



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116242934 A

(43) 申请公布日 2023.06.09

(21) 申请号 202310077275.4

(22) 申请日 2023.01.30

(71) 申请人 山西振东制药股份有限公司
地址 047100 山西省长治市长治县光明南路振东科技园

(72) 发明人 宋素丽 王红芳 张辉 王磊
芦惠

(74) 专利代理机构 北京超凡宏宇专利代理事务所(特殊普通合伙) 11463
专利代理师 王焕

(51) Int. Cl.
G01N 30/02 (2006.01)

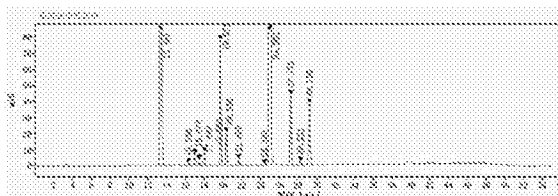
权利要求书3页 说明书22页 附图4页

(54) 发明名称

盐酸培唑帕尼中间体PZP-M2的有关物质的检测方法和应用

(57) 摘要

本发明涉及化学药物分析方法技术领域,尤其是涉及一种盐酸培唑帕尼中间体PZP-M2的有关物质的检测方法和应用。检测方法,包括如下步骤:采用高效液相色谱对供试品溶液进行检测;所述PZP-M2为N-(2-氯嘧啶-4-基)-N-甲基-2,3-二甲基-2H-吡唑-6-胺;所述高效液相色谱的检测条件包括:检测波长为210~214nm;以pH为3.1~3.3的0.009~0.011mol/L磷酸二氢钾的水溶液作为流动相A、乙腈作为流动相B进行梯度洗脱;本发明的检测方法,能够实现一次性高效分离盐酸培唑帕尼中间体PZP-M2中所控的6种杂质的有关物质,且专属性强,耐用性好,灵敏度高。



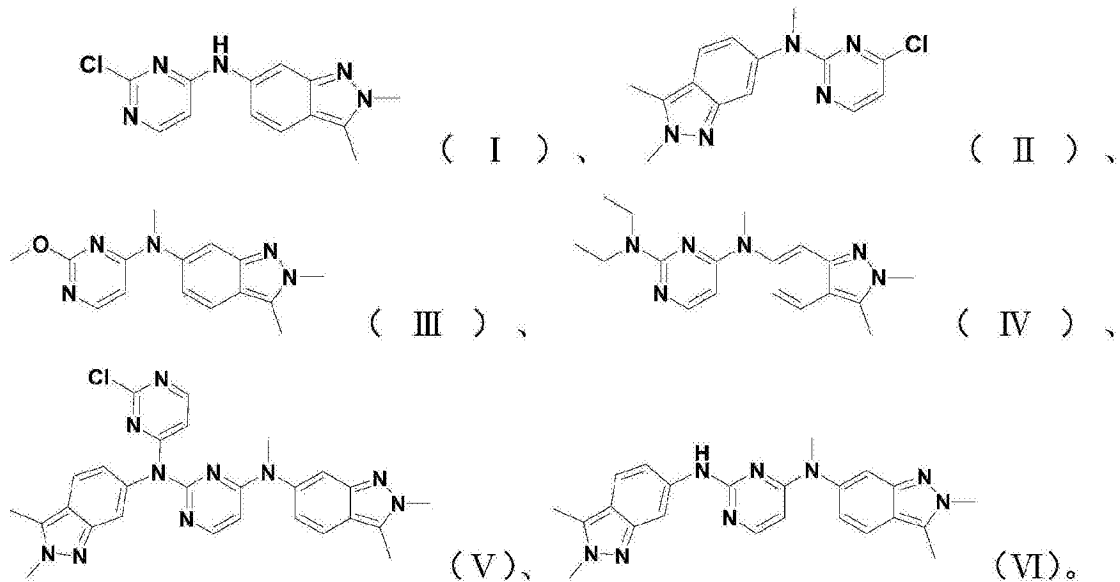
1. 盐酸培唑帕尼中间体PZP-M2的有关物质的检测方法,其特征在于,包括如下步骤:
 采用高效液相色谱对供试品溶液进行检测;
 所述PZP-M2为N-(2-氯嘧啶-4-基)-N-甲基-2,3-二甲基-2H-吡唑-6-胺;
 所述高效液相色谱的检测条件包括:
 色谱柱为十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱;
 检测波长为210~214nm;
 以pH为3.1~3.3的0.009~0.011mol/L磷酸二氢钾的水溶液作为流动相A、乙腈作为流动相B进行梯度洗脱;
 所述梯度洗脱的程序包括:

时间 (min)	A/v%	B/v%
0	79~81	19~21
5	79~81	19~21
22	54~56	44~46
45	29~31	69~71
50	79~81	19~21
55	79~81	19~21

2. 根据权利要求1所述的盐酸培唑帕尼中间体PZP-M2的有关物质的检测方法,其特征在于,所述梯度洗脱的程序包括:

时间 (min)	A/v%	B/v%
0	80	20
5	80	20
22	55	45
45	30	70
50	80	20
55	80	20

3. 根据权利要求1所述的盐酸培唑帕尼中间体PZP-M2的有关物质的检测方法,其特征在于,所述有关物质包括I、II、III、IV、V和VI中的至少一种;结构式分别如下:



4. 根据权利要求1所述的盐酸培唑帕尼中间体PZP-M2的有关物质的检测方法,其特征在于,所述流动相A为pH为3.2的0.01mol/L的磷酸二氢钾的水溶液。

5. 根据权利要求1所述的盐酸培唑帕尼中间体PZP-M2的有关物质的检测方法,其特征在于,所述检测波长为211~213nm;

优选的,所述检测波长为212nm。

6. 根据权利要求1所述的盐酸培唑帕尼中间体PZP-M2的有关物质的检测方法,其特征在于,所述梯度洗脱的流速为0.9~1.1mL/min;

优选的,所述梯度洗脱的流速为1mL/min。

7. 根据权利要求1所述的盐酸培唑帕尼中间体PZP-M2的有关物质的检测方法,其特征在于,所述色谱柱的柱温为38~42℃;

优选的,所述柱温为39~41℃;

更优选的,所述柱温为40℃;

和/或,所述色谱柱为菲罗门Titank C18或效能相当的色谱柱。

8. 根据权利要求1所述的盐酸培唑帕尼中间体PZP-M2的有关物质的检测方法,其特征在于,采用乙腈水溶液溶解供试品;

优选的,所述供试品包括盐酸培唑帕尼中间体N-(2-氯嘧啶-4-基)-N-甲基-2,3-二甲基-2H-吡唑-6-胺;

优选的,所述乙腈水溶液中,乙腈的体积分数为65%~75%。

9. 根据权利要求1或2所述的盐酸培唑帕尼中间体PZP-M2的有关物质的检测方法,其特征在于,所述检测条件包括:

所述色谱柱为菲罗门Titank C18,4.6mm×250mm,5μm;

所述色谱柱的柱温为40℃;

检测波长为212nm;

以pH为3.2的0.01mol/L磷酸二氢钾的水溶液作为流动相A、乙腈作为流动相B进行梯度洗脱;

所述梯度洗脱的流速1mL/min。

10. 权利要求1~9任一项所述的检测方法在N-(2-氯嘧啶-4-基)-N-甲基-2,3-二甲基-2H-吡唑-6-胺的质量控制中的应用。

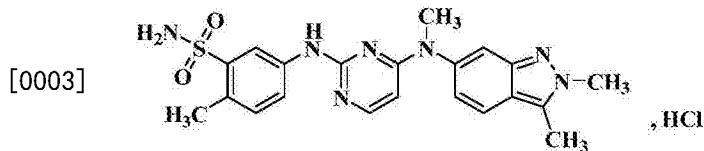
盐酸培唑帕尼中间体PZP-M2的有关物质的检测方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及化学药物分析方法技术领域,尤其是涉及一种盐酸培唑帕尼中间体PZP-M2的有关物质的检测方法和应用。

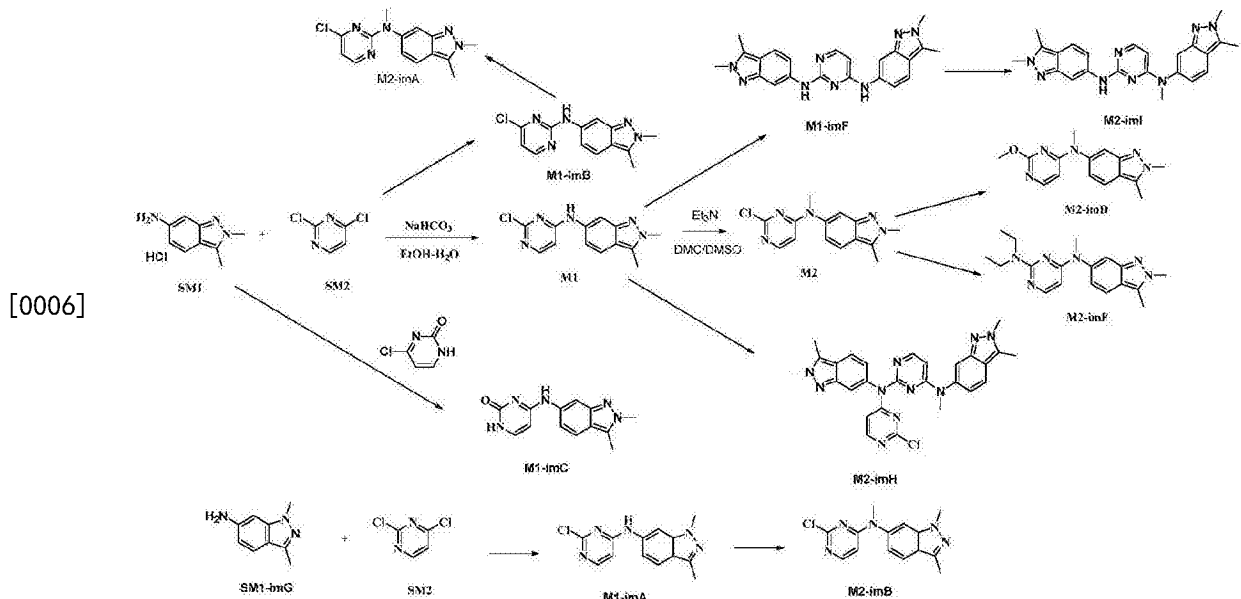
背景技术

[0002] 盐酸培唑帕尼原料药,其结构如下所示:



[0004] 盐酸培唑帕尼作为原料药,如果本身含有杂质,那么在进行制剂生产过程中,杂质或杂质的转化无也有可能随之带入后期的生产中,而影响制剂成品的质量。因此,对于,对于盐酸培唑帕尼中每一步中间体及成品的杂质控制至关重要。

[0005] 通过分析下述合成工艺路线,PZP-M2中可能存在的杂质有:PZP-M1、PZP-M2-imA、PZP-M2-imD、PZP-M2-imF、PZP-M2-imH、PZP-M2-imI,根据合成工艺路线及杂质控制策略,最终将PZP-M1、PZP-M2-imA、PZP-M2-imD、PZP-M2-imF、PZP-M2-imH、PZP-M2-imI作为已知杂质进行研究。



[0007] 有鉴于此,特提出本发明。

发明内容

[0008] 本发明的一个目的在于提供盐酸培唑帕尼中间体PZP-M2的有关物质的检测方法,能够一次性高效的测定盐酸培唑帕尼中间体PZP-M2的6种有关物质,专属性强,耐用性好。

[0009] 本发明的另一目的在于提供盐酸培唑帕尼中间体PZP-M2的有关物质的检测方法在盐酸培唑帕尼中间体PZP-M2的原料的质量控制中的应用。

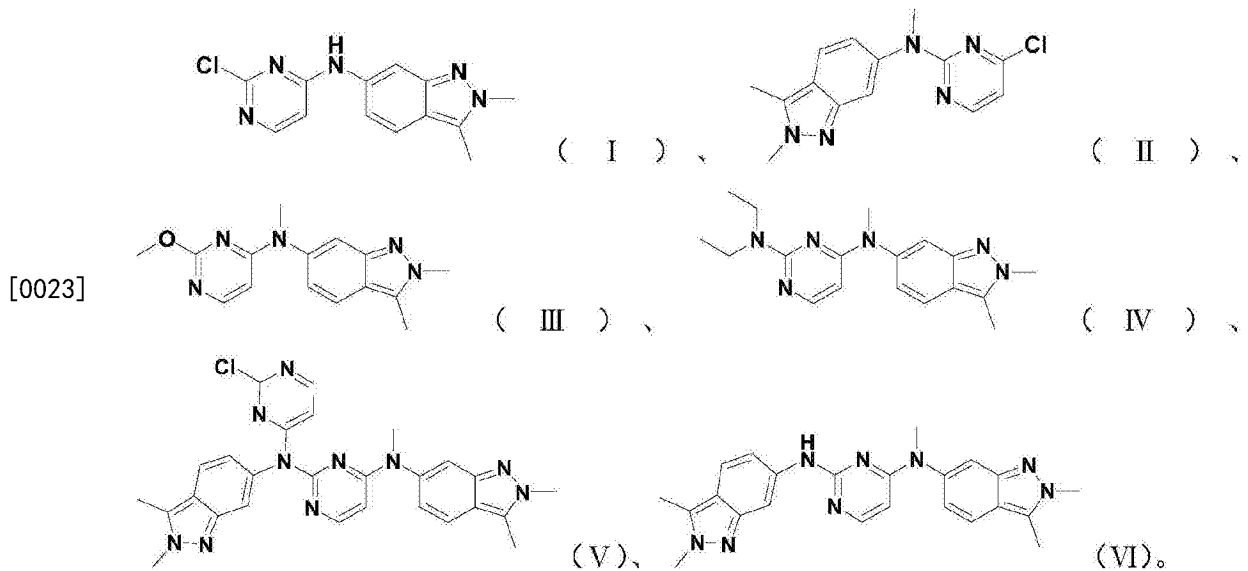
- [0010] 为了实现本发明的上述目的,特采用以下技术方案:
- [0011] 盐酸培唑帕尼中间体PZP-M2的有关物质的检测方法,包括如下步骤:
- [0012] 采用高效液相色谱对供试品溶液进行检测;
- [0013] 所述PZP-M2为N-(2-氯嘧啶-4-基)-N-甲基-2,3-二甲基-2H-吡唑-6-胺;
- [0014] 所述高效液相色谱的检测条件包括:
- [0015] 色谱柱为十八烷基硅烷键合硅胶色谱柱;
- [0016] 检测波长为210~214nm;
- [0017] 以pH为3.1~3.3的0.009~0.011mol/L磷酸二氢钾的水溶液作为流动相A、乙腈作为流动相B进行梯度洗脱;
- [0018] 所述梯度洗脱的程序包括:

	时间 (min)	A/v%	B/v%
	0	79~81	19~21
	5	79~81	19~21
[0019]	22	54~56	44~46
	45	29~31	69~71
	50	79~81	19~21
	55	79~81	19~21

- [0020] 在本发明的具体实施方式中,所述梯度洗脱的程序包括:

	时间 (min)	A/v%	B/v%
	0	80	20
	5	80	20
[0021]	22	55	45
	45	30	70
	50	80	20
	55	80	20

- [0022] 在本发明的具体实施方式中,所述有关物质包括I、II、III、IV、V和VI中的至少一种;结构式分别如下:



[0024] 其中,有关物质I的分子式为 $C_{13}H_{12}ClN_5$,分子量为273.72;有关物质II的分子式为 $C_{14}H_{14}ClN_5$,分子量为287.75;有关物质III的分子式为 $C_{15}H_{17}N_5O$,分子量为283.34;有关物质IV的分子式为 $C_{18}H_{24}N_6$,分子量为324.43;有关物质V的分子式为 $C_{27}H_{25}ClN_{10}$,分子量为525.02;有关物质VI的分子式为 $C_{23}H_{24}N_8$,分子量为412.50;

[0025] 在本发明的具体实施方式中,所述流动相A为pH为3.2的0.01mol/L的磷酸二氢钾的水溶液。其中,所述流动相A是采用磷酸调节磷酸二氢钾的水溶液的pH所得到的。

[0026] 在本发明的具体实施方式中,所述检测波长为211~213nm,优选为212nm。

[0027] 在本发明的具体实施方式中,所述梯度洗脱的流速为0.9~1.1mL/min,优选为1mL/min。

[0028] 在本发明的具体实施方式中,所述色谱柱的柱温为38~42℃,优选为39~41℃,更优选为40℃。

[0029] 在本发明的具体实施方式中,所述色谱柱为菲罗门Titank C18(4.6mm×250mm,5μm)或效能相当的色谱柱。

[0030] 在本发明的具体实施方式中,所述方法还包括:采用自身对照法对所述供试品溶液中的有关物质I、II、III、IV、V和/或VI含量进行计算。具体的,将供试品溶液、对照溶液分别注入高效液相色谱仪中,在所述高效液相色谱的检测条件下测定相应的色谱峰面积,以自身对照法计算得到所述供试品溶液中有关物质I、II、III、IV、V和/或VI的含量。

[0031] 在本发明的具体实施方式中,计算公式如下:

[0032] 单个杂质计算公式:

$$[0033] \text{已知杂质}(\%) = \frac{A_{\text{已知杂质}} \times 0.1\% \times f}{A_{\text{对照}}} \times 100\%$$

$$[0034] \text{未知单杂}(\%) = \frac{A_{\text{杂质}} \times 0.1\%}{A_{\text{对照}}} \times 100\%$$

[0035] 总杂计算公式:

$$[0036] \text{总杂}(\%) = \frac{A_{\text{总杂}} \times 0.1\%}{A_{\text{对照}}} \times 100\%$$

- [0037] f : 已知杂质校正因子;
- [0038] $A_{\text{已知杂质}}$: 供试品溶液色谱图中已知杂质的峰面积;
- [0039] $A_{\text{杂质}}$: 供试品溶液色谱图中单个杂质的峰面积;
- [0040] $A_{\text{总杂}}$: 供试品溶液色谱图中各杂质的峰面积(有校正因子的杂质需乘以校正因子)之和;
- [0041] $A_{\text{对照}}$: 对照溶液色谱图中主峰面积。
- [0042] 在本发明的具体实施方式中,所述供试品溶液的制备包括:采用乙腈水溶液溶解供试品。所述供试品包括盐酸培唑帕尼中间体N-(2-氯嘧啶-4-基)-N-甲基-2,3-二甲基-2H-吡唑-6-胺。所述对照溶液、杂质对照溶液的制备中,采用的溶剂均为乙腈水溶液。进一步的,所述乙腈水溶液中,乙腈的体积分数为65%~75%,如70%。
- [0043] 在实际操作中,所述供试品溶液中,N-(2-氯嘧啶-4-基)-N-甲基-2,3-二甲基-2H-吡唑-6-胺的浓度可以为0.5~2mg/mL,如可以为1mg/mL。在实际操作中,N-(2-氯嘧啶-4-基)-N-甲基-2,3-二甲基-2H-吡唑-6-胺的浓度不局限于此。
- [0044] 在本发明的具体实施方式中,所述检测条件包括:
- [0045] 所述色谱柱为菲罗门Titank C18,4.6mm×250mm,5 μ m;
- [0046] 所述色谱柱的柱温为40 $^{\circ}$ C;
- [0047] 检测波长为212nm;
- [0048] 以pH为3.2的0.01mol/L磷酸二氢钾的水溶液作为流动相A、乙腈作为流动相B进行梯度洗脱;
- [0049] 所述梯度洗脱的流速1mL/min。
- [0050] 本发明还提供了上述任意一种所述盐酸培唑帕尼中间体PZP-M2的有关物质的检测方法在N-(2-氯嘧啶-4-基)-N-甲基-2,3-二甲基-2H-吡唑-6-胺的质量控制中的应用。
- [0051] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:
- [0052] (1) 本发明的检测方法,能够实现一次性高效分离盐酸培唑帕尼中间体PZP-M2中所控的6种杂质的有关物质,且专属性强,耐用性好,灵敏度高;
- [0053] (2) 本发明的检测方法可用于盐酸培唑帕尼中间体PZP-M2的质量控制中。

附图说明

[0054] 为了更清楚地说明本发明具体实施方式或现有技术中的技术方案,下面将对具体实施方式或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图是本发明的一些实施方式,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

- [0055] 图1为本发明实施例1提供的空白溶剂的色谱图;
- [0056] 图2为本发明实施例1提供的系统适用性溶液的色谱图;
- [0057] 图3为本发明实施例1提供的PZP-M1定位溶液的色谱图;
- [0058] 图4为本发明实施例1提供的PZP-M2-imA定位溶液的色谱图;
- [0059] 图5为本发明实施例1提供的PZP-M2-imD定位溶液的色谱图;
- [0060] 图6为本发明实施例1提供的PZP-M2-imF定位溶液的色谱图;
- [0061] 图7为本发明实施例1提供的PZP-M2-imH定位溶液的色谱图;

- [0062] 图8为本发明实施例1提供的PZP-M2-imI定位溶液的色谱图；
- [0063] 图9为本发明实施例1提供的供试品溶液的色谱图；
- [0064] 图10为本发明比较例1提供的系统适用性溶液的色谱图；
- [0065] 图11为本发明比较例2提供的不同条件下的系统适用性溶液的色谱图。

具体实施方式

[0066] 下面将结合附图和具体实施方式对本发明的技术方案进行清楚、完整地描述,但是本领域技术人员将会理解,下列所描述的实施例是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例,仅用于说明本发明,而不应视为限制本发明的范围。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市售购买获得的常规产品。

[0067] 具体实施方式中的对专属性、检测限与定量限、重复性、线性与范围、准确度、溶液稳定性等项目的验证,按照《化学药物质量控制分析方法验证技术指导原则》、《化学药物质量标准建立的规范化过程技术指导原则》、《化学药物杂质研究技术指导原则》、《化学药物残留溶剂研究技术指导原则》以及现行版《中华人民共和国药典》附录中有关的指导原则进行方法学验证。

[0068] 下述实施例中的供试品溶液主要是以N-(2-氯嘧啶-4-基)-N-甲基-2,3-二甲基-2H-吡啶-6-胺、有关物质I、II、III、IV、V和VI配制而成;实际检测中,将待检测盐酸培唑帕尼中间体N-(2-氯嘧啶-4-基)-N-甲基-2,3-二甲基-2H-吡啶-6-胺溶解稀释配制成供试品溶液即可。

[0069] 实施例1

[0070] 本实施例提供了盐酸培唑帕尼中间体N-(2-氯嘧啶-4-基)-N-甲基-2,3-二甲基-2H-吡啶-6-胺有关物质的检测方法,包括如下步骤:

[0071] (1)样品配制

[0072] 溶剂:体积分数为70%的乙腈水溶液;

[0073] 空白溶剂:体积分数为70%的乙腈水溶液;

[0074] 供试品溶液:取待测样品约20mg,精密称定,置20mL量瓶中,加溶剂溶解并稀释至刻度,摇匀。(浓度约为1mg/mL)

[0075] 对照溶液:精密量取供试品溶液1mL,置100mL量瓶中,用溶剂稀释至刻度,摇匀;再精密量取1mL,置10mL量瓶中,用溶剂稀释至刻度,摇匀。(浓度约为1 μ g/mL)

[0076] PZP-M2-imD(有关物质III)贮备液:取PZP-M2-imD对照品约40mg,精密称定,置10mL量瓶中,加溶剂溶解并稀释至刻度,摇匀。(4mg/mL)

[0077] PZP-M2-imD定位溶液:精密量取PZP-M2-imD贮备液1mL,置100mL量瓶中,用溶剂稀释至刻度,摇匀。(浓度约为40 μ g/mL)

[0078] PZP-M2-imI(有关物质VI)贮备液:取PZP-M2-imI对照品约10mg,精密称定,置100mL量瓶中,加溶剂溶解并稀释至刻度,摇匀。(0.1mg/mL)

[0079] PZP-M2-imI定位溶液:精密量取PZP-M2-imI贮备液1mL,置100mL量瓶中,用溶剂稀释至刻度,摇匀。(浓度约为1 μ g/mL)

[0080] PZP-M1(有关物质I)贮备液:取PZP-M1对照品约10mg,精密称定,置10mL量瓶中,加溶剂溶解并稀释至刻度,摇匀。(1mg/mL)

[0081] PZP-M1定位溶液:精密量取PZP-M1贮备液1mL,置100mL量瓶中,用溶剂稀释至刻度,摇匀。(浓度约为10 μ g/mL)

[0082] PZP-M2-imF(有关物质IV)贮备液:取PZP-M2-imF对照品约20mg,精密称定,置100mL量瓶中,加溶剂溶解并稀释至刻度,摇匀。(浓度约为0.2mg/mL)

[0083] PZP-M2-imF定位溶液:精密量取PZP-M2-imF贮备液1mL,置100mL量瓶中,用溶剂稀释至刻度,摇匀。(浓度约为2 μ g/mL)

[0084] PZP-M2-imH(有关物质V)贮备液:取PZP-M2-imH对照品约20mg,精密称定,置100mL量瓶中,加溶剂溶解并稀释至刻度,摇匀。(浓度约为0.2mg/mL)

[0085] PZP-M2-imH定位溶液:精密量取PZP-M2-imH贮备液2.5mL,置100mL量瓶中,用溶剂稀释至刻度,摇匀。(浓度约为5 μ g/mL)

[0086] PZP-M2-imA(有关物质II)贮备液:取PZP-M2-imA对照品约20mg,精密称定,置100mL量瓶中,加溶剂溶解并稀释至刻度,摇匀。(浓度约为0.2mg/mL)

[0087] PZP-M2-imA定位溶液:精密量取PZP-M2-imA贮备液2.5mL,置100mL量瓶中,用溶剂稀释至刻度,摇匀。(浓度约为5 μ g/mL)

[0088] 杂质混合溶液:分别精密量取PZP-M2-imD贮备液、PZP-M2-imI贮备液、PZP-M1贮备液、PZP-M2-imF贮备液各2mL;PZP-M2-imH贮备液、PZP-M2-imA贮备液各5mL,置同一20mL量瓶中,用溶剂稀释至刻度,摇匀。(PZP-M2-imD浓度约为0.4mg/mL、PZP-M2-imI浓度约为10 μ g/mL、PZP-M1浓度约为0.1mg/mL、PZP-M2-imF浓度约为20 μ g/mL、PZP-M2-imH浓度约为50 μ g/mL、PZP-M2-imA浓度约为50 μ g/mL)

[0089] 系统适用性溶液:取本品约20mg,精密称定,置20mL量瓶中,精密加入杂质混合溶液2mL,用溶剂稀释至刻度,摇匀。(PZP-M2-imD浓度约为40 μ g/mL、PZP-M2-imI浓度约为1 μ g/mL、PZP-M1浓度约为10 μ g/mL、PZP-M2-imF浓度约为2 μ g/mL、PZP-M2-imH浓度约为5 μ g/mL、PZP-M2-imA浓度约为5 μ g/mL)

[0090] (2) 高效液相色谱检测条件

[0091] 色谱柱:菲罗门Titank C18(2), 4.6mm \times 250mm, 5 μ m;

[0092] 流动相A:0.01mol/L磷酸二氢钾溶液,并用磷酸调节pH值至3.2;

[0093] 流动相B:乙腈;

[0094] 按表1进行梯度洗脱;

[0095] 流速:1.0mL/min;检测波长:212nm;柱温:40 $^{\circ}$ C;进样量:10 μ L。

[0096] 表1梯度洗脱程序表(体积分数)

时间 (min)	A/v%	B/v%
0	80	20
5	80	20
[0097] 22	55	45
45	30	70
50	80	20
55	80	20

[0098] (3) 检测步骤

[0099] 取空白溶剂、系统适用性溶液、各有关物质的定位溶液、供试品溶液及对照溶液等各10 μ L, 进样检测, 记录色谱图。其中图1~图9分别为不同溶液对应的色谱图。

[0100] 实施例2~14

[0101] 实施例2~14分别提供了盐酸培唑帕尼中间体N-(2-氯嘧啶-4-基)-N-甲基-2,3-二甲基-2H-咪唑-6-胺有关物质的不同的检测方法, 分别对实施例1中的检测方法的某个参数条件等进行改变得到的。具体的改变参数信息见表2。

[0102] 表2实施例2~14改变的参数信息

[0103]

编号	相较实施例1改变的参数
实施例2	流动相A和流动相B的起始比例为79:21
实施例3	流动相A和流动相B的起始比例为81:19
实施例4	柱温38 $^{\circ}$ C
实施例5	柱温42 $^{\circ}$ C
实施例6	流速为0.9mL/min
实施例7	流速为1.1mL/min
实施例8	波长210nm
实施例9	波长214nm
实施例10	流动相A为0.009mol/L磷酸二氢钾的水溶液, 并用磷酸调节pH值至3.2
实施例11	流动相A为0.011mol/L磷酸二氢钾的水溶液, 并用磷酸调节pH值至3.2
实施例12	流动相A为0.01mol/L磷酸二氢钾的水溶液, 并用磷酸调节pH值至3.1
实施例13	流动相A为0.01mol/L磷酸二氢钾的水溶液, 并用磷酸调节pH值至3.3
实施例12	流动相A为0.009mol/L磷酸二氢钾的水溶液, 并用磷酸调节pH值至3.1
实施例13	流动相A为0.011mol/L磷酸二氢钾的水溶液, 并用磷酸调节pH值至3.1
实施例14	色谱柱为同厂家不同批号的菲罗门 Titank C18 4.6mm \times 250mm, 5 μ m

[0104] 实施例1~14的测试结果见表3~6。

[0105] 表3系统适用性检测结果-保留时间(min)

[0106]

编号	PZP-M2-imD	PZP-M2-imI	PZP-M1	PZP-M2-imF	PZP-M2	PZP-M2-imH	PZP-M2-imA
实施例 1	13.361	17.989	19.671	20.336	24.963	27.172	29.150
实施例 2	12.008	17.405	19.106	19.989	24.690	26.576	28.945
实施例 3	13.588	18.360	20.043	20.665	25.215	26.900	29.272
实施例 4	12.873	17.971	19.712	20.364	25.026	26.689	29.217
实施例 5	12.768	17.865	19.490	20.252	24.857	26.786	29.010
实施例 6	13.742	18.685	20.588	21.143	26.009	27.713	30.277
实施例 7	11.986	17.202	18.691	19.524	23.996	25.880	28.036
实施例 8	12.987	17.881	19.577	20.242	24.890	26.897	29.055
实施例 9	12.987	17.880	19.577	20.242	24.884	26.897	29.055
实施例 10	12.888	17.919	19.610	20.310	24.990	26.794	29.139
实施例 11	12.895	17.908	19.596	20.283	24.949	26.784	29.121
实施例 12	12.705	17.851	19.531	20.244	24.906	26.643	29.060
实施例 13	13.344	18.118	19.824	20.494	25.178	27.393	29.372
实施例 14	12.925	17.948	19.641	20.321	24.976	26.795	29.108

[0107] 表4系统适用性检测结果-理论塔板数

[0108]

编号	PZP-M2-imD	PZP-M2-imI	PZP-M1	PZP-M2-imF	PZP-M2	PZP-M2-imH	PZP-M2-imA
实施例 1	40270	107686	117600	159750	99346	192382	171701
实施例 2	27214	93026	104680	143140	93711	185276	166664
实施例 3	47617	124889	130655	174096	103388	198579	174845
实施例 4	35702	110451	121886	158331	99620	192258	171921
实施例 5	36413	109078	113618	157760	98182	192098	170275
实施例 6	40109	107801	121824	162646	99629	188689	165073
实施例 7	29972	98725	107480	144819	96636	187844	166877
实施例 8	39014	107753	116022	158120	99973	191942	169113
实施例 9	39034	107591	116049	158139	98993	192034	169180
实施例 10	37385	110311	118224	160816	99942	194581	172560
实施例 11	36179	104282	112442	154443	95899	188263	166398
实施例 12	33276	105521	114600	154591	97506	190207	169316
实施例 13	44483	115001	118776	160271	99919	200615	176057
实施例 14	35827	102299	112164	152720	96616	183180	162979

[0109] 表5系统适用性检测结果-拖尾因子

编号	PZP-M2-imD	PZP-M2-imI	PZP-M1	PZP-M2-imF	PZP-M2	PZP-M2-imH	PZP-M2-imA
实施例 1	1.05	0.92	1.04	1.09	1.01	1.01	1.03
实施例 2	1.06	0.89	1.03	1.07	0.91	1.03	1.02
实施例 3	1.04	0.89	1.03	1.09	0.96	1.03	1.00
实施例 4	1.01	0.92	1.04	1.11	1.13	1.04	1.03
实施例 5	1.04	0.93	1.02	1.07	1.12	1.06	1.02
实施例 6	1.02	0.90	1.00	1.06	0.94	1.06	1.01
实施例 7	1.03	0.91	1.00	1.07	1.11	1.04	1.04
实施例 8	1.06	0.93	1.02	1.05	1.08	1.03	1.00
实施例 9	1.06	0.93	1.02	1.05	1.17	1.03	1.00
实施例 10	1.06	0.89	1.00	1.04	0.91	1.05	1.02
实施例 11	1.02	0.90	1.01	1.05	1.20	1.08	1.01
实施例 12	1.05	0.92	1.04	1.13	0.97	1.05	1.00
实施例 13	1.03	0.77	0.98	1.02	1.03	1.01	1.00
实施例 14	1.02	0.89	1.02	1.06	0.86	1.08	1.02

[0110]

[0111] 表6系统适用性检测结果-分离度

编号	PZP-M2-imD	PZP-M2-imI	PZP-M1	PZP-M2-imF	PZP-M2	PZP-M2-imH	PZP-M2-imA
实施例 1	/	4.70	3.84	3.09	2.14	7.16	3.45
实施例 2	/	4.89	7.32	2.52	13.90	6.60	3.42
实施例 3	/	4.64	7.82	2.95	2.25	6.08	3.49
实施例 4	/	4.61	7.87	3.04	14.13	5.95	3.58
实施例 5	/	4.95	7.27	3.49	13.30	6.86	3.46
实施例 6	/	3.69	8.23	2.48	14.16	5.81	3.53
实施例 7	/	4.70	6.68	3.85	13.15	4.11	3.32
实施例 8	/	4.72	7.56	3.08	2.04	7.16	3.43
实施例 9	/	4.71	7.56	3.08	2.04	7.19	3.41
实施例 10	/	4.74	7.63	3.25	2.31	6.44	3.46
实施例 11	/	4.61	7.40	3.12	2.09	6.47	3.38
实施例 12	/	4.84	4.29	3.27	2.36	6.15	3.49
实施例 13	/	3.10	7.69	3.07	12.49	7.86	3.24
实施例 14	/	4.58	7.38	3.07	13.51	6.32	3.30

[0112]

[0113] 从上述结果可知：

[0114] 各条件下，空白溶剂均不干扰主成分和杂质测定；

[0115] 系统适用性溶液中，主峰及已知杂质与相邻杂质峰之间分离度大于1.5，主峰和各已知杂质理论板数均不小于5000，拖尾因子大于2.0；

[0116] 因此本发明的检测方法能稳定有效地检测盐酸培唑帕尼中间体PZP-M2的有关物质。

[0117] 比较例1

[0118] 比较例1参考公开号CN107991398A的专利申请中实施例3记载的中间体Ⅲ的相关

杂质的检测方法,将其中的辛烷基硅烷键合硅胶色谱柱替换为菲罗门Titank C18(4.6mm×250mm,5 μ m),对本发明实施例1的系统适用性溶液进行检测。得到的系统适用性溶液的色谱图如图10所示。

[0119] 从图中可知,采用比较例1的方法,PZP-M2-imH(保留时间为29.607min)与相邻未知杂质峰(保留时间为29.823)的分离度为1.31,分离度小于1.5,无法进行准确定量计算。

[0120] 比较例2

[0121] 比较例2参考公开号CN107991398A的专利申请中实施例3记载的中间体Ⅲ的相关杂质的检测方法,将其中的辛烷基硅烷键合硅胶色谱柱替换为菲罗门Titank C18(4.6mm×250mm,5 μ m);在此基础上,用磷酸调节流动相A的pH值分别为3.1、3.2、3.3、3.4、3.5,对本发明实施例1的系统适用性溶液进行检测。得到的不同条件下的系统适用性溶液的色谱图如图11所示。

[0122] 从图中可知,采用比较例2的方法,至少杂质PZP-M2-imI峰型均不对称。

[0123] 实验例1

[0124] 灵敏度试验

[0125] (1)样品配制

[0126] 溶剂:体积分数为70%的乙腈水溶液;

[0127] 空白溶剂:溶剂;

[0128] 各杂质贮备液、对照溶液、系统适用性溶液:用“实施例1”项下配制好的相应溶液。

[0129] PZP-M2对照溶液:取PZP-M2对照品约20mg,精密称定,置20mL量瓶中,加溶剂溶解并稀释至刻度,摇匀;精密量取1mL,置100mL量瓶中,用溶剂稀释至刻度,摇匀;精密量取1mL,置10mL量瓶中,用溶剂稀释至刻度,摇匀。(浓度约为1 μ g/mL)

[0130] PZP-M2溶液:精密量取PZP-M2对照溶液1.6mL,置10mL量瓶中,用溶剂稀释至刻度,摇匀。(浓度约为0.16 μ g/mL)

[0131] PZP-M2-imD溶液:精密量取PZP-M2-imD定位溶液0.1mL,置10mL量瓶中,用溶剂稀释至刻度,摇匀。(浓度约为0.4 μ g/mL)

[0132] PZP-M1溶液:精密量取PZP-M1定位溶液1mL,置10mL量瓶中,用溶剂稀释至刻度,摇匀。(浓度约为1 μ g/mL)

[0133] 定量限溶液:精密量取PZP-M2-imD溶液1mL、PZP-M2-imI定位溶液0.6mL、PZP-M1溶液0.6mL、PZP-M2-imF定位溶液0.3mL、PZP-M2溶液3mL、PZP-M2-imH定位溶液0.1mL、PZP-M2-imA定位溶液0.2mL,置同一10mL量瓶中,用溶剂稀释至刻度,摇匀。(PZP-M2-imD浓度约为0.04 μ g/mL、PZP-M2-imI浓度约为0.06 μ g/mL、PZP-M1浓度约为0.06 μ g/mL、PZP-M2-imF浓度约为0.06 μ g/mL、PZP-M2浓度约为0.048 μ g/mL、PZP-M2-imH浓度约为0.05 μ g/mL、PZP-M2-imA浓度约为0.1 μ g/mL)(S/N \approx 10)

[0134] 检测限溶液:精密量取定量限溶液3mL,置10mL量瓶中,用溶剂稀释至刻度,摇匀。(S/N \approx 3)

[0135] (2)高效液相色谱检测条件:同实施例1。

[0136] (3)检测步骤

[0137] 取空白溶剂(1针)、系统适用性溶液(1针)、定量限溶液(6针)、检测限溶液(2针)各10 μ L,按序进样检测,记录色谱图。

[0138] (4) 分析结果:灵敏度试验结果见表7~表15。

[0139] 表7系统适用性溶液检测结果

峰名称	保留时间 (min)	与相邻杂质 最小分离度	拖尾因子	理论板数
PZP-M2-imD	13.281	/	1.06	43331
PZP-M2-imI	17.914	2.42	0.92	102563
PZP-M1	19.590	3.53	1.01	117210
PZP-M2-imF	20.237	2.96	1.05	152223
主峰	24.859	1.98	0.96	99077
PZP-M2-imH	27.047	2.74	1.05	190260

[0140]

[0141]

PZP-M2-imA	29.031	3.22	1.02	164481
------------	--------	------	------	--------

[0142] 表8 PZP-M2-imD定量限测试结果

[0143]

名称	1	2	3	4	5	6	平均	RSD(%)
峰面积	3.47	3.48	3.50	3.55	3.24	3.67	3.49	4.00
保留时间(min)	13.183	13.166	13.149	13.126	13.116	13.120	13.143	0.21

[0144] 表9 PZP-M2-imI定量限测试结果

[0145]

名称	1	2	3	4	5	6	平均	RSD(%)
峰面积	3.82	3.81	3.60	3.42	3.61	3.57	3.64	4.19
保留时间(min)	17.804	17.803	17.821	17.813	17.808	17.806	17.809	0.04

[0146] 表10 PZP-M1定量限测试结果

[0147]

名称	1	2	3	4	5	6	平均	RSD(%)
峰面积	3.94	3.89	4.25	4.24	4.06	3.91	4.05	4.03
保留时间(min)	19.494	19.487	19.507	19.510	19.495	19.490	19.497	0.05

[0148] 表11 PZP-M2-imF定量限测试结果

[0149]

名称	1	2	3	4	5	6	平均	RSD(%)
峰面积	3.60	3.58	4.19	3.88	3.92	3.59	3.79	6.56
保留时间(min)	20.163	20.158	20.181	20.178	20.176	20.166	20.170	0.05

[0150] 表12 PZP-M2定量限测试结果

[0151]

名称	1	2	3	4	5	6	平均	RSD(%)
峰面积	4.28	4.43	3.86	4.12	4.01	4.17	4.15	4.82
保留时间(min)	24.790	24.792	24.813	24.804	24.798	24.794	24.799	0.04

[0152] 表13 PZP-M2-imH定量限测试结果

[0153]

名称	1	2	3	4	5	6	平均	RSD(%)
峰面积	3.37	3.60	3.34	3.55	3.68	3.33	3.48	4.28
保留时间(min)	26.994	26.995	26.962	26.951	26.940	26.929	26.962	0.11

[0154] 表14 PZP-M2-imA定量限测试结果

[0155]

名称	1	2	3	4	5	6	平均	RSD(%)
峰面积	5.96	6.23	5.90	6.13	5.95	6.23	6.07	2.47
保留时间(min)	28.980	28.979	28.992	28.992	28.984	28.970	28.983	0.03

[0156] 表15灵敏度测试结果

测定项目	定量限		检测限	
	相对供试品百分数表示 (%)	ng 为单位表示 (ng)	相对供试品百分数表示 (%)	ng 为单位表示 (ng)
PZP-M2-imD	0.004	0.40	0.001	0.12
PZP-M2-imI	0.006	0.63	0.002	0.19
PZP-M1	0.006	0.61	0.002	0.18
PZP-M2-imF	0.006	0.60	0.002	0.18
PZP-M2	0.005	0.48	0.001	0.14
PZP-M2-imH	0.005	0.49	0.002	0.15
PZP-M2-imA	0.01	0.99	0.003	0.30

[0157] 计算公式:

[0158] 定量限/检测限浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$) = 称样量 \times 杂质含量/稀释倍数;[0159] 定量限/检测限 (ng) = 浓度 \times 进样量;[0160] 定量限占供试品比 (%) = 定量限浓度/供试品浓度 $\times 100\%$;

[0161] 从上述灵敏度试验结果可知:

[0162] 定量限溶液连续测试6次, PZP-M2与各杂质峰面积RSD均不大于10.0%, 保留时间RSD均不大于2.0%; 定量限均小于报告限度(0.05%的供试品浓度)。

[0163] 实验例2

[0164] 线性试验

[0165] (1) 样品配制

[0166] 溶剂: 体积分数为70%的乙腈水溶液;

[0167] 空白溶剂: 溶剂;

[0168] 系统适用性溶液: 用“实施例1”项下配制好的“系统适用性溶液”。

[0169] 定量限溶液: 用“实验例1”项下配制好的“定量限溶液”。

[0170] PZP-M2-imD对照品溶液: 取PZP-M2-imD对照品约10mg, 精密称定, 置10mL量瓶中, 加溶剂溶解并稀释至刻度, 摇匀。(浓度约为1mg/mL)

[0171] PZP-M2对照品溶液: 取PZP-M2对照品约20mg, 精密称定, 置20mL量瓶中, 加溶剂溶解并稀释至刻度, 摇匀。(浓度约为1mg/mL)

[0172] PZP-M2-imI对照品溶液: 取PZP-M2-imI对照品约10mg, 精密称定, 置10mL量瓶中, 加溶剂溶解并稀释至刻度, 摇匀。(浓度约为1mg/mL) (同法配制PZP-M1、PZP-M2-imF、PZP-M2-imH、PZP-M2-imA对照品溶液)

[0173] 线性贮备液: 精密量取PZP-M2-imD对照品溶液、PZP-M2-imI对照品溶液、PZP-M1对照品溶液、PZP-M2-imF对照品溶液、PZP-M2对照品溶液、PZP-M2-imH对照品溶液、PZP-M2-imA对照品溶液各2mL, 置同一20mL量瓶中, 用溶剂稀释至刻度, 摇匀。(PZP-M2-imD、PZP-M2-imI、PZP-M1、PZP-M2-imF、PZP-M2、PZP-M2-imH、PZP-M2-imA浓度分别约为100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

[0174] 线性溶液1: 定量限溶液。

[0175] 线性溶液2(相当于供试品浓度的0.05%): 精密量取线性贮备液0.25mL, 置50mL量瓶中, 用溶剂稀释至刻度, 摇匀。(浓度约为0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$)

[0176] 线性溶液3(相当于供试品浓度的0.1%): 精密量取线性贮备液0.5mL, 置50mL量瓶

中,用溶剂稀释至刻度,摇匀。(浓度约为1 μ g/mL)

[0178] 线性溶液4(相当于供试品浓度的0.2%):精密量取线性贮备液1mL,置50mL量瓶中,用溶剂稀释至刻度,摇匀。(浓度约为2 μ g/mL)

[0179] 线性溶液5(相当于供试品浓度的0.5%):精密量取线性贮备液2.5mL,置50mL量瓶中,用溶剂稀释至刻度,摇匀。(浓度约为5 μ g/mL)

[0180] 线性溶液6(相当于供试品浓度的1.0%):精密量取线性贮备液1mL,置10mL量瓶中,用溶剂稀释至刻度,摇匀。(浓度约为10 μ g/mL)

[0181] 线性溶液7(相当于供试品浓度的5.0%):精密量取线性贮备液5mL,置10mL量瓶中,用溶剂稀释至刻度,摇匀。(浓度约为50 μ g/mL)

[0182] 线性溶液8(相当于供试品浓度的10.0%):精密量取PZP-M2-imD对照品溶液、PZP-M2对照品溶液各1mL,置10mL量瓶中,用溶剂稀释至刻度,摇匀。(浓度约为100 μ g/mL)

[0183] (2) 高效液相色谱检测条件:同实施例1。

[0184] (3) 检测步骤

[0185] 取空白溶剂(1针)、系统适用性溶液(1针)、线性溶液1~8(各1针)各10 μ L,按序进样检测,记录色谱图。

[0186] (4) 分析结果:线性试验结果见表16~表23。

[0187] 表16PZP-M2-imD线性测试结果

相当于供试品浓度	线性溶液1	线性溶液2	线性溶液3	线性溶液4	线性溶液5	线性溶液6	线性溶液7	线性溶液8
浓度(μ g/mL)	0.0401	0.5079	1.0158	2.0316	5.0789	10.1578	50.7888	101.5775
峰面积	3.61	41.54	79.88	160.12	400.76	793.93	3956.64	7791.02
标准残差	-0.4027	-0.3104	-0.3422	-0.2403	0.0619	0.1983	2.0969	-1.0614
[0188] 相对剩余标准差(%)	1.30							
线性方程	$y=76.83456x+9.19283$							
相关系数	1.0000							
y轴截距占100%浓度峰面积百分比(%)	0.23							

[0189] 表17PZP-M2-imI线性测试结果

相当于供试品浓度	线性溶液1	线性溶液2	线性溶液3	线性溶液4	线性溶液5	线性溶液6	线性溶液7
[0190] 浓度(μ g/mL)	0.0629	0.5015	1.0029	2.0058	5.0146	10.0291	50.1456
峰面积	3.44	29.46	57.40	114.92	287.84	569.79	2857.91
标准残差	-0.4199	0.4013	-0.1016	0.1975	1.3777	-1.6381	0.1787
[0191] 相对剩余标准差(%)	0.22						
线性方程	$y=56.98016x+0.38186$						
相关系数	1.0000						
y轴截距占100%浓度峰面积百分比(%)	0.67						

[0192] 表18PZP-M1线性测试结果

相当于供试品浓度	线性溶液 1	线性溶液 2	线性溶液 3	线性溶液 4	线性溶液 5	线性溶液 6	线性溶液 7
浓度 (µg/mL)	0.0610	0.4985	0.9969	1.9939	4.9847	9.9693	49.8465
峰面积	3.92	30.29	58.69	117.86	294.08	580.91	2904.74
标准残差	-0.7243	-0.0478	-0.5290	0.3080	1.8438	-0.8360	-0.0180
相对剩余标准差 (%)	0.23						
线性方程	$y=58.24777x+1.31609$						
相关系数	1.0000						
y轴截距占100%浓度峰面积百分比 (%)	0.23						

[0194] 表19PZP-M2-imF线性测试结果

相当于供试品浓度	线性溶液 1	线性溶液 2	线性溶液 3	线性溶液 4	线性溶液 5	线性溶液 6	线性溶液 7
浓度 (µg/mL)	0.0597	0.5032	1.0065	2.0129	5.0323	10.0646	50.3230
峰面积	3.78	29.62	57.36	114.17	286.57	567.55	2839.36
标准残差	-0.0389	0.0434	-0.0286	-0.0696	-0.0424	-0.4842	-2.1805
相对剩余标准差 (%)	2.34						
线性方程	$y=56.40355x+0.91935$						
相关系数	1.0000						
y轴截距占100%浓度峰面积百分比 (%)	0.81						

[0196] 表20PZP-M2线性测试结果-1

相当于供试品浓度	线性溶液 1	线性溶液 2	线性溶液 3	线性溶液 4	线性溶液 5	线性溶液 6	线性溶液 7
浓度 (µg/mL)	0.0481	0.5007	1.0014	2.0029	5.0072	10.0144	50.0720
峰面积	4.01	42.44	81.60	163.42	408.60	808.32	4038.43
标准残差	-0.9867	0.1649	-0.5504	0.0900	1.8547	-0.4921	-0.0803
相对剩余标准差 (%)	0.21						
线性方程	$y=80.61930x+1.79587$						
相关系数	1.0000						

[0198]

y轴截距占100%浓度峰面积百分比 (%)	2.20
-----------------------	------

[0199] 表21PZP-M2线性测试结果-2

相当于供试品浓度	线性溶液 1	线性溶液 2	线性溶液 3	线性溶液 4	线性溶液 5	线性溶液 6	线性溶液 7	线性溶液 8
浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	0.0481	0.5007	1.0014	2.0029	5.0072	10.0144	50.0720	100.1441
峰面积	4.01	42.44	81.60	163.42	408.60	808.32	4038.43	7895.95
标准残差	-0.3774	-0.2943	-0.3077	-0.2249	0.0154	0.1359	2.1158	-1.0632
[0200] 相对剩余标准差 (%)	1.90							
线性方程	$y=79.06200x+12.23057$							
相关系数	0.9999							
y 轴截距占 100%浓度峰面积百分比 (%)	14.99							

[0201] 表22PZP-M2- imH线性测试结果

相当于供试品浓度	线性溶液 1	线性溶液 2	线性溶液 3	线性溶液 4	线性溶液 5	线性溶液 6	线性溶液 7
浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	0.0489	0.4953	0.9906	1.9812	4.9529	9.9059	49.5293
峰面积	3.59	32.89	63.88	128.28	319.68	632.28	3161.32
标准残差	-0.7142	-0.0698	-0.5493	0.3941	1.8142	-0.8584	-0.0096
[0202] 相对剩余标准差 (%)	0.21						
线性方程	$y=63.79968x+1.37877$						
相关系数	1.0000						
y 轴截距占 100%浓度峰面积百分比 (%)	0.43						

[0203] 表23PZP-M2- imA线性测试结果

	线性溶液 1	线性溶液 2	线性溶液 3	线性溶液 4	线性溶液 5	线性溶液 6	线性溶液 7
浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	0.0985	0.4952	0.9905	1.9809	4.9523	9.9047	49.5234
峰面积	5.81	30.25	59.11	118.54	296.18	585.94	2929.55
标准残差	-0.8865	-0.0792	-0.4324	0.2777	1.8634	-0.6851	-0.0467
[0204] 相对剩余标准差	0.21						
线性回归方程	$y=59.13455x+1.06284$						
相关系数 r	1.0000						
y 轴截距占 100%浓度峰面积百分比 (%)	0.36						

[0205] 线性相关系数 r 均 ≥ 0.990 ; y轴截距均小于100%限度浓度峰面积的25%, 响应因子的RSD均不大于10.0%。以浓度 C ($\mu\text{g/mL}$) 为横坐标, 对应的峰面积为纵坐标, 得到线性回归方程。PZP-M2- imD、PZP-M2- imI、PZP-M1、PZP-M2- imF、PZP-M2- 1、PZP-M2- 2、PZP-M2- imH、PZP-M2- imA浓度与峰面积的线性关系良好, 符合验证要求。

[0206] 实验例3

[0207] 准确度试验

[0208] (1) 样品配制

[0209] 溶剂: 体积分数为70%的乙腈水溶液;

- [0210] 空白溶剂:溶剂;
- [0211] 系统适用性溶液:用“实施例1”项下配制好的相应溶液。
- [0212] PZP-M2-imD对照品贮备液:取PZP-M2-imD对照品约10mg,置10mL量瓶中,加溶剂溶解并稀释至刻度,摇匀,平行配制2份。(浓度约为1mg/mL)(同法配制PZP-M2-imI、PZP-M1、PZP-M2-imF、PZP-M2-imH、PZP-M2-imA对照品贮备液)
- [0213] PZP-M2-imI对照品溶液:精密量取PZP-M2-imI对照品贮备液1mL,置10mL量瓶中,用溶剂稀释至刻度,摇匀。(浓度约为100 μ g/mL)(同法配制PZP-M2-imF对照品溶液)平行配制2份
- [0214] 混合对照品贮备液:精密量取PZP-M2-imD对照品贮备液8mL、PZP-M2-imI对照品溶液2mL、PZP-M1对照品贮备液2mL、PZP-M2-imF对照品溶液4mL、PZP-M2-imH对照品贮备液1mL、PZP-M2-imA对照品贮备液1mL,置同一100mL量瓶中,用溶剂稀释至刻度,摇匀。(PZP-M2-imD浓度约为80 μ g/mL、PZP-M2-imI浓度约为2 μ g/mL、PZP-M1浓度约为20 μ g/mL、PZP-M2-imF浓度约为4 μ g/mL、PZP-M2-imH浓度约为10 μ g/mL、PZP-M2-imA浓度约为10 μ g/mL,与对照品贮备液一一对应,平行配制两份)
- [0215] 对照品溶液:精密量取混合对照品贮备液5mL,置10mL量瓶中,用溶剂稀释至刻度,摇匀。(PZP-M2-imD浓度约为40 μ g/mL、PZP-M2-imI浓度约为1 μ g/mL、PZP-M1浓度约为10 μ g/mL、PZP-M2-imF浓度约为2 μ g/mL、PZP-M2-imH浓度约为5 μ g/mL、PZP-M2-imA浓度约为5 μ g/mL)与混合对照品贮备液一一对应,平行配制两份
- [0216] 供试品溶液:取本品约10mg,精密称定,置10mL量瓶中,加溶剂溶解并稀释至刻度,摇匀。(浓度约为1mg/mL)
- [0217] 回收率溶液(取混合对照品贮备液-1配制回收率溶液)
- [0218] 50%回收率溶液:取本品约10mg,精密称定,置10mL量瓶中,加溶剂适量使溶解,精密加入混合对照品贮备液2.5mL,用溶剂稀释至刻度,摇匀。(平行配制3份)
- [0219] 100%回收率溶液:取本品约10mg,精密称定,置10mL量瓶中,加溶剂适量使溶解,精密加入混合对照品贮备液5mL,用溶剂稀释至刻度,摇匀。(平行配制3份)
- [0220] 150%回收率溶液:取本品约10mg,精密称定,置10mL量瓶中,加溶剂适量使溶解,精密加入混合对照品贮备液7.5mL,用溶剂稀释至刻度,摇匀。(平行配制3份)
- [0221] (2) 高效液相色谱检测条件:同实施例1。
- [0222] (3) 检测步骤
- [0223] 取空白溶剂(1针)、系统适用性溶液(1针)、对照品溶液-1(连续5针)、对照品溶液-2(2针)、供试品溶液(1针)、50%溶液-1(1针)、50%溶液-2(1针)、50%溶液-3(1针)、100%溶液-1(1针)、100%溶液-2(1针)、100%溶液-3(1针)、150%溶液-1(1针)、150%溶液-2(1针)、150%溶液-3(1针)各10 μ L,按序进样检测,记录色谱图。
- [0224] (4) 分析结果
- [0225] 计算公式为:回收率%=(测得量-样品中含量)/加入量 \times 100%。试验结果见表24~表30。
- [0226] 表24系统适用性溶液检测结果

峰名称	保留时间 (min)	与相邻杂质 最小分离度	拖尾因子	理论板数
PZP-M2-imD	13.160	/	1.03	41739
PZP-M2-imI	17.857	2.87	0.87	98562
[0227] PZP-M1	19.556	7.41	1.04	116457
PZP-M2-imF	20.230	3.08	1.08	150663
主峰	24.874	1.96	1.20	99274
PZP-M2-imII	27.060	7.78	1.03	190624
PZP-M2-imA	29.089	3.27	1.03	168605

[0228] 表25PZP-M2-imD回收率测试结果

名称	加入量 (μg)	测得量 (μg)	样品中含量 (μg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
50%-1	199.3892	396.5875	208.1426	94.51	100.2	2.31
50%-2	199.3892	405.0497	201.4028	102.14		
50%-3	199.3892	395.7597	197.4381	99.46		
[0229] 100%-1	398.7784	597.3332	199.6187	99.73		
100%-2	398.7784	603.9747	204.3762	100.21		
100%-3	398.7784	606.8488	202.3939	101.42		
150%-1	598.1676	804.6473	198.0328	101.41		
150%-2	598.1676	803.7540	198.0328	101.26		

[0230] 150%-3	598.1676	804.6423	197.2399	101.54		
---------------	----------	----------	----------	--------	--	--

[0231] 表26PZP-M2-imI回收率测试结果

名称	加入量 (μg)	测得量 (μg)	样品中含量 (μg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
50%-1	5.0344	5.9218	1.1694	94.40	99.2	2.05
50%-2	5.0344	6.0688	1.1315	98.70		
50%-3	5.0344	6.1104	1.1092	99.34		
[0232] 100%-1	10.0688	11.0945	1.1215	99.05		
100%-2	10.0688	11.1049	1.1482	98.89		
100%-3	10.0688	11.2260	1.1371	100.20		
150%-1	15.1032	16.3139	1.1126	100.65		
150%-2	15.1032	16.3658	1.1126	100.99		
150%-3	15.1032	16.3295	1.1081	100.78		

[0233] 表27PZP-M1回收率测试结果

名称	加入量(μg)	测得量(μg)	样品中含量(μg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)	
[0234]	50%-1	50.9850	65.3772	10.2049	108.21	102.6	4.89
	50%-2	50.9850	57.6733	9.8744	93.75		
	50%-3	50.9850	59.4380	9.6800	97.59		
	100%-1	101.9700	111.5506	9.7869	99.80		
	100%-2	101.9700	116.1138	10.0202	104.04		
	100%-3	101.9700	113.9466	9.9230	102.01		
	150%-1	152.9550	166.4461	9.7092	102.47		
	150%-2	152.9550	174.6058	9.7092	107.81		
	150%-3	152.9550	174.8191	9.6703	107.97		

[0235] 表28PZP-M2- imF回收率测试结果

名称	加入量(μg)	测得量(μg)	样品中含量(μg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)	
[0236]	50%-1	9.9960	17.6405	8.1291	95.15	100.6	2.32
	50%-2	9.9960	18.2371	7.8658	103.75		
	50%-3	9.9960	17.6968	7.7110	99.90		
	100%-1	19.9920	27.7939	7.7961	100.03		
	100%-2	19.9920	28.0403	7.9820	100.33		
	100%-3	19.9920	28.2374	7.9045	101.71		
	150%-1	29.9880	38.1392	7.7342	101.39		
	150%-2	29.9880	38.1498	7.7342	101.43		
	150%-3	29.9880	38.1198	7.7032	101.43		

[0237] 表29PZP-M2- imH回收率测试结果

名称	加入量(μg)	测得量(μg)	样品中含量(μg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)	
[0239]	50%-1	25.1335	39.2402	14.8990	96.85	100.5	1.49
	50%-2	25.1335	39.9532	14.4165	101.60		
	50%-3	25.1335	39.2668	14.1327	100.00		
	100%-1	50.2671	64.6308	14.2888	100.15		
	100%-2	50.2671	65.0083	14.6294	100.22		
	100%-3	50.2671	65.3219	14.4875	101.13		
	150%-1	75.4006	90.5206	14.1753	101.25		
	150%-2	75.4006	90.5549	14.1753	101.30		
	150%-3	75.4006	90.7826	14.1186	101.68		

[0240] 表30PZP-M2- imA回收率测试结果

名称	加入量(μg)	测得量(μg)	样品中含量(μg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)	
[0241]	50%-1	24.5673	45.9159	21.9826	97.42	101.6	1.93
	50%-2	24.5673	47.0768	21.2708	105.04		
	50%-3	24.5673	45.9903	20.8521	102.32		
	100%-1	49.1346	70.6601	21.0824	100.90		
	100%-2	49.1346	71.3175	21.5849	101.22		
	100%-3	49.1346	71.4352	21.3755	101.88		
	150%-1	73.7019	95.9199	20.9149	101.77		
	150%-2	73.7019	95.8455	20.9149	101.67		
	150%-3	73.7019	96.1015	20.8312	102.13		

[0242] 以杂质限度浓度作为100%，按50%、100%和150%三种浓度向样品中定量添加杂质，各浓度水平下，杂质回收率均应90.0%~110.0%范围内，9份回收率RSD均小于5.0%，准确度良好。

[0243] 实验例4

[0244] 重复性试验

[0245] (1) 样品配制

[0246] 溶剂：体积分数为70%的乙腈水溶液；

[0247] 空白溶剂：溶剂；

[0248] 系统适用性溶液：用“实施例1”项下配制好的相应溶液。

[0249] 供试品溶液：取本品约20mg，精密称定，置20mL量瓶中，加溶剂溶解并稀释至刻度，摇匀，作为供试品溶液。（平行配制6份）

[0250] 对照溶液：精密量取供试品溶液1mL，置100mL量瓶中，用溶剂稀释至刻度，摇匀，再精密量取1mL，置10mL量瓶中，用溶剂稀释至刻度，摇匀，作为对照溶液。（平行配制6份）

[0251] (2) 高效液相色谱检测条件：同实施例1。

[0252] (3) 检测步骤

[0253] 取空白溶剂(1针)、系统适用性溶液(1针)、供试品溶液1~6(各1针)、对照溶液1~6(各1针)各10μL，按序进样检测，记录色谱图。

[0254] (4) 分析结果

[0255] 重复性试验结果见下表31~表32。

[0256] 表31系统适用性溶液检测结果

峰名称	保留时间 (min)	与相邻杂质最小分离度	拖尾因子	理论板数
PZP-M2-imD	12.771	/	1.03	33371
PZP-M2-imI	17.886	4.67	0.91	98777
PZP-M1	19.571	7.30	1.02	111581
PZP-M2-imF	20.284	3.20	1.09	147902
主峰	24.920	13.63	1.15	96394
PZP-M2-imH	26.673	6.15	1.05	183945
PZP-M2-imA	29.091	3.43	1.01	164634

[0258] 表32重复性测试结果

供试品	1	2	3	4	5	6	均值 (%)	RSD (%)
PZP-M2-imD (%)	2.053	2.014	2.027	1.941	1.926	1.918	1.98	2.95
PZP-M2-imI (%)	0.013	0.012	0.012	0.011	0.011	0.012	0.01	7.53
PZP-M1 (%)	0.082	0.103	0.086	0.109	0.114	0.080	0.10	14.79
PZP-M2-imF (%)	0.087	0.086	0.086	0.082	0.081	0.081	0.08	3.49
PZP-M2-imH (%)	0.155	0.152	0.154	0.147	0.145	0.145	0.15	3.04
PZP-M2-imA (%)	0.216	0.213	0.216	0.205	0.202	0.203	0.21	3.13
总杂 (%)	2.756	2.699	2.687	2.621	2.580	2.540	2.65	3.06
杂质个数	11	11	10	11	10	10	/	/

[0260] 6份供试品,杂质检出基本一致,总杂及杂质个数无明显变化,重复性良好。

[0261] 实验例5

[0262] 溶液稳定性试验

[0263] (1)样品配制

[0264] 溶剂:体积分数为70%的乙腈水溶液;

[0265] 空白溶剂:溶剂;

[0266] 系统适用性溶液:用“实施例1”项下配制好的相应溶液;

[0267] 供试品溶液、对照溶液配制同实施例1溶液配制。

[0268] (2)高效液相色谱检测条件:同实施例1。

[0269] (3)检测步骤

[0270] 取空白溶剂、系统适用性溶液、对照溶液及供试品溶液等各10 μ L,按表33进样检测,记录色谱图。

[0271] 表33进样顺序及要求

[0272]

序号	样品	针数	序号	样品	针数
1	空白溶剂	1针	16	对照溶液2-13h	1针
2	系统适用性溶液	1针	17	空白溶剂	2针
3	对照溶液1	连续5针	18	供试品溶液2-16h	1针
4	供试品溶液2-0h	1针	19	对照溶液2-17h	1针
5	对照溶液2-1h	1针	20	空白溶剂	2针
6	供试品溶液2-2h	1针	21	供试品溶液2-20h	1针
7	对照溶液2-3h	1针	22	对照溶液2-21h	1针
8	供试品溶液2-4h	1针	23	空白溶剂	2针
9	对照溶液2-5h	1针	24	供试品溶液2-24h	1针
10	对照溶液1	1针	25	对照溶液2-25h	1针
11	空白溶剂	1针	26	空白溶剂	2针
12	供试品溶液2-8h	1针	27	供试品溶液2-28h	1针
13	对照溶液2-9h	1针	28	对照溶液2-29h	1针
14	空白溶剂	2针	29	空白溶剂	1针

15	供试品溶液2-12h	1针	30	对照溶液1	1针
----	------------	----	----	-------	----

[0273] (4) 分析结果: 试验结果见表34~36。

[0274] 表34系统适用性溶液检测结果

峰名称	保留时间 (min)	与相邻杂质 最小分离度	拖尾因子	理论板数
PZP-M2-imD	13.160	/	1.03	39871
PZP-M2-imI	18.131	4.78	0.92	112174
PZP-M1	19.822	7.66	1.01	123301
PZP-M2-imF	20.505	3.19	1.08	166922
主峰	25.181	2.39	0.87	100035
PZP-M2-imH	27.001	6.40	1.03	188953
PZP-M2-imA	29.385	3.45	1.03	168673

[0276] 表35供试品溶液稳定性测试结果

时间 (h)	0	2	4	8	12	16	20	24	28	均值 (%)	RSD (%)
PZP-M2-imD (%)	1.792	1.840	1.801	1.796	1.770	1.792	1.866	1.856	1.823	1.82	1.81
PZP-M2-imI (%)	0.010	0.011	0.011	0.010	0.010	0.011	0.013	0.014	0.013	0.01	13.72
PZP-M1 (%)	0.078	0.080	0.079	0.078	0.077	0.077	0.082	0.081	0.080	0.08	2.24
PZP-M2-imF (%)	0.069	0.070	0.070	0.069	0.068	0.069	0.072	0.071	0.070	0.07	1.72
PZP-M2-imH (%)	0.133	0.137	0.134	0.134	0.132	0.134	0.139	0.139	0.136	0.14	1.89
PZP-M2-imA (%)	0.189	0.197	0.190	0.189	0.187	0.191	0.202	0.198	0.197	0.19	2.71
总杂 (%)	2.481	2.550	2.495	2.484	2.451	2.483	2.593	2.575	2.533	2.52	1.94
杂质个数	12	12	12	12	12	12	11	11	11	/	/

[0278] 表36对照溶液稳定性测试结果

时间 (h)	保留时间 (min)	峰面积
1	25.046	90.26
3	25.029	87.96
5	25.022	89.70
9	25.006	90.25
13	24.982	91.41
17	25.006	90.22
21	25.009	86.51
25	24.963	87.14
29	24.937	88.85
均值	25.000	89.14

RSD(%)	0.14	1.84
--------	------	------

[0280] 供试品溶液室温放置28h,杂质PZP-M2-imD各时间点含量均值为1.82%,RSD为1.81%,小于5.0%;杂质PZP-M2-imI各时间点含量均值为0.01%,相对一致;杂质PZP-M1各时间点含量均值为0.08%,RSD为2.24%,小于20.0%;杂质PZP-M2-imF各时间点含量均值为0.07%,RSD为1.72%,小于20.0%;杂质PZP-M2-imH各时间点含量均值为0.14%,RSD为1.89%,小于15.0%;杂质PZP-M2-imA各时间点含量均值为0.19%,RSD为2.71%,小于10.0%;总杂各时间点含量均值为2.52%,RSD为1.94%,小于5.0%;

[0281] 杂质个数无明显变化,表明供试品溶液室温放置28h稳定。

[0282] 对照溶液室温放置29h,主峰峰面积RSD为1.84%,不大于5.0%,表明对照溶液室温放置29h稳定。

[0283] 最后应说明的是:以上各实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非对其限制;尽管参照前述各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,或者对其中部分或者全部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范围。

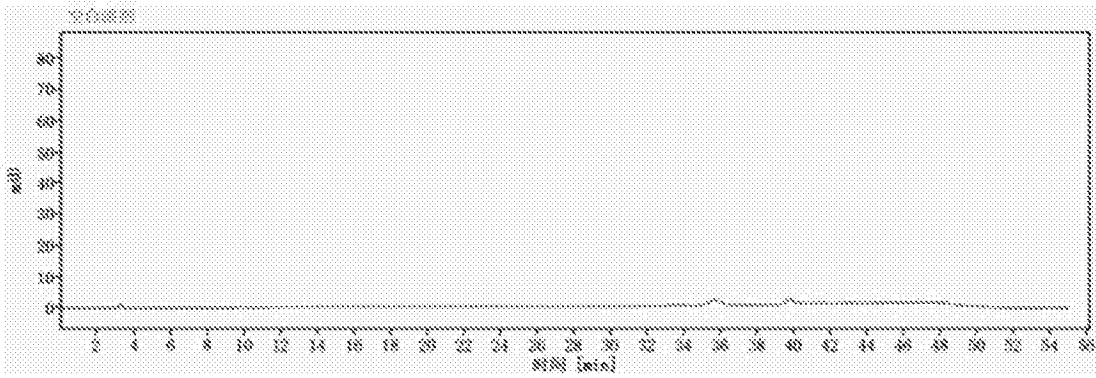


图1

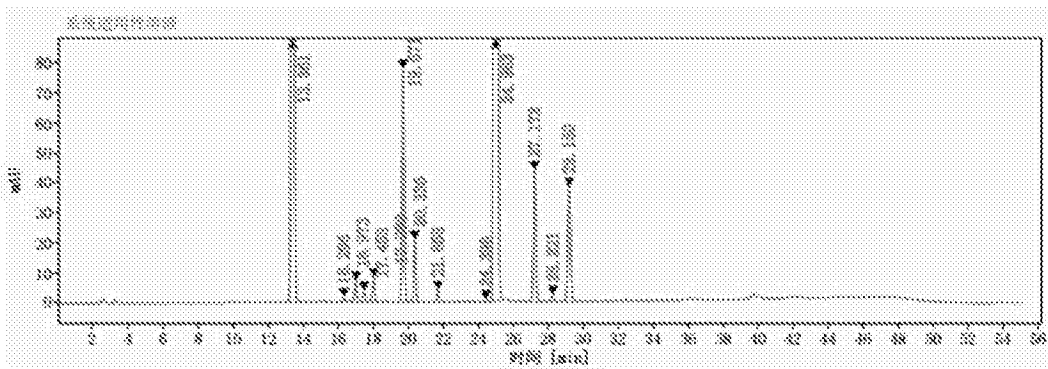


图2

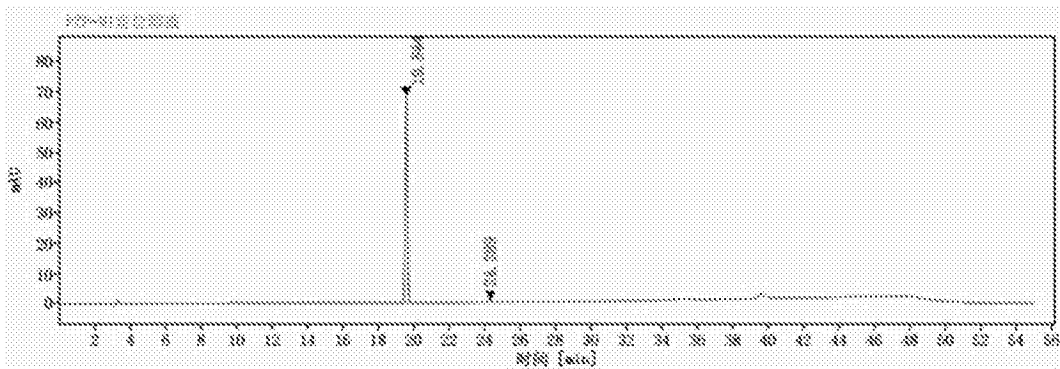


图3

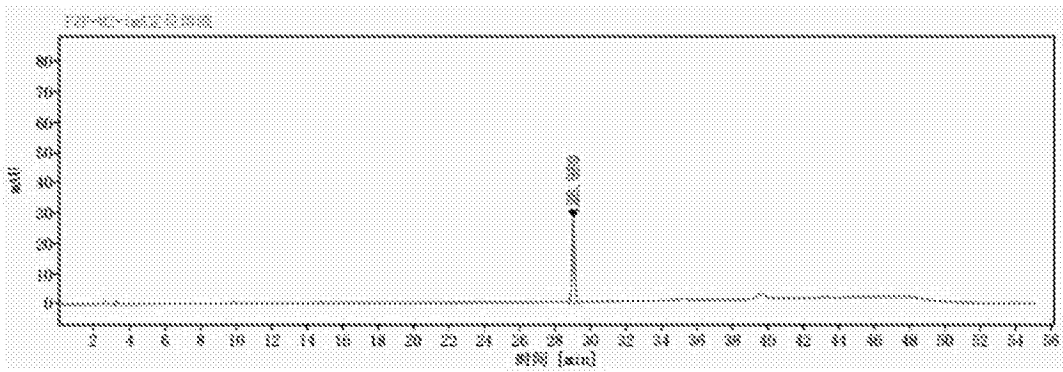


图4

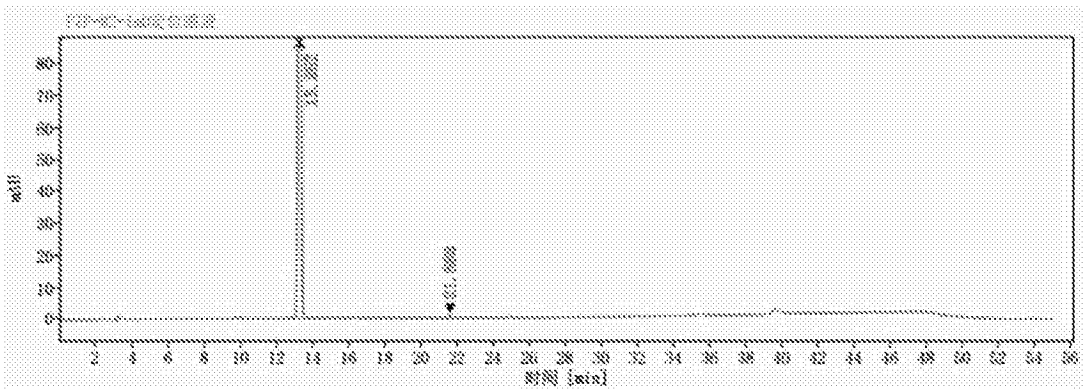


图5

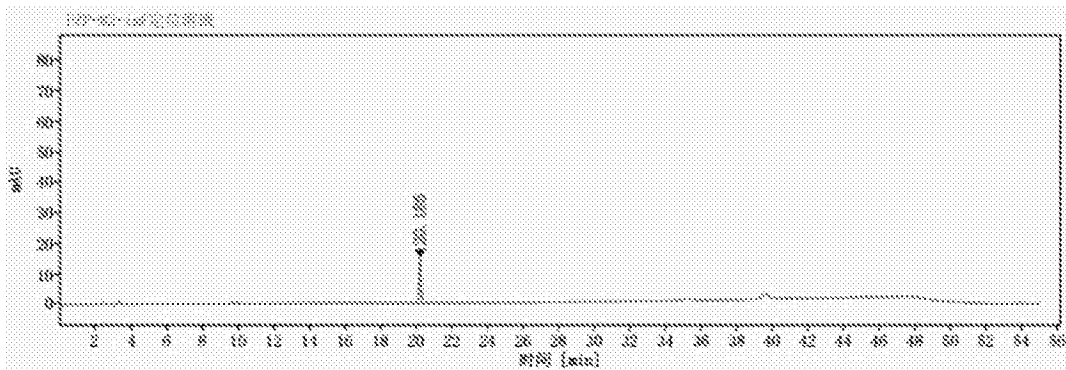


图6

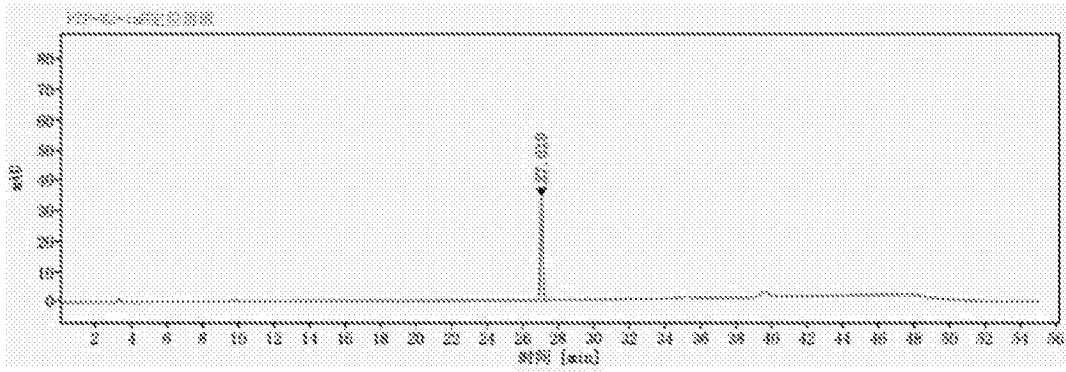


图7

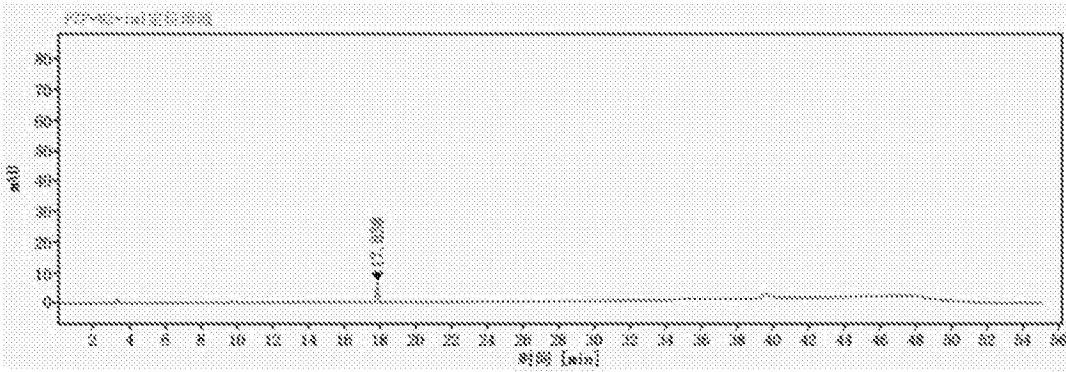


图8

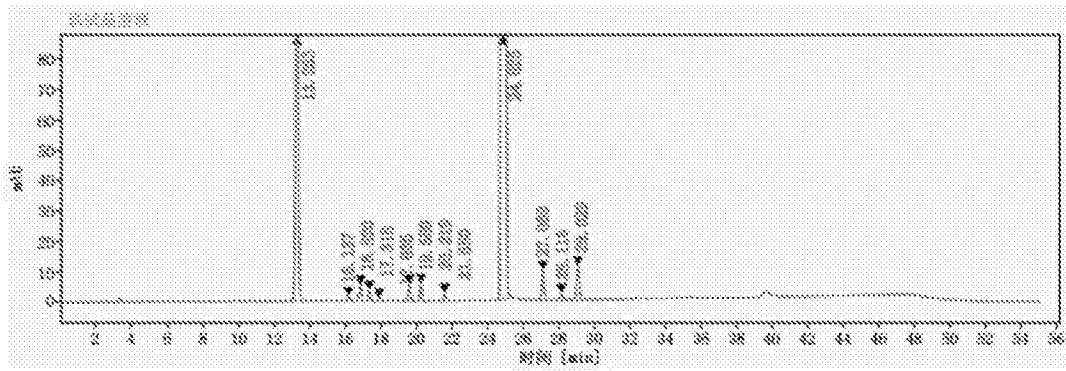


图9

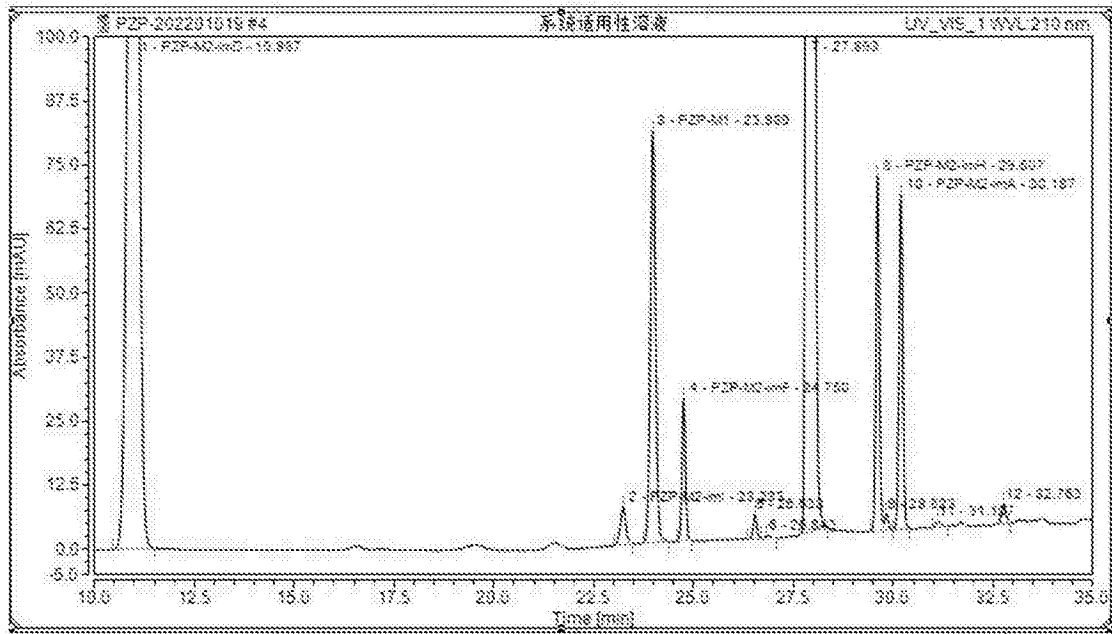


图10

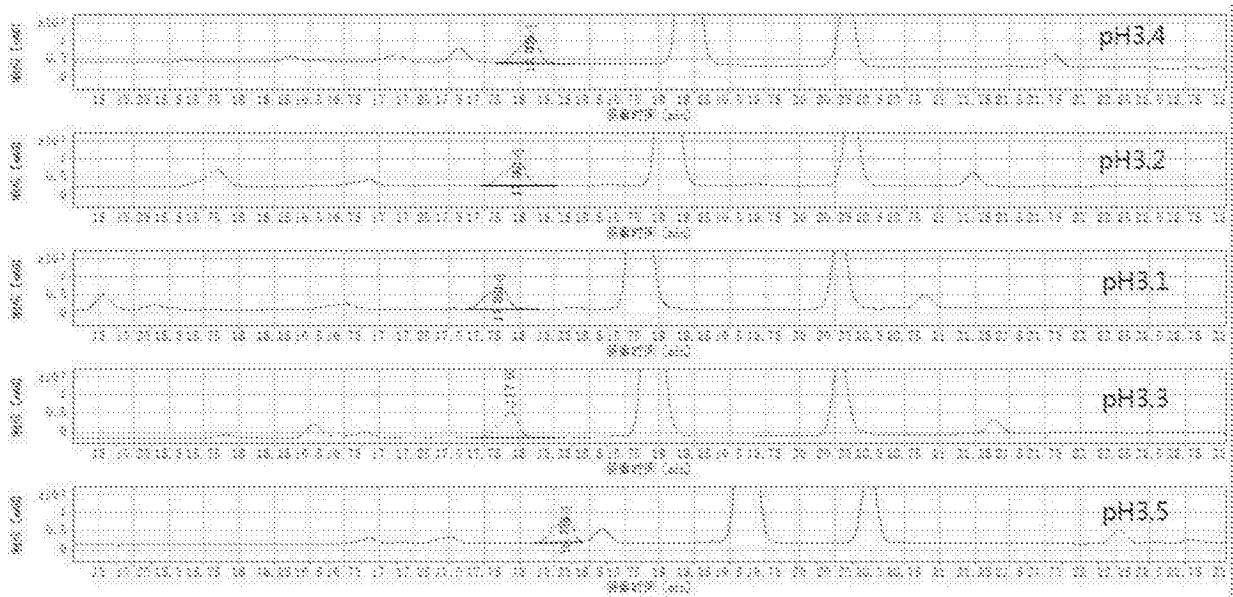


图11