



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106908524 B

(45) 授权公告日 2021.05.04

(21) 申请号 201510980407.X

审查员 钟宇静

(22) 申请日 2015.12.23

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106908524 A

(43) 申请公布日 2017.06.30

(73) 专利权人 重庆华邦胜凯制药有限公司

地址 401520 重庆市合川区南津街街道办
事处荣军路666号

(72) 发明人 周春燕 杨静

(74) 专利代理机构 北京元本知识产权代理事务
所(普通合伙) 11308

代理人 黎昌莉

(51) Int.Cl.

G01N 30/02 (2006.01)

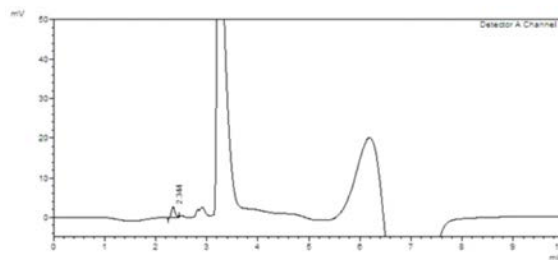
权利要求书1页 说明书5页 附图5页

(54) 发明名称

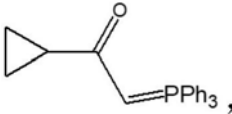
卡泊三醇中间体L及其潜在基因毒性杂质的
分离与测定方法

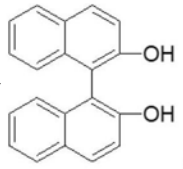
(57) 摘要

本发明属于分析化学领域,具体涉及一种卡泊三醇中间体L及其潜在基因毒性杂质的分离与测定方法,所述的方法是采用以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱,进样,然后采用流动相进行洗脱分离,具体为取中间体L及潜在基因毒性杂质对照品及待测品分别制备成对照品溶液和供试品溶液,进行高效液相色谱分析,记录色谱图,比较供试品溶液与对照品溶液中对峰时间的杂质的峰面积,实现中间体L及潜在基因毒性杂质的有效分离与检测,操作简单,准确度高。



1. 高效液相色谱法分离卡泊三醇中间体L中杂质的方法,其特征在于,所述的方法是采用以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱,进样,然后采用流动相进行洗脱分离,所述

杂质为三苯基氧磷,和X,和S-联萘酚;所述X的结构式为  所述S-联萘酚的

结构式为 , 所述流动相为乙腈与0.5%冰乙酸水溶液的混合液,所述流动相中

乙腈与0.5%冰乙酸水溶液的体积比为40-60:40-60。

2. 根据权利要求1所述的高效液相色谱法分离卡泊三醇中间体L中杂质的方法,其特征在于,具体步骤如下:取中间体L及杂质对照品加稀释剂溶解制备成已知浓度的对照品溶液,取供试品加稀释剂溶解制备成供试品溶液,分别取对照品溶液及供试品溶液进样,进行高效液相色谱分析,记录色谱图,所述稀释剂为流动相或流动相中的任一种有机溶剂。

3. 根据权利要求2所述的高效液相色谱法分离卡泊三醇中间体L中杂质的方法,其特征在于,所述流动相流速为0.5-1.5ml/min;所述高效液相色谱分析采用紫外检测器进行检测,检测波长为 $220 \pm 5\text{nm}$ 。

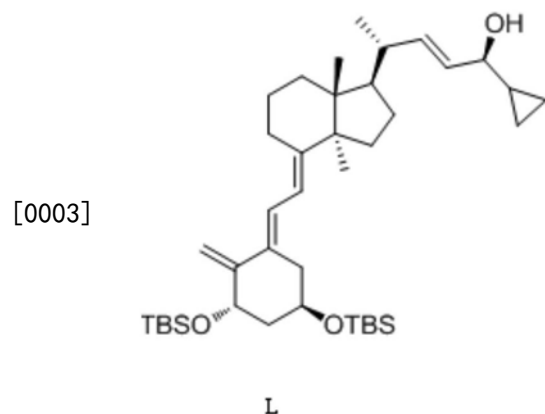
卡泊三醇中间体L及其潜在基因毒性杂质的分离与测定方法

技术领域

[0001] 本发明属于分析化学领域,具体涉及一种卡泊三醇中间体L及其潜在基因毒性杂质的分离与测定方法。

背景技术

[0002] 卡泊三醇化学名称为9,10-开环胆甾-24-环丙基-5,7,10(19),22-四烯-1,3,24三醇,其分子式为 $C_{27}H_{40}O_3$,分子量:412.61。卡泊三醇主要用于寻常型银屑病的局部治疗。化合物L是合成卡泊三醇的一个重要的中间体,其结构式如下:

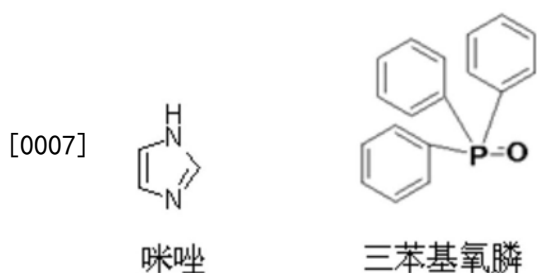


[0004] 基因毒性杂质是指能直接或间接损伤细胞DNA,产生致突变和致癌作用的物质。在生产过程中,可能产生基因毒性杂质的环节包括新药合成、原料纯化、储存运输(与包装物接触)等,故在新药合成阶段应该指明涉及到的所有具有基因毒性或有致癌性的化学物质,如所用试剂、中间体、副产品等。更进一步,在药物活性物质中没有出现的基因毒性反应物和有基因毒性结构的物质,都应该被考虑。具有毒性作用的基团一般具有亲电试剂的性质,这些基团在生理条件下同体内核酸、蛋白质或其他重要成分中的亲核中心发生取代反应,使这些成分发生不可逆的损伤,表现为毒性、致突变或致癌等作用。表现为毒性、致突变或致癌等作用的基团举例如下:

[0005]

a、惶酰烷酯	b、芳香硝基	c、芳香偶氮
d、芳香氮氧-化物	e、芳香伯胺或者仲胺	f、烷基肼
g、酯醛基	h、N-甲醇基	i、卤代烯烃
j、氮芥基	k、氯胺	l、 β -内酯
m、乙烯亚胺	n、卤代烷	o、乌拉坦
p、N-亚硝基胺	q、芳胺或酚	r、环氧基

[0006] 在中间体L的合成中,使用到的原料如咪唑、三苯基氧磷等,这些原料残留杂质的结构式如下:



[0008] 咪唑和三苯基氧磷因含有某些表现为毒性、致突变或致癌等作用的基团因而警示其可能具有基因毒性,卡泊三醇中间体L在合成过程中残留的上述杂质除去不完全最终会影响药物的纯度和质量。因此,为了控制中间体L的质量,需要对中间体L及其潜在基因毒性杂质进行分离和测定。但是,目前还没有分离及测定中间体L及其潜在基因毒性杂质的HPLC方法。

发明内容

[0009] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种高效液相色谱法分离测定卡泊三醇中间体L及其潜在基因毒性杂质的方法,利用高效液相色谱法,能够实现中间体L及杂质的有效分离与测定。

[0010] 为实现上述目的,本发明的技术方案为:

[0011] 高效液相色谱法分离卡泊三醇中间体L及潜在基因毒性杂质的方法,所述的方法是采用以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂的色谱柱,进样,然后采用流动相进行洗脱分离。

[0012] 本发明所述的方法适用于卡泊三醇中间体L及潜在基因毒性杂质的分离,可用于单独分离某一种杂质,也可同时分离卡泊三醇中间体L及杂质。

[0013] 本发明所述的高效液相色谱法分离卡泊三醇中间体L及潜在基因毒性杂质的方法,所述的潜在基因毒性杂质为咪唑。

[0014] 进一步,所述流动相为乙腈与0.3%二乙胺水溶液的混合液。

[0015] 进一步,所述流动相中乙腈与0.3%二乙胺水溶液的体积比为4-6:94-96。进一步,所述0.3%二乙胺水溶液采用磷酸调节pH为 3.1 ± 0.2 。

[0016] 本发明所述的高效液相色谱法分离卡泊三醇中间体L及潜在基因毒性杂质的方法,所述潜在基因毒性杂质为三苯基氧磷。

[0017] 进一步,所述流动相为乙腈与0.5%冰乙酸水溶液的混合液。

[0018] 进一步,所述流动相中乙腈与0.5%冰乙酸水溶液的体积比为40-60:40-60。

[0019] 本发明所述的高效液相色谱法分离卡泊三醇中间体L及潜在基因毒性杂质的方法,具体步骤如下:取中间体L及潜在基因毒性杂质对照品加稀释剂溶解制备成已知浓度的对照品溶液,取供试品加稀释剂溶解制备成供试品溶液,分别取对照品溶液及供试品溶液进样,进行高效液相色谱分析,记录色谱图,比较供试品溶液与对照品溶液中对应出峰时间的杂质的峰面积,计算供试品中所含卡泊三醇中间体L及潜在基因毒性杂质的含量;所述稀释剂为流动相或流动相中的任一种有机溶剂。

[0020] 进一步,进行高效液相色谱分析,所述流动相流速为0.5-1.5ml/min,优选1ml/

min;所述高效液相色谱分析采用紫外检测器进行检测,检测波长为 $220\pm 5\text{nm}$ 。

[0021] 进一步,进行高效液相色谱分析,所述色谱柱的规格为 $4.6\times 250\text{mm}, 5\mu\text{m}$ 。

[0022] 本发明的有益效果在于:本发明的高效液相色谱法分离卡泊三醇中间体L及潜在基因毒性杂质的方法,该方法能够实现卡泊三醇中间体L与杂质的有效分离,实现了杂质有效控制,从根本上确定了产品质量,具有简便,快速,准确度高等优点;同时采用高效液相色谱法操作简单,专属性强,灵敏度高。

附图说明

[0023] 图1为实施例1中稀释剂的HPLC图,图中的色谱峰为稀释剂的色谱峰。

[0024] 图2为实施例1中咪唑对照品的HPLC图,图中的色谱峰为咪唑对照品的色谱峰,保留时间在2.3min左右。

[0025] 图3为实施例1中供试品的HPLC图,图中的色谱峰为供试品的色谱峰,在此系统供试品未出峰,与稀释剂的色谱峰一致。

[0026] 图4为实施例1中混合液的HPLC图,图中的色谱峰为咪唑的色谱峰,保留时间在2.3min左右。

[0027] 图5为实施例2中稀释剂的HPLC图,图中的色谱峰为稀释剂的色谱峰。

[0028] 图6为实施例2中X定位溶液的HPLC图,图中的色谱峰为X的色谱峰,保留时间在1.9min左右。

[0029] 图7为实施例2中三苯基氧磷对照品的HPLC图,图中的色谱峰为三苯基氧磷的色谱峰,保留时间在8.6min左右。

[0030] 图8为实施例2中S-联萘酚对照品的HPLC图,图中的色谱峰为S-联萘酚的色谱峰,保留时间在20.3min左右。

[0031] 图9为实施例2中供试品的HPLC图,图中的色谱峰为供试品的色谱峰,在此系统供试品未出峰,与稀释剂的色谱峰一致。

[0032] 图10为实施例2中混合液的HPLC图,图中的色谱峰依次为X、三苯基氧磷、S-联萘酚的色谱峰,保留时间依次为:1.9min、8.7min、20.4min。

具体实施方式

[0033] 所举实施例是为了更好地对本发明的内容进行说明,但并不是本发明的内容仅限于所举实施例。所以熟悉本领域的技术人员根据上述发明内容对实施方案进行非本质的改进和调整,仍属于本发明的保护范围。

[0034] 实施例中所涉及的对照品来源:

[0035] L:重庆华邦制药有限公司,批号:Ca1-L-140903,99.0%;

[0036] 咪唑:成都科龙化工试剂厂,批号:2014061601 99.3%;

[0037] 三苯基氧磷:阿拉丁试剂,批号:F1410025 98%;

[0038] 实施例1

[0039] 本实施例中采用的仪器及色谱条件如下:

[0040] 仪器:高效液相色谱仪;

[0041] 色谱柱:Agilent ZORBAX SB-C18 ($4.6\times 250\text{mm}, 5\mu\text{m}$);

[0042] 流动相:乙腈:0.3%二乙胺水溶液(磷酸调pH=3.1)=5:95;

[0043] 波长:220nm;

[0044] 柱温:30℃;

[0045] 流速:1.0ml/min;

[0046] 进样体积:10μl;

[0047] 稀释剂:乙腈。

[0048] (1) 咪唑对照品溶液:称取咪唑10.05mg,置100ml量瓶中,加稀释剂溶解并稀释至刻度,摇匀,得咪唑储备液,移取该溶液1ml,置100ml量瓶中,加稀释剂稀释至刻度,摇匀,即得。

[0049] (2) 供试品溶液:称取待测品L 10.25mg,置10ml量瓶中,加稀释剂溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

[0050] (3) 混合溶液:称取中间体L对照品10.29mg,移取咪唑储备液溶液0.1ml,置同一10ml量瓶中,加稀释剂稀释至刻度,摇匀,即得。

[0051] (4) 测定方法:分别取稀释剂、供试品溶液、咪唑对照品溶液和混合溶液各10μl进样,按上述色谱条件进行高效液相色谱分析,记录色谱图,结果见图1-4,比较供试品溶液与对照品溶液中咪唑的峰面积,可以看出,在该条件下L不出峰,与稀释剂色谱峰一致,且不影响咪唑的测定,咪唑的保留时间在2.3min,待测供试品L均未检出杂质咪唑。

[0052] 实施例2

[0053] 本实施例中采用的仪器及色谱条件如下:

[0054] 仪器:SHIMADZU LC-2010AHT;

[0055] 色谱柱:VP-ODS C18 (4.6×250mm,5μm);

[0056] 流动相:乙腈:0.5%冰乙酸=48:52;

[0057] 波长:225nm;

[0058] 柱温:30℃;

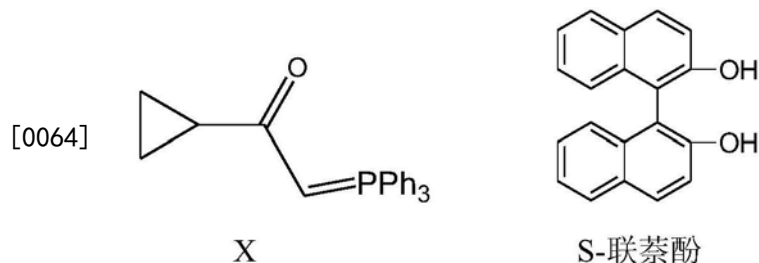
[0059] 流速:1.0ml/min;

[0060] 进样体积:20μl;

[0061] 稀释剂:乙腈。

[0062] 本实施例中所分离的杂质除了三苯基氧磷外,可能还包括X与S-联萘酚。

[0063] 杂质X与S-联萘酚的结构式如下:



[0065] (1) 三苯基氧磷对照品溶液:称取杂质三苯基氧磷10.23mg,置100ml量瓶中,加稀释剂溶解并稀释至刻度,摇匀,得三苯基氧磷储备液,移取该溶液1.0ml至100ml量瓶中,加稀释剂稀释至刻度,摇匀,即得。

[0066] (2) X定位溶液:称取杂质X 10.12mg,置100ml量瓶中,加稀释剂溶解并稀释至刻

度,摇匀,得X储备液,移取该溶液2.5ml至100ml量瓶中,加稀释剂稀释至刻度,摇匀,即得。

[0067] (3) S-联萘酚定位溶液:称取杂质S-联萘酚10.35mg,置100ml量瓶中,加稀释剂溶解并稀释至刻度,摇匀,得S-联萘酚储备液,移取该溶液2.5ml至100ml量瓶中,加稀释剂稀释至刻度,摇匀,即得。

[0068] (4) 供试品溶液:称取待测供试品L10.26mg,置10ml量瓶中,加稀释剂溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

[0069] (5) 混合溶液:称取中间体L的对照品10.21mg,分别移取三苯基氧磷、X、S-联萘酚储备液,各0.5ml,置同一10ml量瓶中,加稀释剂稀释至刻度,摇匀,即得。

[0070] (6) 测定方法:分别取稀释剂、三苯基氧磷对照品溶液、供试品溶液X定位溶液、S-联萘酚定位溶液及混合溶液20 μ l进样,按上述色谱条件进行高效液相色谱分析,记录色谱图,比较供试品溶液与对照品溶液中三苯基氧磷的峰面积,结果见图5-10,可以看出,在该条件下L不出峰,与稀释剂色谱峰一致,且不影响三苯基氧磷的测定;X和S-联萘酚与三苯基氧磷完全分开,分离度符合要求;三苯基氧磷的保留时间在8.6min,待测供试品L均未检出杂质三苯基氧磷。

[0071] 最后说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的宗旨和范围,其均应涵盖在本发明的权利要求范围当中。

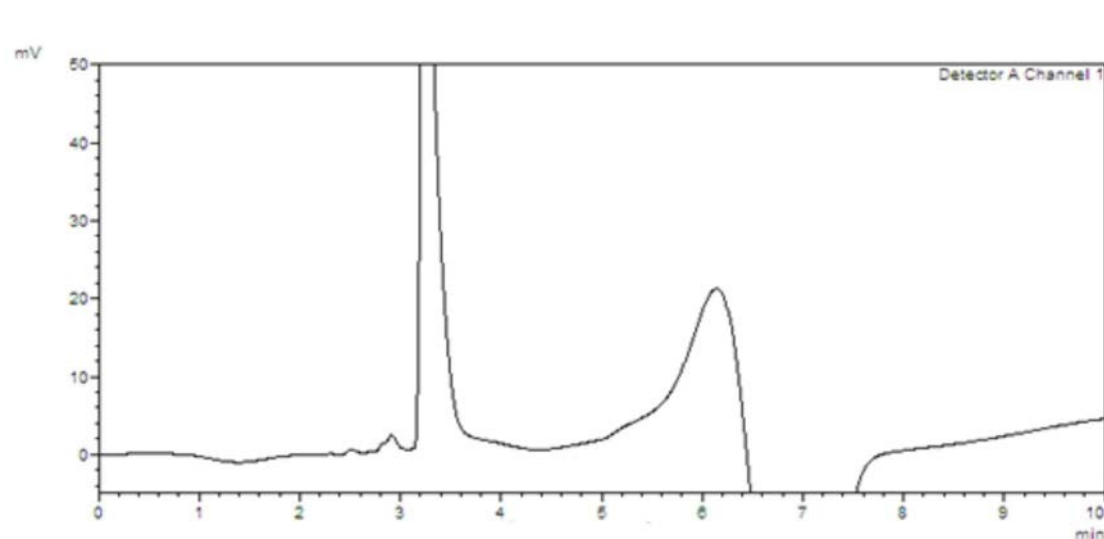


图1

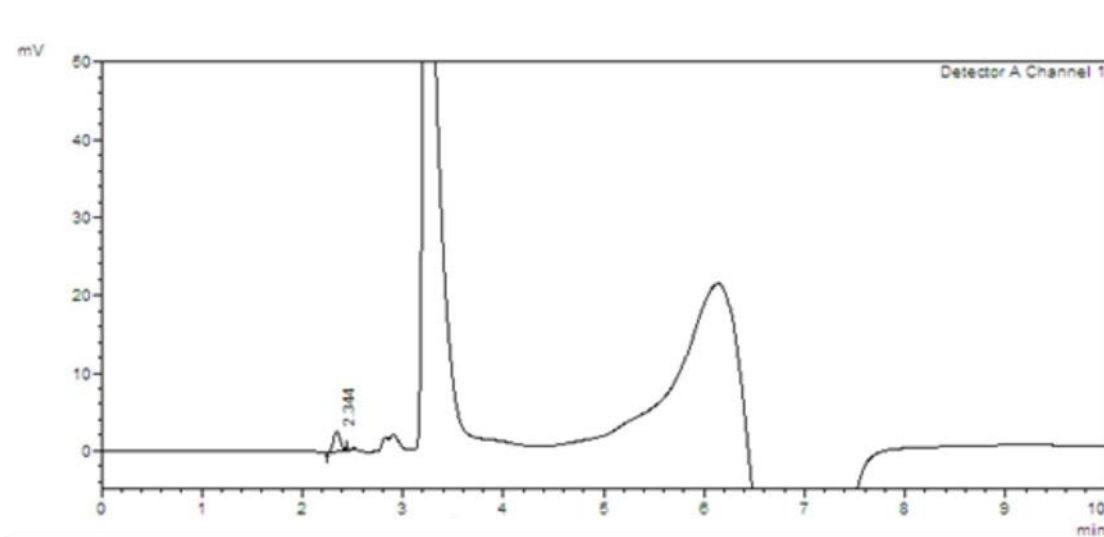


图2

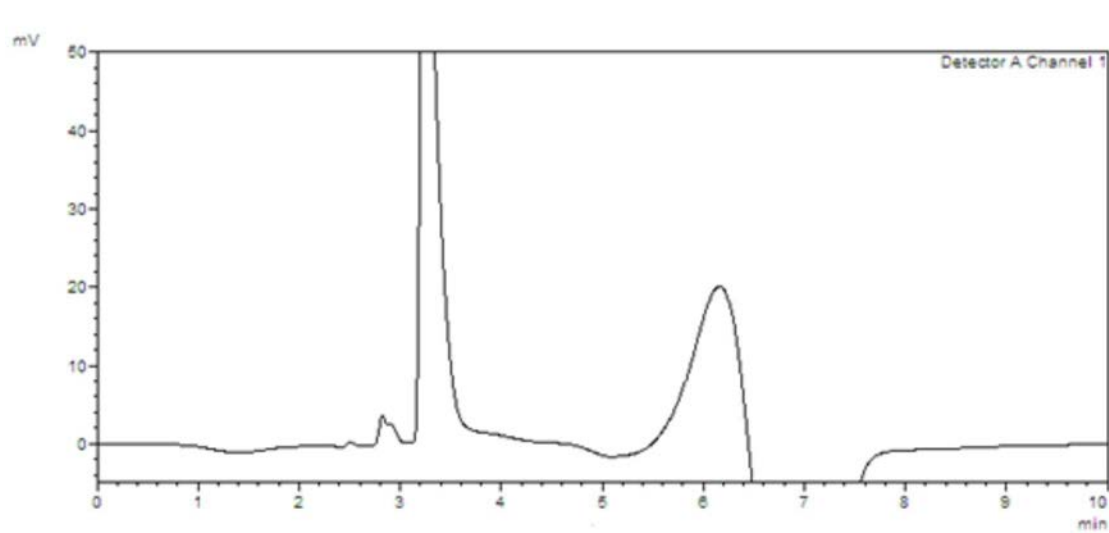


图3

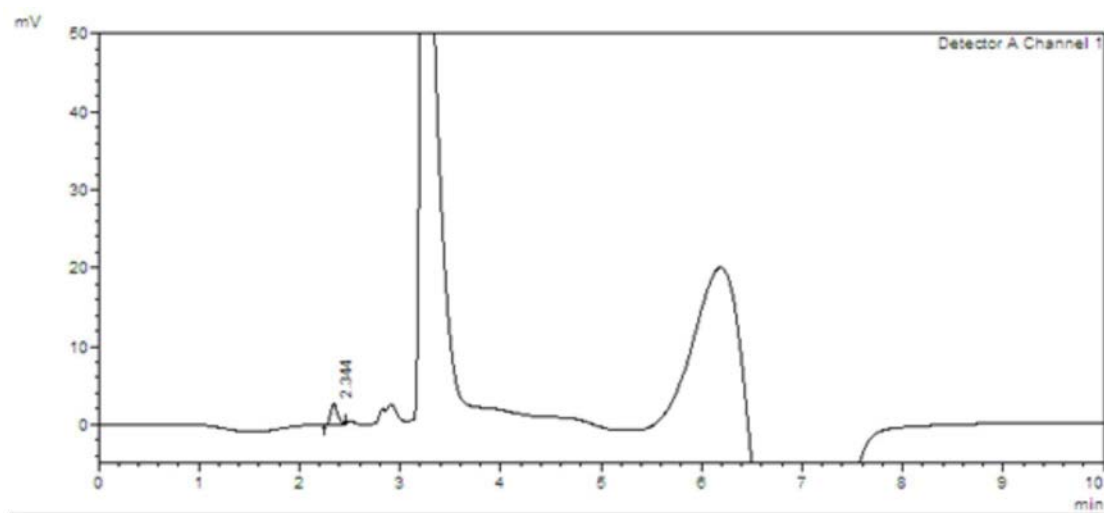


图4

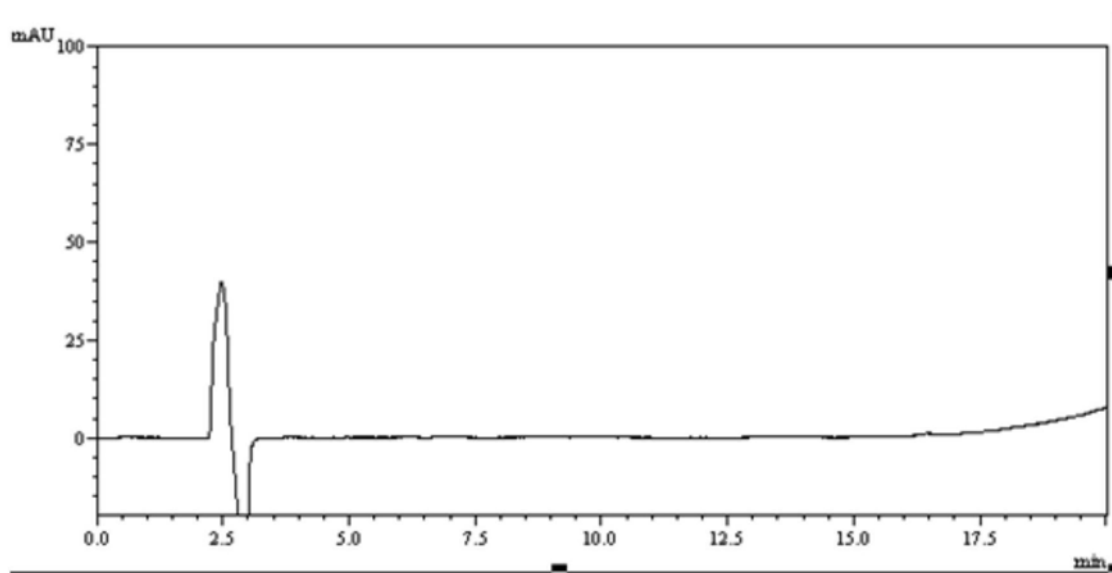


图5

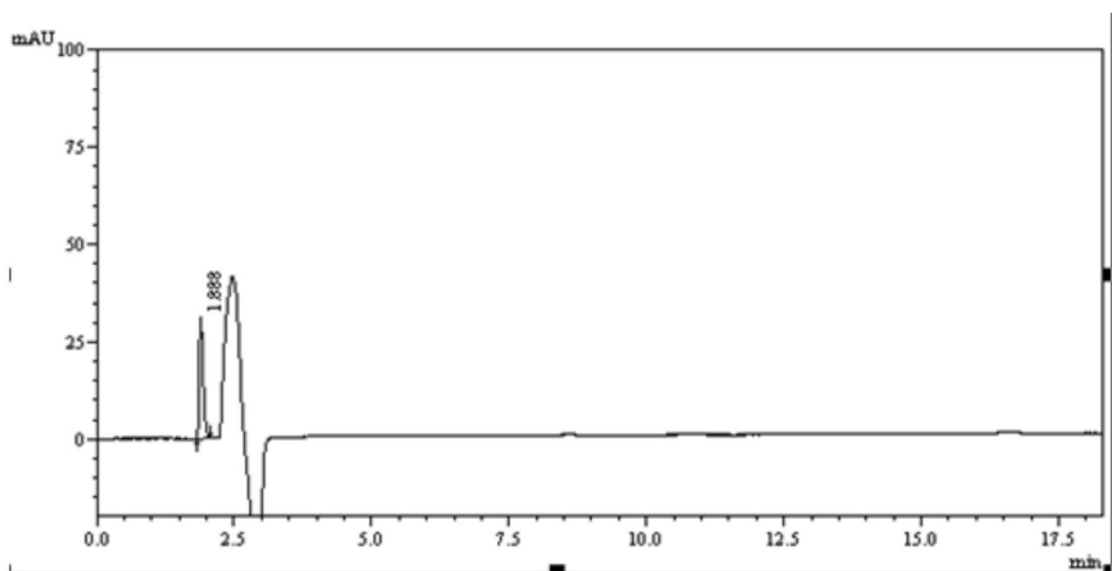


图6

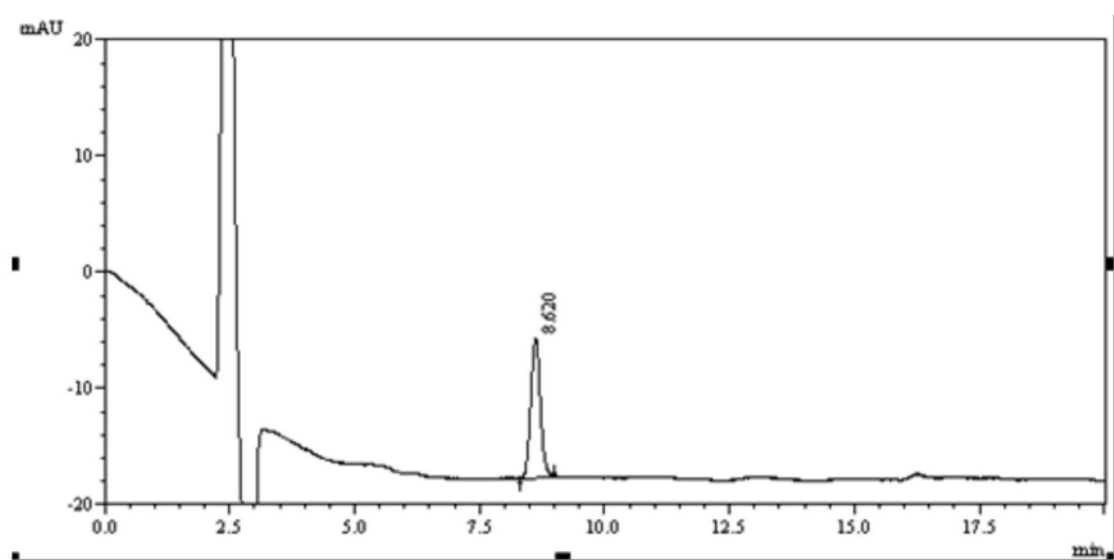


图7

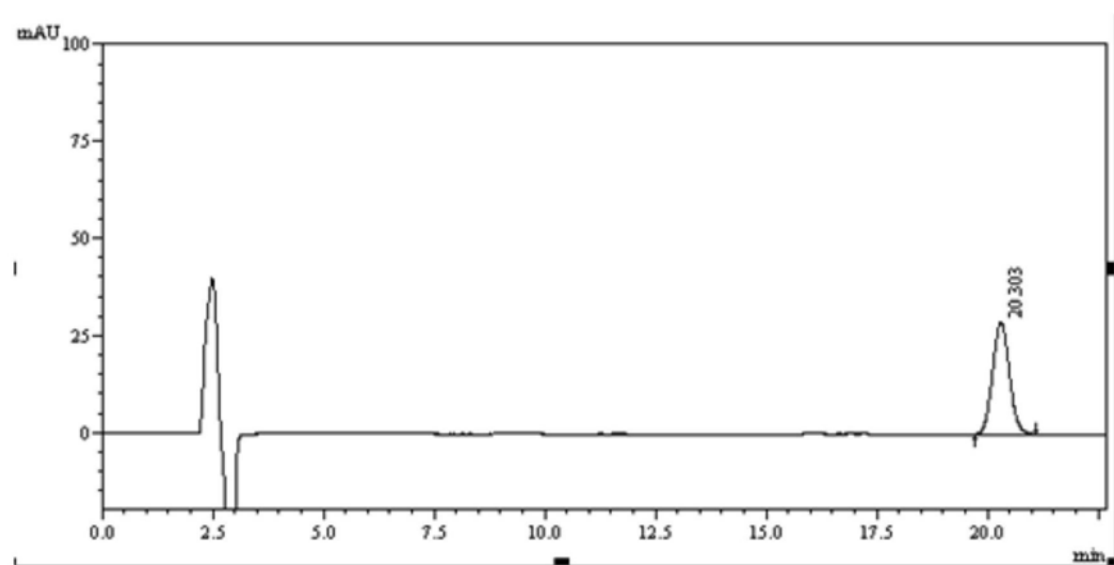


图8

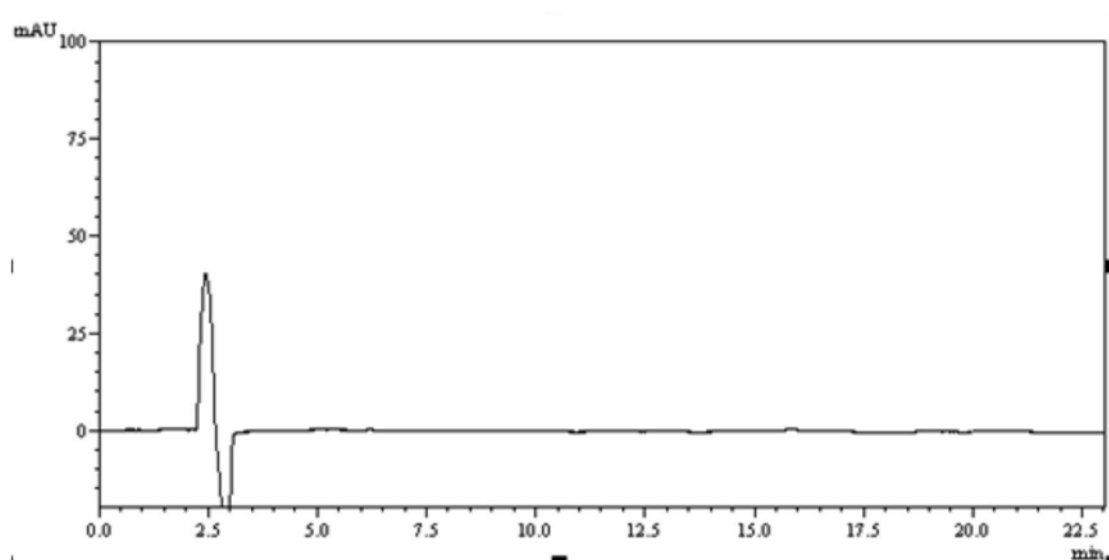


图9

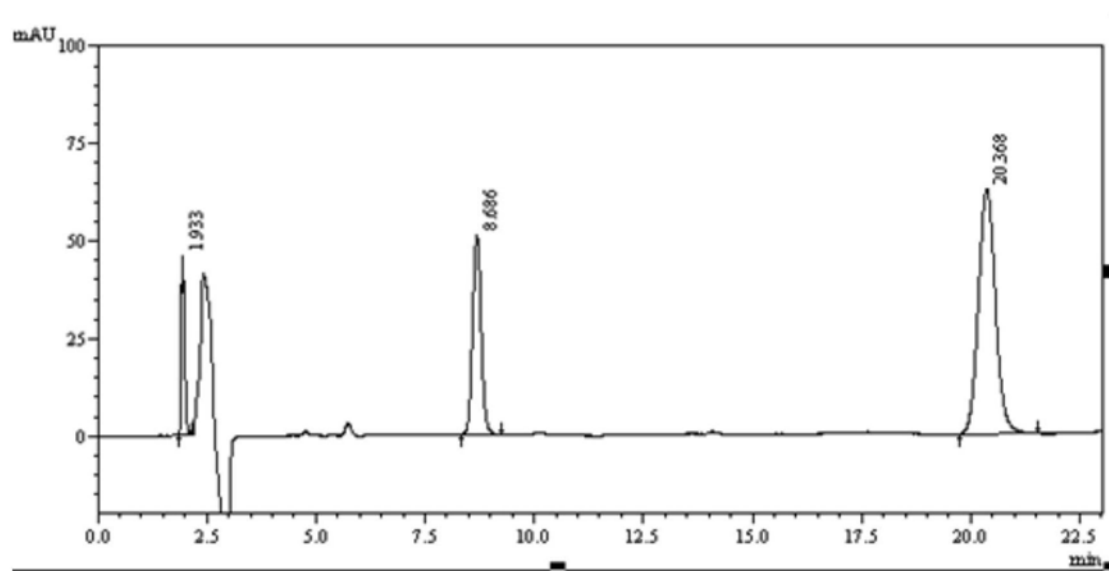


图10