



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107064350 A

(43)申请公布日 2017.08.18

(21)申请号 201710230988.4

(22)申请日 2017.04.11

(71)申请人 山东裕欣药业有限公司

地址 276017 山东省临沂市罗庄区罗七路
中段西侧

(72)发明人 张作芳 刘纯海 孙运贝

(51)Int.Cl.

G01N 30/02(2006.01)

G01N 30/74(2006.01)

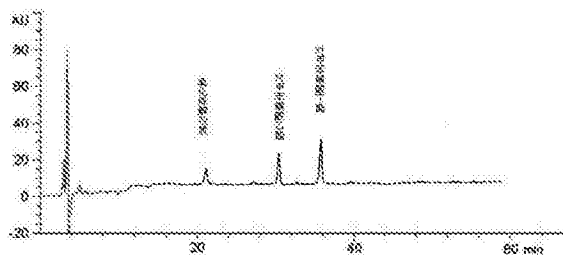
权利要求书1页 说明书7页 附图2页

(54)发明名称

一种枸橼酸托法替布疑似基因毒性杂质的
检测方法

(57)摘要

本发明属于分析化学领域,具体涉及一种枸橼酸托法替布疑似基因毒性杂质的检测方法,选择十八烷基硅烷键合硅胶为固定相,以有机相与缓冲液的混合溶剂作为流动相梯度洗脱。采用该方法可以将枸橼酸托法替布原料药中存在的疑似基因毒性杂质在同一色谱条件下进行快速高效的分离,有效控制原料药及制剂的质量。该检测方法灵敏度高、专属性强、精密度高、准确性强、操作方便,可以达到有效控制原料药质量的目的。



1. 一种枸橼酸托法替布疑似基因毒性杂质的检测方法,其特征在于:

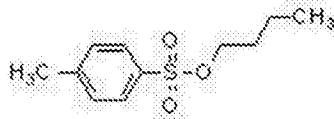
a、色谱条件:色谱柱选用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱;流动相梯度洗脱:流动相由A相和B相组成,流动相A相是0.05mol/L磷酸二氢钠缓冲溶液,流动相B相是甲醇或乙腈;采用二极管阵列检测器进行检测或采用紫外检测器,检测波长:220nm-280nm;

b、样品溶液的配置:采用甲醇和水的混合液将待检测样品配制成一定浓度的样品溶液;

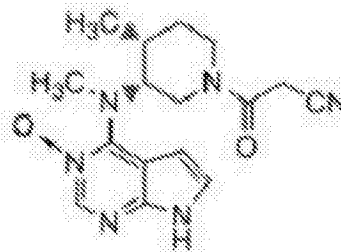
c、分离分析:将样品溶液注入高效液相色谱仪,在适当流速和柱温下进行高效液相色谱分析,记录色谱图,完成枸橼酸托法替布中疑似基因毒性杂质的含量测定,其中,所述疑似基因毒性杂质为对甲苯磺酸乙酯、对甲苯磺酸丁酯及氧化降解杂质,其结构式如下所示:



对甲苯磺酸乙酯



对甲苯磺酸丁酯



氧化降解杂质

2. 如权利要求1所述的检测方法,其特征在于:所述流动相A相是pH值为3.0~4.5的0.05mol/L磷酸二氢钠缓冲溶液。

3. 如权利要求1所述的检测方法,其特征在于:所述甲醇和水的混合液中甲醇和水的体积比为40:60。

4. 如权利要求1所述的检测方法,其特征在于:所述梯度程序如下所示:

时间	流动相A体积比/%	流动相B体积比/%
0	85%	15%
5	85%	15%
34	45%	55%
45	85%	15%
50	85%	15%

5. 如权利要求1所述的检测方法,其特征在于:所述流动相B为甲醇。

6. 如权利要求2所述的检测方法,其特征在于:所述流动相A相是pH值为3.0的0.05mol/L磷酸二氢钠缓冲溶液。

7. 如权利要求4所述的检测方法,其特征在于:所述流动相的流速为0.8~1.2ml/min。

8. 如权利要求4所述的检测方法,其特征在于:所述流动相的流速为1.0ml/min。

9. 如权利要求1所述的检测方法,其特征在于:柱温为25℃~35℃,优选30℃。

10. 如权利要求1所述的检测方法,其特征在于:色谱柱规格用250mm长度*4.6mm内径*5μm填充剂粒径。

一种枸橼酸托法替布疑似基因毒性杂质的检测方法

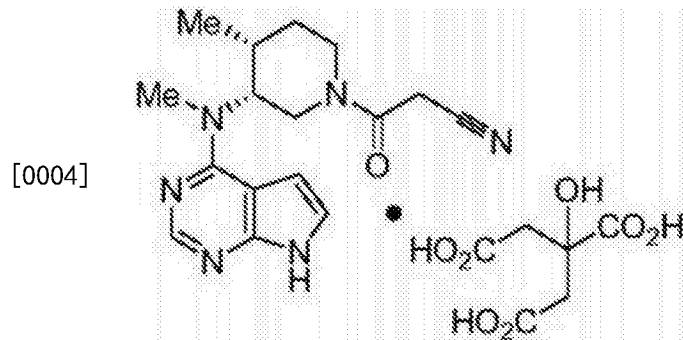
技术领域

[0001] 本发明属于分析化学领域,具体涉及一种枸橼酸托法替布疑似基因毒性杂质的检测分析方法。

背景技术

[0002] 枸橼酸托法替布(TofacitinibCitrate)由美国辉瑞公司研发,适用于对甲氨蝶呤应答不充分或不耐受的中至重度活动性类风湿性关节炎成年患者的治疗。它可用作单药疗法或与甲氨蝶呤或其它非生物性缓解病情的抗风湿药(DMARDs)联用。

[0003] 枸橼酸托法替布结构中含有C3与C4两个手性中心,其中文化学名称:3-((3R,4R)-4-甲基-3-(甲基(7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-4-基)氨基)哌啶-1-基)-3-氧代丙腈枸橼酸盐;分子式: $C_{16}H_{20}N_6O \cdot C_6H_8O_7$;分子量:504.5;CAS登记号:540737-29-9,结构式如下:



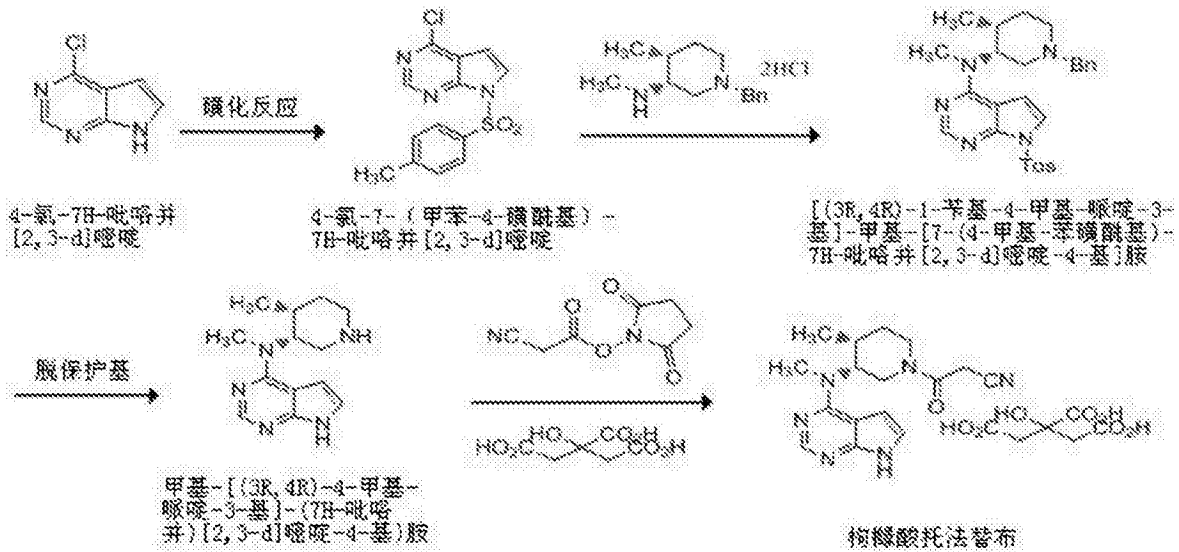
[0005] 枸橼酸托法替布合成过程中可能产生的杂质,需要进行严格控制,以保证产品质量和安全。因此,实现枸橼酸托法替布中疑似基因毒性杂质的快速分离和含量分析在合成过程中的质量控制方面有很重要的现实意义。

发明内容

[0006] 本发明的一个目的在于提出了一种快速分析分离枸橼酸托法替布中的工艺副产物杂质和降解产物的高效液相色谱法,从而实现了枸橼酸托法替布中疑似基因毒性杂质在同一色谱条件下的分离及含量测定。

[0007] 枸橼酸托法替布原料药合成采用的路线:

[0008]



[0009] 4-氯-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶是枸橼酸托法替布常用的起始原料,因其价廉易得备受青睐,4-氯-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶在参与反应过程中,由于吡咯环上的仲胺反应活性强,很容易发生副反应,通常都是先进行磺酰基保护,然后再脱保护。工艺中我们使用了对甲苯磺酰氯作为反应试剂,并且在后续反应中使用了乙醇和正丁醇作为溶剂,因此有可能产生对甲苯磺酸乙酯和对甲苯磺酸丁酯,虽然目前对甲苯磺酸烷基酯暂无基因毒性数据报道,但类似结构的甲磺酸烷基酯类已有基因毒性报道,因此,我们将本品中潜在残留的对甲苯磺酸乙酯和对甲苯磺酸丁酯作为毒性杂质进行控制。对甲苯磺酸乙酯与对甲苯磺酸丁酯为本品潜在的合成副反应产物,考虑到对甲苯磺酸烷基酯类为潜在基因毒性警示结构类化合物,为严格对其残留量进行控制,我们将其订入质量标准,采用HPLC法进行检查,并根据欧盟EMA相关要求,结合本品最大日服用剂量,拟定限度为含对甲苯磺酸乙酯与对甲苯磺酸丁酯总和不得过0.005% (50ppm)。

[0010] 另外枸橼酸托法替布原料药容易产生氧化降解杂质,该氧化降解杂质也具有疑似基因毒性杂质结构。考虑到目前未见其相关毒性报道,因此,我们将其订入标准,在有关物质检查中作为未知杂质进行控制,限度参照ICHQ3A中杂质鉴定限度(本品最大日剂量≤2g,并且小于1.0g)制定为不得过0.1%。

[0011]



[0012] 这三个杂质被ICH(人用药物注册技术要求国际协调会)以及FDA和欧洲药品审评署(EMA)定义为疑似基因毒性杂质,按照ICH以及FDA和EMA规定,根据可接受的阈值量(TTC),每天摄入1.5微克的基因毒性杂质,被认为对大多数药品来说是可以接受的风险。所

以成品中三个杂质的相应限度分别为：甲苯磺酸乙酯与对甲苯磺酸丁酯总和不得过0.005%，氧化降解杂质不得过0.1%。

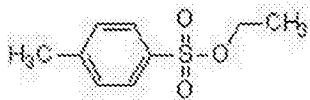
[0013] 本发明提供了一种枸橼酸托法替布疑似基因毒性杂质的检测方法，其特征在于：

[0014] a、色谱条件：色谱柱选用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱；流动相梯度洗脱：流动相由A相和B相组成，流动相A相是0.05mol/L磷酸二氢钠缓冲溶液，流动相B相是甲醇或乙腈；采用二极管阵列检测器进行检测或采用紫外检测器，检测波长：220nm-280nm；

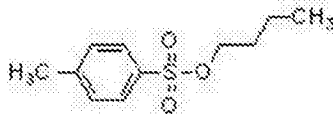
[0015] b、样品溶液的配置：采用甲醇和水的混合液将待检测样品配制成一定浓度的样品溶液；

[0016] c、分离分析：将样品溶液注入高效液相色谱仪，在适当流速和柱温下进行高效液相色谱分析，记录色谱图，完成枸橼酸托法替布中疑似基因毒性杂质的含量测定，其中，所述疑似基因毒性杂质为对甲苯磺酸乙酯、对甲苯磺酸丁酯及氧化降解杂质，其结构式如下所示：

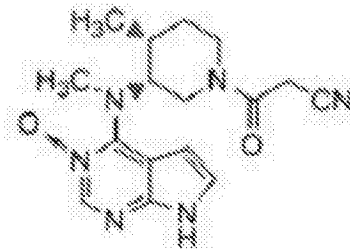
[0017]



对甲苯磺酸乙酯



对甲苯磺酸丁酯



氧化降解杂质

[0018] 采用该方法可以将枸橼酸托法替布中的三个疑似基因毒性杂质进行高效快速的分离和检测，有效控制原料药及制剂的质量。该检测方法灵敏度高、专属性强、精密度高、准确性强、操作方便，可以有效控制原料药的质量。

[0019] 根据本发明实施例的测定枸橼酸托法替布中疑似基因毒性杂质的含量方法，还可以具有以下附加技术特征：

[0020] 根据本发明的实施例，所述流动相B为甲醇。

[0021] 根据本发明的实施例，所述磷酸二氢钠缓冲液的pH值为3.0~4.5，优选pH值为3.0。

[0022] 根据本发明的实施例，所述缓冲液与有机相的体积比为(0~100%)：(0~100%)，所述梯度程序如下所示：

[0023]

时间	流动相A体积比/%	流动相B体积比/%
0	85%	15%
5	85%	15%
34	45%	55%
45	85%	15%
50	85%	15%

[0024] 根据本发明的实施例，所述流动相的流速为0.8~1.2ml/min，优选1.0ml/min。

[0025] 根据本发明的实施例，所述柱温为25℃~35℃，优选30℃。

[0026] 根据本发明的实施例,检测波长为280nm。色谱柱规格用250mm长度*4.6mm内径*5 μ m填充剂粒径。

[0027] 本发明所述的测定方法,可以依照以下方法实现:

[0028] 1、取待检测样品适量,用甲醇:水(体积比40:60)的混合液溶解,配置每1ml含1mg的样品溶液。

[0029] 2、设置流动相流速为0.8-1.2ml/min,流动相的流速优选为1.0ml/min,检测波长280nm,色谱柱温度25-35 $^{\circ}$ C,优选30 $^{\circ}$ C。

[0030] 3、取1的混合样品溶液20 μ l,注入液相色谱仪,完成枸橼酸托法替布中疑似基因毒性杂质的含量的测定。

[0031] 本发明的验证项目包括专属性、系统适用性与精密度、准确度、线性、重复性、检测限、定量限、耐用性等项目。验证结果,在专属性试验中,空白溶剂对样品检测无干扰,杂质对甲苯磺酸乙酯、对甲苯磺酸丁酯及氧化降解杂质及各相邻杂质与枸橼酸托法替布之间的分离度大于1.5;系统适用性与精密度试验中各个杂质质量的相对标准偏差(RSD)均小于2.0%;线性试验中,对甲苯磺酸乙酯、对甲苯磺酸丁酯及氧化降解杂质在相应的测试浓度范围内相关系数均大于0.999;方法重复性实验中对甲苯磺酸乙酯、对甲苯磺酸丁酯及氧化降解杂质、单个未知杂质的RSD均小于10.0%,杂质总量的RSD小于5.0%,中间精密度试验结果良好;方法准确度试验结果表明,其相关杂质的回收率均在90%~110%的范围内;同时通过耐用性试验结果表明色谱条件的微小变化不会影响测定结果的准确性。结果均符合中国药典2015版相关规定,证明该方法精密、有效。

[0032] 本发明方法的洗脱分离效果好,能使原料药样品中三个疑似基因毒性杂质有效分离。检测时间仅需60min,可以快速、准确、可靠的分离枸橼酸托法替布及相邻的疑似基因毒性杂质。

附图说明:

[0033] 图1显示了根据本发明的实施例1,所得三个疑似基因毒性杂质定位的高效液相色谱图;

[0034] 图2显示了根据本发明的实施例2,所得分离枸橼酸托法替布原料药及疑似基因毒性杂质的高效液相色谱图;

[0035] 图3显示了根据本发明的实施例4,所得分离枸橼酸托法替布原料药及疑似基因毒性杂质的高效液相色谱图。

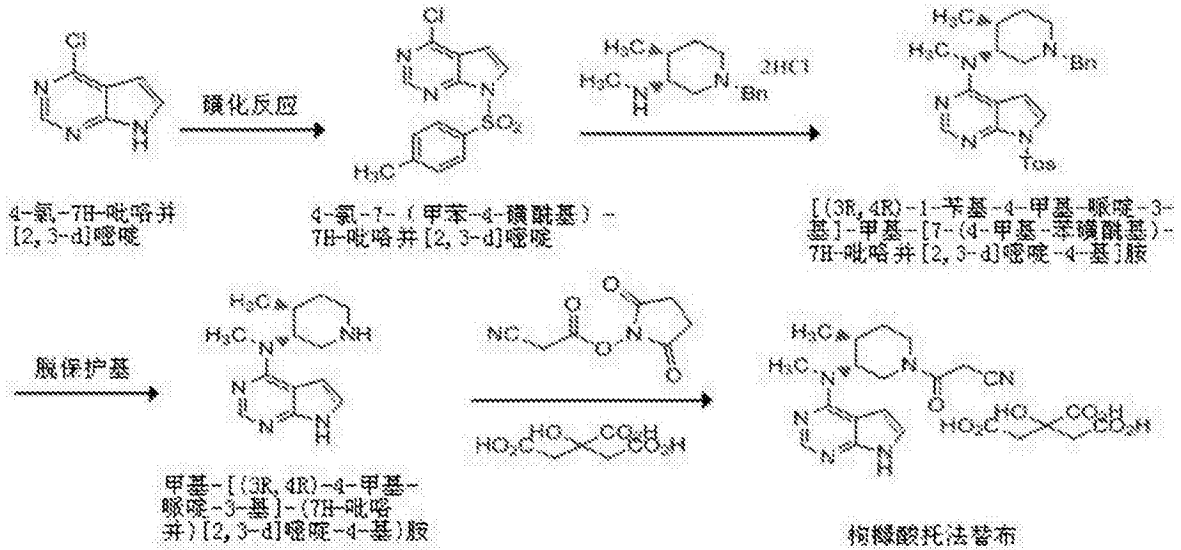
具体实施方式

[0036] 下面详细描述本发明的实施例。下面描述的实施例是示例性的,仅用于解释本发明,而不能理解为对本发明的限制。实施例中未注明具体技术或条件的,按照本领域内的文献描述的技术或条件或按照产品说明书进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商的,均为可以通过市购的常规产品。

[0037] 本发明实施例中所用的枸橼酸托法替布原料药为申请人自制。

[0038] 枸橼酸托法替布原料药的制备工艺为:

[0039]



[0040] 以4-氯-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶进行碘化反应后和(3R,4R)-顺式-1-苄基-4-甲基-3-甲氨基-哌啶二盐酸盐缩合,脱保护,酰化,成盐得到枸橼酸托法替布。

[0041] 实施例1

[0042] 仪器:岛津LC-20A、PDA检测器(仪器编号YQ-分析020)

[0043] 色谱柱:十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂(C18,5μm,4.6*150mm)

[0044] 流动相A:0.05mol/l磷酸二氢钠溶液(磷酸调节pH值为3.0)

[0045] 流动相B:甲醇

[0046] 梯度洗脱:

[0047]

时间	流动相A%	流动相B%
0	85%	15%
5	85%	15%
34	45%	55%
45	85%	15%
50	85%	15%

[0048] 流速:1.0ml/min

[0049] 检测波长:220-280nm

[0050] 进样体积:50μl

[0051] 柱温:30℃

[0052] 运行时间:60min

[0053] 实验步骤:

[0054] 杂质定位溶液配制:精密称取对甲苯磺酸乙酯对照品、对甲苯磺酸丁酯与氧化降解杂质对照品各25mg,置于同一个100ml容量瓶中,加稀释液溶解并稀释至刻度,摇匀,精密量取1ml置10ml容量瓶中,加稀释液稀释至刻度,摇匀,再精密量取1ml置100ml容量瓶中,加稀释液稀释至刻度,摇匀,即得250ppm浓度的溶液。

[0055] 结论:此色谱条件下,三个疑似基因毒性杂质可以在同一色谱条件下达到良好的

分离,图1(检测波长280nm)中保留时间20.735min,30.412min,36.368min的色谱峰分别为氧化降解杂质、对甲苯磺酸乙酯与对甲苯磺酸丁酯。

[0056] 色谱图表明三个杂质在含量为250ppm时,进行高效液相色谱分析是可以作定性分析的,定量限为250ppm。

[0057] 实施例2

[0058] 仪器:岛津2010CHT、紫外检测器(仪器编号YQ-分析021)

[0059] 色谱柱:十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂(C18,5 μ m,4.6*150mm)

[0060] 流动相A:0.05mol/l磷酸二氢钠溶液(磷酸调节pH值为3.0)

[0061] 流动相B:甲醇

[0062]

时间	流动相A%	流动相B%
0	85%	15%
5	85%	15%
34	45%	55%
45	85%	15%
50	85%	15%

[0063] 流速:1.0ml/min

[0064] 检测波长:280nm

[0065] 进样体积:50 μ l

[0066] 柱温:30 $^{\circ}$ C

[0067] 运行时间:60min

[0068] 实验步骤:精密称取枸橼酸托法替布原料药100mg,置同一个10ml容量瓶中,加实施例1配制的杂质定位溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,即得10mg/ml的溶液。

[0069] 结论:此色谱条件下,图2中保留时间20.797min,30.462min,36.413min的色谱峰分别为氧化降解杂质、对甲苯磺酸乙酯与对甲苯磺酸丁酯。

[0070] 色谱图表明原料药中三个疑似基因毒性杂质对甲苯磺酸乙酯、对甲苯磺酸丁酯与氧化降解杂质可在同一色谱条件下达到良好的分离。结果也表明该方法可用于枸橼酸托法替布原料药的质量检测。

[0071] 实施例3

[0072] 仪器:岛津LC-20A、PDA检测器(仪器编号YQ-分析020)

[0073] 色谱柱:十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂(C18,5 μ m,4.6*150mm)

[0074] 流动相A:0.05mol/l磷酸二氢钠溶液(磷酸调节pH值为3.5)

[0075] 流动相B:甲醇

[0076]

时间	流动相A%	流动相B%
0	85%	15%
5	85%	15%
34	45%	55%
45	85%	15%

50	85%	15%
----	-----	-----

[0077] 流速:1.0ml/min

[0078] 检测波长:220nm

[0079] 进样体积:50 μ l

[0080] 柱温:30 $^{\circ}$ C

[0081] 运行时间:60min

[0082] 实验步骤:精密称取枸橼酸托法替布原料药100mg,置同一个10ml容量瓶中,加实施例1配制的杂质定位溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

[0083] 结论:此色谱条件下,色谱图中保留时间20.678min,30.356min,36.375min的色谱峰分别为氧化降解杂质、对甲苯磺酸乙酯与对甲苯磺酸丁酯。

[0084] 色谱图表明原料药中三个疑似基因毒性杂质对甲苯磺酸乙酯、对甲苯磺酸丁酯、氧化降解杂质可在同一色谱条件下达到良好的分离。结果也表明该方法可用于枸橼酸托法替步原料药的质量检测。

[0085] 实施例4

[0086] 仪器:岛津LC-20A、PDA检测器(仪器编号YQ-分析020)

[0087] 岛津2010CHT、紫外检测器(仪器编号YQ-分析021)

[0088] 色谱柱:十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂(C18,5 μ m,4.6*150mm)

[0089] 流动相A:0.05mol/l磷酸二氢钠溶液(磷酸调节pH值为3.0)

[0090] 流动相B:甲醇

[0091] 流动相A:流动相B=85:15(体积比%),等度洗脱

[0092] 流速:1.0ml/min

[0093] 检测波长:280nm

[0094] 进样体积:50 μ l

[0095] 柱温:30 $^{\circ}$ C

[0096] 运行时间:60min

[0097] 实验步骤:杂质定位溶液配制:精密称取对甲苯磺酸乙酯对照品、对甲苯磺酸丁酯与氧化降解杂质对照品各25mg,置于同一个100ml容量瓶中,加稀释液溶解并稀释至刻度,摇匀,精密量取1ml置10ml容量瓶中,加稀释液稀释至刻度,摇匀,再精密量取1ml置100ml容量瓶中,加稀释液稀释至刻度,摇匀,即得250ppm浓度的溶液。

[0098] 结论:三个疑似基因毒性杂质对甲苯磺酸乙酯、对甲苯磺酸丁酯、氧化降解杂质在该色谱条件分离效果不好,氧化降解杂质和主成分分不开。

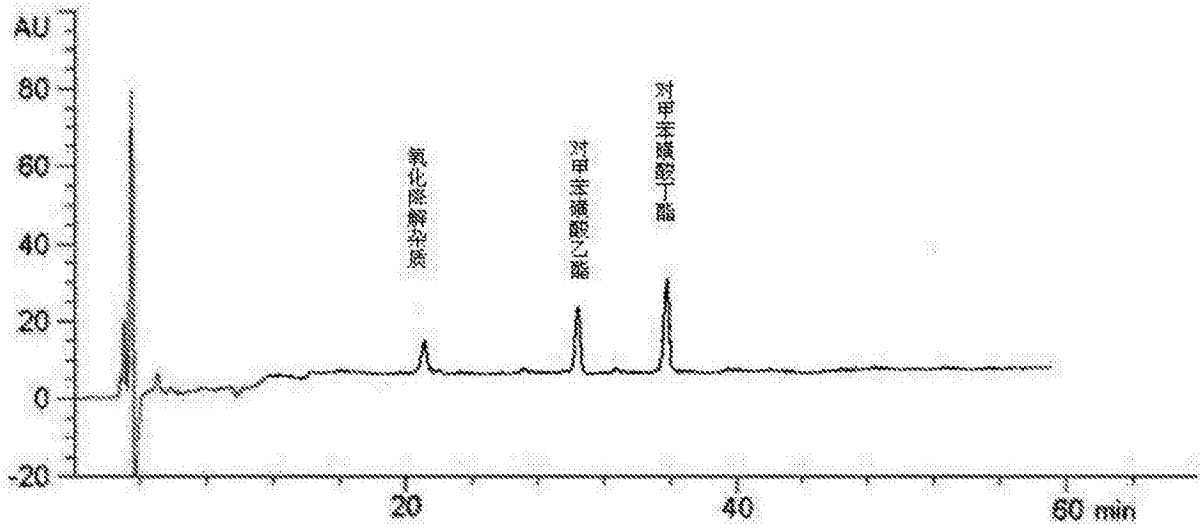


图1

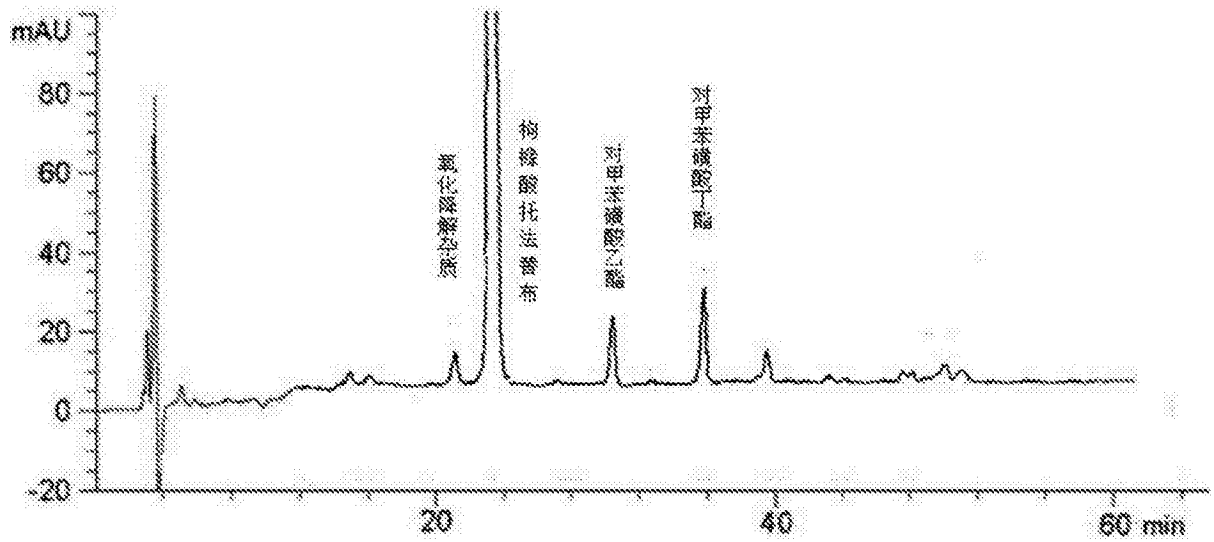


图2

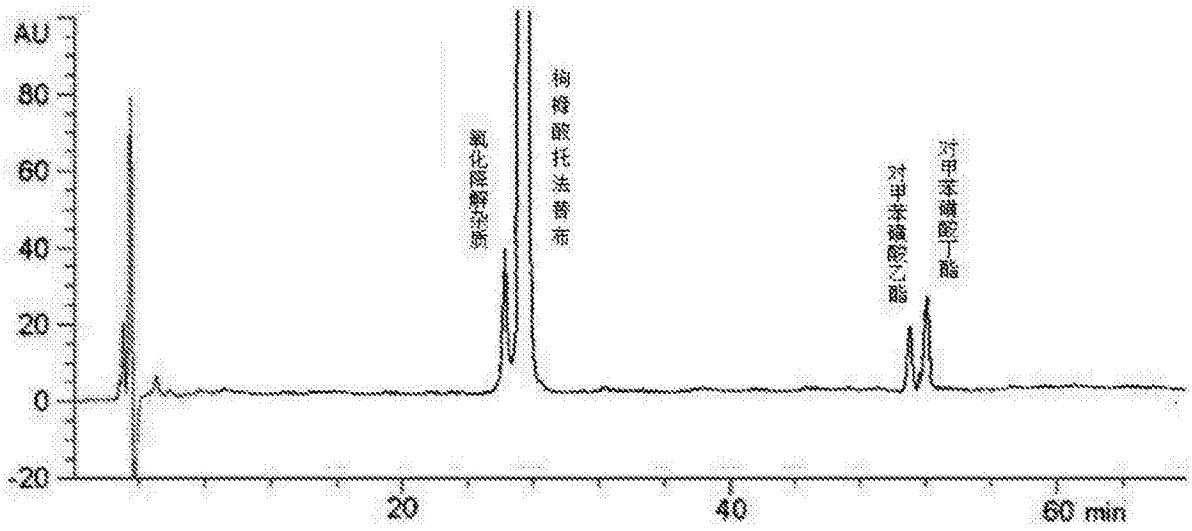


图3