



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113433242 B

(45) 授权公告日 2022. 12. 27

(21) 申请号 202110721762.0 *G01N 30/30* (2006.01)
(22) 申请日 2021.06.28 *G01N 30/32* (2006.01)
(65) 同一申请的已公布的文献号 *G01N 30/34* (2006.01)
申请公布号 CN 113433242 A *G01N 30/74* (2006.01)
G01N 30/86 (2006.01)
(43) 申请公布日 2021.09.24 审查员 杨利
(73) 专利权人 成都大学
地址 610000 四川省成都市外东十陵镇
(72) 发明人 李楠 王倩文 李晓琴 邓盛齐
陈仰 郑林
(74) 专利代理机构 成都帝鹏知识产权代理事务
所(普通合伙) 51265
专利代理师 邵思翰
(51) Int. Cl.
G01N 30/02 (2006.01)
G01N 30/06 (2006.01)

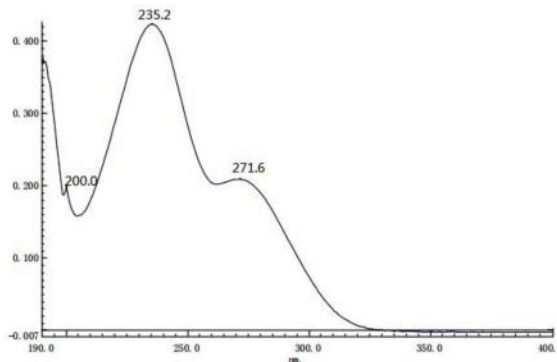
权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54) 发明名称

Molnupiravir含量及有关物质的检测方法

(57) 摘要

本发明属分析化学领域,本发明涉及一种Molnupiravir药物含量及有关物质的检测方法,该检测方法包括制备供试品溶液,采用高效液相色谱法,将十八烷基硅烷键合硅胶为色谱柱填料并对供试品溶液进行上样,通过流动相对供试品进行洗脱检测。本发明能快速、有效、准确的检测Molnupiravir的含量。本发明方法操作简单,分析时间短,准确度高,重复性好,为Molnupiravir提供了可靠的检测方法,为药物产品生产工艺及质量研究提供了参考。



1. 一种Molnupiravir药物含量及有关物质的检测方法,其特征在于,所述检测方法包括如下步骤:制备供试品溶液,采用高效液相色谱法,将十八烷基硅烷键合硅胶为色谱柱填料并对供试品溶液进行上样,再以有机相水溶液作为流动相进行洗脱检测,色谱条件为检测波长为200~300 nm,柱温为25℃~40℃,流速为0.2~2.0 mL/min,记录色谱图;所述有关物质为N4-羟基胞嘧啶核苷酸;

所述有机相为甲醇,所述流动相由甲醇和水按体积比30:70混合而得。

2. 根据权利要求1所述一种Molnupiravir药物含量及有关物质的检测方法,其特征在于,采用高效液相色谱法时,色谱柱选自品牌为Phenomenex Gemini C18柱、ZORBAX SB C18柱或Diamonsil C18柱。

3. 根据权利要求1所述一种Molnupiravir药物含量及有关物质的检测方法,其特征在于,所述检测波长为235 nm。

4. 根据权利要求1所述一种Molnupiravir药物含量及有关物质的检测方法,其特征在于,所述流动相的流速为0.9~1.1 ml/min;所述色谱柱的柱温为25℃~35℃。

5. 根据权利要求1所述一种Molnupiravir药物含量及有关物质的检测方法,其特征在于,所述流动相的流速为1.0 ml/min。

6. 根据权利要求1所述一种Molnupiravir药物含量及有关物质的检测方法,其特征在于,所述柱温为30℃。

7. 根据权利要求1所述一种Molnupiravir药物含量及有关物质的检测方法,其特征在于,进样量为10~50μL。

Molnupiravir含量及有关物质的检测方法

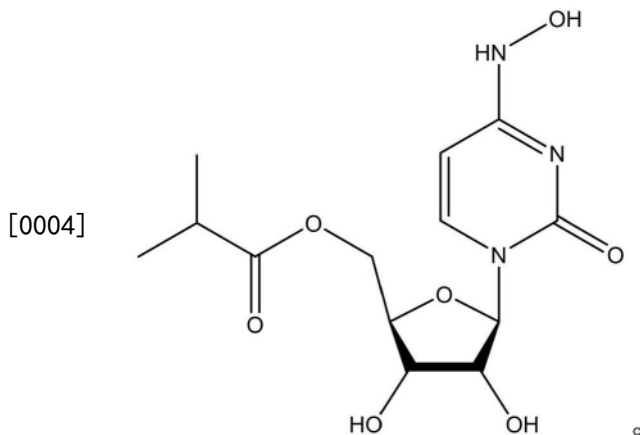
技术领域

[0001] 本发明属于分析化学领域,具体涉及一种用高效液相色谱法分离测定molnupiravir(MK-4482,EIDD-2801)原料药中Molnupiravir药物及有关物质含量的方法。

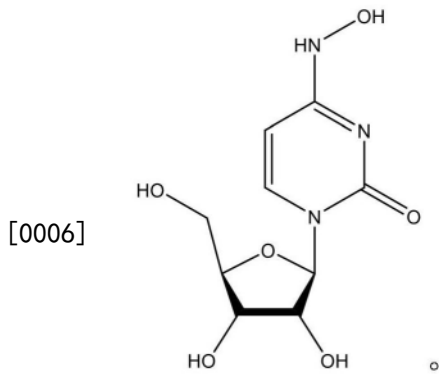
背景技术

[0002] 新冠病毒属于冠状病毒科β冠状病毒中的一种单链RNA病毒,与引起非典型肺炎的病毒基因组序列十分相似,同源性达79.5%。单链RNA病毒的结构特征体现在两类蛋白质:结构蛋白质和非结构蛋白质,例如蛋白酶和RNA依赖性RNA聚合酶(RdRp)。RdRp是病毒生命周期中重要的酶,负责从病毒模板RNA合成多个副本的互补RNA。靶向抑制这种酶可以阻止病毒繁殖并导致病毒死亡。

[0003] 核苷酸每个碱基对都可被细胞良好吸收并被哺乳动物激酶转化为5'-三磷酸形式,并与RdRp酶和RNA模式结合。因此核苷类抗病毒药物是抑制该酶的良好选择。Molnupiravir(MK-4482,EIDD-2801)由美国默克公司研发,是核糖核苷类似物N 4-羟基胞嘧啶核苷(EIDD-1931)的异丁酯前药,现已显示出广泛的流感病毒和多种冠状病毒活性,具有良好的安全性和耐药性。Molnupiravir(MK-4482,EIDD-2801)作为口服制剂,具有很好的便捷性。口服剂量分为单次口服50-1600mg或每日两次口服50-800mg,服用5.5天。Molnupiravir(MK-4482,EIDD-2801)的化学名称为[(2R,3R,4S,5R)-3,4-dihydroxy-5-(4-(hydroxyamino)-2-oxopyrimidin-1(2H)-yl)tetrahydrofuran-2-yl]methyl isobutyrate分子式为C₁₃H₁₉N₃O₇。[(2R,3R,4S,5R)-3,4-二羟基-5-(4-(羟基氨基)-2-氧嘧啶-1(2H)-基)四氢呋喃-2-基]异丁酸甲酯,其化学结构式如下:



[0005] 在Molnupiravir(MK-4482,EIDD-2801)的合成工艺过程及保存过程中,存在因去除不完全而影响药物纯度和质量的杂质,即药物质量控制中的有关物质,其化学名称为N4-羟基胞嘧啶核苷酸(NHC,EIDD-1931),分子式为C₉H₁₃N₃O₆,其结构式如下:



(NHC, EIDD-1931)

[0007] 对于Molnupiravir (MK-4482, EIDD-2801) 合成过程中引入的有关物质,作为原料药时是需要进行质量控制的。因此,实现Molnupiravir及其有关物质的分离,在Molnupiravir的质量控制方面具有重要的现实意义。目前,USP、EP、JP和中国药典及相关文献、专利均未见Molnupiravir含量测定及有关物质的报道。

发明内容

[0008] 针对现有技术的缺陷和实际需求,本发明的目的在于提供一种能够同时精确检测Molnupiravir药物及有关物质含量的方法,以实现Molnupiravir的质量控制。该方法需具有专属性强、分离度高、检测结果准备可信、容易操作及检测成本低的优点。

[0009] 为了实现上述技术目的,本发明提供的方案如下:

[0010] 一种Molnupiravir药物含量及有关物质检测方法,所述检测方法包括如下步骤:制备供试品溶液,采用高效液相色谱法,将十八烷基硅烷键合硅胶为色谱柱填料并对供试品溶液进行上样,再以有机相水溶液作为流动相进行洗脱检测,色谱条件为检测波长为200~300nm,柱温为25℃~40℃,流速为0.2~2.0mL/min,记录色谱图;所述有关物质为N4-羟基胞嘧啶核苷酸(NHC, EIDD-1931);所述有机相选用甲醇、乙腈、异丙醇、四氢呋喃中的一种或多种的组合。

[0011] 本发明采用高效液相色谱法时,色谱柱以十八烷基硅烷键合硅胶为填料,选自Phenomenex Gemini C18柱或ZORBAX SB C18柱或Diamonsil C18柱;优选Phenomenex Gemini C18柱,长度250mm,内径4.6mm,粒径5 μ 。

[0012] 优选地,本发明上述所说的方法中,所述有机相为甲醇;优选地,流动相为甲醇体积百分数为20%~60%的甲醇水溶液,甲醇体积百分数优选为30%。

[0013] 作为本发明可选择的实施例,本发明上述所说的方法中,所述流动相的流速为0.9~1.1ml/min,优选1.0ml/min。

[0014] 作为本发明可选择的实施例,本发明上述所说的方法中,所述色谱柱的柱温为25℃~35℃,优选30℃。

[0015] 作为本发明可选择的实施例,本发明的上述方法中,检测波长为235nm;进样体积为10 μ L。

[0016] 本发明提供了一种Molnupiravir药物含量检测方法及有关物质测定方法的优点在于:本发明能快速、有效、准确的检测Molnupiravir药物的含量及有关物质,系统适应性

分离度达到2.0以上,一法双测,节约成本,为合成研究及其他工艺研究提供了参考依据。

附图说明

- [0017] 图1为波长选择试验中的对照品溶液的光谱扫描图;
- [0018] 图2为系统适用性试验中的对照品色谱图,其中峰1为杂质-I (NHC) 色谱峰,峰2为杂质- II (未知杂质) 色谱峰,峰3为主成分色谱峰;
- [0019] 图3为线性关系试验中的Molnupiravir含量线性图;
- [0020] 图4为实施例3中的供试品溶液色谱图,各色谱峰编号与图2一致;
- [0021] 图5为对比例1中的供试品溶液色谱图,各色谱峰编号与图2一致;
- [0022] 图6为对比例2中的供试品溶液色谱图,各色谱峰编号与图2一致;
- [0023] 图7为对比例3中的供试品溶液色谱图,各色谱峰编号与图2一致。

具体实施方式

[0024] 下面通过具体实施例来进一步说明本发明。应当理解为:本实施例仅用于进一步解释本发明,但不限于本实施的范围。

[0025] 实施例1:方法学验证

[0026] 1. 波长选择试验

[0027] 对照品溶液:取Molnupiravir对照品适量,精密称定,加水溶解并稀释制成每1ml中含10 μ g的溶液。

[0028] 照紫外-可见分光光度法,在200nm~400nm范围内对对照品溶液进行光谱扫描。如图1所示,图1为波长选择试验中的对照品溶液的光谱扫描图。对照品溶液在200.0nm、235.2nm、271.6nm处有最大吸收,从而在200nm-300nm均能够进行一定检测,选235nm为检测波长。

[0029] 2. 专属性试验

[0030] 空白溶剂:30%甲醇水溶液。

[0031] 供试品溶液的制备:精密称定含Molnupiravir 10mg的样品,置50ml量瓶中,加溶剂溶解并稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。采用优选色谱条件测定,精密量取上述溶液各10 μ L,分别注入液相色谱仪,记录色谱图,如图2所示,图2为专属性试验中的供试品溶液与杂质溶液的色谱图。

[0032] 在该色谱条件下空白溶剂不干扰主峰测定;Molnupiravir与相邻峰之间的分离度大于2.0,DAD检测器下最大吸收波长为235nm,主峰峰纯度合格;本方法分离度高、专属性强。

[0033] 3. 线性关系试验:

[0034] 线性关系贮备液的制备:取Molnupiravir对照品约40mg,精密称定,置100ml容量瓶中,加溶剂溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。线性关系系列溶液的制备:精密量取线性储备液适量,逐步稀释为系列梯度浓度标准溶液,摇匀,分别作为限度的5%、12.5%、25%、50%、100%、200%线性溶液。

[0035] 分别量取线性关系溶液各10 μ L,注入液相色谱仪,记录色谱图,计算线性方程和相关系数。

[0036] 其结果如图3所示,图3为线性关系试验中的Molnupiravir含量线性图,由图可知,Molnupiravir在浓度为10.17~406.60ug/ml范围内,峰面积与浓度呈良好的线性关系。

[0037] 4.耐用性试验

[0038] 供试品溶液:同专属性试验样品溶液。

[0039] 色谱条件保持其它参数优选条件色谱条件一致,分别将流速设为0.9ml/min、1.1ml/min、柱温设为28℃、32℃、波长设为233nm、237nm,记录各条件下的Molnupiravir的含量。试验结果见表1。

[0040] 表1耐用性结果

| 变化参数 | 变化值 | 含量% | 平均含量 | RSD% |
|------------|-----|--------|-------|------|
| 优选条件 | | 100.71 | 99.50 | 0.75 |
| 柱温℃ | 28 | 98.24 | | |
| | 32 | 99.37 | | |
| 检测波长 nm | 233 | 99.78 | | |
| | 237 | 99.13 | | |
| 流速 ml/min | 0.9 | 99.52 | | |
| | 1.1 | 99.74 | | |

[0042] 实施例2:分离测定不同批次molnupiravir原料药

[0043] 样品前处理:

[0044] 溶剂:30%甲醇水溶液,即甲醇-水(30:70,v/v)。

[0045] 供试品溶液:取Molnupiravir原料药10mg,精密称定,置于50ml量瓶中,加溶剂溶解、稀释、定容至刻度,摇匀,作为供试品溶液。

[0046] 含量测定对照品溶液:取Molnupiravir对照品10mg,制备方法同供试品溶液,制成含Molnupiravir约200μg/ml的对照品溶液。

[0047] 有关物质检查对照溶液:取供试品溶液,精密量取1ml置100ml容量瓶中,加30%甲醇水溶液稀释至刻度,摇匀,即得1%对照溶液。高效液相色谱条件:

[0048] 色谱柱:Phenomenex Gemini C18(250mm×4.6mm,5.0μm);流动相:甲醇-水(30:70,v/v),等度洗脱;检测波长:235nm;流速:1.0mL/min;柱温:30℃;进样体积:10μL。

[0049] 分别取供试品溶液、对照品溶液及1%对照溶液各10μL,注入高效液相色谱仪中,按照上述色谱条件进行检测,记录色谱图及峰面积。对于含量测定,按外标法以峰面积计算得到供试品中molnupiravir含量;对于有关物质检查,各杂质含量按主成分自身对照法计算。

[0050] 按相同方法,对多批次molnupiravir原料药进行检测。检测结果如下表2所示,其中,杂质-I为N4-羟基胞嘧啶核苷酸(NHC,EIDD-1931),杂质-II为不明杂质。

[0051] 表2多批次Molnupiravir原料药测定结果

| 批号 | 杂质-I,% | 杂质-II,% | 总杂质,% | Molnupiravir,% |
|--------|--------|---------|-------|----------------|
| 101616 | 0.11 | 0.06 | 0.17 | 100.8 |
| 102427 | 0.20 | 0.06 | 0.26 | 99.56 |
| 102529 | 0.18 | 0.06 | 0.24 | 99.37 |

[0053] 实施例3:

[0054] 样品前处理:

[0055] 溶剂:20%甲醇水溶液,即甲醇-水(20:80,v/v)。

[0056] 供试品溶液、含量测定对照品溶液及有关物质检查对照溶液:除溶剂外,制备方法同实施例2中样品前处理方法。

[0057] 高效液相色谱条件:

[0058] 色谱柱:Phenomenex Gemini C18 (250mm×4.6mm,5.0μm);流动相:甲醇-水(20:80,v/v),等度洗脱;检测波长:235nm;流速:1.0mL/min;柱温:30℃;进样体积:10μL;进样浓度:200ug/ml;稀释剂:20%甲醇水溶液。

[0059] 精密量取上述溶液各10μL,注入液相色谱仪,记录色谱图,如图4所示。在该色谱条件下,供试品色谱峰个数与优选色谱条件一致,各峰面积百分比与优选色谱条件下测定结果无明显差异。

[0060] 对比例1:

[0061] 样品前处理:

[0062] 溶剂:纯水。

[0063] 供试品溶液、含量测定对照品溶液及有关物质检查对照溶液:除溶剂外,制备方法同实施例2中样品前处理方法。

[0064] 高效液相色谱条件:

[0065] 色谱柱:Phenomenex Gemini C18 (250mm×4.6mm,5.0μm);流动相:A相为纯水,B相为甲醇,梯度洗脱,洗脱程序见表3;检测波长:235nm;流速:1.0mL/min;柱温:30℃;进样体积:10μL;进样浓度:200ug/ml;稀释剂:纯水。

[0066] 表3梯度洗脱程序表

| 时间(min) | 流动相A(%) | 流动相B(%) |
|---------|---------|---------|
| 0 | 5 | 95 |
| 5 | 5 | 95 |
| 60 | 0 | 100 |
| 65 | 0 | 100 |
| 65.01 | 5 | 95 |
| 75 | 5 | 95 |

[0068] 精密量取上述溶液各10μL,注入液相色谱仪,记录色谱图,如图5所示。在该色谱条件下,供试品色谱峰个数与优选色谱条件一致,测定结果与优选色谱条件无明显差异。对比例1在流动相梯度洗脱下并没有更多的杂质峰检出,且分析方法运行时间较长,而本发明方法可以有效分离检测有关物质的同时大大缩短分析时间。

[0069] 对比例2:

[0070] 样品前处理:

[0071] 溶剂:30%乙腈水溶液,即乙腈-水(30:70,v/v)。

[0072] 供试品溶液、含量测定对照品溶液及有关物质检查对照溶液:除溶剂外,制备方法同实施例2中样品前处理方法。

[0073] 高效液相色谱条件:

[0074] 色谱柱:Phenomenex Gemini C18(250mm×4.6mm,5.0μm);流动相:乙腈-水(30:70,v/v),等度洗脱;检测波长:235nm;流速:1.0mL/min;柱温:30℃;进样体积:10μL;进样浓度:200ug/ml;稀释剂:30%乙腈水溶液。

[0075] 精密量取上述溶液各10μL,注入液相色谱仪,记录色谱图,如图6所示。在该色谱条件下,杂质峰1与杂质峰2分离度降低,主峰拖尾严重,不适用于molnupiravir原料药的检测。

[0076] 对比例3:

[0077] 样品前处理:

[0078] 溶剂:磷酸盐缓冲液(pH7.0)-水(30:70,v/v)。

[0079] 供试品溶液、含量测定对照品溶液及有关物质检查对照溶液:除溶剂外,制备方法同实施例2中样品前处理方法。

[0080] 高效液相色谱条件:

[0081] 色谱柱:Phenomenex Gemini C18(250mm×4.6mm,5.0μm);流动相:磷酸盐缓冲液(pH7.0)(取0.02mol/L磷酸二氢钠溶液与0.02mol/L磷酸氢二钠溶液等体积混合后,用0.1mol/L氢氧化钠溶液或0.1mol/L磷酸溶液调节pH值至7.0)-甲醇(30:70,v/v),等度洗脱;检测波长:235nm;流速:1.0mL/min;柱温:30℃;进样体积:10μL;进样浓度:200ug/ml;稀释剂:流动相。

[0082] 精密量取上述溶液各10μL,注入液相色谱仪,记录色谱图,如图6所示。在该色谱条件下,供试品色谱峰个数与优选色谱条件一致,测定结果与优选色谱条件无明显差异;对比例2中杂质分离度没有明显优化,但流动相配制更为复杂,因此本发明方法在实现相同分离度的条件下实验操作更为简便。

[0083] 综上所述,本发明所述方法操作简单,灵敏度高,专属性好,可准确测定Molnupiravir的含量及有关物质,从而有效控制Molnupiravir的产品质量,为Molnupiravir原料药合成及质量标准的进一步完善提升提供了参考方法。

[0084] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

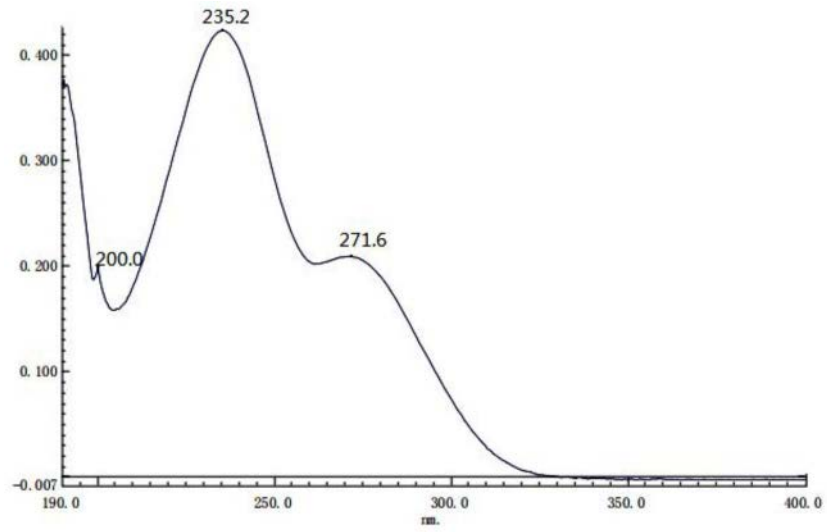


图1

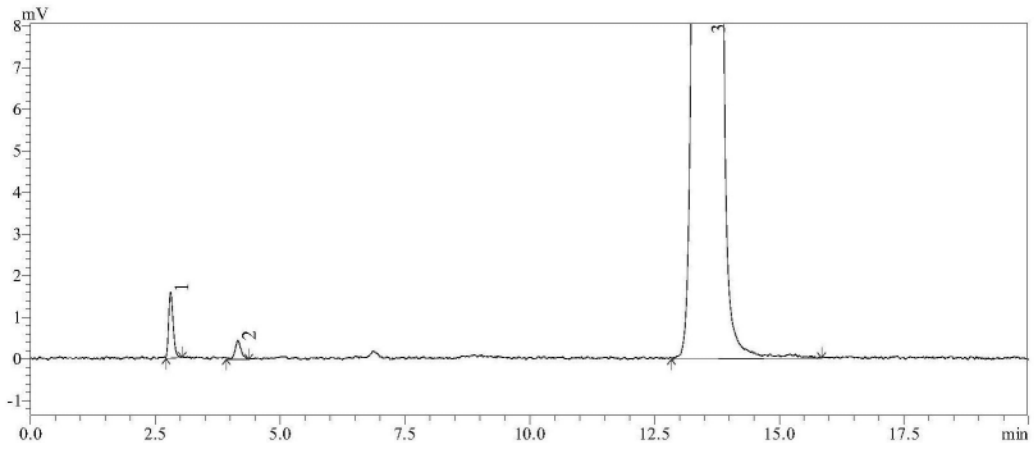


图2

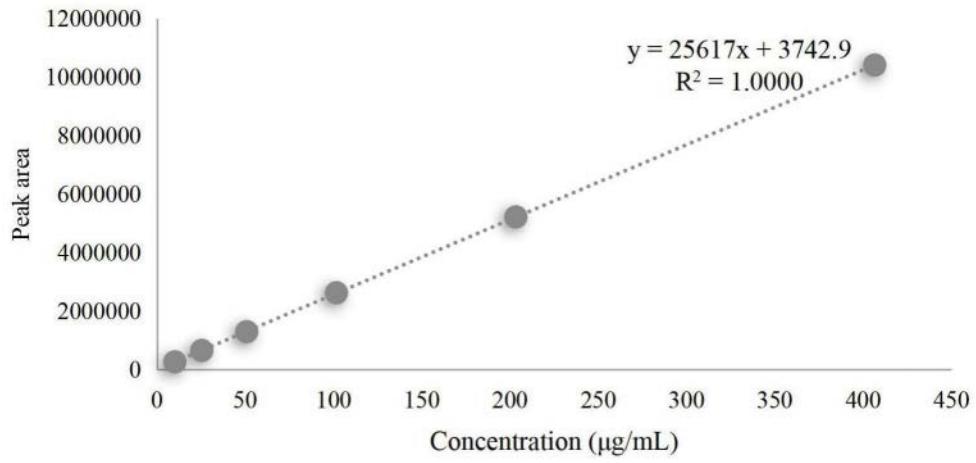


图3

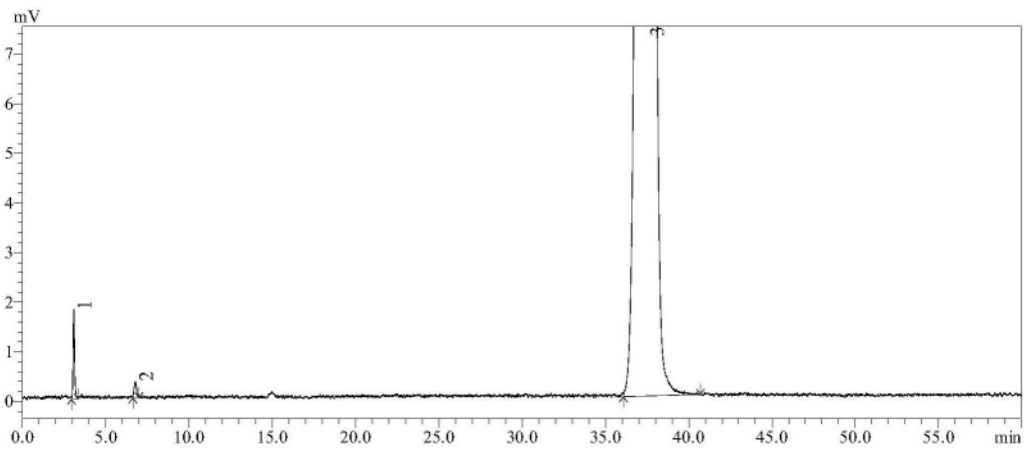


图4

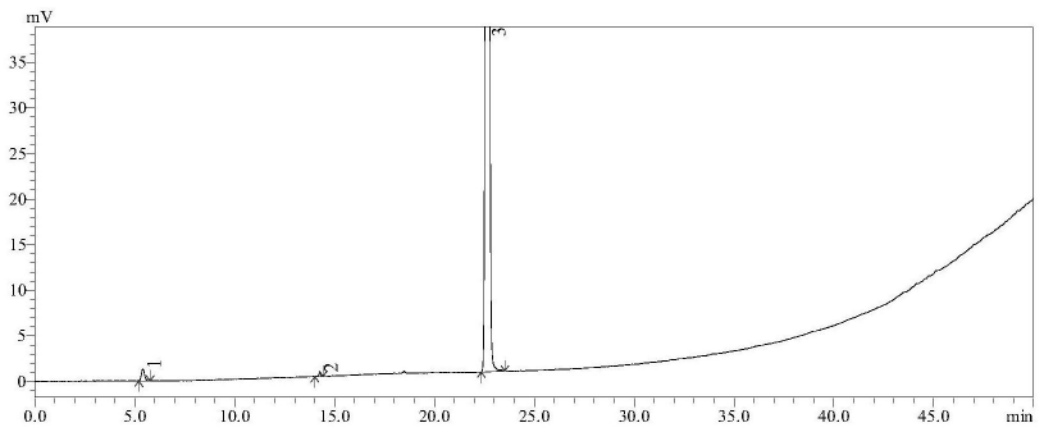


图5

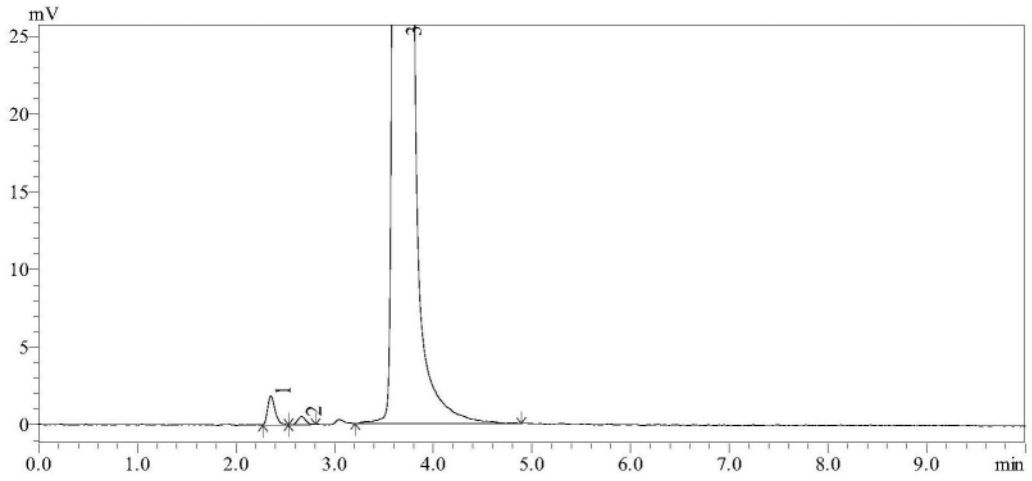


图6

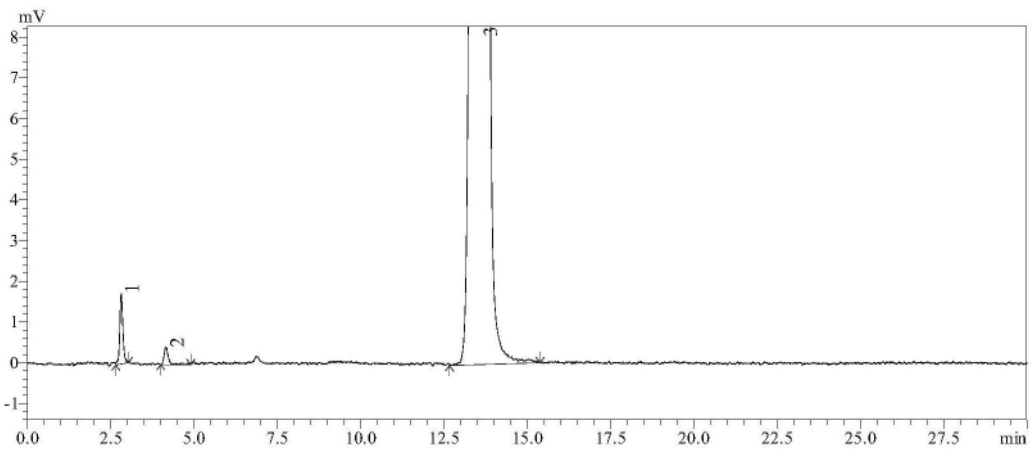


图7