

说明书

发明名称: 一种生发肽制剂中有关物质的分析方法

技术领域

[0001] 本发明涉及分析化学领域，特别涉及一种生发肽制剂中有关物质的分析方法。

背景技术

[0002] 生发肽为胸腺肽T β 4中与肌动蛋白结合的核心功能区，由美国国立卫生研究院(NIH)科学家研究发现，共七个氨基酸组成，序列为亮氨酸-赖氨酸-赖氨酸-苏氨酸-谷氨酸-苏氨酸-谷氨酰胺(L-K-K-T-E-T-Q)。研究表明，生发肽具有键合肌动蛋白、促进毛发生长、刺激血管再生、加速表皮伤口愈合及促进细胞迁移等多种功能。

[0003] 药效学试验和安全性评价试验结果表明，生发肽安全无毒，具有促进大鼠角膜上皮修复，减轻炎症反应的作用。生发肽滴眼液的适应症为干眼症引起的角膜上皮点状缺损和各种原因(包括Ⅰ、Ⅱ度烧伤、机械伤、医源性)引起的角膜上皮片状缺损。

[0004] 生发肽在合成过程中可能生成差向异构体、缺失肽、插入肽等，得到了所有的单个位点的差向异构体7个(其中Thr的非对映异构体为D-allo结构)，以及容易产生的缺失肽杂质6个、插入肽杂质13个、错接肽杂质7个、断裂肽杂质10个，同时根据其序列结构和工艺，合成了容易降解产生的IM020/Glu7杂质，研究了共计44个杂质。

[0005] 目前在中国药典并没有原料药的检测方法，生发肽生产商浙江湃肽生物股份有限公司提供的检测方法为：

[0006] 色谱柱：YMC-Pack ODS-AQ 4.6 $\times$ 250mm，3 μ m(日本YMC公司生产的C18高效色谱柱)

[0007] 柱温：45 $^{\circ}$ C

[0008] 流动相A：50mM磷酸盐缓冲液(pH6.0)流动相B：50%甲醇

[0009] 流速：0.8ml/min

[0010] 进样量：20 μ l(2mg/ml)

[0011] 检测波长：UV210nm

[0012] 洗脱梯度：

时间（min）	流动相 A（%）	流动相 B（%）
0	98	2
30	92	8
40	40	60
50	40	60
51	98	2
60	98	2

[0013] 如图1-3所示，图1为现有技术中生发肽检测的谱图、图2为现有技术中生发肽中API与杂质A(Glu⁷-生发肽)的谱图、图3为现有技术中生发肽中API与杂质B(D-Leu¹-生发肽)和杂质C(Di-Glu⁵-生发肽)的谱图。上述检测方法的问题是，检测的时间长达50min以上，影响检测效率，同时检测多个杂质的专属性不好，杂质于主峰的分离度欠佳，且混标检测后，前面的两个杂质分离度很差(远小于1.5)，而且主峰后的杂质根本无法实现基线分离，无法同时对多个已知杂质进行检测。因此需要一个新的纯度检测方法，从而能够检测和分离以上多个已知杂质及其他未知杂质。

[0014] 因此，需要开发一种能将生发肽中有关物质有效分离及并能排除辅料干扰的分析检测方法。

[0015] 发明内容

[0016] 针对生发肽中的杂质，本发明的发明人开发了多个液相色谱条件进行分离，同时通过对工艺的研究，最终确定了能够全面控制这些杂质的工艺。本申请针对几个常见杂质检测进行了方法的优化。

[0017] 本发明提供了一种能对生发肽中有关物质进行高效分析，且分析时间大为缩短的方法，所述分析方法包含样品准备步骤和采用高效液相色谱法进行检测过程；所述高压液相色谱柱法采用以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱。

[0018] 进一步的，所述分析方法能够将生发肽与有关杂质进行有效分离，优选的，所述有关物质是指Glu⁷-生发肽(杂质A)、D-Leu¹-生发肽(杂质B)和Di-Glu⁵-生发肽(杂质C)。

- [0019] 进一步的,所述高压液相色谱柱法的流动相包括流动相A和流动相B,其中流动相A为三氟乙酸水溶液,其中三氟乙酸和水的体积比为0.05:100至0.15:100,例如还可以是0.06:100、0.07:100、0.08:100、0.09:100、0.10:100、0.11:100、0.12:100、0.13:100、0.14:100。优选的,流动相A中三氟乙酸和水的体积比是0.1:100。
- [0020] 进一步的,所述流动相B为三氟乙酸-乙腈,其中三氟乙酸与乙腈的体积比为0.05:100至0.15:100。例如还可以是0.06:100、0.07:100、0.08:100、0.09:100、0.10:100、0.11:100、0.12:100、0.13:100、0.14:100。优选的,流动相B中三氟乙酸和乙腈的体积比是0.1:100。
- [0021] 进一步的,所述高压液相色谱法检测波长为200nm至220nm,例如还可以是201nm、202nm、203nm、204nm、205nm、206nm、207nm、208nm、209nm、210nm、211nm、212nm、213nm、214nm、215nm、216nm、217nm、218nm、219nm。优选的,所述检测波长为210nm;
- [0022] 进一步的,所述色谱柱的柱温为30~40℃,例如还可以是31℃、32℃、33℃、34℃、35℃、36℃、37℃、38℃、39℃。优选的,所述色谱柱的温度为35℃。
- [0023] 进一步的,高效液相色谱法的进样量为90~110 μ l,例如可以是91 μ l、92 μ l、93 μ l、94 μ l、95 μ l、96 μ l、97 μ l、98 μ l、99 μ l、100 μ l、101 μ l、102 μ l、103 μ l、104 μ l、105 μ l、106 μ l、107 μ l、108 μ l、109 μ l。优选的,所述进样量为100 μ l。
- [0024] 进一步的,所述高压液相色谱法的流速为0.8~1.5ml/min,例如可以是0.8ml/min、0.9ml/min、1.0ml/min、1.1ml/min、1.2ml/min、1.3ml/min、1.4ml/min、1.5ml/min,优选的,流速为0.8ml/min。
- [0025] 优选的,所述色谱柱的规格为4.6 $\times$ 150mm, 3 μ m。
- [0026] 进一步的,所述色谱柱选自Waters色谱柱、Agilent色谱柱、Thermo色谱柱、Phenomenex色谱柱、Shimatsu色谱柱或YMC色谱柱中的一种。在一个具体实施方式中,所述色谱柱为YMC-Triart C18。
- [0027] 进一步的,所述高压液相色谱法采用梯度洗脱,所述梯度洗脱的程序为:

- [0028] 0min: 流动相A与流动相B的体积比为100:0;
- [0029] 8min: 流动相A与流动相B的体积比为83:17至87:13;
- [0030] 8min ~ 13min: 流动相A与流动相B的体积比维持在83:17至87:13;
- [0031] 13min之后直到20min: 流动相A与流动相B的体积比为100:0。
- [0032] 优选的, 所述梯度洗脱的程序为:
- [0033] 0min: 流动相A与流动相B的体积比为100:0;
- [0034] 8min: 流动相A与流动相B的体积比维持在85:15;
- [0035] 8min ~ 13min: 流动相A与流动相B的体积比维持在85:15;
- [0036] 13min之后直到20min: 流动相A与流动相B的体积比为100:0。
- [0037] 在一个具体实施方式中, 洗脱程序如下:

时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	100	0
8	85	15
13	85	15
13.1	100	0
20	100	0

- [0038] 进一步的, 在一些需要定量的具体实施方案中, 所述方法还包括计算峰的积分面积。
- [0039] 本发明的第二方面, 提供了一种如前所述的分析方法在生发肽制剂质量控制方面的应用。
- [0040] 在一些具体实施方式中, 所述应用包括用于检测生发肽的纯度、分析生发肽的杂质种类和/或纯度。
- [0041] 在一个具体实施方式中, 所述生发肽制剂为生发肽滴眼液。
- [0042] 本发明所述方法以氨基酸/多肽型的十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂(4.6 × 150mm, 3 μm), 流动相为: A: 超纯水(0.1%三氟乙酸); B: 乙腈(0.1%三氟乙酸); 检测波长为210nm, 柱温为35℃, 流速为0.8–1.5ml/min, 可以有效检测和分离生发肽的3个已知杂质(Glu⁷-生发肽、D-Leu¹-生发肽和Di-Glu⁵-生发肽)的干扰, 并且将检测时间缩短到了20分钟左右, 并由此可以建立生发肽的质量标准。

附图说明

- [0043] 图1为现有技术中生发肽检测的谱图；
- [0044] 图2为现有技术中生发肽中API与有关物质的谱图；
- [0045] 图3为现有技术中生发肽中API与其他有关物质的谱图；
- [0046] 图4为实施例1的优化条件下的谱图；
- [0047] 图5为实施例2的等度洗脱的谱图；
- [0048] 图6为实施例3的降低进样量后的谱图；
- [0049] 图7为实施例4的提高梯度洗脱后的谱图。

具体实施方式

- [0050] 本发明公开了一种生发肽制剂中有关物质的分析方法，本领域技术人员可以借鉴本文内容，适当改进工艺参数来实现。特别需要指出的是，所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的，它们都被视为包括在本发明。本发明的方法已经通过较佳实施案例进行描述，相关人员明显能在部脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法和应用进行改动或适当变更与组合来实施和应用本发明技术。
- [0051] 除非另有定义，本发明中所使用的所有科学和技术术语具有与本发明涉及技术领域的技术人员通常理解的相同的含义。
- [0052] 本发明中，术语“流动相”是指色谱过程中携带待测组分向前移动的物质称为流动相。与固定相处于平衡状态、带动样品向前移动的另一相。
- [0053] 为了使本领域的技术人员更好地理解本发明的技术方案，下面结合具体实施例对本发明做进一步的详细说明。
- [0054] 以下实施例中生发肽来自浙江湃肽生物股份有限公司，批号为PT2021122101，水为超纯水，其他试剂均为分析纯试剂。
- [0055] 实施例1：
- [0056] 按照如下方法配制生发肽滴眼液：
- [0057] 1)在一定容量配液罐中加入处方量约70%的注射用水；

- [0058] 2)将处方量的无机盐加入不锈钢桶内，加入处方量约15%的注射用水，搅拌使溶解；加入处方量的生发肽，搅拌溶解至澄清溶液；
- [0059] 3)将混合溶液转置25L配液罐内，用处方量约10%的注射用水荡洗盛放混合溶液的容器3次，荡洗液一并加入配液罐内，搅拌5min，使混合均匀；
- [0060] 4)取盐酸适量，缓慢加入冷却的注射用水中配制成1mol/L的盐酸溶液，备用；
- [0061] 5)开启搅拌，缓慢加入配制好的盐酸溶液，边加边搅拌，调节pH至6.5-7.5，继续搅拌5min。
- [0062] 6)补足注射用水至处方全量，启动搅拌，搅拌10min使混合均匀。取样检测。
- [0063] 采用以十八烷基硅烷键合硅胶为色谱柱填充剂。
- [0064] 色谱条件：
- [0065] 【仪器】Agilent Infinity II
- [0066] 【检测器】Agilent DAD
- [0067] 流动相A：0.1%三氟乙酸水溶液
- [0068] 流动相B：0.1%三氟乙酸乙腈
- [0069] 色谱柱：YMC-Triart C184.6×150mm，3μm
- [0070] 柱温35℃，进样量100μl，检测波长210nm，流速0.8ml/min
- [0071] 按照表1进行梯度洗脱：
- [0072] 表1：洗脱程序

时间（min）	流动相 A（%）	流动相 B（%）
0	100	0
8	85	15
13	85	15
13.1	100	0
20	100	0

- [0073] 结果如图4所示，此方法中生发肽主峰与杂质峰的分度佳(2.5)，峰型、拖尾(1.1)及理论塔板数(13000)均能达到优化的目的，其进样时间大大缩短至20min，且主峰峰形良好、拖尾因子小，与杂质峰分离度良好。
- [0074] 实施例2：在原色谱条件的基础上改变色谱柱，调整洗脱梯度为等度洗脱
- [0075] 色谱条件：

- [0076] 流动相A：0.1%三氟乙酸水溶液
- [0077] 流动相B：0.1%三氟乙酸乙腈
- [0078] 色谱柱：Agilent Zorbax SB-C18色谱柱，4.6×150mm，5 μm
- [0079] 柱温35℃，进样量100 μl，波长210nm，流速0.8ml/min
- [0080] 调整洗脱梯度为等度洗脱(流动相A：B=90：10),洗脱30min，观察主峰在10%有机相比比例下等度洗脱情况。结果如图5所示，三个梯度条件下，生发肽主峰出峰位置均出现杂质峰，分离度较小。证明在等度洗脱条件下，主峰与杂质峰分离度较差，且低比例有机相时，主峰拖尾严重。
- [0081] 实施例3：降低进样量为50 μl，并继续考察洗脱梯度
- [0082] 色谱条件：
- [0083] 流动相A：0.1%三氟乙酸水溶液
- [0084] 流动相B：0.1%三氟乙酸乙腈
- [0085] 色谱柱：YMC-Triart C184.6×150mm，3 μm
- [0086] 柱温35℃，进样量50 μl，波长210nm，流速0.8ml/min
- [0087] 洗脱的前3min采用高比例水相洗脱极性较大的辅料峰，3–15min采用7%有机相比比例洗脱主峰，观察主峰峰形及与杂质峰分离情况，并保证主峰出峰不受梯度变化影响，按表2进行梯度洗脱：
- [0088] 表2：洗脱程序

时间（min）	流动相 A（%）	流动相 B（%）
0	100	0
3	98	2
3.1	93	7
15	93	7
15.1	85	15
20	85	15
20.1	100	0
30	100	0

- [0089] 考察结果如图6所示，主峰受梯度变化峰干扰较大。
- [0090] 实施例4：提高梯度变化速率，观察主峰与杂质峰分离情况
- [0091] 色谱条件：

[0092] 流动相A：0.1%三氟乙酸水溶液

[0093] 流动相B：0.1%三氟乙酸乙腈

[0094] 色谱柱：YMC-Triart C184.6×150mm，3μm

[0095] 柱温35℃，进样量100μl，波长210nm，流速0.8ml/min

[0096] 按表3进行梯度洗脱：

[0097] 表3：洗脱程序

时间 (min)	流动相 A(%)	流动相 B (%)
0	98	0
8	85	15
13	85	15
13.1	100	0
20	100	0

[0098] 结果如图7所示，供试品溶液中生发肽主峰与杂质峰分离度差(1.1)。

[0099] 以上所述仅为本发明的优选实施例而已，并不用于限制本发明，对于本领域的技术人员来说，本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内，所作的任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

权利要求书

- [权利要求 1] 一种生发肽制剂中有关物质的分析方法，其特征在于，该分析方法包含以下步骤：
- (1)准备样品；
- (2)采用高效液相色谱法进行检测；其中，所述高压液相色谱柱法采用以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱；所述高压液相色谱柱法的流动相包括流动相A和流动相B，其中流动相A为三氟乙酸水溶液，其中三氟乙酸和水的体积比为0.05:100至0.15:100，流动相B为三氟乙酸-乙腈。
- [权利要求 2] 根据权利要求1所述生发肽制剂中有关物质的分析方法，其特征在于，所述流动相B中三氟乙酸与乙腈的体积比为0.05:100至0.15:100。
- [权利要求 3] 根据权利要求1所述生发肽制剂中有关物质的分析方法，其特征在于，所述色谱柱的柱温为30~40℃。
- [权利要求 4] 根据权利要求1所述生发肽制剂中有关物质的分析方法，其特征在于，高效液相色谱法的进样量为90~110 μ l。
- [权利要求 5] 根据权利要求1所述生发肽制剂中有关物质的分析方法，其特征在于，所述高压液相色谱法中的检测波长为210nm。
- [权利要求 6] 根据权利要求1所述生发肽制剂中有关物质的分析方法，其特征在于，所述色谱柱选自Waters色谱柱、Agilent色谱柱、Thermos色谱柱、Phenomenex色谱柱、Shimatsu色谱柱或YMC色谱柱中的一种。
- [权利要求 7] 根据权利要求1所述生发肽制剂中有关物质的分析方法，其特征在于，所述色谱柱的规格为4.6 $\times$ 150mm，3 μ m。
- [权利要求 8] 根据权利要求1所述生发肽制剂中有关物质的分析方法，其特征在于，所述高压液相色谱法采用梯度洗脱，所述梯度洗脱的程序为：
- 0min：流动相A与流动相B的体积比为100:0；
- 8min：流动相A与流动相B的体积比为83:17至87:13；

- 8min ~ 13min: 流动相A与流动相B的体积比为83:17至87:13;
13min之后直到20min: 流动相A与流动相B的体积比为100:0。
- [权利要求 9] 根据权利要求1所述生发肽制剂中有关物质的分析方法, 其特征在于, 所述高压液相色谱法采用梯度洗脱, 所述梯度洗脱的程序为:
0min: 流动相A与流动相B的体积比为100:0;
8min: 流动相A与流动相B的体积比为85:15;
8min ~ 13min: 流动相A与流动相B的体积比为85:15;
13min之后直到20min: 流动相A与流动相B的体积比为100:0。
- [权利要求 10] 权利要求1-9任一项所述生发肽制剂中有关物质的分析方法在生发肽制剂质量控制中的应用。