



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114088822 A

(43) 申请公布日 2022.02.25

(21) 申请号 202111123805.1

(22) 申请日 2021.09.24

(71) 申请人 伊犁川宁生物技术股份有限公司

地址 835000 新疆维吾尔自治区伊犁哈萨克自治州霍尔果斯市经济开发区伊宁园区阿拉木图亚村516号

(72) 发明人 董进臣 陈倩 张宝新 牛李杰  
周路 张霞飞 高占虎

(74) 专利代理机构 成都高远知识产权代理事务所(普通合伙) 51222  
代理人 郑勇力 张娟

(51) Int.Cl.

G01N 30/02 (2006.01)

G01N 30/06 (2006.01)

G01N 30/86 (2006.01)

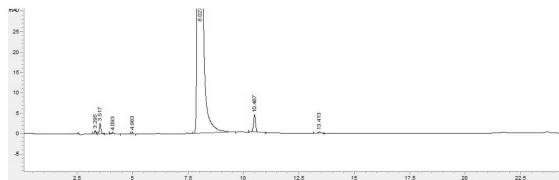
权利要求书2页 说明书10页 附图2页

(54) 发明名称

一种7-ADCA组合物及其中杂质的检测方法

(57) 摘要

本发明属于药物分析技术领域，具体涉及一种7-ADCA组合物及其中杂质的检测方法。本发明的7-ADCA组合物含有如下重量百分比的组分：7-氨基去乙酰氧基头孢烷酸90.0-99.9%；去乙酰氧基头孢菌素C 0-5.0%；去乙酰基头孢菌素C 0-5.0%；去乙酰基-7-氨基头孢烷酸0-5.0%。对于7-ADCA组合物中的杂质乙酰氧基头孢菌素C、去乙酰基头孢菌素C和去乙酰基-7-氨基头孢烷酸，通过高效液相色谱进行检测，其中，色谱条件为：色谱柱以含碳量大于12%的十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂；磷酸盐溶液为流动相A，磷酸盐溶液-乙腈混合液为流动相B。本发明的检测方法准确好、灵敏高且专属强，在对7-ADCA产品的质量控制中具有很高的应用潜力。



1. 一种7-ADCA组合物,其特征在于,它含有如下重量百分比的组分:

7-氨基去乙酰氧基头孢烷酸90.0-99.9%;

去乙酰氧基头孢菌素C 0-5.0%;

去乙酰基头孢菌素C 0-5.0%;

去乙酰基-7-氨基头孢烷酸0-5.0%。

2. 按照权利要求1所述的组合物,其特征在于:它的HPLC色谱图中,所述7-氨基去乙酰氧基头孢烷酸的保留时间为2-5min,所述去乙酰氧基头孢菌素C的保留时间为4-8min,所述去乙酰基头孢菌素C的保留时间为5-11min,所述去乙酰基-7-氨基头孢烷酸的保留时间为8-15min;

HPLC色谱的色谱条件为:色谱柱以含碳量大于12%的十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;磷酸盐溶液为流动相A,磷酸盐溶液-乙腈混合液为流动相B。

3. 按照权利要求2所述的组合物,其特征在于:它的HPLC色谱图如图2所示。

4. 一种权利要求1-3任一项所述的组合物中杂质的检测方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 将所述组合物配制成为供试品溶液;

(2) 对所述供试品溶液进行HPLC测试,检测所述组合物中的乙酰氧基头孢菌素C、去乙酰基头孢菌素C和去乙酰基-7-氨基头孢烷酸;

其中,色谱条件为:色谱柱以含碳量为12%~20%的十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;磷酸盐溶液为流动相A,磷酸盐溶液-乙腈混合液为流动相B。

5. 按照权利要求4所述的检测方法,其特征在于:步骤(1)中,供试品溶液的制备方法为采用助溶剂溶解组合物后,用流动相A定容;所述助溶剂为氨水与乙腈按照体积比(80~40):(20~60)的混合溶液,所述氨水的浓度为质量百分比0.1~1.0%;所述组合物与所述助溶剂的用量比为20mg:1~10ml。

6. 按照权利要求5所述的检测方法,其特征在于:步骤(1)中,所述助溶剂为氨水与乙腈按照体积比60:40的混合溶液,所述氨水的浓度为质量百分比0.25%。

7. 按照权利要求4所述的检测方法,其特征在于:步骤(2)中,所述色谱柱以含碳量为12%~20%的十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂。

8. 按照权利要求4所述的检测方法,其特征在于:步骤(2)中,所述磷酸盐溶液为磷酸二氢钾、磷酸二氢钠、磷酸氢二钾或磷酸氢二钠中至少一种的溶液;和/或,所述磷酸盐溶液以磷酸根计浓度为5~100mmol/L;和/或,所述流动相A的pH为4.0~5.0;

和/或,所述流动相B是磷酸盐溶液-乙腈按照体积比(95~60):(5~40)的混合液。

9. 按照权利要求4所述的检测方法,其特征在于:步骤(2)中,所述色谱条件还包括:所述流动相的流速为0.8~1.2ml/min;和/或,柱温为20~40℃;和/或,检测波长为250~260nm;和/或,进样量为5~50ul;

和/或,洗脱方式为按照如下洗脱程序进行梯度洗脱:在0→t<sub>1</sub>时间内,流动相B的比例为0%,t<sub>1</sub>为0~5min;在t<sub>1</sub>→t<sub>2</sub>时间内,流动相B的比例由0%匀速上升到100%,t<sub>2</sub>为10~30min;在t<sub>2</sub>→t<sub>3</sub>时间内,保持流动相B为100%,t<sub>3</sub>时间比t<sub>2</sub>长2~10min;在t<sub>3</sub>→t<sub>4</sub>时间内,保持流动相A的比例为100%,t<sub>4</sub>时间比t<sub>3</sub>长2~10min。

10. 按照权利要求6所述的检测方法,其特征在于:步骤(2)中,采用标准曲线法计算乙

酰氧基头孢菌素C、去乙酰基头孢菌素C和去乙酰基-7-氨基头孢烷酸的含量。

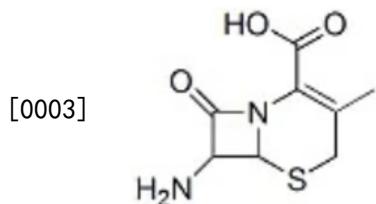
## 一种7-ADCA组合物及其中杂质的检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于药物分析技术领域,具体涉及一种7-ADCA组合物及其中杂质的检测方法。

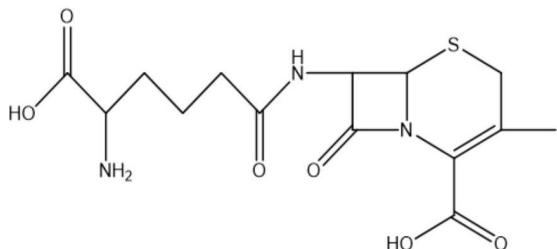
### 背景技术

[0002] 7-氨基去乙酰氧基头孢烷酸(7-ADCA)结构式如下:



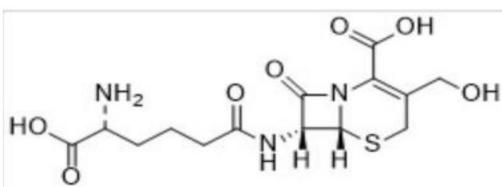
[0004] 其是重要的头孢类抗菌素半合成的中间体,在医药工业上用于合成头孢氨苄、头孢拉定和头孢羟氨苄等市场用量较大的药物。

[0005] 目前大多数厂家采用青霉素G钾盐经过化学合成扩环,再经酶解掉侧链得到。中国发明专利申请“CN112831421A-一种头孢菌素类化合物生产菌株及其应用”提出了一种新的工艺,其通过发酵法直接得到去乙酰氧基头孢菌素C,然后经酶解去掉侧链得到7-ADCA。发酵法生产7-ADCA的过程中会引入去乙酰氧基头孢菌素C、去乙酰基头孢菌素C和去乙酰基-7-氨基头孢烷酸等工艺特有的杂质。上述三种杂质的结构式如下:

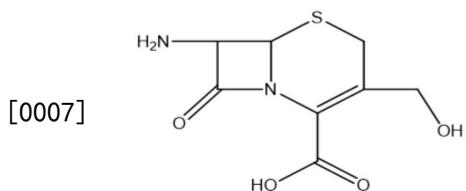


[0006]

去乙酰氧头孢菌素 C



## 去乙酰头孢菌素 C



## 去乙酰-7 氨基头孢烷酸

[0008] 上述杂质存在于7-ADCA中,其中去乙酰氧头孢菌素C和去乙酰头孢菌素C会影响产品的纯度,去乙酰-7-氨基头孢烷酸不仅会影响纯度还会使下游原料药的合成产生新的杂质。因而,有必要对经过发酵法生产的7-ADCA产品中的上述三种杂质含量进行质量控制。然而,目前已有的7-ADCA的有关物质检测方法主要针对化学法产生的工艺杂质苯乙酸、扩环酸、异构体等。对于上述新工艺引入的杂质去乙酰氧头孢菌素C(DAOC)、去乙酰基头孢菌素C(DCPC)和去乙酰基-7-氨基头孢烷酸(D-7-ACA)等,现有技术中尚缺乏相关的方法进行检测。中国发明专利申请“CN112831421A-一种头孢菌素类化合物生产菌株及其应用”中提出了利用高效液相色谱对DAOC发酵得到的发酵菌液进行检测的技术方案。

[0009] 然而,对于进一步生产得到的7-ADCA产品,其中的7-ADCA、DAOC、DCPC和D-7-ACA结构较为相似,实现色谱分离的难度较大。这为7-ADCA产品中DAOC、DCPC和D-7-ACA杂质的检測造成了较大的障碍。

## 发明内容

[0010] 针对现有技术的缺陷,本发明提供一种7-ADCA组合物及其中杂质的检测方法。目的在于对色谱条件等进行优化,实现对7-ADCA产品中DAOC、DCPC和D-7-ACA杂质的色谱分离和高效液相色谱检测。

[0011] 一种7-ADCA组合物,它含有如下重量百分比的组分:

[0012] 7-氨基去乙酰氧基头孢烷酸90.0-99.9%;

[0013] 去乙酰氧基头孢菌素C 0-5.0%;

[0014] 去乙酰基头孢菌素C 0-5.0%;

[0015] 去乙酰基-7-氨基头孢烷酸0-5.0%。

[0016] 优选的,它的HPLC色谱图中,所述7-氨基去乙酰氧基头孢烷酸的保留时间为2-5min,所述去乙酰氧基头孢菌素C的保留时间为4-8min,所述去乙酰基头孢菌素C的保留时间为5-11min,所述去乙酰基-7-氨基头孢烷酸的保留时间为8-15min;

[0017] HPLC色谱的色谱条件为:色谱柱以含碳量大于12%的十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;磷酸盐溶液为流动相A,磷酸盐溶液-乙腈混合液为流动相B。

[0018] 优选的,它的HPLC色谱图如图2所示。

[0019] 本发明还提供上述组合物中杂质的检测方法,包括如下步骤:

[0020] (1)将所述组合物配制成为供试品溶液;

[0021] (2)对所述供试品溶液进行HPLC测试,检测所述组合物中的乙酰氧基头孢菌素C、去乙酰基头孢菌素C和去乙酰基-7-氨基头孢烷酸;

[0022] 其中,色谱条件为:色谱柱以含碳量为12%~20%的十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂;磷酸盐溶液为流动相A,磷酸盐溶液-乙腈混合液为流动相B。

[0023] 优选的,步骤(1)中,供试品溶液的制备方法为采用助溶剂溶解组合物后,用流动相A定容;所述助溶剂为氨水与乙腈按照体积比(80~40):(20~60)的混合溶液,所述氨水的浓度为质量百分比0.1~1.0%;所述组合物与所述助溶剂的用量比为20mg:1~10ml。

[0024] 优选的,步骤(1)中,所述助溶剂为氨水与乙腈按照体积比60:40的混合溶液,所述氨水的浓度为质量百分比0.25%。

[0025] 优选的,步骤(2)中,所述色谱柱以含碳量为12%~20%的十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,优选以含碳量为15%的十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂。

[0026] 优选的,步骤(2)中,所述磷酸盐溶液为磷酸二氢钾、磷酸二氢钠、磷酸氢二钾或磷酸氢二钠中至少一种的溶液;和/或,所述磷酸盐溶液以磷酸根计浓度为5~100mmol/L;和/或,所述流动相A的pH为4.0~5.0;优选的,所述磷酸盐溶液为磷酸二氢钠溶液,以磷酸根计的浓度为10mmol/L,pH值为4.5;

[0027] 和/或,所述流动相B是磷酸盐溶液-乙腈按照体积比(95~60):(5~40)的混合液,优选为体积比80:20。

[0028] 优选的,步骤(2)中,所述色谱条件还包括:所述流动相的流速为0.8~1.2ml/min,优选1.0ml/min;和/或,柱温为20~40℃,优选30℃;和/或,检测波长为250~260nm,优选254nm;和/或,进样量为5~50ul,优选20ul;

[0029] 和/或,洗脱方式为按照如下洗脱程序进行梯度洗脱:在0→t<sub>1</sub>时间内,流动相B的比例为0%,t<sub>1</sub>为0~5min,优选1~3min,最优选1min;在t<sub>1</sub>→t<sub>2</sub>时间内,流动相B的比例由0%匀速上升到100%,t<sub>2</sub>为10~30min,优选15~25min,最优选20min;在t<sub>2</sub>→t<sub>3</sub>时间内,保持流动相B为100%,t<sub>3</sub>时间比t<sub>2</sub>长2~10min,优选3~8min,最优选5min;在t<sub>3</sub>→t<sub>4</sub>时间内,保持流动相A的比例为100%,t<sub>4</sub>时间比t<sub>3</sub>长2~10min,优选3~8min,最优选5min。

[0030] 优选的,步骤(2)中,采用标准曲线法计算乙酰氧基头孢菌素C、去乙酰基头孢菌素C和去乙酰基-7-氨基头孢烷酸的含量。

[0031] 采用本发明的技术方案后,能够通过优选的色谱条件对7-ADCA产品中的DAOC、DCPC和D-7-ACA杂质进行色谱分离,实现这三种杂质的高效液相色谱检测。本发明的方法准确度高、灵敏度高、专属性强,为经过发酵、酶解的工艺生产的7-ADCA产品提供了一种有效的质量检测方法。

[0032] 显然,根据本发明的上述内容,按照本领域的普通技术知识和惯用手段,在不脱离本发明上述基本技术思想前提下,还可以做出其它多种形式的修改、替换或变更。

[0033] 以下通过实施例形式的具体实施方式,对本发明的上述内容再作进一步的详细说明。但不应将此理解为本发明上述主题的范围仅限于以下的实例。凡基于本发明上述内容所实现的技术均属于本发明的范围。

## 附图说明

[0034] 图1为实施例1中得到的加标溶液(含D-7-ACA、DCPC、7-ADCA和DAOC的浓度分别为10μg/ml、10μg/ml、1mg/ml、0.5mg/ml)各杂质和主成分的典型色谱图;

[0035] 图2为实施例2中得到的供试品溶液的典型色谱图;

- [0036] 图3为实施例2中得到的加标溶液各杂质和主成分的典型色谱图；
- [0037] 图4为实施例3中得到的加标溶液各杂质和主成分的典型色谱图；
- [0038] 图5为实施例4中得到的加标溶液各杂质和主成分的典型色谱图。

## 具体实施方式

- [0039] 以下实施例和实验例中,所用的试剂和材料均为市售品。
- [0040] 实施例1
- [0041] 本实施例包括如下步骤：
- [0042] 1、供试品溶液配制：
- [0043] 流动相A配制：流动相A为10mmol/L磷酸二氢钾溶液(用磷酸调pH至4.0)。
- [0044] 供试品溶液配制：称取7-ADCA样品(供试品)50mg,置100ml容量瓶中,加助溶剂10ml,溶解,然后用流动相A溶解并稀释至刻度,摇匀即得供试品溶液。其中,助溶剂为重量百分数0.2%的氨水与乙腈按照体积比50:50的混合液。
- [0045] 加标溶液的配制：采用流动相A作为溶剂,配制成含D-7-ACA、DCPC、7-ADCA和DAOC的浓度分别为10 $\mu$ g/ml、10 $\mu$ g/ml、1mg/ml、0.5mg/ml的加标溶液。
- [0046] 2、进行HPLC色谱检测：
- [0047] 仪器:Agilent 1260高效液相色谱仪；
- [0048] 色谱条件为：
- [0049] 色谱柱:岛津Shim-pack GIST C18 (4.6\*250mm,5 $\mu$ m)；
- [0050] 流动相:流动相A为10mmol/L磷酸二氢钾溶液(用磷酸调pH至4.0)；流动相B为流动相A与乙腈按照体积比85:15的混合溶液。
- [0051] 洗脱梯度表：
- [0052] 

时间(min)	流动相A(%)	流动相B(%)
0	100	0
2	100	0
18	0	100
18	100	0
24	100	0
- [0053] 检测波长:252nm；
- [0054] 流速:0.8ml/min；
- [0055] 柱温:25℃；
- [0056] 进样量:10 $\mu$ l。
- [0057] 检测得到的加标溶液的色谱图如图1所示。
- [0058] 3、方法学验证
- [0059] 根据工作站软件计算D-7-ACA/DCPC、DCPC/7-ADCA和7-ADCA/DAOC的分离度；计算加标浓度为(2 $\mu$ g/ml~10 $\mu$ g/ml)的D-7-ACA、DCPC和DAOC的回收率；按照信噪比法计算D-7-ACA、DCPC和DAOC的检测限；按照信噪比法方法计算D-7-ACA、DCPC和DAOC的定量限。结果如下表所示。

	项目	结果	标准规定
[0060]	分离度 分离度	D-7-ACA/DCPC 7.9	$\geq 2.0$
	DCPC/7-ADCA 7-ADCA/DAOC	7.3 11.7	$\geq 2.0$
	回收率 D-7-ACA DCPC DAOC	98.4% 96.5% 97.3%	90.0~110.0%
[0061]	检测限 D-7-ACA DCPC 7-ADCA DAOC	0.03ug/ml 0.03ug/ml 0.03ug/ml 0.03ug/ml	<0.1ug/ml (0.02%)
	D-7-ACA DCPC 7-ADCA DAOC	0.08ug/ml 0.08ug/ml 0.08ug/ml 0.08ug/ml	<0.25ug/ml (0.05%)

[0062] 结果表明,各杂质峰的分离度、回收率均符合《中国药典》2020年版《通则:9101分析方法验证指导原则》的规定,各杂质及主成分的检测限浓度小于样品浓度(1mg/ml)的0.02%,定量限浓度小于样品浓度的0.05%。

[0063] 实施例2

[0064] 本实施例包括如下步骤:

[0065] 1、供试品溶液配制:

[0066] 配制流动相A,流动相A为10mmol/L磷酸二氢钾溶液(用磷酸调pH至4.5)。

[0067] 称取7-ADCA样品(供试品)50mg,置100ml容量瓶中,加助溶剂10ml,溶解,然后用流动相A溶解并稀释至刻度,摇匀即得供试品溶液。

[0068] 其中,助溶剂为重量百分数0.25%的氨水与乙腈按照体积比60:40的混合液。

[0069] 2、进行HPLC色谱检测:

[0070] 仪器:Agilent 1260高效液相色谱仪;

[0071] 色谱条件为:

[0072] 色谱柱:大阪曹达CAPCELL PAK C18-MGII (4.6\*250mm,5um);

[0073] 流动相:流动相A为10mmol/L磷酸二氢钾溶液(用磷酸调pH至4.5);流动相B为流动相A与乙腈按照体积比80:20的混合溶液。

[0074] 洗脱梯度表:

时间(min)	流动相A(%)	流动相B(%)
0	100	0
1	100	0

20	0	100
20.01	100	0
25	100	0

[0076] 检测波长:254nm;

[0077] 流速:1ml/min;

[0078] 柱温:30℃;

[0079] 进样量:20ul。

[0080] 检测得到的供试品溶液的色谱图如图2所示,加标溶液的色谱图如图3所示。

[0081] 3、方法学验证

[0082] 根据工作站软件计算D-7-ACA/DCPC、DCPC/7-ADCA和7-ADCA/DAOC的分离度;计算加标浓度为(2μg/ml~10μg/ml)的D-7-ACA、DCPC和DAOC的回收率;按照信噪比法计算D-7-ACA、DCPC和DAOC的检测限;按照信噪比法方法计算D-7-ACA、DCPC和DAOC的定量限。结果如下表所示。

项目		结果	标准规定
分离度	D-7-ACA/DCPC	9.5	≥2.0
	DCPC/7-ADCA	6.6	≥2.0
	7-ADCA/DAOC	15.1	≥2.0
回收率	D-7-ACA	96.8%	90.0~110.0%
	DCPC	96.1%	90.0~110.0%
	DAOC	98.4%	90.0~110.0%
[0083] 检测限	D-7-ACA	0.02ug/ml	<0.1ug/ml (0.02%)
	DCPC	0.02ug/ml	<0.1ug/ml (0.02%)
	7-ADCA	0.02ug/ml	<0.1ug/ml (0.02%)
	DAOC	0.02ug/ml	<0.1ug/ml (0.02%)
定量限	D-7-ACA	0.05ug/ml	<0.25ug/ml (0.05%)
	DCPC	0.05ug/ml	<0.25ug/ml (0.05%)
	7-ADCA	0.05ug/ml	<0.25ug/ml (0.05%)
	DAOC	0.05ug/ml	<0.25ug/ml (0.05%)

[0084] 结果表明,各杂质峰的分离度、回收率均符合《中国药典》2020年版《通则:9101分析方法验证指导原则》的规定,各杂质及主成分的检测限浓度小于样品浓度(1mg/ml)的0.02%,定量限浓度小于样品浓度的0.05%。

[0085] 实施例3

[0086] 本实施例包括如下步骤:

[0087] 1、供试品溶液配制:

[0088] 配制流动相A,流动相A为20mmol/L磷酸二氢钾溶液(用磷酸调pH至5.0)。

[0089] 称取7-ADCA样品(供试品)50mg,置100ml容量瓶中,加助溶剂10ml,溶解,然后用流

流动相A溶解并稀释至刻度，摇匀即得供试品溶液。

[0090] 其中，助溶剂为重量百分数0.5%的氨水与乙腈按照体积比60:40的混合液。

[0091] 2、进行HPLC色谱检测：

[0092] 仪器：Agilent 1260高效液相色谱仪；

[0093] 色谱条件为：

[0094] 色谱柱：费罗门Luna C18 (2) (4.6\*250mm, 5um)；

[0095] 流动相：流动相A为20mmol/L磷酸二氢钾溶液（用磷酸调pH至5.0）；流动相B为流动相A与乙腈按照体积比75:25的混合溶液。

[0096] 洗脱梯度表：

[0097]	时间(min)	流动相A(%)	流动相B(%)
	0	100	0
	3	100	0
	18	0	100
	18.01	100	0
	25	100	0

[0098] 检测波长：260nm；

[0099] 流速：1.2ml/min；

[0100] 柱温：30℃；

[0101] 进样量：20ul。

[0102] 检测得到的供试品溶液的色谱图如图4所示。

[0103] 3、方法学验证

[0104] 根据工作站软件计算D-7-ACA/DCPC、DCPC/7-ADCA和7-ADCA/DAOC的分离度；计算加标浓度为(2μg/ml～10μg/ml)的D-7-ACA、DCPC和DAOC的回收率；按照信噪比法计算D-7-ACA、DCPC和DAOC的检测限；按照信噪比法方法计算D-7-ACA、DCPC和DAOC的定量限。结果如下表所示。

项目		结果	标准规定
分离度	D-7-ACA/DCPC	8.5	≥2.0
	DCPC/7-ADCA	6.0	≥2.0
	7-ADCA/DAOC	14.3	≥2.0
回收率	D-7-ACA	95.9%	90.0~110.0%
	DCPC	96.6%	90.0~110.0%
	DAOC	97.4%	90.0~110.0%
[0105]	D-7-ACA	0.02ug/ml	<0.1ug/ml (0.02%)
	DCPC	0.02ug/ml	<0.1ug/ml (0.02%)
	7-ADCA	0.02ug/ml	<0.1ug/ml (0.02%)
	DAOC	0.02ug/ml	<0.1ug/ml (0.02%)
定量限	D-7-ACA	0.05ug/ml	<0.25ug/ml (0.05%)
	DCPC	0.05ug/ml	<0.25ug/ml (0.05%)
	7-ADCA	0.05ug/ml	<0.25ug/ml (0.05%)
	DAOC	0.05ug/ml	<0.25ug/ml (0.05%)

[0106] 结果表明,各杂质峰的分离度、回收率均符合《中国药典》2020年版《通则:9101分析方法验证指导原则》的规定,各杂质及主成分的检测限浓度小于样品浓度(1mg/ml)的0.02%,定量限浓度小于样品浓度的0.05%。

[0107] 实施例4

[0108] 本实施例包括如下步骤:

[0109] 1、供试品溶液配制:

[0110] 配制流动相A,流动相A为25mmol/L磷酸二氢钾溶液(用磷酸调pH至4.5)。

[0111] 称取7-ADCA样品(供试品)50mg,置100ml容量瓶中,加助溶剂10ml,溶解,然后用流动相A溶解并稀释至刻度,摇匀即得供试品溶液。

[0112] 其中,助溶剂为重量百分数0.25%的氨水与乙腈按照体积比60:40的混合液。

[0113] 2、进行HPLC色谱检测:

[0114] 仪器:岛津LC-2030高效液相色谱仪;

[0115] 色谱条件为:

[0116] 色谱柱:大阪曹达CAPCELL PAK C18-MGII (4.6\*250mm,5um);

[0117] 流动相:流动相A为25mmol/L磷酸二氢钾溶液(用磷酸调pH至4.5);流动相B为流动相A与乙腈按照体积比70:30的混合溶液。

[0118] 洗脱梯度表:

时间(min)	流动相A(%)	流动相B(%)
0	100	0
1	100	0
20	0	100

20.01	100	0
25	100	0

- [0120] 检测波长:254nm;
- [0121] 流速:1.0ml/min;
- [0122] 柱温:30℃;
- [0123] 进样量:20ul。
- [0124] 检测得到的供试品溶液的色谱图如图5所示。
- [0125] 3、方法学验证
- [0126] 根据工作站软件计算D-7-ACA/DCPC、DCPC/7-ADCA和7-ADCA/DAOC的分离度;计算加标浓度为(2μg/ml~10μg/ml)的D-7-ACA、DCPC和DAOC的回收率;按照信噪比法计算D-7-ACA、DCPC和DAOC的检测限;按照信噪比法方法计算D-7-ACA、DCPC和DAOC的定量限。结果如下表所示。

项目		结果	标准规定
分离度	D-7-ACA/DCPC	9.7	≥2.0
	DCPC/7-ADCA	5.4	≥2.0
	7-ADCA/DAOC	13.2	≥2.0
回收率	D-7-ACA	96.2%	90.0~110.0%
	DCPC	98.6%	90.0~110.0%
	DAOC	96.4%	90.0~110.0%
检测限	D-7-ACA	0.02ug/ml	<0.1ug/ml (0.02%)
	DCPC	0.02ug/ml	<0.1ug/ml (0.02%)

	7-ADCA	0.02ug/ml	<0.1ug/ml (0.02%)
	DAOC	0.02ug/ml	<0.1ug/ml (0.02%)
定量限	D-7-ACA	0.05ug/ml	<0.25ug/ml (0.05%)
	DCPC	0.05ug/ml	<0.25ug/ml (0.05%)
	7-ADCA	0.05ug/ml	<0.25ug/ml (0.05%)
	DAOC	0.05ug/ml	<0.25ug/ml (0.05%)

[0129] 结果表明,各杂质峰的分离度、回收率均符合《中国药典》2020年版《通则:9101分析方法验证指导原则》的规定,各杂质及主成分的检测限浓度小于样品浓度(1mg/ml)的0.02%,定量限浓度小于样品浓度的0.05%。

[0130] 对上述实施例进行对比,发现各实施例均具有较好的分离度和回收率,且检测限和定量限均较低。其中实施例2-4的检测限和定量限更低于实施例1。此外在实施例2-4得到的色谱图中,实施例2的色谱图基线更加平整,更有利准确的定量检测。

[0131] 通过上述实施例可以看到,采用本发明提供的方法,能够对7-ADCA产品中的D-7-ACA、DCPC和DAOC三种杂质进行高效液相色谱检测,本发明的方法对D-7-ACA/DCPC、DCPC/7-

ADCA和7-ADCA/DAOC的谱峰分离度好,且对D-7-ACA、DCPC和DAOC三种杂质的回收率高、检测限低、定量限低,这表明本发明的方法准确好、灵敏高且专属强。本发明在对7-ADCA产品的质量控制中具有很高的应用潜力。

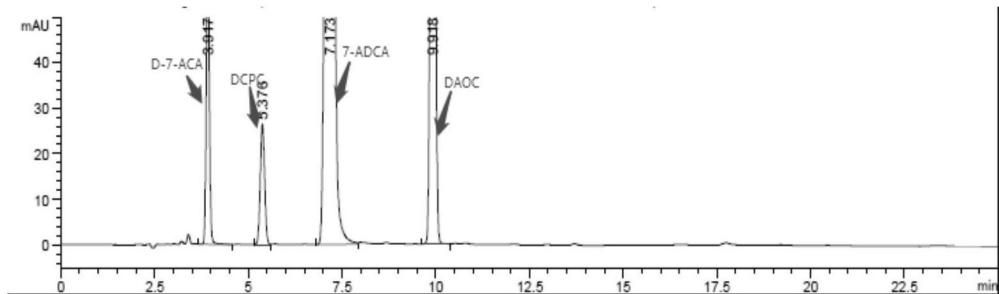


图1

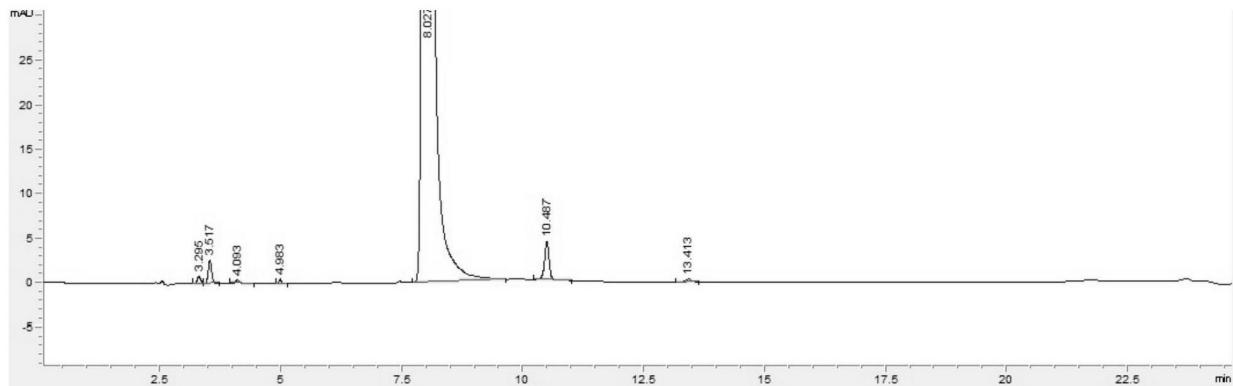


图2

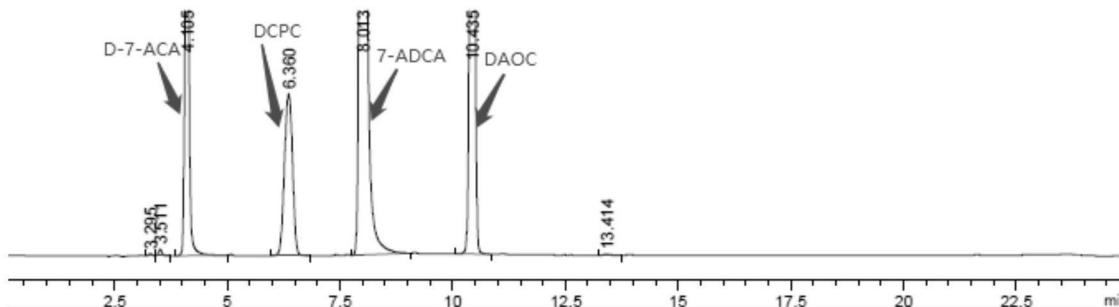


图3

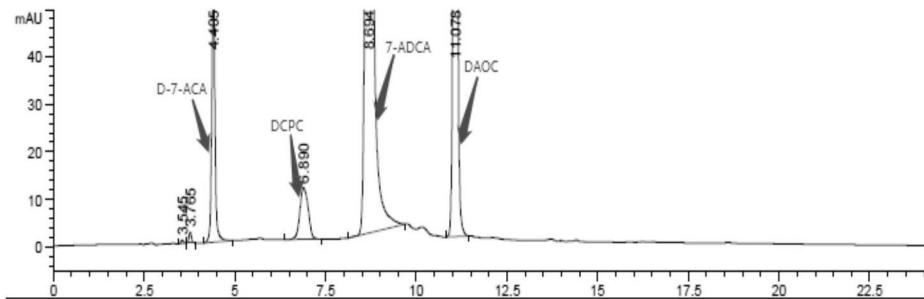


图4

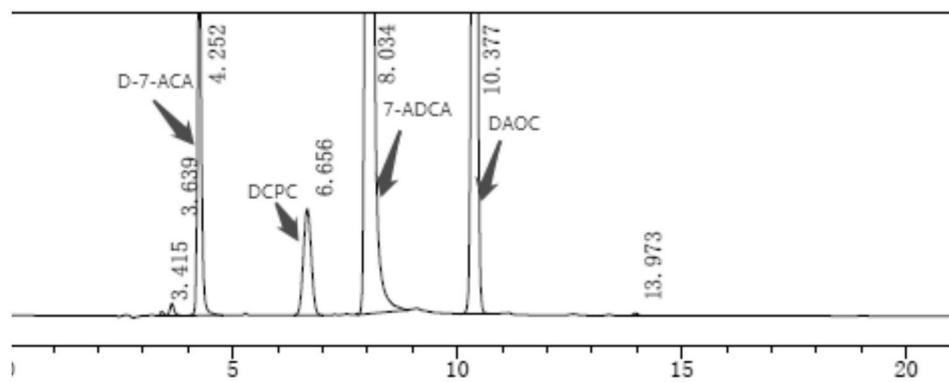


图5