



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113514588 B

(45) 授权公告日 2023.02.10

(21) 申请号 202110614428.5

G01N 30/74 (2006.01)

(22) 申请日 2021.06.02

审查员 吴雨

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 113514588 A

(43) 申请公布日 2021.10.19

(73) 专利权人 原子高科股份有限公司

地址 100089 北京市海淀区厂洼中街66号1
号楼二层南部201室

(72) 发明人 孙钰林 张丛 黄旭虎 秦祥宇

李泽全 孙明月 陈孟毅

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限公司

11002

专利代理师 朱芳

(51) Int. Cl.

G01N 30/06 (2006.01)

权利要求书2页 说明书10页 附图4页

(54) 发明名称

注射用双半胱乙酯有关物质的高效液相色谱分析方法

(57) 摘要

本发明提供一种注射用双半胱乙酯有关物质的高效液相色谱分析方法,高效液相色谱条件包括:采用亲水作用色谱柱,流动相由6~9mM三氟乙酸和乙腈按体积比(30~70):(30~70)组成,检测波长为190~220nm。本发明方法的系统适应性、专属性、精密度、准确性、线性与范围、检测限和定量限及耐用性验证均符合可接受标准,可快速准确对注射用双半胱乙酯的质量进行检测与监控,有利于注射用双半胱乙酯的安全推广与应用,以解决注射用双半胱乙酯尚无有关物质检测方法的问题。

1. 一种注射用双半胱乙酯有关物质的高效液相色谱分析方法,其特征在于,高效液相色谱条件包括:

采用亲水作用色谱柱,流动相由6~9mM 三氟乙酸和乙腈按体积比50:50组成,检测波长为190~220nm;

所述色谱柱以氨基键合硅胶为填充剂,所述注射用双半胱乙酯中的有关物质为缩二脲。

2. 根据权利要求1所述的注射用双半胱乙酯有关物质的高效液相色谱分析方法,其特征在于,所述高效液相色谱条件还包括:

流速为0.8~1.2mL/min,柱温为10~60℃,进样量为5~15μL。

3. 根据权利要求1所述的注射用双半胱乙酯有关物质的高效液相色谱分析方法,其特征在于,所述色谱柱的规格为4.6mm×250mm,5μm。

4. 根据权利要求3所述的注射用双半胱乙酯有关物质的高效液相色谱分析方法,其特征在于,所述色谱柱的规格为Alilent ZORBAX NH₂,4.6×250mm,5μm。

5. 根据权利要求1-4任一项所述的注射用双半胱乙酯有关物质的高效液相色谱分析方法,其特征在于,检测波长为200nm。

6. 根据权利要求1所述的注射用双半胱乙酯有关物质的高效液相色谱分析方法,其特征在于,流速为1.0mL/min,柱温为20~30℃,进样量为10μL。

7. 根据权利要求1所述的注射用双半胱乙酯有关物质的高效液相色谱分析方法,其特征在于,运行时间为8~12min。

8. 根据权利要求7所述的注射用双半胱乙酯有关物质的高效液相色谱分析方法,其特征在于,运行时间为10min。

9. 根据权利要求1所述的注射用双半胱乙酯有关物质的高效液相色谱分析方法,其特征在于,采用由乙腈和水组成的溶剂制备供试品溶液及对照溶液,所述乙腈和水的体积比为(40~60):(40~60)。

10. 根据权利要求9所述的注射用双半胱乙酯有关物质的高效液相色谱分析方法,其特征在于,所述乙腈和水的体积比为50:50。

11. 根据权利要求1所述的注射用双半胱乙酯有关物质的高效液相色谱分析方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 样品制备

供试品溶液的制备:以乙腈和水的体积比为50:50的溶剂,配制含有1mg/mL盐酸双半胱乙酯、40mg/mL尿素的供试品溶液;

对照溶液的制备:以乙腈和水的体积比为50:50的溶剂,取上述供试品溶液适量,配制含有10μg/mL盐酸双半胱乙酯、400μg/mL尿素的对照溶液;

2) 按照所述高效液相色谱条件分别对上述供试品溶液和对照溶液进行检测,按照主成分自身对照法测得有关物质的含量。

12. 根据权利要求8所述的注射用双半胱乙酯有关物质的高效液相色谱分析方法,其特征在于,所述高效液相色谱条件包括:

以Alilent ZORBAX NH₂,4.6×250mm,5μm为色谱柱,以7.5mM三氟乙酸和乙腈按体积比50:50为流动相,检测波长为200nm,流速为1mL/min,柱温为20~30℃,进样量为10μL,运行时

间为10min。

注射用双半胱乙酯有关物质的高效液相色谱分析方法

技术领域

[0001] 本发明实施例涉及药物分析技术领域,具体涉及一种注射用双半胱乙酯有关物质的高效液相色谱分析方法。

背景技术

[0002] 注射用双半胱乙酯属于静脉注射的放射性药物,于1998年批准上市(国药准字H10980145),用于制备锝^[99mTc]双半胱乙酯注射液。锝^[99mTc]双半胱乙酯注射液能穿透血脑屏障,在脑内有固定的分布,脑摄取高,滞留时间长,而且体外稳定,适合临床使用,是理想的脑灌注SPECT显像剂,在临床上用于各种脑血管性疾病(梗塞、出血、短暂性缺血发作等),癫痫和痴呆、脑瘤等疾病的脑血流灌注SPECT显像。

[0003] 注射用双半胱乙酯的主要成分为盐酸双半胱乙酯与尿素,其杂质来源主要从原辅料中引入,尿素在造粒过程中,当温度超过133℃时,尿素发生缩合反应产生缩二脲。氮肥中缩二脲含量较高时,会导致农作物烧苗、烧根,影响作物的生长发育。虽然缩二脲对人体的影响未见报道,但缩二脲的存在会对药品的安全性和有效性产生潜在的风险。

[0004] 注射用双半胱乙酯已上市多年,但中国药典尚未收录,美国、日本和欧洲药典也未收录。其现行质量标准为中华人民共和国卫生部颁标准WS-387(X-333)-97,该标准中没有有关物质检查项。为了保证注射用双半胱乙酯的质量,需要控制注射用亚锡葡庚糖酸钠中的有关物质的含量。因此亟需建立注射用双半胱乙酯有关物质的分析方法。

发明内容

[0005] 针对现有技术的不足,本发明提供一种注射用双半胱乙酯有关物质的高效液相色谱分析方法,该方法通过系统适应性、专属性、精密度、准确性、线性与范围、检测限和定量限及耐用性验证,证实可以有效用于检测注射用双半胱乙酯中的有关物质。

[0006] 本发明提供如下技术方案:

[0007] 一种注射用双半胱乙酯有关物质的高效液相色谱分析方法,高效液相色谱条件包括:

[0008] 采用亲水作用色谱柱,流动相由6~9mM三氟乙酸和乙腈按体积比(30~70):(30~70)组成,检测波长为190~220nm。

[0009] 进一步地,所述高效液相色谱条件还包括:

[0010] 流速为0.8~1.2mL/min,柱温为10~60℃,进样量为5~15μL。

[0011] 进一步地,色谱柱以氨基键合硅胶为填充剂,规格为4.6mm×250mm,5μm;

[0012] 优选为Alilent ZORBAX NH₂,4.6×250mm,5μm。

[0013] 进一步地,流动相由7.5mM三氟乙酸和乙腈按体积比(45~55):(45~55)组成,检测波长为200nm。

[0014] 进一步地,流速为1.0mL/min,柱温为20~30℃,进样量为10μL。

[0015] 进一步地,运行时间为8~12min,优选为10min。

[0016] 进一步地,采用由乙腈和水组成的溶剂制备供试品溶液及对照溶液,所述乙腈和水的体积比为(40~60):(40~60),优选为50:50。

[0017] 具体地,所述注射用双半胱乙酯有关物质的高效液相色谱分析方法包括以下步骤:

[0018] 1) 样品制备

[0019] 供试品溶液的制备:以乙腈和水的体积比为50:50的溶剂,配制含有1mg/mL盐酸双半胱乙酯、40mg/mL尿素的供试品溶液;

[0020] 对照溶液的制备:以乙腈和水的体积比为50:50的溶剂,取上述供试品溶液适量,配制含有10 μ g/mL盐酸双半胱乙酯、400 μ g/mL尿素的对照溶液;

[0021] 2) 按照所述高效液相色谱条件对上述供试品溶液和对照溶液进行检测,按照主成分自身对照法测得有关物质的含量。

[0022] 进一步地,所述高效液相色谱条件包括:

[0023] 以Alilent ZORBAX NH₂,4.6 \times 250mm,5 μ m为色谱柱,以7.5mM三氟乙酸和乙腈按体积比(45~55):(45~55)为流动相,检测波长为200nm,流速为1mL/min,柱温为20~30 $^{\circ}$ C,进样量为10 μ L,运行时间为10min。

[0024] 进一步地,所述有关杂质为缩二脲。

[0025] 本发明实施例具有如下优点:

[0026] 本发明采用特定的高效液相色谱条件能够有效分离注射用双半胱乙酯中的有关杂质(缩二脲),该方法的系统适应性、专属性、精密度、准确性、线性与范围、检测限和定量限及耐用性验证均符合可接受标准,可快速准确对注射用双半胱乙酯的质量进行检测与监控,有利于注射用双半胱乙酯的安全推广与应用。

附图说明

[0027] 图1为实施例1对照溶液第1针的色谱图。

[0028] 图2为实施例2空白溶液的色谱图。

[0029] 图3为实施例2供试品溶液的色谱图。

[0030] 图4为实施例2盐酸双半胱乙酯定位溶液的色谱图。

[0031] 图5为实施例2缩二脲定位溶液的色谱图。

[0032] 图6为实施例5线性回归结果图。

[0033] 图7为实施例8市售注射用双半胱乙酯的色谱图。

[0034] 图8为对比例1供试品溶液的色谱图。

[0035] 图9为对比例2供试品溶液的色谱图。

[0036] 图10为对比例3供试品溶液的色谱图。

具体实施方式

[0037] 以下实施例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。实施例中未注明具体技术或条件者,按照本领域内的文献所描述的技术或条件,或者按照产品说明书进行。

[0038] 本发明中,所用仪器等未注明生产厂商者,均为可通过正规渠道商购买得到的常规产品。本发明中所用的原料均可在国内产品市场方便买到。

- [0039] 本发明所用仪器与试剂如下：
- [0040] Waters QSM-R高效液相色谱仪，配有紫外检测器。
- [0041] 盐酸双半胱乙酯购自德国ABX公司；尿素购自湖南芙蓉制药有限公司；注射用双半胱乙酯为公司自制，含0.5mg盐酸双半胱乙酯和20mg尿素；缩二脲对照品、三氟乙酸、乙腈（色谱级）购自国药化学集团有限公司。
- [0042] 本发明所用分析方法为：
- [0043] 色谱柱：Alilent ZORBAX NH₂，4.6×250mm，5μm。
- [0044] 流动相：7.5mM三氟乙酸：乙腈=50：50（v/v），其中，7.5mM三氟乙酸的配制方法：量取1000mL水，加入0.855g三氟乙酸，超声脱气即可。
- [0045] 检测波长：200nm。
- [0046] 流速：1mL/min。
- [0047] 进样体积：10μL。
- [0048] 柱温：25℃。
- [0049] 运行时间：10min。
- [0050] 溶剂的制备：水：乙腈=50：50（v/v）。
- [0051] 空白溶液的制备：水：乙腈=50：50（v/v）。
- [0052] 空白辅料溶液的制备：量取尿素20mg，精密加10mL溶剂，摇匀，得空白辅料溶液。
- [0053] 供试品溶液的制备：称取0.5mg盐酸双半胱乙酯和20mg尿素，精密加0.5mL溶剂，充分摇匀，得供试品溶液。
- [0054] 对照溶液的制备：精密量取供试品溶液0.5mL，置50mL量瓶中，用溶剂稀释定容至刻度，摇匀，得对照溶液。
- [0055] 盐酸双半胱乙酯定位溶液的制备：称取盐酸双半胱乙酯1mg，精密加1mL溶剂，摇匀，即得。
- [0056] 缩二脲定位溶液的制备：称取缩二脲对照品1mg，精密加10mL溶剂，摇匀，即得。
- [0057] 按照上述确定的色谱分析方法，待基线平衡后，取溶液进样1针，取对照溶液连续进样3针，记录色谱图及对照溶液第1针盐酸双半胱乙酯的理论塔板数，计算3针盐酸双半胱乙酯峰面积的RSD。
- [0058] 可接受标准：对照溶液第1针盐酸双半胱乙酯的理论塔板数不得低于3000，对照溶液重复进样3针盐酸双半胱乙酯峰面积的RSD不大于4.0%。
- [0059] 取对照溶液进样1针，取供试品溶液进样1针，记录色谱图。按照以下公式计算各杂质的百分比：
- [0060] 单杂% = $A_x/A_s \times 1.0\%$
- [0061] 总杂% = $\Sigma A_x/A_s \times 1.0\%$
- [0062] 式中： A_x ：供试品溶液中杂质的峰面积；
- [0063] A_s ：对照溶液中盐酸双半胱乙酯、尿素和各杂质的峰面积之和；
- [0064] 1.0%：对照溶液与供试品溶液浓度比值。
- [0065] 分析方法的验证
- [0066] 本次验证项目包括：系统适应性、专属性、精密度、准确性、线性与范围、检测限和定量限及耐用性，验证结果见表1。

[0067] 表1有关物质分析方法验证结果

验证项目		验证结果	可接受标准
[0068]	系统适应性	对照溶液第 1 针盐酸双半胱乙酯的	≥ 3000
验证项目		验证结果	可接受标准
		理论塔板数为 14837	
		对照溶液重复进样 3 针, 盐酸双半胱乙酯峰面积的相对标准偏差 (RSD) 为 2.6%	$\leq 4.0\%$
专属性	空白干扰试验	空白溶液在盐酸双半胱乙酯相应的保留时间处无干扰; 空白辅料溶液在盐酸双半胱乙酯相应的保留时间干扰为 0.07%	空白溶液和空白辅料溶液在盐酸双半胱乙酯相应的保留时间干扰 $\leq 0.1\%$
		供试品溶液中盐酸双半胱乙酯色谱峰与相邻的杂质峰的分离度为 17.4	主峰与相邻的杂质峰的分离度 ≥ 1.5
精密程度	重复性	盐酸双半胱乙酯峰面积的 RSD 为 1.3% (n=6)	$\leq 4.0\%$
	中间紧密度	2 人所得盐酸双半胱乙酯峰面积的 RSD 为 1.2% (n=6)	$\leq 4.0\%$
准确性		各浓度下盐酸双半胱乙酯回收率在 77.1%-118.7%, RSD=8.3% (n=9)	回收率应在 75%-120%, RSD ≤ 10
线性和范围		线性范围 1.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~1050 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (即限度浓度水平为 0.1~100%), $r=0.9998$	$r\geq 0.990$
检测限		检测限浓度为供试品溶液浓度的 0.075%	--
定量限		检测限浓度为供试品溶液浓度的 0.2%	定量限不大于鉴定限度, 即供试品溶液浓度的 1.0%
耐用性		对照溶液盐酸双半胱乙酯理论塔板数均不低于 1000, 各杂质峰与主峰	对照溶液盐酸双半胱乙酯理论塔板数均不低于 1000, 各杂质峰

	验证项目	验证结果	可接受标准
[0070]		的分离度均不小于 1.5	与主峰的分离度均不小于 1.5

[0071] 实施例1:系统适应性

[0072] 按分析方法配制溶剂和对照溶液,依分析方法进行色谱试验。待基线平衡后,取溶剂进样1针,取对照溶液连续进样3针,记录色谱图及对照溶液第1针盐酸双半胱乙酯的理论塔板数,计算3针盐酸双半胱乙酯峰面积的RSD。

[0073] 各项测量标准要求为:对照溶液第1针盐酸双半胱乙酯的理论塔板数不得低于3000,对照溶液重复进样3针盐酸双半胱乙酯峰面积的RSD不大于4.0%。对照溶液第1针的色谱图见图1。

[0074] 表2有关物质分析方法系统适应性验证结果

	名称	主峰面积	RSD	第1针主峰理论塔板数
[0075]	对照溶液连续进样3针	36411	2.6%	14837
		34586		
		35896		

[0076] 由表2可知:对照溶液第1针色谱图中盐酸双半胱乙酯的理论塔板数为14837(≥ 3000);对照溶液重复进样3针,盐酸双半胱乙酯峰面积的RSD为2.6% ($\leq 4.0\%$),符合接受标准,系统适应性良好。

[0077] 实施例2:专属性

[0078] 取空白溶液、空白辅料溶液、供试品溶液、盐酸双半胱乙酯定位溶液、缩二脲定位溶液,按“分析方法”项下的色谱条件试验,各进1针,记录色谱图。空白溶液色谱图见图2;供试品溶液色谱图见图3;盐酸双半胱乙酯定位溶液色谱图见图4;缩二脲定位溶液色谱图见图5。

[0079] 各项测量标准要求为:在供试品溶液盐酸双半胱乙酯保留时间处,空白溶液及空白辅料溶液干扰 $\leq 0.1\%$ 。供试品溶液色谱图中盐酸双半胱乙酯峰与相邻的杂质峰的分离度不小于1.5。

[0080] 在盐酸双半胱乙酯相应的保留时间处,空白溶液和空白辅料溶液无干扰。供试品溶液色谱图中主峰与相邻的杂质峰的分离度为17.4(不小于1.5),符合可接受标准。

[0081] 实施例3:精密度

[0082] (1) 重复性

[0083] 由一位检验员独立操作。称取1mg盐酸双半胱乙酯和40mg尿素,加入1mL溶剂,按“分析方法”项下的色谱条件进行测定,平行测样6次,记录色谱图,计算峰面积测量值的RSD。

[0084] 各项测量标准要求为:6次测试结果的RSD不大于4.0%。

[0085] 表3有关物质分析方法验证--精密度--重复性

名称	峰面积测量值	平均值	RSD
样品 1	3457763	3463740	1.3%
样品 2	3448689		
样品 3	3433108		
样品 4	3420578		
样品 5	3468520		
样品 6	3553786		

[0087] 由表3可知:注射用双半胱乙酯有关物质测定重复性测定的RSD值为1.3%,重复性结果符合可接受标准的规定。

[0088] (2) 中间精密度

[0089] 由两位检验员使用不同滴定器具进行操作。称取1mg盐酸双半胱乙酯和40mg尿素,加入1mL溶剂,按分析方法的色谱条件进行测定,两位检验员分别平行测样3次,记录色谱图,计算峰面积测量值的RSD。

[0090] 各项测量标准要求为:6次测试结果的RSD不大于4.0%。

[0091] 表4有关物质分析方法验证--精密度--中间精密度

名称	峰面积测量值	平均值	RSD
样品 1	3420578	3477364	1.2%
样品 2	3468520		
样品 3	3553786		
样品 4	3456918		
样品 5	3466706		
样品 6	3497681		

[0093] 由表4可知:注射用双半胱乙酯有关物质测定中间精密度测定的RSD值为1.2%,中间精密度结果符合可接受标准的规定。

[0094] 实施例4:准确性

[0095] 准确性溶液的制备:取盐酸双半胱乙酯5mg,精密称定,置10mL量瓶中,加溶剂溶解并稀释至刻度,摇匀。精密量取上述溶液0.8mL、1mL、1.2mL,分别置于已经加有20mg尿素的100mL量瓶中,加溶剂溶解并稀释至刻度,摇匀,作为准确性溶液。平行配制3份。

[0096] 对照品溶液的制备:取盐酸双半胱乙酯5mg,精密称定,置10mL量瓶中,加溶剂溶解并稀释至刻度,摇匀,精密量取上述溶液1mL,置于已经加有20mg尿素的100mL量瓶中,加溶剂溶解并稀释至刻度,摇匀。

[0097] 按分析方法的色谱条件取对照品溶液进样2针,计算平均峰面积。分别取3种浓度

准确性溶液,每种浓度进样3针,计算9份准确性溶液中盐酸双半胱乙酯回收率,并报告实测值、回收率、平均回收率及RSD值。

$$[0098] \quad \text{回收率}(\%) = A_s \times W_u \times D_s / A_u \times W_s \times D_u \times 100\%$$

[0099] 式中:

[0100] A_s :准确性溶液中盐酸双半胱乙酯峰面积;

[0101] A_u :对照品溶液中盐酸双半胱乙酯峰面积;

[0102] W_s :准确性溶液中盐酸双半胱乙酯的称样量;

[0103] W_u :对照品溶液中盐酸双半胱乙酯的称样量;

[0104] D_s :准确性溶液稀释因子;

[0105] D_u :对照品溶液稀释因子;

[0106] 各项测量标准要求为:各浓度下盐酸双半胱乙酯回收率应在75%-120%,RSD≤10。

[0107] 表5有关物质分析方法验证--线性及范围--溶液配制及结果

样品名	样品号	加入量 (mg)	实测量 (mg)	回收率 (%)	平均回收 率(%)	RSD(%)
[0108] 盐酸双半 胱乙酯+ 尿素	1	0.224	0.266	118.7%	110.8%	8.3%
	2	0.224	0.229	102.2%		
	3	0.224	0.250	111.6%		
	4	0.280	0.300	107.1%	103.4%	
	5	0.280	0.249	88.9%		
	6	0.280	0.320	114.2%		
	7	0.336	0.274	81.5%	81.2%	
	8	0.336	0.286	85.1%		
	9	036	059	77.1%		

[0109] 由表5可知:各浓度下盐酸双半胱乙酯回收率在75%-120%,RSD≤10,分析准确性符合可接受标准的规定。

[0110] 实施例5:线性和范围

[0111] 线性母液的制备:取盐酸双半胱乙酯10mg,精密称定,置10mL量瓶中,加溶剂溶解并稀释至刻度,得浓度为1mg/mL的线性母液。

[0112] 线性储备液的制备:精密量取线性母液5mL于50mL量瓶中,加溶剂稀释至刻度,得浓度为0.1mg/mL的线性储备液。

[0113] 线性溶液的制备:分别精密量取线性储备液0.5mL、2.5mL、1mL、5mL于50mL、50mL、10mL、10mL量瓶中,加溶剂稀释至刻度,摇匀,即得到0.1%、0.5%、1.0%、5.0%的线性溶液;线性储备液为10.0%线性溶液;分别精密量取线性母液2.0mL、5.0mL于10mL、10mL量瓶

中,加溶剂稀释至刻度,摇匀,即得到20%、50%的线性溶液;线性母液为100.0%线性溶液。即得到0.1%、0.5%、1.0%、5.0%、10.0%、20%、50%、100%的线性溶液。

[0114] 按分析方法的色谱条件分别取上述线性溶液,各进样1针,记录色谱图中盐酸双半胱乙酯的峰面积。以峰面积对盐酸双半胱乙酯浓度进行线性回归,计算线性相关系数 r 和 Y 轴截距、斜率。

[0115] 各项测量标准要求为:相关系数 $r \geq 0.990$ 。

[0116] 表6有关物质分析方法验证--线性及范围--溶液配制及结果

浓度水平 (%)	实际浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	峰面积平均值
0.1	1.05	11566
0.5	5.25	22142
1.0	10.5	45247
5.0	52.5	87365
10.0	105	389799
20.0	210	756987
50.0	525	1778875
100.0	1050	3616295

[0118] 有关物质分析方法验证--线性及范围--线性回归结果见图7。

[0119] 由表6和图6可知:以所测结果主峰面积值 Y 对盐酸双半胱乙酯实际浓度 X 作线性回归,线性回归方程为 $y = 3422.4x + 13586$,相关系数为 $r = 0.9998$,符合接受标准规定。结果表明,本有关物质测定方法在 $1.05\mu\text{g}/\text{mL} \sim 1050\mu\text{g}/\text{mL}$ (即限度0.1%~100%)范围内溶液浓度与主峰面积呈良好的线性关系,线性范围符合标准规定。

[0120] 实施例6:定量限和检测限

[0121] 溶液的制备:精密称取尿素10mg,置100mL量瓶中,加溶剂稀释至刻度,再分别精密量取上述稀释液1.5mL、4mL至10mL、10mL量瓶中,得到最终浓度相当于正常测定供试品溶液浓度0.075%、0.2%。

[0122] 取上述溶液,按分析方法的色谱条件分别进样3针,记录主峰的峰面积和信噪比(S/N)。

[0123] 各项测量标准要求为:检测限的信噪比(S/N)约等于3;定量限的信噪比(S/N)约等于10,定量限不大于鉴定限度,即相当于正常测定供试品溶液主峰浓度的1%。

[0124] 表7有关物质分析方法验证--检测限和定量限结果

LOD (检测限)				LOQ (定量限)			
浓度 (供试品)	主峰面积	信噪比	平均信噪比	浓度 (供试品)	主峰面积	信噪比	平均信噪比
0.15%	8805	2.7	3.6	0.4%	25301	9.7	10.8
	10439	5.0			26769	11.3	
	8305	3.1			26628	11.4	

[0126] 由表7可知:检测限浓度为供试品溶液浓度的0.075%,检测限浓度为供试品溶液浓度的0.2%,小于鉴定限度1%。

[0127] 实施例7:耐用性

[0128] 除按下列部分改变的条件外,其余按分析方法的色谱条件进样1针,记录色谱图。

[0129] A改变色谱柱温度:柱温分别为20℃、25℃、30℃。

[0130] B改变流动相比比例:流动相比比例分别如下:

[0131] 7.5mM三氟乙酸:乙腈=45:55 (v/v)

[0132] 7.5mM三氟乙酸:乙腈=50:50 (v/v)

[0133] 7.5mM三氟乙酸:乙腈=55:45 (v/v)

[0134] C改变流速:流速分别为0.8mL/min、1.0mL/min、1.2mL/min。

[0135] 各项测量标准要求为:各色谱条件下,供试品溶液盐酸双半胱乙酯理论塔板数均不低于3000,主峰与相邻杂质峰最小分离度不小于1.5。

[0136] 表8有关物质分析方法验证--耐用性结果

改变色谱条件	参数	供试品溶液	
		理论塔板数	最小分离度
温度	20℃	6138	12.3
	25℃	6205	12.5
	30℃	6369	12.4
[0137] 流动相比比例	7.5mM 三氟乙酸: 乙腈=45: 55	6159	11.8
	7.5mM 三氟乙酸: 乙腈=50: 50	6205	12.5
	7.5mM 三氟乙酸: 乙腈=55: 45	7028	11.8
流速	0.8mL/min	6945	13.2
	1.0mL/min	6205	12.5
	1.2mL/min	6757	12.7

[0138] 由表8可知:各色谱条件下,供试品溶液盐酸双半胱乙酯理论塔板数均不低于3000,主峰与相邻杂质峰最小分离度不小于1.5。结果表明该方法色谱条件的柱温在20~30℃范围内,流动相(7.5mM三氟乙酸:乙腈)比例在(45~55):(45~55)范围内,流速在0.8~1.2mL/min范围内耐用性良好。

[0139] 综上所述:该方法系统适应性符合可接受标准,满足检验要求;专属性良好,无溶剂及辅料干扰;检测限为供试品溶液浓度的0.075%,检测限浓度为供试品溶液浓度的0.2%;在浓度范围1.05μg/mL~1050μg/mL(即限度0.1%~100%)内,溶液浓度与峰面积间有良好的线性关系;精密度和耐用性良好。该方法在给定的条件下,能准确测定注射用双半胱乙酯的有关物质,适用于本品有关物质检测。

[0140] 实施例8

[0141] 取市售注射用双半胱乙酯,按本发明中的分析方法进行有关物质检测,色谱图见图7。

[0142] 实验结果:

[0143] 表9市售注射用双半胱乙酯有关物质检测结果

序号	名称	保留 (min)	面积 (%)	拖尾因子	理论塔板数	分离度	信噪比
[0144] 1	盐酸双半胱乙酯	1.834	26.50	0.924	6123.124	/	494.311
2	杂质	3.087	5.20	/	11039.270	12.098	87.894
3	尿素	3.307	68.31	1.314	11044.790	17.100	1046.551

[0145] 从表9和图7中可以看出,用本发明中分析方法对市售注射用双半胱乙酯进行检测,盐酸双半胱乙酯的保留时间为1.834min,杂质的保留时间为3.087min,尿素的保留时间为3.307min,主峰与杂质峰的分离度为12.098,高于2020版中国药典四部0512高效液相色谱法中分离度不小于1.5的要求,各组分能够实现较好的分离。

[0146] 对比例1

[0147] 本对比例与实施例8的区别仅在于:本对比例选用Agilent 1260Infinity II型液相色谱仪,Dismonsil C18 (200×4.6mm,5 μ)为色谱柱,乙腈:水=60:40 (v/v)为流动相。

[0148] 按照对比例1的色谱条件对供试品溶液进行有关物质检测,记录色谱图,见图8。由图可知,采用对比例1的测定方法测定,注射用双半胱乙酯的主峰和辅料峰重叠,故该色谱方法不适合检测注射用双半胱乙酯的有关物质。

[0149] 对比例2

[0150] 本对比例与实施例8的区别仅在于:本对比例选用SHIMADZU LC-20AT型液相色谱仪,Agilent ZORBAX Eclipse Plus C18 (250×4.6mm,5 μ)为色谱柱。

[0151] 按照对比例2的色谱条件对供试品溶液进行有关物质检测,记录色谱图,见图9。由图可知,对比例2的测定方法不能将注射用双半胱乙酯的主峰、辅料峰和杂质峰有效分离,故该色谱方法不适合检测注射用双半胱乙酯的有关物质。

[0152] 对比例3

[0153] 本对比例与实施例8的区别仅在于:本对比例选用254nm为检测波长。

[0154] 按照对比例3的色谱条件对供试品溶液进行有关物质检测,记录色谱图,见图10。由图可知,在该检测波长下,杂质和辅料的紫外吸收很弱,故该色谱方法不适合检测注射用双半胱乙酯的有关物质。

[0155] 最后应说明的是:以上实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非对其限制;尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,本领域的普通技术人员应当理解:其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换;而这些修改或者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的精神和范围。

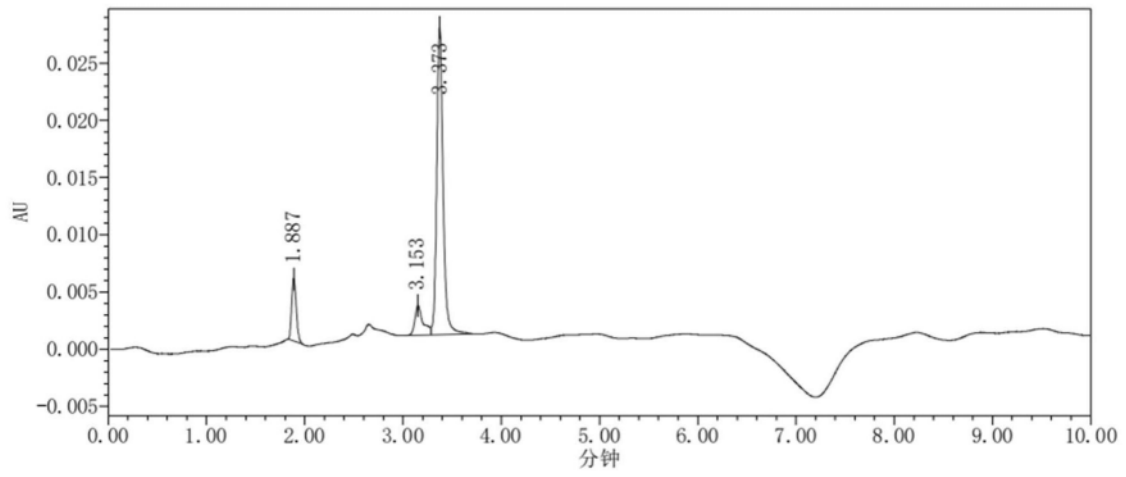


图1

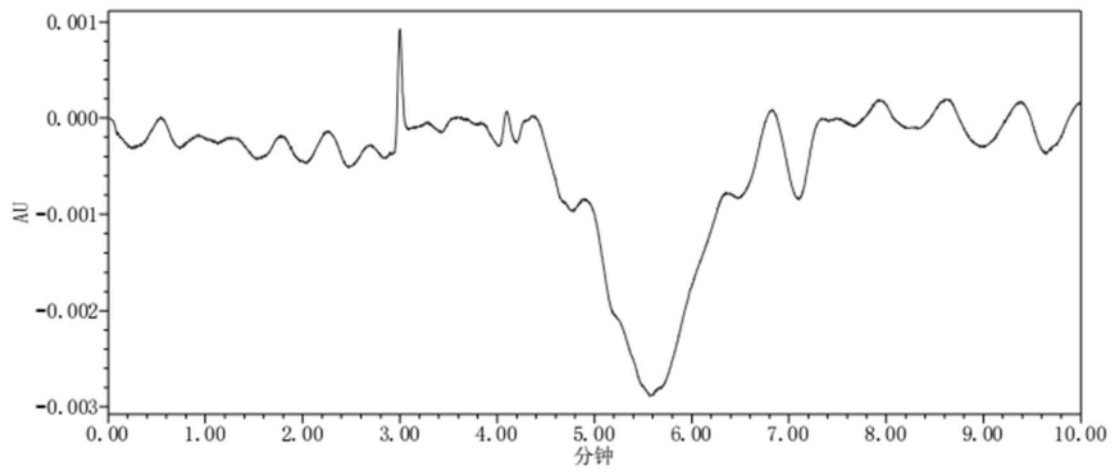


图2

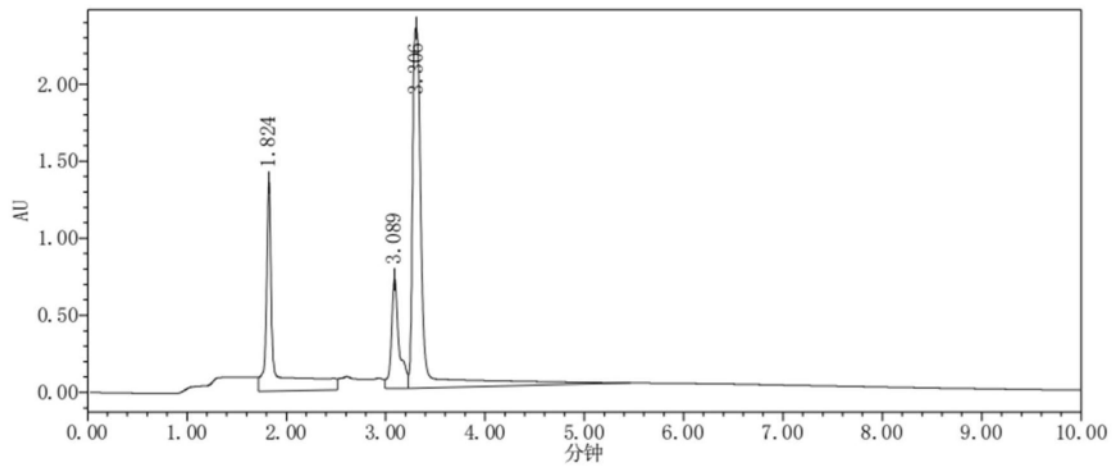


图3

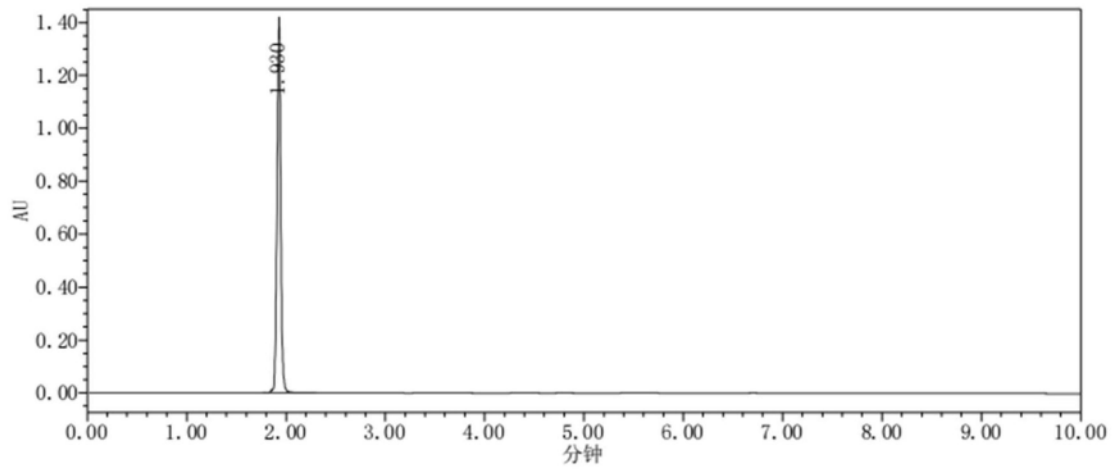


图4

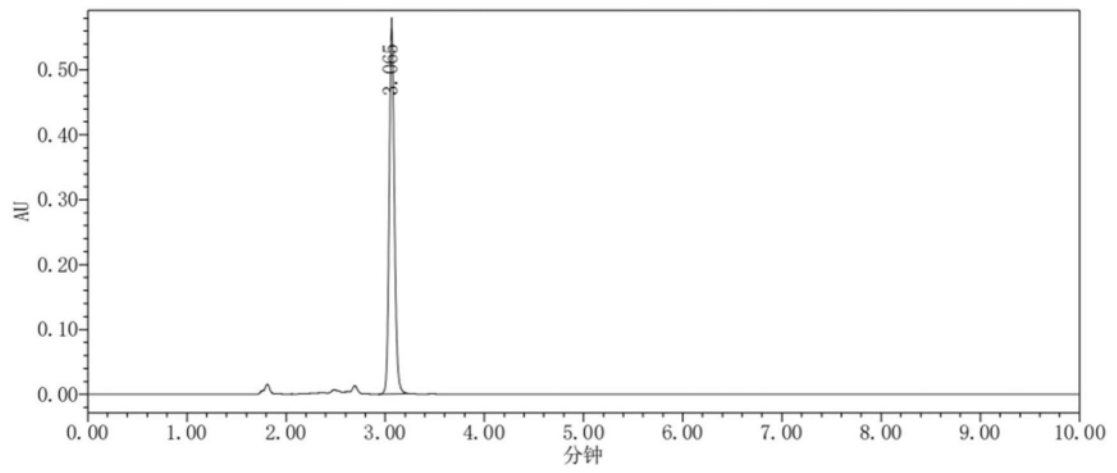


图5

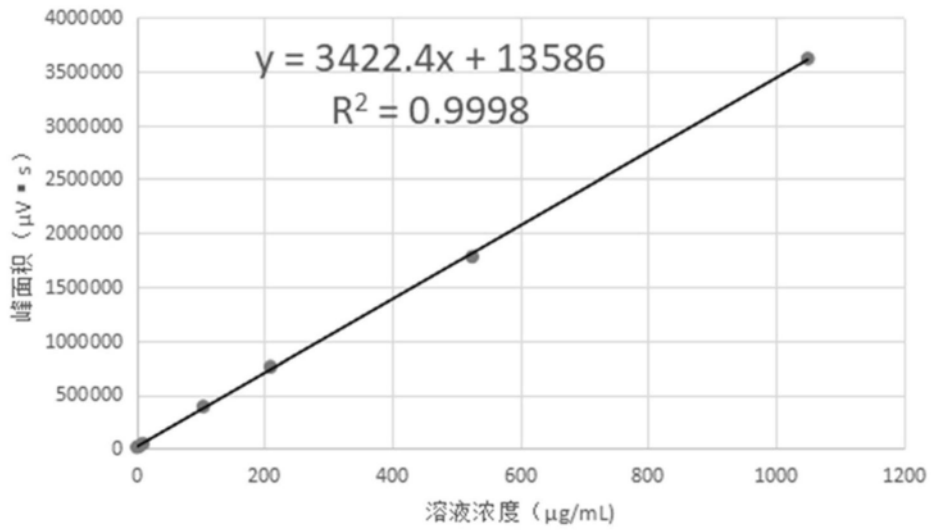


图6

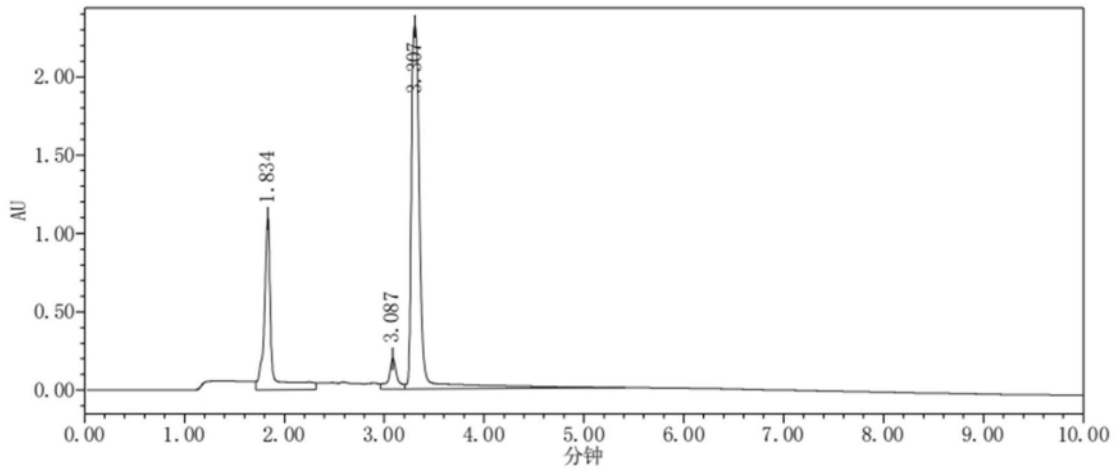


图7

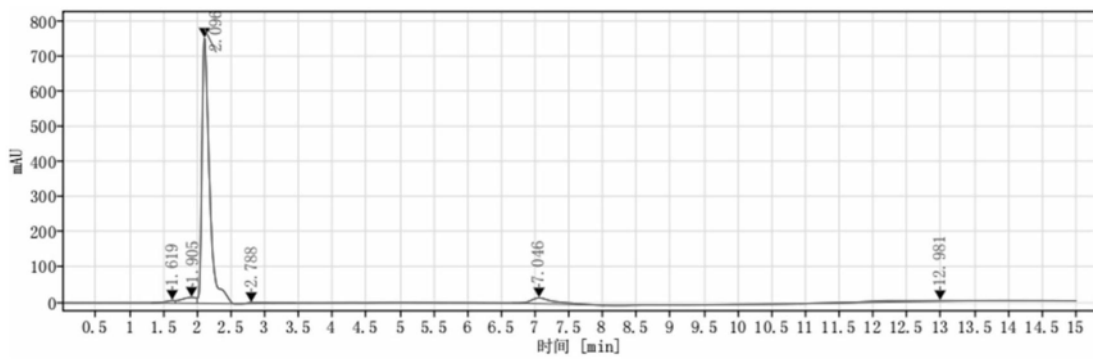


图8

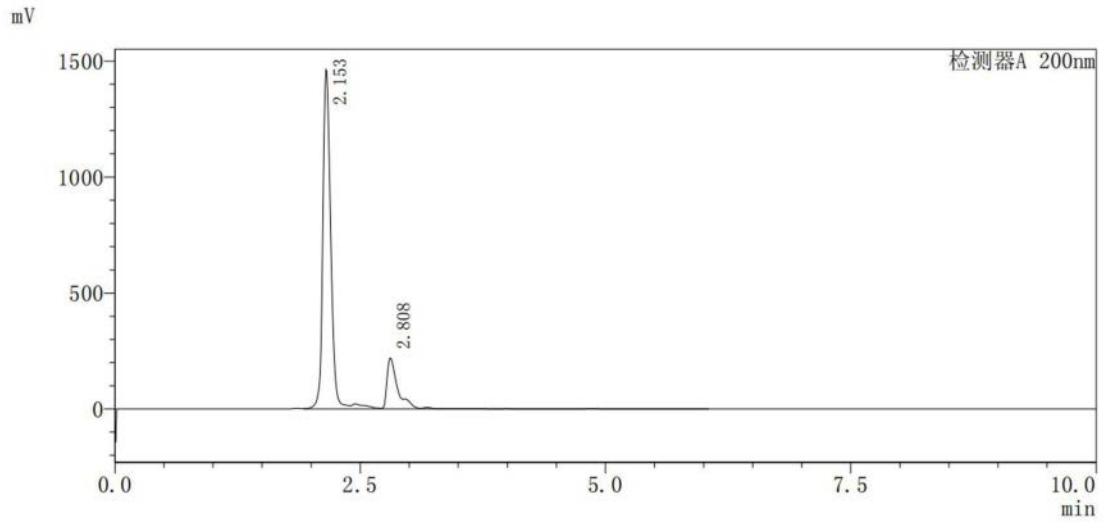


图9

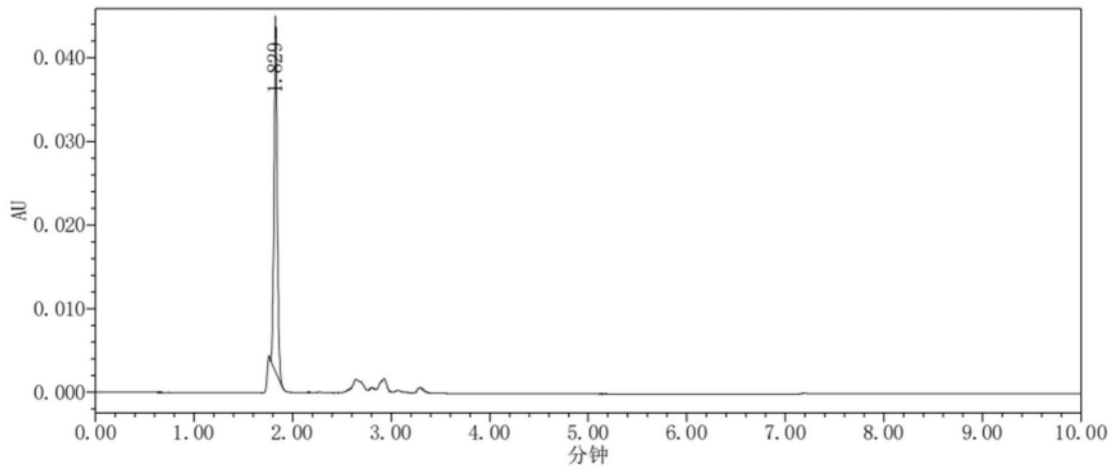


图10