



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 115656372 B

(45) 授权公告日 2024. 10. 11

(21) 申请号 202211326057.1

G01N 30/06 (2006.01)

(22) 申请日 2022.10.27

G01N 30/30 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

G01N 30/32 (2006.01)

申请公布号 CN 115656372 A

G01N 30/34 (2006.01)

G01N 30/74 (2006.01)

(43) 申请公布日 2023.01.31

(56) 对比文件

(73) 专利权人 北京斯利安药业有限公司

CN 111333697 A, 2020.06.26

地址 100176 北京市大兴区北京经济技术

CN 1052509 A, 1991.06.26

开发区运成街3号1号楼

审查员 李培凤

(72) 发明人 王家龙 韩雅慧 王洪伟 李雪莲

李爱琴 苏小楠 杨卓理

(74) 专利代理机构 北京元周律知识产权代理有

限公司 11540

专利代理师 苏少康

(51) Int. Cl.

G01N 30/02 (2006.01)

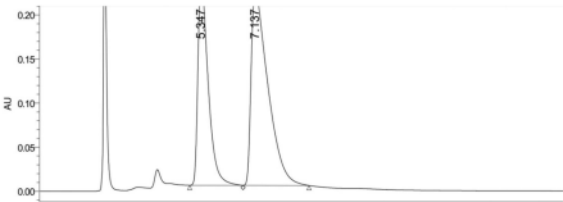
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

一种S-四氢叶酸异构体手性分析方法

(57) 摘要

本申请提供了一种S-四氢叶酸异构体手性分析方法,包括如下步骤:步骤1) 将待测样品溶解配置成待测溶液;步骤2) 通过液相色谱法分析待测溶液;其中,流动相采用磷酸二氢钠水溶液与乙腈的混合溶液,流动相中磷酸二氢钠水溶液:乙腈的体积比为96:4~97:3,磷酸二氢钠水溶液的pH为6.5~7;色谱柱采用手性色谱填料。



1. 一种S-四氢叶酸异构体手性分析方法,其特征在于,包括如下步骤:

步骤1) 将待测样品溶解配置成待测溶液;

步骤2) 通过液相色谱法分析待测溶液;

其中,流动相采用磷酸二氢钠水溶液与乙腈的混合溶液,流动相中磷酸二氢钠水溶液:乙腈的体积比为96:4 ~ 97:3,磷酸二氢钠水溶液的pH为6.5~7;所述磷酸二氢钠水溶液的浓度为25~35 mol · L⁻¹;

色谱柱采用手性色谱填料;

所述手性色谱填料为人血白蛋白键合硅胶;

所述步骤1) 中配置待测溶液的方法为称取S-四氢叶酸样品,采用所述流动相的混合溶液溶解,所述待测溶液还包含1~20mg/mL的抗氧化剂;

检测波长为280 nm;

所述手性分析的目标物为R-四氢叶酸与S-四氢叶酸。

2. 根据权利要求1所述的S-四氢叶酸异构体手性分析方法,其特征在于,所述抗氧化剂包括焦亚硫酸钠、维生素C、亚硫酸氢钠、L-半胱氨酸中的至少一种。

3. 根据权利要求1所述的S-四氢叶酸异构体手性分析方法,其特征在于,所述抗氧化剂为1~20mg/mL的 L-半胱氨酸。

4. 根据权利要求1所述的S-四氢叶酸异构体手性分析方法,其特征在于,所述步骤1) 待测溶液中S-四氢叶酸含量为0.05~10%。

5. 根据权利要求1所述的S-四氢叶酸异构体手性分析方法,其特征在于,所述步骤2) 中流动相采用氢氧化钠调节pH至6.8。

6. 根据权利要求1所述的S-四氢叶酸异构体手性分析方法,其特征在于,所述步骤2) 中液相色谱法分析待测溶液的流速为0.6~0.8ml/min。

7. 根据权利要求1所述的S-四氢叶酸异构体手性分析方法,其特征在于,所述步骤2) 中液相色谱法分析待测溶液的柱温为柱温25~35℃。

一种S-四氢叶酸异构体手性分析方法

技术领域

[0001] 本发明属于化学检测方法领域,具体涉及一种S-四氢叶酸异构体手性分析方法。

背景技术

[0002] S-四氢叶酸是叶酸重要的体内代谢产物之一,同时也是合成S-5-甲基四氢叶酸钙的原料药的关键医药中间体。S-5-甲基四氢叶酸钙是治疗或补充叶酸代谢缺乏综合症的替代叶酸的重要原料药,R-四氢叶酸将会带到终产品中变成非对映异构体杂质R-5-甲基四氢叶酸钙,该杂质因在体内无法代谢从而无药理活性,为生产工艺过程中必要去除的杂质。R-四氢叶酸的量将是在合成的过程中影响终产品的关键质量属性。

[0003] 目前的检测方法采用25mM羟丙基 β -环糊精:乙腈(90:10,v/v)为流动相。该方法经实验发现重现后不易区分R-四氢叶酸与其他降解杂质,方法中供试品溶液现配制现进样,无法控制连续进样,因而给分析工作带来不便。该方法无明显的定量限与检测限数值,在定性与定量能力上不便于评估;同时因方法中R-四氢叶酸与S-四氢叶酸出峰时间靠近,无法分析浓度较大的供试品,难以实现药企生产检验的需求。因此开发一种能保持一定稳定性、快速、耐用的色谱分析方法,为药企研发生产过程质控R-5-甲基四氢叶酸钙的前体中间体R-四氢叶酸成为必要的检验手段。

发明内容

[0004] 根据本申请的一个方面,针对以上亟需解决的关键问题,本发明提出一种S-四氢叶酸异构体手性分析方法。

[0005] 本方法采用如下技术方案实现:

[0006] 一种S-四氢叶酸异构体手性分析方法,包括如下步骤

[0007] 步骤1) 将待测样品溶解配置成待测溶液;

[0008] 步骤2) 通过液相色谱法分析待测溶液;

[0009] 其中,流动相采用磷酸二氢钠水溶液与乙腈的混合溶液,流动相中磷酸二氢钠水溶液:乙腈的体积比为96:4~97:3,磷酸二氢钠水溶液的pH为6.5~7;所述磷酸二氢钠水溶液的浓度为25~35mol $\cdot$ L⁻¹;

[0010] 色谱柱采用手性色谱填料。

[0011] 可选地,所述步骤1) 中配置待测溶液的方法为称取S-四氢叶酸样品,采用所述流动相的混合溶液溶解,所述待测溶液还包含1~20mg/mL的抗氧化剂。

[0012] 可选地,所述抗氧化剂包括焦亚硫酸钠、维生素C、亚硫酸氢钠、L-半胱氨酸中的至少一种。

[0013] 可选地,所述抗氧化剂为1~20mg/mL的L-半胱氨酸。

[0014] 可选地,所述步骤1) 待测溶液中S-四氢叶酸含量为0.05~10%。

[0015] 可选地,所述步骤2) 中流动相采用氢氧化钠调节pH至6.8。

[0016] 可选地,所述步骤2) 中液相色谱法分析待测溶液的流速为0.6~0.8ml/min。

[0017] 可选地,所述步骤2)中液相色谱法分析待测溶液的柱温为柱温25~35℃。

[0018] 可选地,所述手性色谱填料为人血白蛋白键合硅胶。

[0019] 以下提出一种具体的实施方式:

[0020] 根据四氢叶酸异构体的检测方法,以大赛璐CHIRAL PAK (HSA 4.6×150mm,5μm)为色谱柱;以4.2~4.8g/L二水合磷酸二氢钠溶液,用32%氢氧化钠调节pH=6.5~7.0,二水合磷酸二氢钠溶液:乙腈=96:4~97:3为流动相;流速:0.6~0.8ml/min;检测波长为280nm;柱温为25~35℃;进样体积为10μl;运行时间20min。稀释剂采用溶解1~20mg/L的L-半胱氨酸的流动相。

[0021] 本申请的方法可获得如下的有益效果:

[0022] 解决样品稳定性问题:供试品溶液配制后16小时内稳定,便于检测的批量控制,样品中加入抗氧化剂能够有效控制样品降解,同时不影响样品检测结果的准确性。从而实现在实验过程中释放劳动力,可连续多批量序列进样模式检测多批次样品。

[0023] 目标物分离良好:R-四氢叶酸与S-四氢叶酸出峰时间相差较大,分离度与色谱性能完全符合检测要求,不容易受到杂质及溶剂峰的干扰。

[0024] 检测方法的定性与定量能力较好:能够准确检测样品中杂质含量的同时,定量限浓度仅为1.25μg/ml,定量限相当于供试品浓度的0.25%;检测限浓度仅为0.31μg/ml,检出限相当于供试品浓度的0.08%。线性范围较宽,在1.25μg/ml~20.9μg/ml在此范围内线性方程分别为 $y=22111.0714x-6610.1626$,相关系数 r 分别为0.9991,Y轴截距在100%响应值的25%以内,定性定量能力良好。

附图说明

[0025] 图1是对照品溶液色谱图。

[0026] 图2是供试品溶液色谱图。

[0027] 图3是分离度溶液色谱图。

具体实施方式

[0028] 下面将结合附图,对本发明技术方案进行清楚、完整地描述。实施例中各原料均为市售,采用仪器为:Waters 2696液相与waters 2998DAD或waters 2487UV检测器。

[0029] 实施例1

[0030] S-5-甲基四氢叶酸钙异构体手性分析方法,包括以下步骤:

[0031] 步骤1)配制溶液

[0032] 配制流动相溶液:流动相比比例为4.54g/L的二水合磷酸二氢钠水溶液:乙腈=97:3,用32%氢氧化钠调节pH=6.8。

[0033] 配置稀释剂:在上述流动相中加入L-半胱氨酸,浓度为5mg/mL。

[0034] 分离度溶液:称取S-四氢叶酸对照品5mg,置10ml量瓶中,加入15μg/ml四氢叶酸消旋体1ml,加稀释剂溶解并稀释至刻度,摇匀;即得(浓度约为500μg/ml)。

[0035] 供试品溶液:称取S-四氢叶酸供试品约5mg,置10ml量瓶,加稀释剂溶解并稀释至刻度,摇匀;即得(浓度为500μg/ml)。

[0036] 对照品溶液:称取S-四氢叶酸(消旋体)对照品约5mg,置10ml量瓶,加稀释剂溶解

并稀释至刻度,摇匀;即得(浓度为500 μ g/ml)。

[0037] 步骤2)液相色谱分析:

[0038] 色谱柱采用大赛璐CHIRALPAK (HSA 4.6 $\times$ 150mm,5 μ m)

[0039] 流动相流速:0.7ml/min;检测波长为280nm;柱温为30 $^{\circ}$ C;进样体积为10 μ l;运行时间20min。

[0040] 实验结果:

时间 (h)	供试品溶液			
	异构体含量%	变化率%	主峰含量%	变化率%
供试品溶液-0h	4.99	/	95.01	/
供试品溶液-140min	5.01	0.40	94.99	0.02
供试品溶液-6h	5.06	1.40	94.94	0.07
供试品溶液-8h	5.05	1.20	94.95	0.06
供试品溶液-10h	5.05	1.20	94.95	0.06
供试品溶液-12h	5.04	1.00	94.96	0.05
供试品溶液-14h	5.07	1.60	94.93	0.08
供试品溶液-16h	5.11	2.40	94.89	0.13
时间 (h)	分离度溶液			
	异构体含量%	变化率%	主峰含量%	变化率%
分离度溶液-1-0h	6.3	/	93.7	/
分离度溶液-140min	6.35	0.79	93.65	0.05
分离度溶液-6h	6.41	1.75	93.59	0.12
分离度溶液-8h	6.42	1.90	93.58	0.13
分离度溶液-10h	6.41	1.75	93.59	0.12
分离度溶液-12h	6.4	1.59	93.6	0.11
分离度溶液-14h	6.43	2.06	93.57	0.14
分离度溶液-16h	6.48	2.86	93.52	0.19

[0042] 本实施例中四氢叶酸R异构体与四氢叶酸S异构体分离度为1.6。

[0043] 本方法能够保证溶液稳定性保持在16h以内,确保R四氢叶酸的稳定性考察期内峰面积的百分比变化率 $\leq$ 3.0%,S四氢叶酸的稳定性考察期内峰面积百分比变化率 $\leq$ 0.2%,满足检测时限要求。

[0044] 实施例2

[0045] 以4.54g/L磷酸二氢钠二水合物,用32%氢氧化钠调节pH=6.6:乙腈=97:3为流动相;流速:0.7ml/min;检测波长为280nm;柱温为30 $^{\circ}$ C。四氢叶酸R异构体与四氢叶酸S异构体分离度为1.62。

[0046] 实施例3

[0047] 以4.54g/L磷酸二氢钠二水合物,用32%氢氧化钠调节pH=7.0:乙腈=97:3为流

动相;流速:0.7ml/min;检测波长为280nm;柱温为30℃。四氢叶酸R异构体与四氢叶酸S异构体分离度为1.60。

[0048] 实施例4

[0049] 以4.54g/L磷酸二氢钠二水合物,用32%氢氧化钠调节pH=6.8:乙腈=97:3为流动相;流速:0.6ml/min;检测波长为280nm;柱温为30℃。四氢叶酸R异构体与四氢叶酸S异构体分离度为1.61。

[0050] 实施例5

[0051] 以4.54g/L磷酸二氢钠二水合物,用32%氢氧化钠调节pH=6.8:乙腈=97:3为流动相;流速:0.8ml/min;检测波长为280nm;柱温为30℃。四氢叶酸R异构体与四氢叶酸S异构体分离度为1.53。

[0052] 实施例6

[0053] 以4.54g/L磷酸二氢钠二水合物,用32%氢氧化钠调节pH=6.8:乙腈=98:2为流动相;流速:0.7ml/min;检测波长为280nm;柱温为30℃。四氢叶酸R异构体与四氢叶酸S异构体分离度为1.29。

[0054] 实施例7

[0055] 以4.54g/L磷酸二氢钠二水合物,用32%氢氧化钠调节pH=6.8:乙腈=96:4为流动相;流速:0.7ml/min;检测波长为280nm;柱温为30℃。四氢叶酸R异构体与四氢叶酸S异构体分离度为1.61。

[0056] 实施例8

[0057] 以4.54g/L磷酸二氢钠二水合物,用32%氢氧化钠调节pH=6.8:乙腈=97:3为流动相;流速:0.7ml/min;检测波长为280nm;柱温为25℃。四氢叶酸R异构体与四氢叶酸S异构体分离度为1.62。

[0058] 实施例9

[0059] 以4.54g/L磷酸二氢钠二水合物,用32%氢氧化钠调节pH=6.8:乙腈=96:4为流动相;流速:0.7ml/min;检测波长为280nm;柱温为35℃。四氢叶酸R异构体与四氢叶酸S异构体分离度为1.51。

[0060] 实施例10

[0061] 以4.21g/L磷酸二氢钠二水合物,用32%氢氧化钠调节pH=6.8:乙腈=97:3为流动相;流速:0.7ml/min;检测波长为280nm;柱温为30℃。四氢叶酸R异构体与四氢叶酸S异构体分离度为1.62。

[0062] 实施例11

[0063] 以4.84g/L磷酸二氢钠二水合物,用32%氢氧化钠调节pH=6.8:乙腈=97:3为流动相;流速:0.7ml/min;检测波长为280nm;柱温为35℃。四氢叶酸R异构体与四氢叶酸S异构体分离度为1.61。

[0064] 各实施例产品的表征数据以及效果数据

[0065] 表1

	色谱参数	主峰与异构体峰分离度
	规定值	大于 1.5
[0066]	分离度溶液-增流速 (0.8ml/min)	1.53
	分离度溶液-减流速 (0.6ml/min)	1.61
	分离度溶液-减柱温(25℃)	1.62
	分离度溶液-增柱温(35℃)	1.51
	分离度溶液变化 pH(pH=6.6)	1.62
[0067]	分离度溶液变化 pH(pH=7.0)	1.60
	分离度溶液-减盐浓度(4.21g/L)	1.62
	分离度溶液-增盐浓度(4.84g/L)	1.61
	分离度溶液-增有机相(96:4)	1.83
	分离度溶液-减有机相(98:2)	1.29

[0068] 表2变化实验条件-杂质含量结果

	柱温 (℃)	异构体	
		Q%	RD%
[0069]	25	5.32	3.6
	35	4.86	1.00
	流速 (ml/min)	异构体	
		Q%	RD%
	0.6	4.97	0.20
	0.8	5.01	0.6
	流动相比例	异构体	
		Q%	RD%
	96:4	5.11	0.1
	98:2	4.95	1.7
	流动相 pH	异构体	
		Q%	RD%
	6.6	4.72	4.1
	7.0	5.34	2.1
	盐浓度 (g/L)	异构体	
		Q%	RD%
	4.21	5.20	0.8
	4.84	4.99	1.3

[0070] 以上所述,仅是本申请的几个实施例,并非对本申请做任何形式的限制,虽然本申请以较佳实施例揭示如上,然而并非用以限制本申请,任何熟悉本专业的技术人员,在不脱离本申请技术方案的范围,利用上述揭示的技术内容做出些许的变动或修饰均等同于等效实施案例,均属于技术方案范围内。

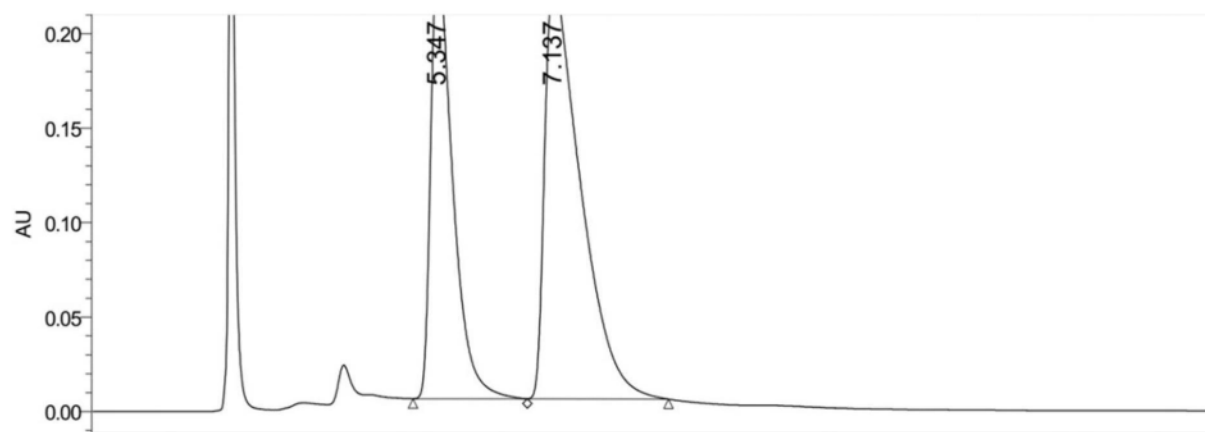


图1

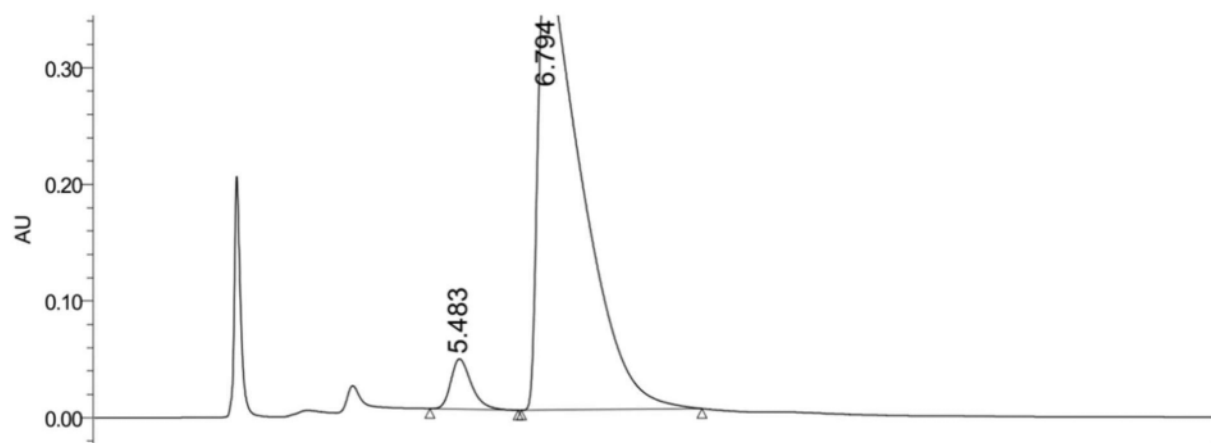


图2

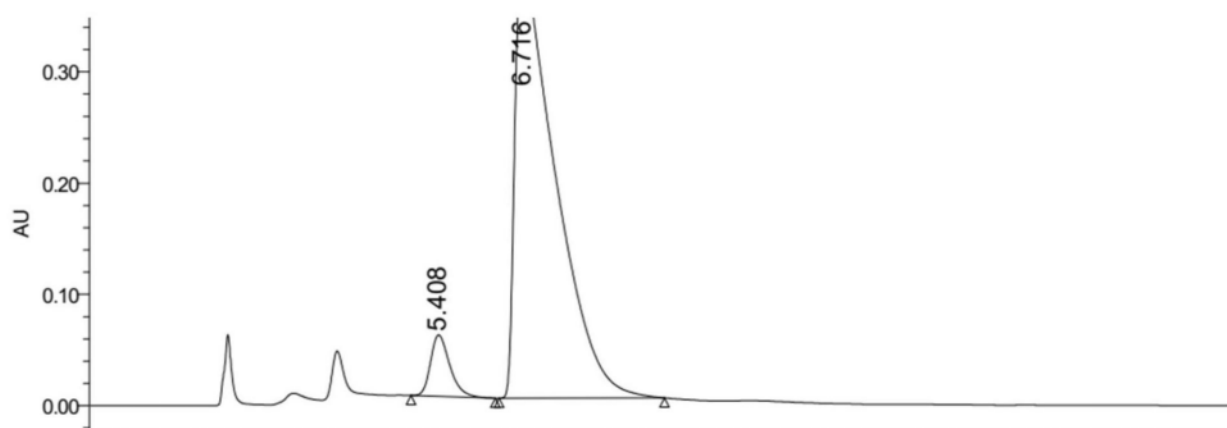


图3