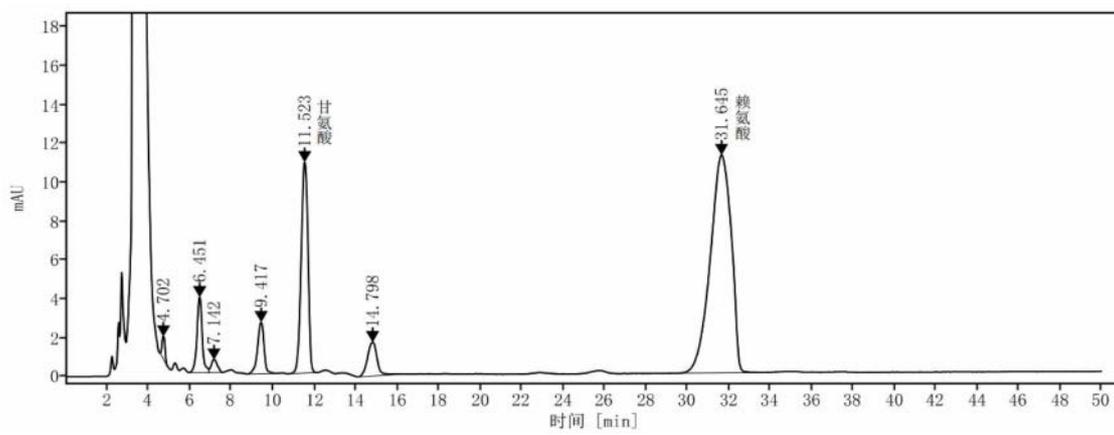


图6