



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 106908531 B

(45)授权公告日 2019.08.06

(21)申请号 201710096465.5

(22)申请日 2017.02.22

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106908531 A

(43)申请公布日 2017.06.30

(73)专利权人 深圳海王医药科技研究院有限公司

地址 518057 广东省深圳市南山区高新技术北区朗山二路海王工业城

(72)发明人 刘小柔 余琴 朱丹 石涛
杨经安 金锋 唐田

(74)专利代理机构 北京律诚同业知识产权代理有限公司 11006

代理人 黄韧敏

(51)Int.Cl.

G01N 30/02(2006.01)

G01N 30/06(2006.01)

(56)对比文件

CN 106389435 A,2017.02.15,

CN 105777655 A,2016.07.20,

CN 105777656 A,2016.07.20,

CN 103755688 A,2014.04.30,

WO 2007085638 A1,2008.10.22,

CN 103476770 A,2013.12.25,

李赫宇.HPLC 法测定阿法替尼片中主药和有关物质的含量.《天津药学》.2016,第28卷(第4期),

审查员 陈永晖

权利要求书1页 说明书15页 附图3页

(54)发明名称

一种高效液相色谱梯度法同时测定萘普替尼光降解产物及其它有关物质的方法

(57)摘要

本发明公开了一种萘普替尼的高效液相色谱分析法,具体是色谱柱为十八烷基硅烷键合硅胶柱(100×4.6mm,3.5 μm),以磷酸盐缓冲液-甲醇(82:18)为流动相A,以磷酸盐缓冲液-甲醇(40:60)为流动相B,梯度洗脱,柱温为30℃,流速为1.0ml/min,检测波长为247nm;取萘普替尼或萘普替尼制剂,加流动相A制成浓度为0.5mg/ml的溶液,作为供试品溶液;取萘普替尼对照品,加流动相A制成浓度为0.005mg/ml的溶液,作为对照品溶液。分别进样,按外标法以峰面积计算,供试品溶液的色谱图中各杂质峰面积的和不得超过1.0%。本发明首次测定了萘普替尼光降解产物及其它有关物质的含量,未见相关文献报导。可快速准确的检测出萘普替尼的光降解产物及其它杂质,操作简单,重现性好,灵敏度高,可较好地控制萘普替尼产品质量,为合成和制剂工艺优化提供了保证。

1. 一种高效液相色谱梯度法同时测定萘普替尼光降解产物及其它有关物质的方法,其特征在于,该检测方法包括以下步骤:

(1) 制备标准品溶液,以所述标准品溶液在下述色谱条件下进行系统适用性试验,校定检测系统;

色谱条件:色谱柱为十八烷基硅烷键合硅胶柱,以体积比为82:18的磷酸盐缓冲液-甲醇为流动相A,以体积比为40:60的磷酸盐缓冲液-甲醇为流动相B,梯度洗脱,磷酸盐缓冲液的浓度为0.04~0.1mol/L,pH值为7.0~7.8,柱温为25~35℃,流速为0.9~1.1ml/min,检测波长为247nm;

标准品溶液制备:分别取起始原料、中间体1、中间体2、中间体3、杂质A、杂质B和萘普替尼对照品加流动相A制成每1ml中含0.0025~0.5mg的混合溶液;

精密量取10μl所述混合溶液注入液相色谱仪,记录色谱图,校定检测系统至萘普替尼主峰与相邻杂质B的峰的分度大于1.5,萘普替尼主峰的理论板数不低于10000,拖尾因子不大于1.5;

(2) 制备供试品溶液和对照品溶液;

取萘普替尼待测样品,加流动相A制成浓度为0.5mg/ml的溶液,作为供试品溶液;取萘普替尼对照品,加流动相A制成浓度为0.005mg/ml的溶液,作为对照品溶液;

(3) 通过高效液相色谱测定待测样品中杂质B及相关有关物质的含量;

以对照品溶液注入经上述步骤(1)校定后的液相色谱仪,调节检测灵敏度,再将供试品溶液注入液相色谱仪,在步骤(1)所述的色谱条件下进行高效液相色谱测定,记录色谱图至萘普替尼主峰保留时间的3~4倍;

(4) 计算待测样品中各杂质的含量;

按外标法以峰面积计算,各杂质峰面积之和不得超过1.0%;

其中所述的梯度洗脱中,流动相A比例的变化范围为:于0~10分钟,线性梯度洗脱,流动相A的比例从75%变化为55%,流动相B的比例从25%变化为45%;于10~20分钟,等度洗脱,流动相A的比例保持55%不变,流动相B的比例保持45%不变;于20~30分钟,线性梯度洗脱,流动相A的比例从55%变化为0%,流动相B的比例从45%变化为100%;于30~40分钟,等度洗脱,流动相A的比例保持0%不变,流动相B的比例保持100%不变,于40~45分钟,流动相A和B回到初始比例,色谱柱重新平衡。

2. 如权利要求1所述的方法,其中所述磷酸盐为磷酸二氢钠。

3. 如权利要求2所述的方法,其中所述的磷酸二氢钠的浓度为0.05mol/L,pH值为7.5。

4. 如权利要求1所述的方法,其色谱条件为:色谱柱为十八烷基硅烷键合柱,以体积比为82:18的磷酸盐缓冲液-甲醇为流动相A,以体积比为40:60的磷酸盐缓冲液-甲醇为流动相B,梯度洗脱,柱温为30℃,流速为1.0ml/min,检测波长为247nm。

5. 如权利要求4所述的方法,所述的色谱柱为Waters XBridge C₁₈色谱柱。

6. 如权利要求1-5任一项所述的方法,其特征在于,所述萘普替尼待测样品包括萘普替尼原料、萘普替尼粗品、萘普替尼片剂和萘普替尼胶囊。

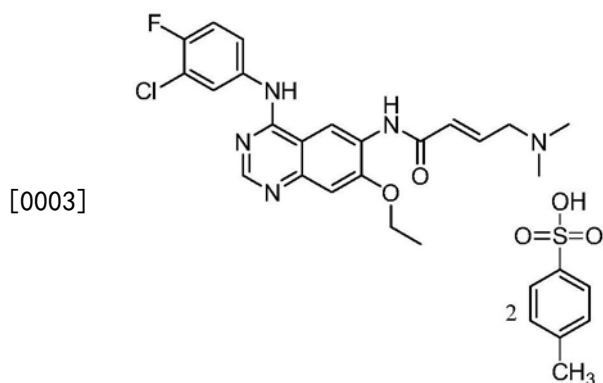
一种高效液相色谱梯度法同时测定萘普替尼光降解产物及其它有关物质的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及萘普替尼原料及其相关制剂的分析方法,具体涉及一种用高效液相色谱梯度法进行测定的方法,属于药物分析检测领域。

背景技术

[0002] 萘普替尼是一种苯胺喹唑啉类抗癌新药,临床拟用于晚期非小细胞肺癌的治疗。其化学名称为(E)-N-[4-(3-氯-4-氟苯基)氨基]-7-乙氧基喹唑啉-6-基]-4-(二甲氨基)丁-2-烯酰胺二甲苯磺酸盐结晶水合物,分子式为 $C_{22}H_{23}ClFN_5O_2 \cdot (C_7H_8O_3S)_2$,其化学结构式如下:



[0004] 萘普替尼在合成和储藏过程中在2位双键上容易产生顺式异构体,另同时也可能存在各中间体、副产物和降解产物,采用一般的分析方法难于分离萘普替尼与它的光学异构体,本文通过调节不同的流动相组成、比例、不同的洗脱方式,不同的PH值及不同的无机盐浓度首次实现了同时测定萘普替尼光降解产物及其它相关有关物质的目的,很好地保证了萘普替尼原料的质量可控,具有现实意义。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种高效液相色谱梯度法同时测定萘普替尼光降解产物及其它有关物质的方法,可用于萘普替尼制备过程及最终产品的质量控制。

[0006] 本发明的技术方案为:

[0007] 一种高效液相色谱梯度法同时测定萘普替尼光降解产物及其它相关有关物质的方法,其特征在于,该检测方法包括以下步骤:

[0008] (1) 制备标准品溶液

[0009] 以所述标准品溶液在下述色谱条件下进行系统适用性试验,校定检测系统:

[0010] 色谱条件:色谱柱为十八烷基硅烷键合硅胶柱,以磷酸盐缓冲液-甲醇(82:18)为流动相A,以磷酸盐缓冲液-甲醇(40:60)为流动相B,梯度洗脱,磷酸盐缓冲液的浓度为0.04~0.1mol/L,pH值为7.0~7.8,柱温为25~35℃,流速为0.9~1.1ml/min,检测波长为247nm;

[0011] 标准品溶液制备:分别取起始原料、中间体1、中间体2、中间体3、杂质A、光照产物(杂质B)和萘普替尼对照品加流动相A制成每1ml中约含0.0025~0.5mg的混合溶液;

[0012] 精密量取10 μ l所述混合溶液注入液相色谱仪,记录色谱图,校定检测系统至萘普替尼主峰与相邻杂质B的峰的分度应大于1.5,理论板数和拖尾因子按萘普替尼主峰计算应不低于10000和不大于1.5;

[0013] (2) 制备供试品溶液和对照品溶液

[0014] 取萘普替尼待测样品,加流动相A制成浓度为0.5mg/ml的溶液,作为供试品溶液;取萘普替尼对照品,加流动相A制成浓度为0.005mg/ml的溶液,作为对照品溶液。

[0015] (3) 通过高效液相色谱测定待测样品中杂质B及相关有关物质的含量

[0016] 以对照品溶液注入经上述步骤(1)校定后的液相色谱仪,调节检测灵敏度,再将供试品溶液注入液相色谱仪,在步骤(1)所述的色谱条件下进行高效液相色谱测定,记录色谱图至萘普替尼主峰保留时间的3~4倍。

[0017] (4) 计算待测样品中各杂质的含量

[0018] 按外标法以峰面积计算,各杂质峰面积之和不得过1.0%。

[0019] 其中,上述的梯度洗脱中,流动相A比例的变化范围于0~10分钟,线性梯度洗脱,流动相A的比例从75%变化为55%,流动相B的比例从25%变化为45%;于10~20分钟,等度洗脱,流动相A的比例保持55%不变,流动相B的比例保持45%不变;于20~30分钟,线性梯度洗脱,流动相A的比例从55%变化为0%,流动相B的比例从45%变化为100%;于30~40分钟,等度洗脱,流动相A的比例保持0%不变,流动相B的比例保持100%不变,于40~45分钟,流动相A和B回到初始比例,色谱柱重新平衡。

[0020] 更优选地,上述磷酸盐选自磷酸二氢钠,浓度为0.05mol/L,pH值为7.5。

[0021] 上述色谱条件为:色谱柱为十八烷基硅烷键合硅胶柱(100 $\times$ 4.6mm,3.5 μ m),以体积比为82:18的磷酸盐缓冲液-甲醇为流动相A,以体积比为40:60的磷酸盐缓冲液-甲醇为流动相B,梯度洗脱,柱温为30 $^{\circ}$ C,流速为1.0ml/min,检测波长为247nm。

[0022] 更优选地,上述色谱柱为Waters XBridge C₁₈色谱柱。

[0023] 上述萘普替尼样品包括萘普替尼原料、萘普替尼中间体、萘普替尼片和萘普替尼胶囊。

[0024] 本发明通过使用高效液相色谱梯度法同时测定萘普替尼的光降解产物及其它有关物质,通过对色谱条件的探索,确定了可以有效分离萘普替尼及有关物质的色谱条件,本方法专属性好、分离度佳、灵敏度高、重现性好,对评价合成和制剂工艺的优劣、终产品质量控制及稳定性样品检测具有重要的意义,本发明首次测定了萘普替尼光降解产物及其它有关物质的含量,未见相关文献报导。

[0025] 本发明中,所述“有关物质”是指在药物制备和贮存过程中,可能生成和降解产生的杂质(包括中间体、副产物等有机杂质)。其中,萘普替尼的有关物质包括:杂质A、杂质B、中间体1、中间体2、中间体3、起始原料。

[0026] 本发明方法适用于萘普替尼中间体、萘普替尼原料及含萘普替尼的相关制剂,如固体制剂包括片剂以及胶囊等。本发明检测方法准确,操作简单,时间迅速,可以充分满足有关物质检查与分解产物测定的要求,较好地控制样品中的特定杂质与非特定杂质,保证产品质量,在实际质量控制工作中实用性强。

附图说明

[0027] 图1是系统适用性典型HPLC图谱,1是杂质A,2是光照产物(杂质B),3是萘普替尼,4是中间体2,5是中间体3,6是起始原料,7是中间体1;

[0028] 图2是萘普替尼原料供试品溶液的色谱图(批号:20141201);

[0029] 图3是萘普替尼粗品供试品溶液的色谱图(批号:20141201);

[0030] 图4是萘普替尼片剂供试品溶液的色谱图(批号:20150204);

[0031] 图5是萘普替尼胶囊供试品溶液的色谱图(批号:20150301);

具体实施方式

[0032] 仪器:Agilent 1260系列高效液相色谱仪;

[0033] 试剂:磷酸二氢钠(分析纯),氢氧化钠(分析纯),甲醇(色谱纯,Merk公司);

[0034] 色谱柱:Waters XBridge C₁₈色谱柱(100×4.6mm,3.5μm);

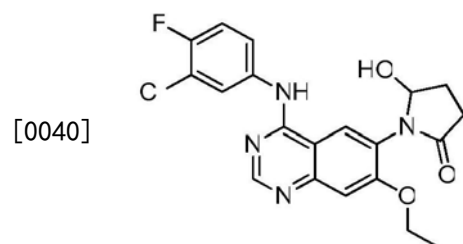
[0035] 标准品的化学名、结构式及来源:

[0036] 萘普替尼:自制,纯度:97.6%,批号:20141001;取萘普替尼原料经甲醇-水重结晶,干燥,即得;

[0037] 杂质A:

[0038] 化学名:1-[4-(3-氯-4-氟苯基氨基)-7-乙氧基喹唑啉-6-基]-5-羟基吡咯烷-2-酮

[0039] 结构式:

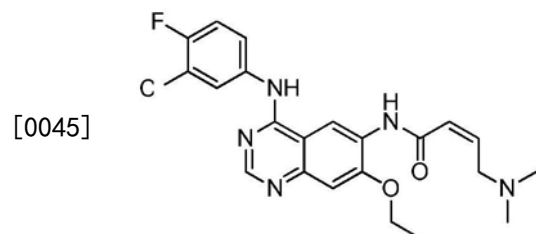


[0041] 来源:自制,纯度:98.6%,批号:20141105,取萘普替尼原料溶于甲醇-水,60℃降解2小时,经制备液相色谱收集,浓缩,冷冻干燥即得;

[0042] 杂质B:

[0043] 化学名:(Z)-N-[4-(3-氯-4-氟苯基)氨基]-7-乙氧基喹唑啉-6-基]-4-(二甲氨基)丁-2-烯酰胺

[0044] 结构式:



[0046] 来源:自制,纯度:98.2%,批号:20141117,取萘普替尼原料溶于甲醇-水,置光照(5000±500lx)条件下放置5天,取出,经制备液相色谱收集,浓缩,冷冻干燥即得;

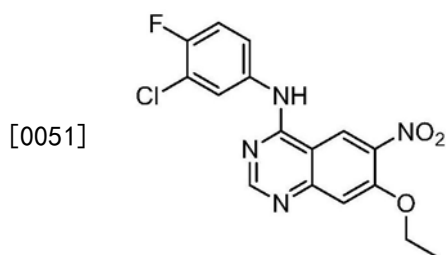
[0047] 起始原料:化学名:N-(3-氯-4-氟苯基)-7-氟-6-硝基-4-喹唑啉胺,批号:BM-

20140410,市售;

[0048] 中间体1:

[0049] 化学名:N-(3-氯-4-氟苯基)-7-乙氧基-6-硝基-4-喹唑啉胺

[0050] 结构式:

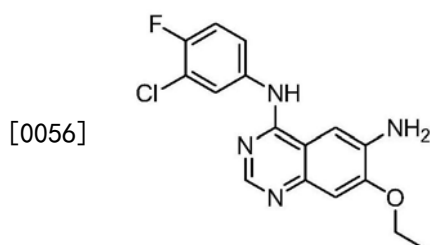


[0052] 来源:自制,纯度:95.0%,批号:20140501,参照公开号为CN 103755688A、名称为《一种阿法替尼化合物的制备方法》中的方法制得;

[0053] 中间体2:

[0054] 化学名:N-(3-氯-4-氟苯基)-7-乙氧基-4,6-喹唑啉二胺

[0055] 结构式:

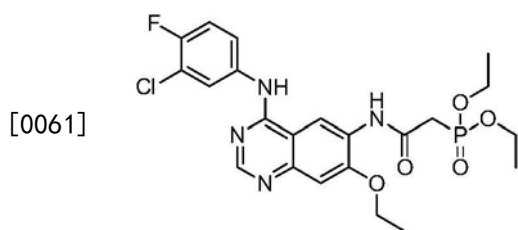


[0057] 来源:自制,纯度:95.4%,批号:20140501,参照公开号为CN 103755688A、名称为《一种阿法替尼化合物的制备方法》中的方法制得;

[0058] 中间体3:

[0059] 化学名:二乙基-[4-(3-氯-4-氟苯基氨基)-7-乙氧基喹唑啉-6-氨基]-2-氧乙基磷酸酯

[0060] 结构式:



[0062] 来源:自制,纯度:97.7%,批号:20140501,参照公开号为CN 103755688A、名称为《一种阿法替尼化合物的制备方法》中的方法制得;

[0063] 萘普替尼原料及粗品:参照专利号为ZL201410822395.3、名称为《萘普替尼对甲苯磺酸盐的 α 晶型及制备方法和含有其的药物组合物》中的方法制得;

[0064] CN105777655A公开了萘普替尼以N-(3-氯-4-氟苯基)-7-氟-6-硝基-4-喹唑啉胺为起始原料,参考专利W02007085638类似的方法来制备,成盐过程参考专利W02012121764的制备方法。

[0065] 萘普替尼片剂及胶囊:参照本公司专利《一种含(E)-N-(4-((3-氯-4-氟苯基)氨

基)-7-乙氧基喹唑啉-6-基)-4-(二甲氨基)丁-2-烯酰胺或其盐的制剂组合物及其杂质控制方法》中的方法制得。

[0066] 萘普替尼片剂及胶囊的制备方法如下：

[0067] 1、制备二甲苯磺酸萘普替尼的胶囊剂

[0068] 表1制备二甲苯磺酸萘普替尼的胶囊剂的原料及比重

[0069]

组分	规格 1	规格 2	规格 3	规格 4
二甲苯磺酸萘普替尼 (以无水物计)	1.78mg (1mg 萘普替尼)	5.33mg (3mg 萘普替尼)	8.88mg (5mg 萘普替尼)	17.76mg (10mg 萘普替尼)
甘露醇	120.78mg	138.12mg	236.12mg	276.24 mg
胶态二氧化硅	1.25mg	1.5mg	2.5mg	3.0
山嵛酸甘油酯	1.25mg	1.5mg	2.5 mg	3.0mg
总重	125mg	150mg	250 mg	300 mg

[0070] 制备方法：根据表1所示的组分和量，将活性成分二甲苯磺酸萘普替尼过60-100目筛处理，然后与甘露醇、胶态二氧化硅、山嵛酸甘油酯过40-60目筛一次并总混，总混完成后，直接置于胶囊自动填充机中，根据内容物重量填装于4号、3号、2号明胶空心胶囊中即可。

[0071] 2、制备二甲苯磺酸萘普替尼的片剂

[0072] 2.1

[0073] 表2制备二甲苯磺酸萘普替尼的片剂的原料及比重

[0074]

组分	规格 1	规格 2	规格 3	规格 4
二甲苯磺酸萘普替尼 (以无水物计)	1.78mg (1mg 萘普替尼)	5.33mg (3mg 萘普替尼)	8.88mg (5mg 萘普替尼)	17.76mg (10mg 萘普替尼)
一水乳糖	31.1mg	37.8mg	44.5mg	89.0 mg

[0075]

甘露醇	62.12mg	75.62mg	89.12 mg	178.24 mg
交联聚维酮	3.0mg	3.75 mg	4.5 mg	9 mg
胶态二氧化硅	1.0 mg	1.25 mg	1.5 mg	3 mg
山嵛酸甘油酯	1.0 mg	1.25 mg	1.5 mg	3 mg
欧巴代包衣粉	4 mg	5 mg	6 mg	12 mg
总重	104 mg	130 mg	156.0mg	312.0

[0076] 制备方法：根据表2所示的组分和量，将活性成分二甲苯磺酸萘普替尼过60-100目筛处理，其他辅料过40-60目筛，再一起进行总混后进行压片，按照规格1~4分别采用6mm、

6mm、7mm和9mm圆形浅凹冲模压成素片。对素片喷涂包衣材料(HPMC、三乙酸甘油酯或者二氧化钛),包衣时控制片表面受热温度在40-55℃之间。

[0077] 2.2

[0078] 表3制备二甲苯磺酸萘普替尼的片剂的原料及比重

[0079]

组分	规格 1
二甲苯磺酸萘普替尼(以无水物计)	8.88mg (5mg 萘普替尼)
一水乳糖	44.5mg
微晶纤维素	89.12 mg
交联聚维酮	4.5 mg
胶态二氧化硅	1.5 mg
硬酯酸镁	1.5 mg
欧巴代包衣粉	6 mg
总重	156.0mg

[0080] 制备方法:与2.1相同。

[0081] 2.3

[0082] 表4制备二甲苯磺酸萘普替尼的片剂的原料及比重

[0083]

组分	规格 1
二甲苯磺酸萘普替尼(以无水物计)	8.88mg (5mg 萘普替尼)
一水乳糖	44.5mg

[0084]

预胶化淀粉	89.12 mg
交联聚维酮	4.5 mg
胶态二氧化硅	1.5 mg
硬酯酸镁	1.5 mg
欧巴代包衣粉	6 mg
总重	156.0mg

[0085] 制备方法:与2.1相同。

[0086] 2.4

[0087] 表5制备二甲苯磺酸萘普替尼的片剂的原料及比重

[0088]

组分	规格 1
二甲苯磺酸萘普替尼（以无水物计）	8.88mg (5mg 萘普替尼)
一水乳糖	44.5mg
微晶纤维素	89.12 mg
羧甲基纤维素钠	4.5 mg
胶态二氧化硅	1.5 mg
硬酯酸镁	1.5 mg
欧巴代包衣粉	6 mg
总重	156.0mg

[0089] 制备方法：与2.1相同。

[0090] 2.5制备含有稳定剂的二甲苯磺酸萘普替尼的片剂

[0091] 表6制备二甲苯磺酸萘普替尼的片剂的原料及比重

[0092]

组分	规格 1	规格 2	规格 3	规格 4
二甲苯磺酸萘普替尼 (以无水物计)	1.78mg (1mg 萘普替尼)	5.33mg (3mg 萘普替尼)	8.88mg (5mg 萘普替尼)	17.76mg (10mg 萘普替尼)
一水乳糖	22.1mg	26.6mg	39.5mg	79.1 mg
甘露醇	44.12mg	53.07mg	79.12mg	158.14 mg
交联聚维酮	2.4mg	3.0 mg	4.5 mg	9 mg
胶态二氧化硅	0.8 mg	1.0 mg	1.5 mg	3 mg
山嵛酸甘油酯	0.8 mg	1.0 mg	1.5 mg	3 mg

[0093]

酒石酸	8	10	15	30
欧巴代包衣粉	3.2mg	4 mg	6 mg	12 mg
总重	83.2mg	104 mg	156.0mg	312.0

[0094] 制备方法：将活性成分二甲苯磺酸萘普替尼过60-100目筛处理，酒石酸粉碎后过80-120目筛处理，将筛分后的二甲苯磺酸萘普替尼、酒石酸和胶态二氧化硅进行预混合，再与其他辅料总混，然后进行压片，按照规格1~4分别分别采用6mm、6mm、7mm和9mm圆形浅凹冲模压成素片。对素片喷涂包衣材料（HPMC、三乙酸甘油酯或者二氧化钛），包衣时控制片表面受热温度在40-55℃之间。

[0095] 2.6制备含有稳定剂的二甲苯磺酸萘普替尼的片剂

[0096] 表7制备二甲苯磺酸萘普替尼的片剂的原料及比重

[0097]

组分	规格 1	规格 2	规格 3	规格 4
二甲苯磺酸萘普替尼 (以无水物计)	1.78mg (1mg 萘普替尼)	5.33mg (3mg 萘普替尼)	8.88mg (5mg 萘普替尼)	17.76mg (10mg 萘普替尼)
一水乳糖	22.1mg	26.6mg	39.5mg	79.1 mg
甘露醇	44.12mg	53.07mg	79.12mg	158.14 mg
交联聚维酮	2.4mg	3.0 mg	4.5 mg	9 mg
胶态二氧化硅	0.8 mg	1.0 mg	1.5 mg	3 mg
山嵛酸甘油酯	0.8 mg	1.0 mg	1.5 mg	3 mg
苹果酸	8	10	15	30
欧巴代包衣粉	3.2mg	4 mg	6 mg	12 mg
总重	83.2mg	104 mg	156.0mg	312.0

[0098] 制备方法:与2.5相同。

[0099] 【实施例1】高效液相色谱梯度法的条件筛选

[0100] 1色谱条件与系统适用性试验

[0101] 1.1流动相的选择

[0102] 以萘普替尼与杂质B(光照产物)的分离度,主峰理论板数 and 对称因子作为评价指标,照下表8进行梯度洗脱,筛选最佳磷酸盐缓冲液浓度,最佳流动相的pH值,最终确定磷酸二氢钠缓冲液最佳浓度为0.05mol/L,流动相的最佳pH值为7.5左右。磷酸盐缓冲液浓度和pH值选择结果见下表9~10。

[0103] 表8.流动相与洗脱时间

	时间 (分钟)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
	0~10	75→55	25~45
[0104]	10~20	55	45
	20~30	55→0	45→100
	30~40	0	100
	40~45	75	25

[0105] 表9.磷酸盐浓度选择结果

[0106]

磷酸盐浓度 (mol/L)	分离度	理论板数	对称度
0.01	0.95	22478	0.92
0.02	1.24	24592	0.95
0.04	2.15	25418	0.95
0.05	2.30	25724	0.96
0.06	2.27	25716	0.95
0.08	2.26	25312	0.96
0.10	2.24	25418	0.98

[0107] 表10.pH值选择结果

[0108]

流动相 (pH)	分离度	理论板数	对称度
6.8	1.34	23417	0.96
7.0	1.51	24158	0.95
7.2	1.78	25169	0.98
7.4	2.00	24724	0.95
7.5	2.03	25462	0.96
7.6	2.07	24692	0.94
7.8	1.80	23745	0.97
7.9	1.49	24214	0.95
8.0	1.47	23127	0.96

[0109] 1.2色谱柱的选择

[0110] 以萘普替尼与杂质B(光照产物)的分离度,主峰理论板数和对称因子作为评价指标,尝试用不同品牌、不同型号的色谱柱,最后确定采用Waters XBridge C₁₈柱(100×4.6mm,3.5μm),色谱柱选择结果见表11。

[0111] 表11.色谱柱选择结果

[0112]

色谱柱	分离度	理论板数	对称度
Xbridge C ₁₈ 柱 (100×4.6mm, 3.5μm)	2.51	25362	1.02
Xbridge C ₈ 柱 (100×4.6mm, 3.5μm)	1.45	17241	1.05
Xbridge 苯基柱 (100×4.6mm, 5μm)	1.24	15124	1.04
SymmetryC ₁₈ 柱 (150×4.6mm, 5μm)	1.32	13540	1.25
Zorbax SB- C ₁₈ 柱 (150×4.6mm, 5μm)	1.00	11458	1.34

[0113] 1.3柱温的选择

[0114] 以萘普替尼与杂质B(光照产物)的分离度,主峰理论板数和对称因子作为评价指标,选择柱温为25℃、28℃、30℃、32℃和35℃进行考察,最后确定柱温为30℃,柱温选择结果见表12。

[0115] 表12.柱温选择结果

	柱温(℃)	分离度	理论板数	对称度
	25	1.85	22452	1.03
	28	2.07	24575	1.04
[0116]	30	2.54	25546	1.02
	32	2.41	25870	1.02
	35	2.20	23435	1.03

[0117] 1.4仪器及流速

[0118] Agilent 1260系列,DAD检测器;流速为1.0ml/min。

[0119] 在上述色谱条件下,萘普替尼主峰保留时间适中,理论板数高,峰形对称,主峰与相邻杂峰的分离度符合要求。

[0120] 1.5灵敏度的测定

[0121] 取适量萘普替尼对照品,用流动相A配制成每1ml含0.5mg萘普替尼的溶液,作为供试品溶液。再分别用流动相A稀释成一系列不同浓度的溶液,分别进样10μl,使之产生主峰为基线噪音三倍的信号。经试验,最小检出量为0.6ng, (S/N≥3),若以有关物质检查时的浓度0.5mg/ml计算,其检出限度为0.01%。

[0122] 1.6溶液稳定性

[0123] 取同一份供试品溶液,分别于0、0.5、1、2、4、6、8、10、12小时分别进样测定,其主峰面积及有关物质测定结果在12小时内基本稳定。

[0124] 以上实验结果表明,此方法简单灵敏,重现性好,可对样品中萘普替尼的质量进行较好的控制。

[0125] 色谱条件的确定:经上述选择试验,确定的色谱条件为:以十八烷基硅烷键合硅胶(100×4.6mm,3.5μm)为填充剂,以磷酸盐缓冲液-甲醇(82:18)为流动相A,以磷酸盐缓冲

液-甲醇(40:60)为流动相B,梯度洗脱,柱温为30℃,流速为1.0ml/min,检测波长为247nm;其中所述的梯度洗脱中,流动相A比例的变化范围于0~10分钟,线性梯度洗脱,流动相A的比例从75%变化为55%,流动相B的比例从25%变化为45%;于10~20分钟,等度洗脱,流动相A的比例保持55%不变,流动相B的比例保持45%不变;于20~30分钟,线性梯度洗脱,流动相A的比例从55%变化为0%,流动相B的比例从45%变化为100%;于30~40分钟,等度洗脱,流动相A的比例保持0%不变,流动相B的比例保持100%不变,于40~45分钟,流动相A和B回到初始比例,色谱柱重新平衡。

[0126] 1.7系统适用性试验:

[0127] 分别取起始原料、中间体1、中间体2、中间体3、杂质A、光照产物(杂质B)和萘普替尼对照品加流动相A制成每1ml中约含0.0025~0.5mg的混合溶液;精密量取10μl所述混合溶液注入液相色谱仪,记录色谱图,校定检测系统至萘普替尼主峰与相邻杂质B的峰的分度应大于1.5,理论板数和拖尾因子按萘普替尼主峰计算应不低于10000和不大于1.5;图谱如附图1所示,萘普替尼与光照产物的分度为2.84,萘普替尼主峰的理论板数和拖尾因子分别为26395和1.00,分度、理论塔板数、拖尾因子满足上述要求,因此,确定的色谱条件可用于萘普替尼原料、萘普替尼粗品、萘普替尼片剂、萘普替尼胶囊有关物质的测定。

[0128] 2供试品溶液的制备

[0129] 取萘普替尼待测样品,加流动相A制成浓度为0.5mg/ml的溶液,作为供试品溶液;

[0130] 3对照品溶液的制备

[0131] 取萘普替尼对照品,加流动相A制成浓度为0.005mg/ml的溶液,作为对照品溶液。

[0132] 4测定法

[0133] 精密量取对照品溶液10μl注入液相色谱仪,调节检测灵敏度,使主成分色谱峰高约为满量程的10~20%,再精密量取供试品溶液10μl注入液相色谱仪,记录色谱图至萘普替尼主峰保留时间的3~4倍,供试品溶液色谱图中如有杂质峰,量取各杂质峰面积的和,按外标法以峰面积计算,各杂质峰面积之和不得过1.0%。

[0134] 【实施例2】萘普替尼原料有关物质的测定

[0135] 取萘普替尼原料适量,精密称定,加流动相A制成浓度0.5mg/ml的溶液,作为供试品溶液。另取萘普替尼对照品,加流动相A稀释并制成浓度为0.005mg/ml的溶液,作为对照品溶液。在下列选定的色谱条件下:Waters XbridgeC₁₈柱(100×4.6mm,3.5μm),以磷酸盐缓冲液-甲醇(82:18)为流动相A,以磷酸盐缓冲液-甲醇(40:60)为流动相B,照下表13进行梯度洗脱,柱温为30℃,流速为1.0ml/min,检测波长为247nm;理论板数按萘普替尼主峰计算应不低于10000,主峰与相邻杂质峰的分度应大于1.5。精密量取对照品溶液10μl注入液相色谱仪,调节检测灵敏度,使主成分色谱峰高约为满量程的10~20%,再精密量取供试品溶液10μl注入液相色谱仪,记录色谱图至萘普替尼主峰保留时间的3~4倍,供试品溶液色谱图中如有杂质峰,计算各杂质峰面积的和,按外标法计算不得过1.0%)。分别对三个批次(20141001、20141101、20141201)的萘普替尼原料进行测定,其中,萘普替尼原料有关物质的测定结果如下表15所示,图谱如附图2所示。

[0136] 表13.流动相与洗脱时间

	时间 (分钟)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
[0137]	0~10	75→55	25~45
	10~20	55	45
	20~30	55→0	45→100
	30~40	0	100
	40~45	75	25

[0138] 表14. 萘普替尼原料有关物质测定结果

[0139]

	批号	20141001	20141101	20141201
[0140]	杂质 A (%)	0.02	0.03	0.01
	杂质 B (%)	0.01	0.01	0.02
	中间体 2 (%)	0.01	0.01	0.02
	其它杂质 (%)	0.02	0.02	0.02
	总杂质 (%)	0.06	0.07	0.07

[0141] 【实施例3】萘普替尼粗品有关物质的测定

[0142] 取萘普替尼粗品适量,精密称定,加流动相A制成浓度0.5mg/ml的溶液,作为供试品溶液。另取萘普替尼对照品,加流动相A稀释并制成浓度为0.005mg/ml的溶液,作为对照品溶液。在下列选定的色谱条件下:Waters Xbridge C₁₈柱(100×4.6mm,3.5μm),以磷酸盐缓冲液-甲醇(82:18)为流动相A,以磷酸盐缓冲液-甲醇(40:60)为流动相B,照下表15进行梯度洗脱,柱温为30℃,流速为1.0ml/min,检测波长为247nm;理论板数按萘普替尼主峰计算应不低于10000,主峰与相邻杂质峰的分离度应大于1.5。精密量取对照品溶液10μl注入液相色谱仪,调节检测灵敏度,使主成分色谱峰高约为满量程的10~20%,再精密量取供试品溶液10μl注入液相色谱仪,记录色谱图至萘普替尼主峰保留时间的3~4倍,供试品溶液色谱图中如有杂质峰,计算各杂质峰面积的和,按外标法计算不得过1.0%)。分别对三个批次(20141001、20141101、20141201)的萘普替尼粗品进行测定,其中,萘普替尼粗品有关物质的测定结果如下表16所示。图谱如附图3所示。

[0143] 表15. 流动相与洗脱时间

	时间(分钟)	流动相 A (%)	流动相 B(%)
	0~10	75→55	25~45
[0144]	10~20	55	45
	20~30	55→0	45→100
	30~40	0	100
	40~45	75	25

[0145] 表16. 萘普替尼粗品有关物质测定结果

	批号	20141001	20141101	20141201
[0146]	杂质 A (%)	0.01	0.14	0.02
	杂质 B (%)	0.04	0.05	0.03
	中间体 2 (%)	0.01	0.01	0.00
[0147]	其它杂质(%)	0.82	0.21	0.07
	总杂质 (%)	0.88	0.41	0.13

[0148] 【实施例4】萘普替尼片剂有关物质的测定

[0149] 取萘普替尼片细粉适量,精密称取适量(约相当于萘普替尼25mg),加流动相A制成浓度0.5mg/ml的溶液,作为供试品溶液。另取萘普替尼对照品,加流动相A稀释并制成浓度为0.005mg/ml的溶液,作为对照品溶液。在下列选定的色谱条件下:Waters Xbridge C₁₈柱(100×4.6mm,3.5μm),以磷酸盐缓冲液-甲醇(82:18)为流动相A,以磷酸盐缓冲液-甲醇(40:60)为流动相B,照下表17进行梯度洗脱,柱温为30℃,流速为1.0ml/min,检测波长为247nm;理论板数按萘普替尼主峰计算应不低于10000,主峰与相邻杂质峰的分离度应大于1.5。精密量取对照品溶液10μl注入液相色谱仪,调节检测灵敏度,使主成分色谱峰高约为满量程的10~20%,再精密量取供试品溶液10μl注入液相色谱仪,记录色谱图至萘普替尼主峰保留时间的3~4倍,供试品溶液色谱图中如有杂质峰,量取各杂质峰面积的和,按外标法计算不得过1.0%。分别对三个批次(20150202、20150203、20150204)的萘普替尼片剂进行测定,其中,萘普替尼片有关物质的测定结果如下表18所示。图谱如附图4所示。

[0150] 表17. 流动相与洗脱时间

	时间 (分钟)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
[0151]	0~10	75→55	25~45
	10~20	55	45
	20~30	55→0	45→100
	30~40	0	100
	40~45	75	25

[0152] 表18萘普替尼片有关物质测定结果

	批号	20150202	20150203	20150204
[0153]	杂质 A (%)	0.01	0.02	0.07
	杂质 B (%)	0.01	0.02	0.02
	中间体 2 (%)	0.02	0.01	0.02
	其它杂质 (%)	0.01	0.01	0.01
[0154]	总杂质 (%)	0.05	0.06	0.12

[0155] 【实施例5】萘普替尼胶囊有关物质的测定

[0156] 取萘普替尼胶囊粉末混匀,精密称取适量(约相当于萘普替尼25mg),加流动相A制成浓度0.5mg/ml的溶液,作为供试品溶液。另取萘普替尼对照品,加流动相A稀释并制成浓度为0.005mg/ml的溶液,作为对照品溶液。在下列选定的色谱条件下:Waters Xbridge C₁₈柱(100×4.6mm,3.5μm),以磷酸盐缓冲液-甲醇(82:18)为流动相A,以磷酸盐缓冲液-甲醇(40:60)为流动相B,照下表19进行梯度洗脱,柱温为30℃,流速为1.0ml/min,检测波长为247nm;理论板数按萘普替尼主峰计算应不低于10000,主峰与相邻杂质峰的分离度应大于1.5。精密量取对照品溶液10μl注入液相色谱仪,调节检测灵敏度,使主成分色谱峰高约为满量程的10~20%,再精密量取供试品溶液10μl注入液相色谱仪,记录色谱图至萘普替尼主峰保留时间的3~4倍,供试品溶液色谱图中如有杂质峰,量取各杂质峰面积的和,按外标法计算不得过1.0%。分别对三个批次(20150301、20150302、20150303)的萘普替尼胶囊进行测定,其中,萘普替尼胶囊有关物质的测定结果如下表20所示。图谱如附图5所示。

[0157] 表19.流动相与洗脱时间

[0158]	时间（分钟）	流动相 A(%)	流动相 B(%)
	0~10	75→55	25~45
	10~20	55	45
	20~30	55→0	45→100
	30~40	0	100
	40~45	75	25

[0159] 表20. 萘普替尼胶囊有关物质测定结果

[0160]	批号	20150301	20150302	20150303
	杂质 A (%)	0.02	0.02	0.01
	杂质 B (%)	0.01	0.02	0.03
	中间体 2 (%)	0.02	0.01	0.01
	其它杂质(%)	0.02	0.01	0.03
	总杂质 (%)	0.07	0.06	0.08

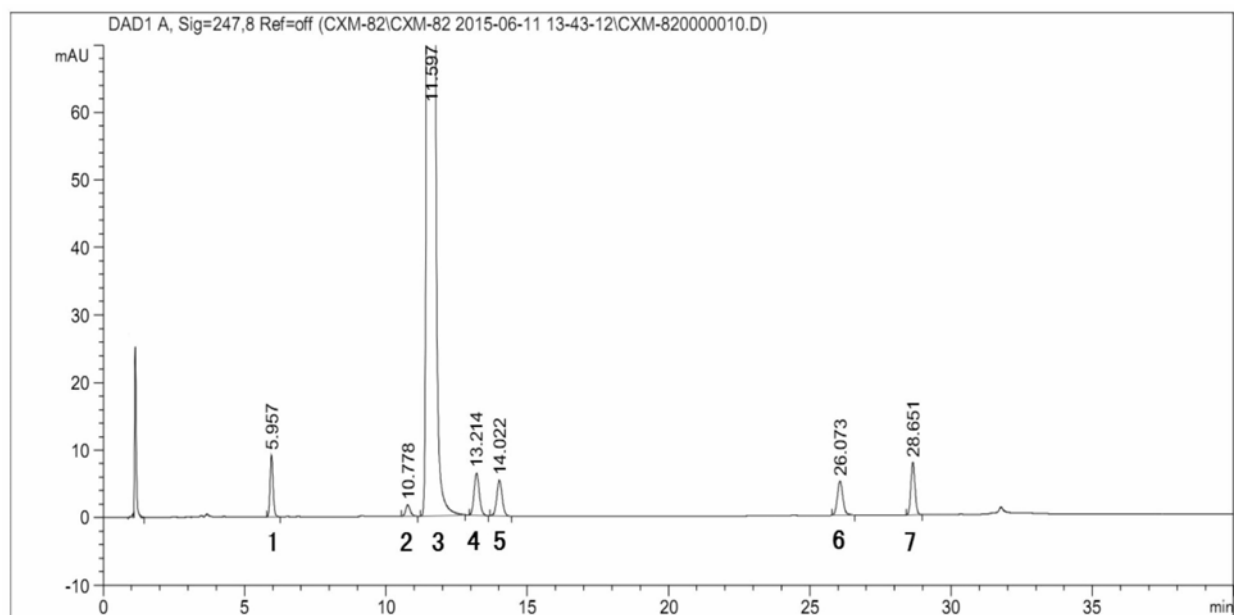


图1

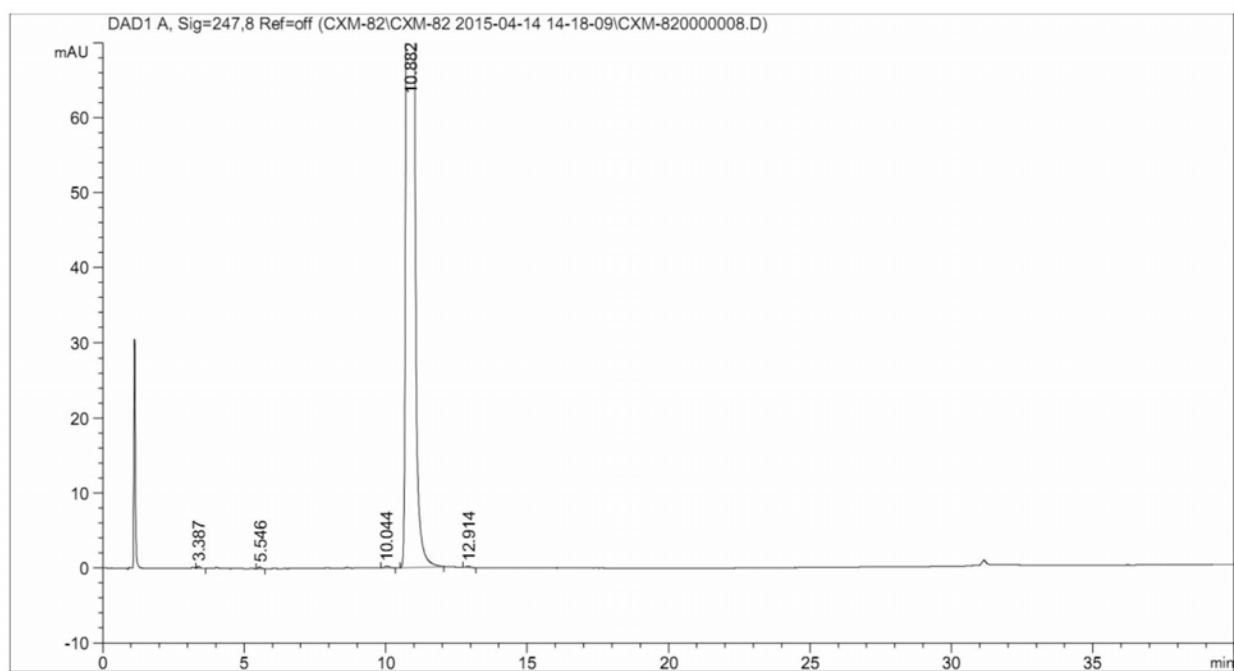


图2

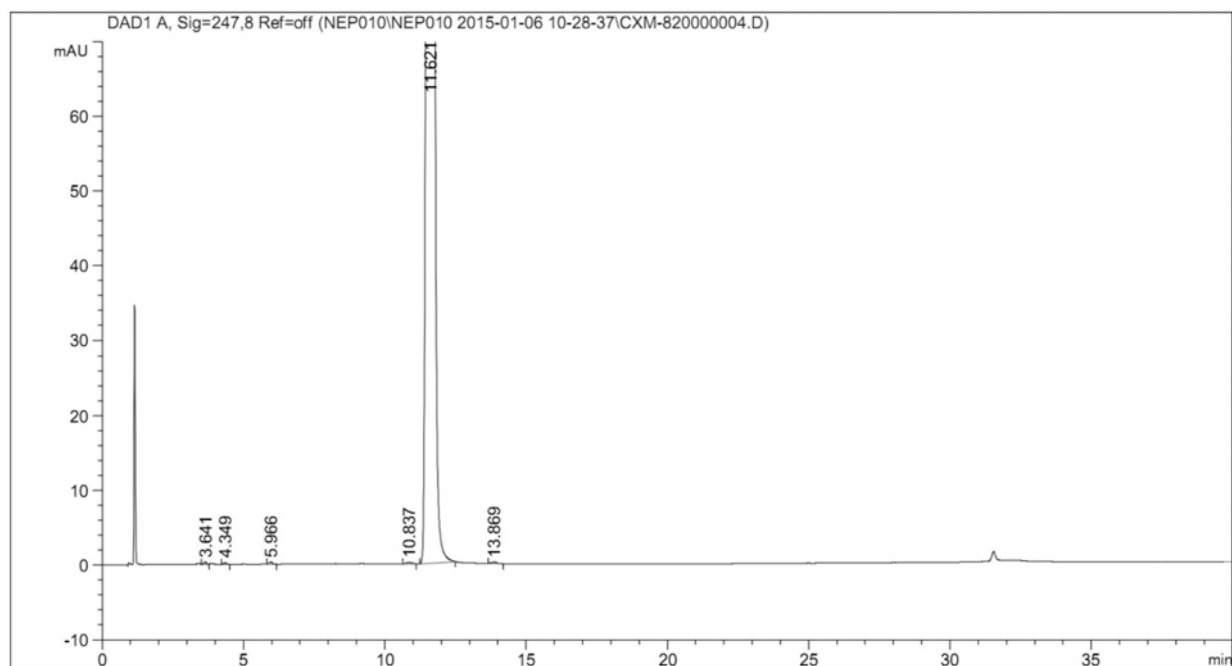


图3

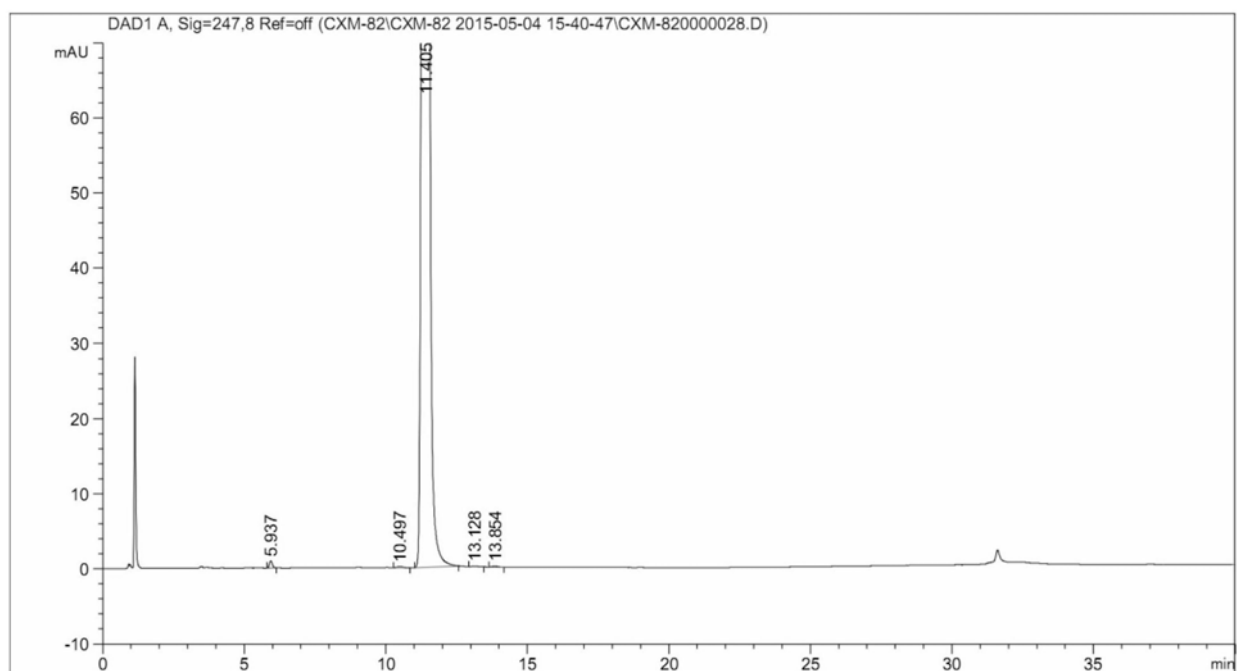


图4

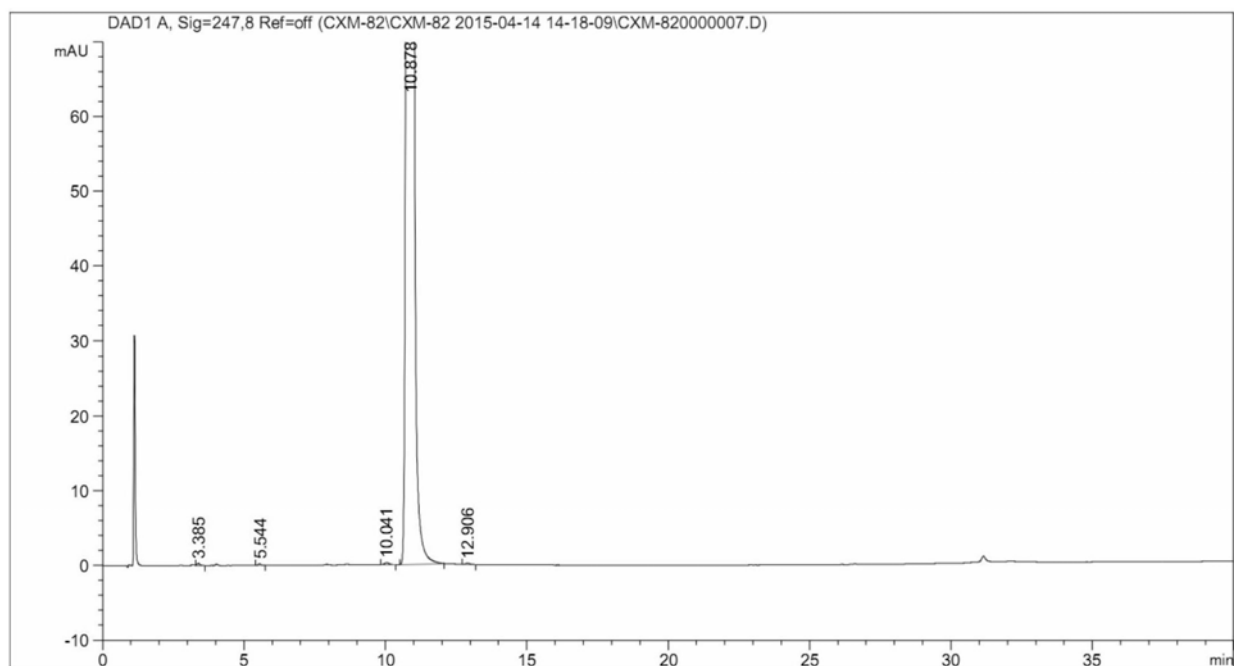


图5