



(21)申請案號：105138626

(22)申請日：中華民國 105 (2016) 年 11 月 24 日

(51)Int. Cl. : G01N33/15 (2006.01)

G01N30/88 (2006.01)

A61K31/336 (2006.01)

(30)優先權：2015/11/25 美國

62/260,019

(71)申請人：德瑪製藥公司(加拿大) DEL MAR PHARMACEUTICALS (CA)

加拿大

(72)發明人：徐 強 XU, QIANG (US)

(74)代理人：洪武雄；陳昭誠

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：28 項 圖式數：5 共 54 頁

## (54)名稱

用於分析和解析二脫水半乳糖醇及其衍生物或類似物之製備方法

METHODS FOR ANALYSIS AND RESOLUTION OF PREPARATIONS OF  
DIANHYDROGALACTITOL AND DERIVATIVES OF ANALOGS THEREOF

## (57)摘要

用於二脫水半乳糖醇製劑之分析的改良分析方法係提供一種於二脫水半乳糖醇製劑中用於測定二脫水半乳糖醇的純度及檢測雜質，以及識別任何此等雜質之方法。該方法採用高效液相層析術(HPLC)，特別是，利用蒸發光散射檢測(ELSD)的逆相醯胺管柱的 HPLC；該 HPLC 之後可接著使用串聯式質譜術。該方法可進一步包含進行製備性 HPLC 收集存在於二脫水半乳糖醇之製劑中的至少一個特定物質峰之步驟。

An improved analytical method for analysis of dianhydrogalactitol preparations provides a method for determining the purity of dianhydrogalactitol and detecting impurities in preparations of dianhydrogalactitol, as well as identifying any such impurities. The method employs high performance liquid chromatography (HPLC), in particular, HPLC employing a reverse phase amide column with ELSD detection; the HPLC can be followed by tandem mass spectroscopy. The method can further comprise the step of performing preparative HPLC collection of at least one specific substance peak present in a preparation of dianhydrogalactitol.

## 發明摘要

※ 申請案號： 105138626

※ 申請日： 105/11/24

※ I P C 分類： *G01N 33/15* (2006.01)  
*G01N 30/88* (2006.01)  
*A61K 31/336* (2006.01)

## 【發明名稱】(中文/英文)

用於分析和解析二脫水半乳糖醇及其衍生物或類似物之製備方法

METHODS FOR ANALYSIS AND RESOLUTION OF PREPARATIONS OF DIANHYDROGALACTITOL AND DERIVATIVES OF ANALOGS THEREOF

## 【中文】

用於二脫水半乳糖醇製劑之分析的改良分析方法係提供一種於二脫水半乳糖醇製劑中用於測定二脫水半乳糖醇的純度及檢測雜質，以及識別任何此等雜質之方法。該方法採用高效液相層析術(HPLC)，特別是，利用蒸發光散射檢測(ELSD)的逆相醯胺管柱的 HPLC；該 HPLC 之後可接著使用串聯式質譜術。該方法可進一步包含進行製備性 HPLC 收集存在於二脫水半乳糖醇之製劑中的至少一個特定物質峰之步驟。

**【英文】**

An improved analytical method for analysis of dianhydrogalactitol preparations provides a method for determining the purity of dianhydrogalactitol and detecting impurities in preparations of dianhydrogalactitol, as well as identifying any such impurities. The method employs high performance liquid chromatography (HPLC), in particular, HPLC employing a reverse phase amide column with ELSD detection; the HPLC can be followed by tandem mass spectroscopy. The method can further comprise the step of performing preparative HPLC collection of at least one specific substance peak present in a preparation of dianhydrogalactitol.

**【代表圖】**

**【本案指定代表圖】**：第（ 無 ）圖。

**【本代表圖之符號簡單說明】**：

本案的圖為實驗數據，並非本案的代表圖。故本案無指定代表圖。

**【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】**：

無代表化學式。

# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

## 【發明名稱】(中文/英文)

用於分析和解析二脫水半乳糖醇及其衍生物或類似物之製備方法

METHODS FOR ANALYSIS AND RESOLUTION OF PREPARATIONS OF DIANHYDROGALACTITOL AND DERIVATIVES OF ANALOGS THEREOF

## 參考相關申請案

【0001】此申請案主張申請日期為 2015 年 11 月 25 日、名稱為「用於分析和解析二脫水半乳糖醇及其衍生物或類似物之製備方法」、由 Q. Xu 提出的美國臨時專利申請案第 62/260,019 號的權益，其全部內容係以參考的方式併入本文。

## 【技術領域】

【0002】本發明係有關於用於二脫水半乳糖醇及其衍生物或類似物之改良分析方法，特別是涉及高效液相層析術(HPLC)。

## 【先前技術】

【0003】二脫水半乳糖醇(1,2:5,6 二脫水半乳糖醇或 DAG)為具有包括化學治療活性之顯著藥理活性的多種己糖醇或己糖醇衍生物中之一者。更明確言之，已經提示二脫水半乳糖醇用於化學療法，諸如發給 Nielsen 等人的美國專利案第 7,157,079 號，其係以參考的方式併入本文。

【0004】二脫水半乳糖醇具有對抗多種腫瘤的活性。但若欲將二脫水半乳糖醇成功地使用作為治療劑，則極高純度及雜質的去除乃必要者。雜質的存在可能導致非期望的副作用。多年前發生的一個實例，當蛋白質的正常組成分之胺基酸色胺酸批料中存在有雜質時，導致嗜酸性細胞性肌痛症候群顯著爆發，造成永久性失能的大量病例及至少 37 人死亡。若治療劑諸如二脫水半乳糖醇將使用於患有免疫系統受損或肝或腎功能異常的病人或老年病人時尤為如此。此種病人因其對污染物敏感故可能更易出現非期望的副作用。

【0005】二脫水半乳糖醇製劑中出現的雜質之一者為半乳糖醇(dulcitol)。取決於其製備方法，其它雜質也可能存在於二脫水半乳糖醇製劑中。

【0006】因此，需要有檢測二脫水半乳糖醇製劑中的雜質及降解產物之改良分析方法以提供具有更高純度的製劑，當二脫水半乳糖醇投予用於治療目的時其較不可能誘發副作用。

### 【發明內容】

【0007】本文中描述滿足此等需要之用於二脫水半乳糖醇及其衍生物或類似物之製劑中測定二脫水半乳糖醇及其衍生物或類似物之純度及檢測雜質及降解產物之改良分析方法。更明確言之，該分析方法係適合用於二脫水半乳糖醇製劑中測定二脫水半乳糖醇的純度及檢測雜質及降解產物。

【0008】一般而言，此種分析方法採用高效液相層析術(HPLC)，特別是，配合蒸發光散射檢測(ELSD)的 HPLC。

【0009】更明確言之，依據本發明之分析方法可檢測於二脫水半乳糖醇製劑中的雜質半乳糖醇及二溴半乳糖醇(dibromodulcitol)。

【0010】本發明之一個態樣為一種分析存在於二脫水半乳糖醇製劑中的雜質之存在及數量的分析方法，包含下列步驟：

(a)使用在親水交互作用模式及乙烯架橋混合(BEH)技術中採用醯胺化學的逆相醯胺管柱讓該製劑接受高效液相層析術以分析二脫水半乳糖醇製劑，利用移動相梯度洗提，其中第一移動相為 100%乙腈及第二移動相為 100%水，以從該製劑的半乳糖醇及其它污染物分離二脫水半乳糖醇；及

(b)判定藉高效液相層析術所解析的表示二脫水半乳糖醇本身以外的化合物之一或多個峰的相對濃度。

【0011】典型地，該方法檢測及定量下列中之至少一者：(1)半乳糖醇；(2)二溴半乳糖醇；(3)半乳糖醇以外的雜質；及(4)二脫水半乳糖醇之降解產物。

【0012】典型地，該流速為約 0.72 毫升/分鐘(mL/min)至約 0.88 毫升/分鐘。較佳地，該流速為約 0.80 毫升/分鐘。

【0013】典型地，該洗提方案為(1)0.00 分鐘，90%之 100%乙腈，10%之 100%水；(2)3.00 分鐘，90%之 100%乙腈，10%之 100%水；(3)20.00 分鐘，75%之 100%乙腈，25%之

100%水；(4)25.00 分鐘，50%之 100%乙腈，50%之 100%水；(5)30.00 分鐘，50%之 100%乙腈，50%之 100%水；(6)30.10 分鐘，90%之 100%乙腈，10%之 100%水；及(7)40.00 分鐘，90%之 100%乙腈，10%之 100%水。

【0014】典型地，該注入體積為約 15 微升至約 35 微升。較佳地，該注入體積為約 25 微升。

【0015】典型地，該管柱溫度為約 28°C 至約 32°C。較佳地，該管柱溫度為約 30°C。

【0016】典型地，該執行時間為約 40 分鐘。

【0017】於一個替代例中，該注入器溫度為約 5°C。於另一個替代例中，該注入器溫度為約 20°C 至約 22°C。

【0018】該方法可包括以 100%乙腈洗滌針頭。

【0019】於依據本發明之方法中，典型地，檢測係利用蒸發光散射(ELSD)。典型地，該蒸發光散射檢測包含揮發性溶劑的管柱後添加以增進任何存在的移動相之水性分量的蒸發。該揮發性溶劑可選自於由甲醇、乙醇、異丙醇、及乙腈所組成的組群。於一個較佳替代例中，該 ELSD 檢測條件為約 36°C 至約 44°C 之溫度，約 2.0 巴(bar)至約 3.0 巴之氣體壓力，及增益 7。於一更佳替代例中，該 ELSD 檢測條件為約 38°C 至約 42°C 之溫度，約 2.25 巴至約 2.75 巴之氣體壓力，及增益 7。於一又更佳替代例中，該 ELSD 檢測條件為約 40°C 之溫度，約 2.5 巴之氣體壓力，及增益 7。該蒸發光散射檢測係與電噴灑 LC/MS 可相容。當該蒸發光散射檢測係與電噴灑 LC/MS 可相容時，電噴灑串聯式

質譜儀係經安裝及線上連結到配合 ELSD 的 HPLC 系統。當電噴灑串聯式質譜儀係經安裝及線上連結時，可收集針對可存在於二脫水半乳糖醇製劑中的該等雜質及降解產物各者提供化學資訊的串聯式質譜數據。與 HPLC 串聯的質譜術針對該等觀察到的雜質及降解產物各者可提供分子離子資訊及具有與該分子離子資訊符合一致的分子量之可能化學結構。於此替代例中，至少一個雜質或降解產物係藉管柱層析術分離，接著藉至少一個純化程序獲得固體未知試樣而予以識別。該固體未知試樣可藉選自於由下列所組成的組群中之至少一個標準分析程序進行特徵化予以識別：核磁共振(NMR)、質譜術(MS)、富利葉變換紅外線光譜術(FT-IR)、元素分析、藉 HPLC 之純度測定、及藉卡爾費雪(Karl Fischer)滴定法之水含量測定。

【0020】於如前文描述的方法中，該方法可進一步包含進行製備性 HPLC 收集存在於二脫水半乳糖醇製劑中之至少一個特定物質峰的步驟。存在於該二脫水半乳糖醇製劑中之該至少一個特定物質峰可以是雜質。另外，存在於該二脫水半乳糖醇製劑中之該至少一個特定物質峰可以是降解產物。

### 【圖式簡單說明】

【0021】參考後文詳細說明部分、隨附之申請專利範圍、及所附圖式，本發明之此等及其它特徵、態樣、及優點將變得更加明瞭，於圖式中：

【0022】第 1 圖係顯示空白組、新製錠劑試樣、標準

溶液、及偽試樣溶液的重疊層析圖(DAG 為二脫水半乳糖醇及 DBD 為二溴半乳糖醇)。

【0023】第 2 圖係顯示 0.004 毫克/毫升(mg/mL)半乳糖醇溶液(0.05%理論濃度(nominal concentration))用於測定半乳糖醇的檢測極限(LOD)的層析術結果圖。

【0024】第 3 圖係顯示 0.008 毫克/毫升半乳糖醇溶液(0.1%理論濃度)用於測定半乳糖醇的定量極限(LOQ)的層析術結果圖。

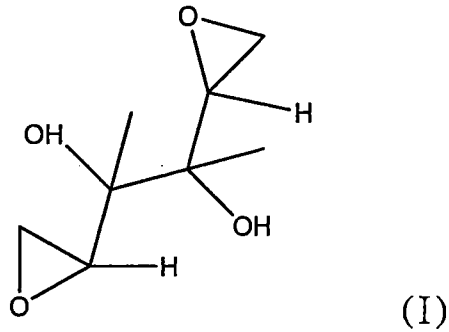
【0025】第 4 圖係顯示使用半乳糖醇進行線性度試驗的結果圖。

【0026】第 5 圖係顯示試樣溶液中的雜質圖。

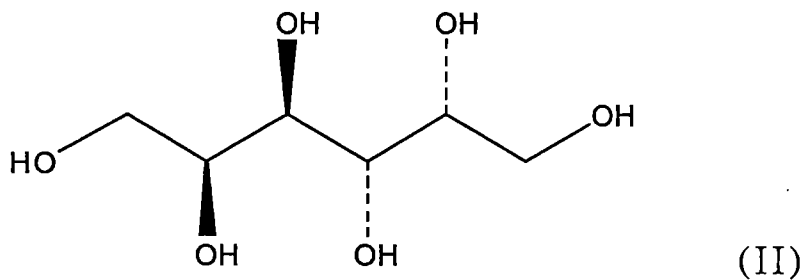
### 【實施方式】

【0027】本發明係有關於用於測定存在於二脫水半乳糖醇及其衍生物或類似物製劑中的二脫水半乳糖醇及其衍生物或類似物之純度及測定雜質的存在及濃度的改良分析方法。本文中描述滿足此等需要用於二脫水半乳糖醇及其衍生物或類似物製劑中測定二脫水半乳糖醇及其衍生物或類似物之純度及檢測雜質及降解產物之改良分析方法。更明確言之，該分析方法係適合用於二脫水半乳糖醇製劑中測定二脫水半乳糖醇的純度及檢測雜質及降解產物。

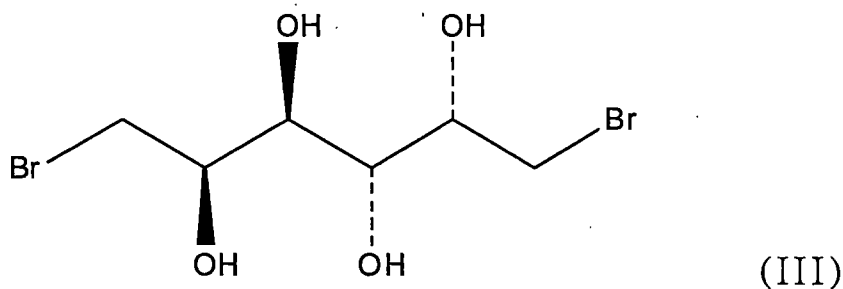
【0028】二脫水半乳糖醇之結構式顯示如下於式(I)：



【0029】存在於二脫水半乳糖醇製劑中的顯著雜質之一者為半乳糖醇。半乳糖醇之結構式顯示如下於式(II)：



【0030】可能存在於二脫水半乳糖醇製劑中之又另一種雜質為二溴半乳糖醇。二溴半乳糖醇之結構式顯示如下於式(III)：



【0031】其它雜質可存在於二脫水半乳糖醇製劑中。此等雜質的確實身分可取決於二脫水半乳糖醇的合成及純化途徑。此等雜質也可表示二脫水半乳糖醇的降解產物。

【0032】二脫水半乳糖醇製劑的改良分析方法係基於高效液相層析術(HPLC)配合蒸發光散射檢測(ELSD)。於一個替代例中，為了檢測及識別存在於此等二脫水半乳糖醇

製劑中之全部顯著組成分，HPLC 係與質譜術(MS)組合。

【0033】HPLC 的理論及實務係描述於 L.R. Snyder et al., “Introduction to Modern Liquid Chromatography” (近代液相層析術導論) (3<sup>rd</sup> ed., John Wiley & Sons, New York, 2009)。MS 的理論及實務係描述於 E. de Hoffmann & V. Stroobant, “Mass Spectroscopy: Principles and Applications” (質譜術：原理與應用) (3<sup>rd</sup> ed., John Wiley & Sons, New York, 2007)。

【0034】於一個較佳替代例中，HPLC 係採用逆相醯胺管柱進行。特佳的醯胺管柱為在親水交互作用模式採用醯胺化學的 4.6 毫米 x250 毫米管柱；該管柱採用乙烯架橋混合(BEH)技術。管柱的粒子呈球狀及具有 3.5 微米的粒徑。粒子具有混合基材及具有 130 埃的孔隙大小。特佳的逆相醯胺管柱為瓦特氏(Waters)愛克斯橋(XBridge) BEH 醯胺管柱第 186004870 號(瓦特氏，麻薩諸塞州密爾福)。其它逆相醯胺管柱為業界已知。

【0035】至於移動相，較佳的替代方案係使用 100%乙腈作為移動相 A 及 100%水作為移動相 B。較佳流速為約 0.72 毫升/分鐘(mL/min)至約 0.88 毫升/分鐘；特佳流速為約 0.80 毫升/分鐘。

【0036】較佳洗提方案為如下：(1)0.00 分鐘，90%之 100%乙腈，10%之 100%水；(2)3.00 分鐘，90%之 100%乙腈，10%之 100%水；(3)20.00 分鐘，75%之 100%乙腈，25%之 100%水；(4)25.00 分鐘，50%之 100%乙腈，50%之 100%水；

(5)30.00 分鐘，50%之 100%乙腈，50%之 100%水；(6)30.10 分鐘，90%之 100%乙腈，10%之 100%水；及(7)40.00 分鐘，90%之 100%乙腈，10%之 100%水。

【0037】注入體積可以是約 15 微升至約 35 微升。較佳的注入體積為 25 微升。

【0038】管柱溫度可以是約 28°C 至約 32°C。較佳管柱溫度為約 30°C。

【0039】較佳執行時間為約 40 分鐘。注入器溫度可於約 5°C 或於約室溫(約 20°C 至約 22°C)。分析方法可包括以 100%乙腈洗滌針頭。

【0040】典型地，於依據本發明之 HPLC 分析方法中，檢測係利用蒸發光散射(ELSD)。蒸發光散射檢測(ELSD)霧化管柱洗提物，照光於所得微粒狀組成分，及檢測所得散射光。理論上，ELSD 可檢測任何非揮發性成分。非產色性化合物的蒸發光散射檢測係基於 HPLC 洗提劑的噴霧及移動相溶劑的氣化而產生霧化的溶質粒子以供光散射檢測。此種產生霧化分析物溶質粒子的噴霧及溶劑氣化方法係與電噴灑 LC/MS 程序可相媲美。典型地，ELSD 檢測係與電噴灑 LC/MS 可相容。

【0041】配合與電噴灑 LC/MS 應用可相容的 ELSD 檢測之 HPLC 方法的實施典型地涉及揮發性溶劑的管柱後添加(post-column addition)以增進任何存在的移動相之水性分量的蒸發。揮發性溶劑典型地係選自於由甲醇、乙醇、異丙醇、及乙腈所組成的組群。

【0042】典型地，ELSD 檢測條件為約 36°C 至約 44°C 之溫度，約 2.0 巴至約 3.0 巴之氣體壓力，及增益 7。較佳地，ELSD 條件為約 38°C 至約 42°C 之溫度，約 2.25 巴至約 2.75 巴之氣體壓力，及增益 7。更佳地，該 ELSD 條件為約 40°C 之溫度，約 2.5 巴之氣體壓力，及增益 7。

【0043】典型地，蒸發光散射檢測係與電噴灑 LC/MS 可相容。因此，於依據本發明之方法中，電噴灑串聯式質譜儀可安裝及線上連結到配合 ELSD 的 HPLC 系統。可收集針對可存在於二脫水半乳糖醇製劑中的該等雜質各者提供分子資訊的質譜資料及提供化學結構資訊的串聯式質譜資料。與 HPLC 串聯的該質譜術將針對該等觀察得的雜質及降解產物各者提供分子離子資訊及具有與該分子離子資訊符合一致的分子量之可能化學結構。

【0044】於另一個替代例中，可進行特定 DAG 相關物質峰，包括存在於 DAG 製劑的雜質的製備性 HPLC 收集。

【0045】據此，一種分析存在於二脫水半乳糖醇製劑的雜質之存在及數量的分析方法包含下列步驟：

(a)使用在親水交互作用模式及乙烯架橋混合(BEH)技術中採用醯胺化學的逆相醯胺管柱讓該製劑接受高效液相層析術以分析二脫水半乳糖醇製劑，使用移動相梯度洗提，其中第一移動相為 100%乙腈及第二移動相為 100%水，以從該製劑的半乳糖醇及其它污染物中分離二脫水半乳糖醇；及

(b)判定藉高效液相層析術所解析的表示二脫水半乳

糖醇本身以外的化合物之一或多個峰的相對濃度。

【0046】二脫水半乳糖醇本身以外的化合物可以是下列中之至少一者：(1)半乳糖醇；(2)二溴半乳糖醇；(3)半乳糖醇以外的雜質；及(4)二脫水半乳糖醇之降解產物。

【0047】逆相層析分析及 ELSD 檢測的適當條件係如前文描述。

【0048】於一個替代例中，依據本發明之方法進一步包含藉電噴灑串聯式質譜術分析自高效液相層析術洗提的一或多個峰的步驟。於另一個替代例中，依據本發明之方法進一步包含製備性 HPLC 收集至少一個特定二脫水半乳糖醇相關物質峰的步驟。

【0049】若存在有雜質或降解產物(非為半乳糖醇)，則未知的雜質或降解產物可藉管柱層析術分離，接著藉至少一個純化程序獲得固體未知試樣加以識別，然後該試樣可藉選自於由下列所組成的組群中之至少一個標準分析程序特徵化加以識別：核磁共振(NMR)、質譜術(MS)、富利葉變換紅外線光譜術(FT-IR)、元素分析、藉 HPLC 之純度測定、及藉卡爾費雪(Karl Fischer)滴定法之水含量測定。此等方法為業界眾所周知。

【0050】於如前文描述的方法中，該方法可進一步包含進行製備性 HPLC 收集存在於二脫水半乳糖醇製劑之至少一個特定物質峰的步驟。存在於該二脫水半乳糖醇製劑之該至少一個特定物質峰可以是雜質。另外，存在於該二脫水半乳糖醇製劑之該至少一個特定物質峰可以是降解產物。

【0051】本發明係藉下列實施例例示說明。此實施例僅供例示目的而非意圖限制本發明。

#### 實施例

二脫水半乳糖醇製劑採用乙腈及水之梯度的逆相 HPLC 分析

【0052】要言之，本試驗程序係藉配合 ELSD 檢測的高效液相層析術(HPLC) (HPLC-ELSD)使用以測定於二脫水半乳糖醇(DAG)藥物物質及藥物產品製劑中之一或多種相關物質或物質。使用逆相管柱(瓦特氏醯胺，3.5 微米，4.6x250 毫米)以 100%乙腈(ACN)作移動相 A 及 100%水作移動相 B。流速為 0.8 毫克/毫升。以於約 5.20 分鐘的滯留時間檢測得 DAG 之峰。DAG 試樣係於 8 毫克/毫升之目標濃度製備。

#### 【0053】試劑及參考標準

【0054】試劑及參考標準包括：(1)純水(H<sub>2</sub>O)，HPLC 等級或相當等級；(2)乙腈(ACN)，HPLC 等級或相當等級；及(3)半乳糖醇參考標準。

#### 【0055】儀器與設備

【0056】儀器與設備包括：(1)裝配有 ELSD 檢測器的島津(Shimadzu) LC20A HPLC 系統或相當系統；(瓦特氏醯胺逆相 HPLC 管柱，3.5 微米，4.6x250 毫米，PN: 186004870)；(3)純水產生器；及(4)分析天平。

#### 【0057】溶液之製備

【0058】視試驗的需要可放大或縮小體積。藉徹底混

合 850 毫升乙腈 (CAN) 及 150 毫升水可製備含乙腈/水之稀釋劑 (85:15, v/v)。移動相為 100% ACN (移動相 A) 及 100% 水 (移動相 B)。製備 0.016 mg/mL (0.2%)、0.08 mg/mL (1%)、及 0.4 mg/mL (5%) 之半乳糖醇線性度標準溶液。標明的重量及體積為例示定量分析的推薦用量。可使用其它用量，但終濃度維持相同。玻璃器皿須以純水及 ACN 預先沖洗五次以減少潛在污染。

【0059】可製備其它濃度。舉例言之，用於 3% (0.24 mg/mL) 半乳糖醇濃度標準，將約 24 毫克半乳糖醇參考標準準確地稱重入 100 毫升容量瓶內，加入 15 毫升純水及音振處理而溶解之，以乙腈稀釋至容積及混合均勻。標示為 L-3%-#1 (STD#1) 及 L-3%-#2 (STD#2)。使用前容量瓶須以純水及 ACN 沖洗而完全清潔。

【0060】針對 0.08 mg/mL (1%) 可製備一個複本。舉例言之，將約 20 毫克半乳糖醇參考標準準確地稱重入 250 毫升容量瓶內，加入 37.5 毫升純水及音振處理而溶解之，以乙腈稀釋至容積及混合均勻。標示為 L-1%。

【0061】針對 0.016 mg/mL (0.2%) 可製備一個複本。可如下表 1 顯示製備。

表 1

位準	稀釋程序實例	標示為	目標濃度 (mg/mL)
0.2%	2 mL L-1% → 10 mL	L-0.2%	0.016

【0062】標準液於 2-8°C 可儲存長達 48 小時及於環境實驗室條件可儲存長達 52 小時。標準液可用以產生標準曲線，容後詳述。

【0063】一個複本中之半乳糖醇敏感度溶液(0.008 mg/mL (0.1%))可如下表 2 顯示製備。

表 2

位準	稀釋程序實例	標示為	目標濃度 (mg/mL)
0.1%	1 mL L-5% -#1 → 50 mL	SS	0.008

【0064】二脫水半乳糖醇(DAG)標準液(8 mg/mL) (僅供識別目的)可製備如下：於一個複本中，準確地稱重約 80 毫克 DAG 工作標準入乾淨 10 毫升容量瓶內。將 DAG 工作標準溶解於約 5 毫升稀釋劑，以稀釋劑稀釋到容積及混合。溶液可為液體及冷凍儲存供未來使用，直到層析圖中不再可檢測得相關峰為止。

【0065】試樣溶液(理論 8 mg/mL)製備如下。DAG 藥物物質或 API 之試樣製備如下。二重複中，準確地稱重約 80 毫克 DAG 工作標準入乾淨 10 毫升容量瓶內。將 DAG API 試樣溶解於約 5 毫升稀釋劑，以稀釋劑稀釋到容積及混合。DAG 藥物產品(凍乾粉末，40 毫克/小瓶)之試樣製備如下：清潔及移除小瓶蓋。以 5.0 毫升稀釋劑重新調製凍乾小瓶而獲得 8 mg/mL 溶液。製備試樣為二重複(使用兩個小瓶)。試樣溶液於 2-8°C 可儲存長達 48 小時及於環境實驗室

條件可儲存長達 52 小時。

【0066】層析條件

【0067】層析條件係顯示於表 3。

表 3

移動相	移動相 A：100%ACN 移動相 B：100%水			
管柱	瓦特氏醃胺 4.6*250 毫米，3.5 微米			
梯度	時間(分鐘)	流速(毫升/分鐘)	MPA%	MPB%
	0.00	0.8	90	10
	3.00	0.8	90	10
	20.00	0.8	75	25
	25.00	0.8	50	50
	30.00	0.8	50	50
	30.10	0.8	90	10
	40.00	0.8	90	10
ELSD 條件	溫度：40°C 氣體壓力：2.5 巴 增益：7			
注入體積	25 微升			
管柱溫度	30°C			
執行時間	40 分鐘			
注入器溫度	室溫或 5°C			
針頭洗滌	100%ACN			

【0068】試樣分析之前，HPLC 管柱須於初始方法條件調理及平衡。

【0069】注入順序

【0070】確保如下陳述的系統適合性要求滿足之後，進行試樣分析。注入順序顯示於表 4。

表 4

序號	試樣名稱	注入次數
1	空白(稀釋劑)	1 或以上
2	敏感度溶液(SS)	1
3	L-0.2%	1
4	L-1%	1
5	STD#1(L-3%#1)	5
6	STD#2(L-3%#2)	1
7	DAG 標準液(僅供識別目的)	1
8	試樣溶液	各 1
9	STD#1(L-3%#1)	1

【0071】該順序兩端係各注入 STD#1(L-3%#1)一次，接著不超過 6 次注入試樣溶液，及於該順序結束時再度注入 STD#1(L-3%#1)。

【0072】系統適合性

【0073】至於空白組，確保系統為乾淨穩定，及於半乳糖醇的滯留時間，於空白層析圖中未觀察到干擾峰。若有任何干擾，則干擾不應大於敏感度溶液中的半乳糖醇峰。

【0074】至於敏感度溶液，敏感度溶液中的半乳糖醇

峰之信號對雜訊比(S/N)須不小於 10。

【0075】至於相關度(r)，針對 L-0.2%、L-1%及 L-3%#1(第一次注入)對數校準曲線的相關度須不小於 0.980。

【0076】至於標準液，針對 STD#1 (L-3%#1)的頭五次初始注入中，半乳糖醇的 Lg(峰面積)的相對標準差(RSD)須≤5%。STD#1 (L-3%#1)的第一次注入中，半乳糖醇峰的拖尾因子須≤2.0。STD#2 (L-3%#2)的回復須落入 95%-105%以內。標準液#2 的回復係根據方程式(1)計算：

$$\text{檢查標準回復} = \frac{\lg(C_{\text{STD}\#1})}{\lg(C_{\text{STD}\#2})} \times \frac{\lg(A_{\text{STD}\#2})}{\lg(A_{\text{STD}\#1})} \times 100\%$$

(方程式(1))，

其中：C<sub>STD#1</sub> 為標準液#1(STD#1)中之半乳糖醇參考標準的濃度(mg/mL)；C<sub>STD#2</sub> 為標準液#2(STD#2)中之半乳糖醇參考標準的濃度(mg/mL)；A<sub>STD#1</sub> 為標準液#1(STD#1)的五次初始注入中半乳糖醇的平均峰面積；及 A<sub>STD#2</sub> 為標準液#2(STD#2)的五次初始注入中半乳糖醇的平均峰面積。

【0077】為了定標(bracketing)標準液，定標注入的 Lg(峰面積)與 STD#1 (L-3%#1)的頭五次初始注入的平均 Lg(峰面積)間之比須落入 95%-105%以內。

【0078】至於檢測極限(LOD)，信號對雜訊比(S/N)須不小於 3。針對二脫水半乳糖醇製劑的預期雜質之一者半乳糖醇的檢測極限(LOD)之測定係顯示於第 2 圖。第 2 圖係顯示 0.004 毫克/毫升半乳糖醇溶液(理論濃度之 0.05%)用

於測定半乳糖醇的檢測極限(LOD)的層析術結果。

【0079】至於定量極限(LOQ)，信號對雜訊比(S/N)須不小於 10。針對半乳糖醇的定量極限(LOQ)之測定係顯示於第 3 圖。第 3 圖係顯示 0.008 毫克/毫升半乳糖醇溶液(理論濃度之 0.1%)用於測定半乳糖醇的定量極限(LOQ)的層析術結果。

【0080】各個位準的平均回復( $n=3$ )須落入約 80%至約 120%以內。

【0081】至於重複性，針對 0.1%至 0.4%位準，須紀錄 RSD%。針對 0.5%及以上，RSD%須 $\leq 20\%$ 。組合 RSD%須 $\leq 20\%$ 。

【0082】至於結果相較於 ELSD 氣體壓力的變異度，針對 $\leq 1.0\%$ 雜質，絕對差異須不大於 0.2%。針對 $> 1.0\%$ 雜質，相對差異須調控於 $\pm 20\%$ 以內。須觀察無新雜質 $\geq 0.1\%$ 。

【0083】相對於溶液安定性，老化溶液的回復須落入初始分析試驗的 85%-115%以內。針對 $\leq 1.0\%$ 雜質，絕對差異須不大於 0.2%。針對 $> 1.0\%$ 雜質，老化溶液的結果須落入原先的 80%-120%以內。須觀察無新雜質 $\geq 1.0\%$ 。

#### 【0084】識別

【0085】至於安慰劑，對應 DAG 標準層析圖中之 DAG 峰，不應檢測到大於敏感度溶液(SS)中之半乳糖醇峰的層析峰。至於 DAG 活性物質，DAG 於試樣中及於 DAG 標準中之滯留時間實質上相同(於 $\pm 5\%$ 以內)。

#### 【0086】計算

【0087】針對個別相關物質，半乳糖醇使用線性工作標準的計算曲線進行如下(方程式(2))：

$$\lg A_{\text{STD}} = b + k \times \lg\left(\frac{W_{\text{STD}} \times P}{V_{\text{STD}}}\right)$$

(方程式(2))，

其中：A<sub>STD</sub> 為表示針對線性度標準液(針對 L-3%，可使用 STD#1 的第一次注入)半乳糖醇的面積；V<sub>STD</sub> 為針對線性度標準液的稀釋容積(毫升)；W<sub>STD</sub> 為線性度標準液的半乳糖醇重量(毫克)；P 為半乳糖醇之純度(或含量)；b 為已確立校準曲線的 Y 截距；及 k 為已確立校準曲線的斜率。個別相關物質的百分比係藉方程式(3)計算

$$\text{個別相關物質 \%} = \frac{10(\lg A_{\text{SPL}} - b)/k \times V_{\text{SPL}} \times 100}{\text{LC or } W_{\text{SPL}}}$$

(方程式(3))，

其中：A<sub>SPL</sub> 為個別相關物質之面積；V<sub>SPL</sub> 為試樣溶液的稀釋容積；b 為已確立校準曲線的 Y 截距；k 為已確立校準曲線的斜率；LC 為各個小瓶中 DAG 的標籤聲明(如標籤上陳述的理論數量)(藥品的 LC=40 毫克)；及 W<sub>SPL</sub> 為 DAG 藥物重量(毫克)。使用半乳糖醇的線性度試驗結果顯示於第 4 圖；此等結果係得自下表 18。

【0088】至於總相關物質，針對總相關物質的計算須將全部不少於 0.1% 的個別相關物質加總。無效峰及空白峰不應加總至總相關物質。

【0089】報告

【0090】至於個別相關物質的報告，針對不少於 0.1% 的全部雜質，報告不少於 0.1% 的全部雜質參照其相對滯留時間(RRT)或名稱，及呈現到兩個小數位數。若有兩個試驗結果不少於規定極限(0.1%)，則平均結果須報告為最終結果。但若有一個試驗結果係少於 0.1%，則最大結果須報告為最終結果。針對總相關物質(總雜質)，加總不少於 0.1% 的全部個別雜質。報告總相關物質到兩個小數位數。

【0091】參考

【0092】參考標準顯示於表 5。

表 5

組成	單位公式	
	量 (mg)/小瓶	w/w, %
注入用 DAG	40	100
總計	40	100

【0093】結果

【0094】滿足全部系統適合性標準。於稀釋劑層析圖中於 DAG 峰、DBD、及半乳糖醇的滯留時間未觀察到可見的干擾峰。試樣中及標準液中的 DAG 峰的滯留時間之差係於 0% 至 3% 之範圍。於三重複試驗中，就檢測極限而言信號對雜訊比(S/N)為 6、6、及 3。於三重複試驗中，就數量極限而言信號對雜訊比(S/N)為 22、20、及 16。相關係數(r)為 0.9985，具有 1.7212 的斜率及 7.7258 之 y 截距。針對 0.5%、1.0%、及 3.0% 位準的平均回復顯示於下表 6。針對兩次二重複執行的 RSD% 顯示於下表 7(執行 1)及表 8(執行

2)。至於 P-0.5%(出現於 0.5%位準或更高的污染物)，半乳糖醇顯示於下表 9；於表 9 中，半乳糖醇顯示出現於 0.59%位準。針對 0.5%位準的中間產物精度之組合 RSD%(於經定義的條件集合下之精度度量：相同測量程序，相同測量系統，相同位置，及長時間在相同或相似物體的重複度量)係顯示於下表 10。針對 2.6 巴及 2.4 巴之 ELSD 氣體壓力之絕對差係顯示於下表 11。未觀察到>1.0%的雜質，及未觀察到 $\geq 0.1\%$ 的新雜質。針對 39°C 及 41°C 之 ELSD 溫度的結果係顯示於下表 12。未觀察到>1.0%的雜質，及未觀察到 $\geq 0.1\%$ 的新雜質。

#### 【0095】溶液安定性

【0096】用於測定溶液安定性的實驗方案如下：至於標準液，一複本中製備 1.0%DAG 理論濃度的半乳糖醇標準液，將溶液分別置於環境實驗室條件及冷藏條件(2-8°C)下，使用 1%線性度標準液。溶液於不同的時間間隔再度分析，諸如 2 小時、4 小時、8 小時、24 小時、及 48 小時。針對少於 24 小時的時間點，對新製標準評估溶液安定性。評估老化溶液的回復。用於試樣溶液，一複本中製備於特定 DAG 理論濃度的試樣溶液，將溶液置於環境溫度的實驗室條件及冷藏條件(2-8°C)下。溶液於不同的時間間隔再度分析，諸如 2 小時、4 小時、8 小時、24 小時、及 48 小時。針對少於 24 小時的時間點，對新製標準評估溶液安定性。

【0097】就於 2-8°C 及於環境實驗室條件下老化的變異度結果係顯示於下表 13。至於雜質，就於環境實驗室條件

下老化而言，結果係顯示於下表 14。未觀察到 $\geq 0.1\%$ 的新雜質。至於雜質，就於 2-8°C 老化而言，結果係顯示於下表 15。未觀察到 $\geq 0.1\%$ 的新雜質。

表 6

位準	平均回復(%)	RSD% (n=3)
0.5%	120	2.1
1.0%	116	0.9
3.0%	95	0.1

表 7

執行 1:		
峰名稱	平均含量(%)	RSD (n=6)
RRT 0.48	0.18	2.9
RRT 0.51	0.34	1.1
RRT 0.56	0.28	1.0
RRT 0.71	1.06	0.7
半乳糖醇	0.15	2.9
RRT 1.02	0.08	5.2
RRT 1.07	0.08	4.0

表 8

執行 2 :		
峰名稱	平均含量(%)	RSD (n=6)
RRT 0.48	0.23	1.5
RRT 0.56	0.35	1.8
RRT 0.71	0.67	0.8
半乳糖醇	0.20	1.8
RRT 1.07	0.21	3.8
RRT 1.19	0.15	2.8
RRT 1.27	0.12	10.1

表 9

P-0.5%		
峰名稱	平均含量(%)	RSD (n=6)
半乳糖醇	0.59	0.9

表 10

位準	RSD% (n=12)
0.5%	2.1

表 11

2.6 巴：	
峰名稱	絕對差(%)
RRT 0.48	0.001
RRT 0.51	0.01
RRT 0.56	0.01
RRT 0.71	0.02
半乳糖醇	0.004
2.4 巴：	
峰名稱	絕對差(%)
RRT 0.48	0.01
RRT 0.51	0.01
RRT 0.56	0.01
RRT 0.71	0.02
半乳糖醇	0.001

表 12

39℃ :	
峰名稱	絕對差(%)
RRT 0.48	0.01
RRT 0.51	0.01
RRT 0.56	0.003
RRT 0.71	0.04
半乳糖醇	0.02
RRT 1.02	0.01
RRT 1.07	0.01
41℃ :	
峰名稱	絕對差(%)
RRT 0.48	0.001
RRT 0.51	0.0001
RRT 0.56	0.01
RRT 0.71	0.01
半乳糖醇	0.002
RRT 1.02	0.001
RRT 1.07	0.01

表 13

環境實驗室條件：	
時間點(小時)	回復(相較於初始，%)
0	N/A
2	100
4	99
8	99
27	101
52	99
2-8°C：	
時間點(小時)	回復(相較於初始，%)
0	N/A
2	100
4	100
8	99
25	100
48	100

表 14

## 環境實驗室條件

試樣名稱	含量(%)						絕對差(%)				
	0h	2h	4h	8h	25h	48h	2h	4h	8h	25h	48h
RRT 0.48	0.15	0.16	0.15	0.16	0.18	0.17	0.01	0.004	0.01	0.03	0.02
RRT 0.51	0.32	0.32	0.32	0.31	0.33	0.33	0.002	0.01	0.01	0.01	0.01
RRT 0.56	0.37	0.36	0.36	0.36	0.38	0.38	0.01	0.004	0.01	0.02	0.01
半乳糖醇	0.19	0.19	0.20	0.19	0.21	0.20	0.001	0.01	0.003	0.02	0.01
RRT 1.02	0.12	0.11	0.12	0.11	0.13	0.12	0.004	0.01	0.01	0.01	0.01
RRT 1.07	0.15	0.14	0.13	0.13	0.16	0.14	0.01	0.02	0.02	0.01	0.01
RRT 1.19	0.11	0.10	0.10	0.10	0.11	0.09	0.002	0.01	0.004	0.01	0.01
RRT 1.27	0.08	0.09	0.07	0.08	0.08	0.08	0.004	0.01	0.002	0.002	0.004
試樣名稱	含量(%)						相較於初始的百分比(%)				
	0h	2h	4h	8h	25h	48h	2h	4h	8h	25h	48h
RRT 0.71	1.24	1.24	1.22	1.22	1.24	1.21	100	98	98	100	98

表 15

2-8°C

試樣名稱	含量(%)						絕對差(%)				
	0h	2h	4h	8h	27h	52h	2h	4h	8h	27h	52h
RRT 0.48	0.15	0.16	0.17	0.18	0.25	0.29	0.002	0.01	0.02	0.1	0.1
RRT 0.51	0.32	0.31	0.32	0.32	0.34	0.32	0.01	0.001	0.002	0.02	0.005
RRT 0.56	0.36	0.35	0.37	0.36	0.37	0.36	0.01	0.01	0.0004	0.01	0.001
半乳糖醇	0.23	0.24	0.24	0.25	0.25	0.24	0.004	0.01	0.01	0.02	0.01
RRT 1.02	0.11	0.12	0.12	0.12	0.13	0.13	0.01	0.01	0.003	0.02	0.01
RRT 1.07	0.15	0.14	0.14	0.15	0.18	0.15	0.002	0.01	0.0005	0.03	0.001
RRT 1.19	0.10	0.09	0.09	0.09	0.10	0.10	0.01	0.01	0.01	0.001	0.01
RRT 1.22~1.23	0.08	0.09	0.08	0.07	0.09	0.08	0.01	0.003	0.01	0.01	0.0004
RRT 1.27	0.10	0.10	0.09	0.10	0.10	0.09	0.002	0.01	0.0003	0.003	0.01
試樣名稱	含量(%)						相較於初始的百分比(%)				
	0h	2h	4h	8h	27h	52h	2h	4h	8h	27h	52h
RRT 0.71	1.10	1.13	1.11	1.12	1.13	1.12	103	101	102	103	102

【0098】系統適合性的進一步細節係顯示於下表 16 及 17，顯示滿足回復一致性的標準。

表 16

執行編號	空白	S/N	相關(r)	RSD	拖尾 因子	標準回 復	定標回復
執行 1	滿足	23	0.9959	0.3%	滿足	99%	99%, 98%, 98%, 97%, 96%, 96%, 96%, 96%, 96%, 96%,
執行 2	滿足	19	0.9974	0.02%	滿足	100%	100%
執行 3	滿足	14	0.9975	0.1%	滿足	98%	100%
執行 4	滿足	12	0.9973	0.01%	滿足	97%	100%
執行 5	滿足	14	0.9975	0.1%	滿足	101%	100%
執行 6	滿足	13	0.9939	0.2%	滿足	99%	100%
執行 7	滿足	13	0.9948	0.5%	滿足	98%	99%

表 17

執行編號	空白	S/N	相關(r)	RSD	拖尾 因子	標準回復	定標回復
執行 8	滿足	14	0.9983	0.02%	滿足	100%	100%, 100%, 100%, 100%, 100%
執行 9	滿足	10	0.9981	0.1%	滿足	100%	100%, 100%, 100%, 100%
執行 10	滿足	13	0.9988	0.1%	滿足	100%	100%, 100%, 100%, 100%

【0099】第 1 圖係顯示空白組、新製錠劑試樣、標準溶液、及偽試樣溶液的重疊層析圖(DAG 為二脫水半乳糖醇及 DBD 為二溴半乳糖醇)。於第 1 圖中，於 DAG 峰、DBD 及半乳糖醇的滯留時間未觀察到顯著干擾峰，故明確建立此等物質的解析。於試樣及標準液中 DAG 峰的滯留時間係落入於±5%以內。

【0100】第 5 圖係顯示試樣溶液中的雜質。半乳糖醇除外的雜質包括於 0.48、0.51、0.56、0.71、1.02、1.07、1.19、1.23、及 1.27 之相對滯留時間(RRT)的雜質。

【0101】下表 18 顯示半乳糖醇之線性度結果。

表 18

位準	實際濃度 (mg/mL)	Lg(實際 濃度)	峰面積	Lg(峰面 積)	斜率	y-截距	相關(r)
0.1%	0.00797	-2.0985	11663	4.0668	1.7212	7.7258	0.9985
0.5%	0.03985	-1.3996	236370	5.3736			
1.0%	0.07970	-1.0985	774592	5.8891			
2.0%	0.15940	-0.7975	2238583	6.3500			
3.0%	0.23910	-0.6214	3939708	6.5955			

【0102】下表 19 顯示半乳糖醇的準確結果。

表 19

位準	重複	峰面積	回復%	平均回復 %(n=3)	RSD%(n=3)
對照	1	0	N/A	N/A	N/A
	2	0			
	3	0			
0.5%	1	253384	117.95	120	2.1
	2	254422	118.22		
	3	270620	122.46		
1.0%	1	839048	116.78	116	0.9
	2	829611	116.03		
	3	812409	114.65		
3.0%	1	4021051	95.18	95	0.1
	2	4003232	94.94		
	3	4004851	94.96		

【0103】下表 20 顯示執行 1 的精度(可重複性)結果。

表 20

峰名稱	含量 (%, #1)	含量 (%, #2)	含量 (%, #3)	含量 (%, #4)	含量 (%, #5)	含量(%, #6)	平均含 量(%)	RSD% (n=6)
RRT 0.48	0.17	0.17	0.17	0.18	0.18	0.18	0.18	2.9
RRT 0.51	0.33	0.34	0.33	0.34	0.34	0.34	0.34	1.1
RRT 0.56	0.27	0.28	0.27	0.28	0.28	0.28	0.28	1.0
RRT 0.71	1.06	1.07	1.07	1.05	1.07	1.06	1.06	0.7
半乳糖醇	0.15	0.16	0.15	0.16	0.15	0.15	0.15	2.9
RRT 1.02	0.09	0.08	0.09	0.08	0.08	0.08	0.08	5.2
RRT 1.07	0.08	0.08	0.09	0.08	0.08	0.08	0.08	4.0

【0104】下表 21 顯示執行 2 的精度(可重複性)結果。

表 21

峰名稱	含量 (%, #1)	含量 (%, #2)	含量 (%, #3)	含量 (%, #4)	含量 (%, #5)	含量 (%, #6)	平均 含量 (%)	RSD%(n=6)
RRT 0.48	0.22	0.23	0.22	0.23	0.23	0.23	0.23	1.5
RRT 0.56	0.35	0.34	0.34	0.34	0.35	0.35	0.35	1.8
RRT 0.71	0.67	0.68	0.67	0.68	0.67	0.67	0.67	0.8
半乳糖醇	0.20	0.20	0.21	0.20	0.20	0.20	0.20	1.8
RRT 1.07	0.21	0.21	0.21	0.21	0.21	0.19	0.21	3.8
RRT 1.19	0.14	0.15	0.15	0.15	0.15	0.16	0.15	2.8
RRT 1.27	0.12	0.14	0.12	0.11	0.14	0.11	0.12	10.1

【0105】下表 22 顯示 P-0.5%的精度(可重複性)結果。

表 22

峰名稱	含量 (%)	平均含量 (%)	含量之 RSD(%, n=6)
半乳糖醇	0.5796	0.59	0.9
	0.5789		
	0.5878		
	0.5930		
	0.5890		
	0.5859		

【0106】下表 23 顯示半乳糖醇的精度結果(中間產物精度)。

表 23

分析物	含量(%)	平均含量 (% , n=12)	含量之 RSD(% , n=12)
第一	0.5796	0.58	2.1
	0.5789		
	0.5878		
	0.5930		
	0.5890		
	0.5859		
第二	0.5683		
	0.5570		
	0.5716		
	0.5682		
	0.5618		
	0.5597		

【0107】下表 24 顯示帶有 ELSD 溫度變異的研究結果。

表 24

試樣名稱	含量%40℃	含量%39℃	含量%41℃	39℃與 40℃間之絕對差	41℃與 40℃間之絕對差
RRT0.48	0.1787	0.1704	0.1795	0.01	0.001
RRT0.51	0.3164	0.3113	0.3163	0.01	0.0001
RRT0.56	0.3021	0.2992	0.3096	0.003	0.01
RRT0.71	0.8608	0.8961	0.8724	0.04	0.01
半乳糖醇	0.1814	0.1660	0.1789	0.02	0.002
RRT1.02	0.1037	0.0932	0.1044	0.01	0.001
RRT1.07	0.1094	0.1005	0.1197	0.01	0.01

【0108】下表 25 顯示帶有 ELSD 氣體壓力變異的研究結果。

表 25

試樣名稱	含量% 2.5 巴	含量% 2.6 巴	含量% 2.4 巴	2.6 巴與 2.5 巴間之絕對差	2.4 巴與 2.5 巴間之絕對差
RRT0.48	0.2041	0.2051	0.2092	0.001	0.01
RRT0.51	0.2511	0.2616	0.2651	0.01	0.01
RRT0.56	0.2626	0.2687	0.2694	0.01	0.01
RRT0.71	0.8570	0.8730	0.8771	0.02	0.02
半乳糖醇	0.1591	0.1631	0.1578	0.004	0.001

【0109】下表 26 顯示針對執行 1 於 2-8℃ 的標準液安定性結果。

表 26

時間點	濃度(mg/mL)	試驗(%)	回復(相較於 初始, %)
0h	0.0895	109.233	N/A
2h	0.0894	109.076	100
4h	0.0895	109.164	100
8h	0.0888	108.302	99
25h	0.0894	109.056	100
48h	0.0893	108.947	100

【0110】 下表 27 顯示針對執行 2 於 2-8°C 的標準液安定性結果。

表 27

試樣名稱	含量(%)						絕對差(%)				
	0h	2h	4h	8h	25h	48h	2h	4h	8h	25h	48h
RRT 0.48	0.15	0.16	0.15	0.16	0.18	0.17	0.01	0.004	0.01	0.03	0.02
RRT 0.51	0.32	0.32	0.32	0.31	0.33	0.33	0.002	0.01	0.01	0.01	0.01
RRT 0.56	0.37	0.36	0.36	0.36	0.38	0.38	0.01	0.004	0.01	0.02	0.01
半乳糖醇	0.19	0.19	0.20	0.19	0.21	0.20	0.001	0.01	0.003	0.02	0.01
RRT 1.02	0.12	0.11	0.12	0.11	0.13	0.12	0.004	0.01	0.01	0.01	0.01
RRT 1.07	0.15	0.14	0.13	0.13	0.16	0.14	0.01	0.02	0.02	0.01	0.01
RRT 1.19	0.11	0.10	0.10	0.10	0.11	0.09	0.002	0.01	0.004	0.01	0.01
RRT 1.27	0.08	0.09	0.07	0.08	0.08	0.08	0.004	0.01	0.002	0.002	0.004
試樣名稱	含量(%)						相較於初始的百分比(%)				
	0h	2h	4h	8h	25h	48h	2h	4h	8h	25h	48h
RRT 0.71	1.24	1.24	1.22	1.22	1.24	1.21	100	98	98	100	98

【0111】下表 28 顯示針對執行 1 於環境實驗室條件的標準液安定性結果。

表 28

時間點	濃度 (mg/mL)	試驗 (%)	回復(相較於初 始, %)
0h	0.0898	109.944	N/A
2h	0.0897	109.778	100
4h	0.0891	109.059	99
8h	0.0887	108.590	99
25h	0.0903	110.553	101
48h	0.0891	108.986	99

【0112】下表 29 顯示針對執行 2 於環境實驗室條件的標準液安定性結果。

表 29

試樣名稱	含量(%)						絕對差(%)				
	0h	2h	4h	8h	27h	52h	2h	4h	8h	27h	52h
RRT 0.48	0.15	0.16	0.17	0.18	0.25	0.29	0.002	0.01	0.02	0.1	0.1
RRT 0.51	0.32	0.31	0.32	0.32	0.34	0.32	0.01	0.001	0.002	0.02	0.005
RRT 0.56	0.36	0.35	0.37	0.36	0.37	0.36	0.01	0.01	0.0004	0.01	0.001
半乳糖醇	0.23	0.24	0.24	0.25	0.25	0.24	0.004	0.01	0.01	0.02	0.01
RRT 1.02	0.11	0.12	0.12	0.12	0.13	0.13	0.01	0.01	0.003	0.02	0.01
RRT 1.07	0.15	0.14	0.14	0.15	0.18	0.15	0.002	0.01	0.0005	0.03	0.001
RRT 1.19	0.10	0.09	0.09	0.09	0.10	0.10	0.01	0.01	0.01	0.001	0.01
RRT 1.22~1.23	0.08	0.09	0.08	0.07	0.09	0.08	0.01	0.003	0.01	0.01	0.0004
RRT 1.27	0.10	0.10	0.09	0.10	0.10	0.09	0.002	0.01	0.0003	0.003	0.01
試樣名稱	含量(%)						相較於初始的百分比(%)				
	0h	2h	4h	8h	27h	52h	2h	4h	8h	27h	52h
RRT 0.71	1.10	1.13	1.11	1.12	1.13	1.12	103	101	102	103	102

【0113】針對分析方法建立下列接受度標準。

【0114】針對系統適合性/層析參數的接受度標準

【0115】此等接受度標準係針對特異性、檢測極限 (LOD)、定量極限 (LOQ) 及穩健度的參數。至於空白組 (稀釋劑)，系統需要乾淨且穩定及於半乳糖醇之滯留時間於空白組層析圖中未觀察到干擾峰。若存在有任何干擾，則干擾

不應大於敏感度溶液中之半乳糖醇峰。至於敏感度溶液，敏感度溶液中的半乳糖醇峰之信號對雜訊比(S/N)須不小於 10。至於相關度(r)，針對 L-0.2%、L-1%及 L-5%#1(第一次注入)對數校準曲線的相關度須不小於 0.980。至於標準液，針對 STD#1 (L-5%#1)的頭五次初始注入中半乳糖醇的 Lg(峰面積)的相對標準差(RSD)須 $\leq 5\%$ 。STD#1(L-5%#1)的第一次注入中半乳糖醇峰的拖尾因子須 $\leq 2.0$ 。STD#2 (L-5%#2)的回復須落入 95%-105%以內。為了定標標準液，定標注入的 Lg(峰面積)與 STD#1(L-5%#1)的頭五次初始注入的平均 Lg(峰面積)間之比須落入 95%-105%以內。

【0116】此等接受度標準係針對線性度、範圍、精度(可重複性及中間產物)、準確度及溶液安定性的參數。至於空白組(稀釋劑)，系統需要乾淨且穩定及於半乳糖醇之滯留時間於空白組層析圖中未觀察到干擾峰。若存在有任何干擾，則干擾不應大於敏感度溶液中之半乳糖醇峰。至於敏感度溶液，敏感度溶液中的半乳糖醇峰之信號對雜訊比(S/N)須不小於 10。至於相關度(r)，針對 L-0.2%、L-1%及 L-3%#1(第一次注入)對數校準曲線的相關度須不小於 0.980。至於標準液，針對 STD#1 (L-3%#1)的頭五次初始注入中半乳糖醇的 Lg(峰面積)的相對標準差(RSD)須 $\leq 5\%$ 。STD#1(L-3%#1)的第一次注入中半乳糖醇峰的拖尾因子須 $\leq 2.0$ 。STD#2(L-3%#2)的回復率須落入 95%-105%以內。為了定標標準液，定標注入的 Lg(峰面積)與 STD#1(L-3%#1)的頭五次初始注入的平均 Lg(峰面積)間之比須落入

95%-105%以內。

【0117】至於特異性，於稀釋劑層析圖中在 DAG 峰、DBD 及半乳糖醇之滯留時間未觀察到顯著干擾峰。若存在有任何干擾峰，則對 DAG 的干擾不應大於敏感度溶液中的半乳糖醇峰。於試樣及標準液中 DAG 峰的滯留時間係實質上相同( $\pm 5\%$ 以內)。

【0118】至於檢測極限(LOD)，信號對雜訊比(S/N)須不小於 3。

【0119】至於定量極限(LOQ)，信號對雜訊比(S/N)須不小於 10。

【0120】至於線性度及範圍，相關係數(r)須不小於 0.980。

【0121】至於準確度，針對各個位準的平均回復(n=3)須在 80%-120%以內。

【0122】至於精度及可重複性，及 0.5%及以上之位準，相對標準差須為 $\leq 20\%$ 。

【0123】至於中間產物精度，組合 RSD%須為 $\leq 20\%$ 。

【0124】至於穩健度，針對雜質 $\leq 1.0\%$ 絕對差須不大於 0.2%。針對雜質 $> 1.0\%$ ，相對差須調控在 $\pm 20\%$ 以內。不應觀察到新雜質。此等穩健度標準適用於 ELSD 氣體壓力及 ELSD 溫度的變化。

【0125】至於溶液安定性，老化溶液的回復須落入初始分析試驗的 85%-115%以內。至於試樣針對 $\leq 1.0\%$ 雜質，絕對差異須不大於 0.2%。針對 $> 1.0\%$ 雜質，老化溶液的結

果須落入初始結果的 80%-120%以內。須觀察無新雜質  $\geq 1.0\%$ 。

【0126】於環境實驗室條件，滿足全部接受度標準長達 52 小時時間。於冷藏條件(2-8°C)，滿足全部接受度標準長達 48 小時時間。

#### 【0127】結論

【0128】於本實施例中描述的分析系統及方法滿足針對敏感度、精度、穩健度、安定性、及信號對雜訊比、包括於檢測極限的信號對雜訊比的全部標準。據此，本分析系統及方法用於二脫水半乳糖醇及出現於二脫水半乳糖醇製劑中的雜質，包括半乳糖醇、二溴半乳糖醇、及其它雜質的分析上是有用的。

【0129】依據本發明之方法用於二脫水半乳糖醇製劑之分析與二脫水半乳糖醇製劑中的雜質之測定及定量上具有工業應用性。

【0130】就數值範圍而言，除非上下文另行明白指示，否則本發明涵蓋在該範圍的上限與下限間之各個中介數值至該下限之單位的至少十分之一。再者，除非從所述範圍特別排除，否則本發明涵蓋任何其它所述中介數值及範圍，含該範圍的上限與下限中之任一者或兩者。

【0131】除非另行界定，否則本文中使用的全部技術及科學術語的意義乃業界熟諳技藝人士通常瞭解本發明所屬的意義。業界熟諳技藝人士也將瞭解相似於或相當於本文中描述的任何方法及材料也可使用以實施或測試本發

明。

【0132】本文中討論的公開案及專利案只因為其在本案提出申請日期之前揭示而予提供。本文中並不解釋為承認其為先前技術發明而此等公開文獻比本發明的日期早。又，所提供的公開日期可能與實際公開日期不同，可能需要個別確定。

【0133】引述的全部公開文獻係全文以參考的方式併入本文，包括全部已公開的專利案、專利申請案、及參考文獻、以及已經融入該等公開文件中的該等公開文獻。然而，於以參考的方式併入本文的任何公開文獻述及的欲公開資訊範圍中，發明人並不承認在本案提出申請日期以後公開的任何此等資訊為先前技術。

【0134】如於本說明書及於隨附之申請專利範圍中使用，單數形包括複數形。舉例言之，除非上下文另行明白指示，否則術語「一(a)」、「一(an)」、及「該」包括述及複數。此外，須瞭解在一串列元件前方的術語「至少」係指該等串列中的每個元件。本文中例示性描述的發明可於本文中未特別揭示的任何元件、限制不存在下實施。如此，例如，術語「包含」、「包括」、「含有」等須被擴大解讀而非限制性。此外，本文中採用的術語及表示法已經用作為描述性術語而非限制性，非意圖於此等術語及表示法的使用中排除所顯示的及描述的任何未來相當用法或其任何部分，及須瞭解於本案所請範圍以內各種修改皆屬可能。如此，須瞭解雖然已藉較佳具體例及選擇性特徵特

別揭示本發明，但熟諳技藝人士可訴諸本文揭示的發明之修改及變化，及此等修改及變化被視為落入於本文揭示的發明之範圍內。本文中已經廣義地通俗地描述本發明。落入於通用揭示內容範圍內的各個更狹窄種類及亞屬分類也構成本發明之一部分。如此包括各發明的通用描述，但先決條件或負面限制從該種類中去除任何主題，而與所實施的材料是否特別駐在其中獨立無關。此外，當發明特徵或態樣係以馬庫西群組(Markush group)描述時，熟諳技藝人士將瞭解藉此本發明也係以馬庫西群組的任何個別成員或子群組成員描述。也須瞭解前文詳細說明部分意圖為例示性而非限制性。當綜覽前文詳細說明部分時許多具體例將為熟諳技藝人士顯然易知。因此本發明之範圍並非參照前文描述決定，而是以參照隨附之申請專利範圍連同此等申請專利範圍所享有的完整相當範圍而確定。無需使用超過例示性實驗，熟諳技藝人士將瞭解或認清所描述之本發明的特定具體例的許多相當例。意圖此等相當例係由如下申請專利範圍所涵蓋。

### **【符號說明】**

**【0135】**

無。

## 申請專利範圍

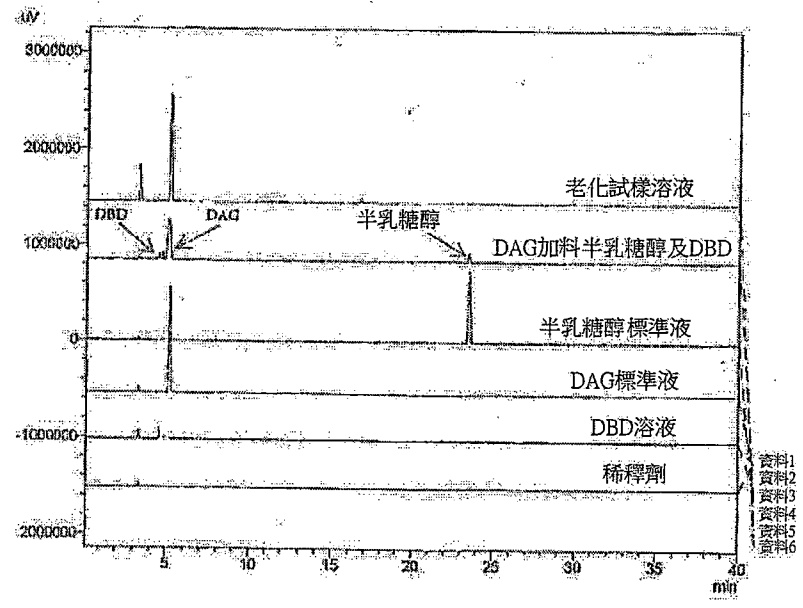
1. 一種分析存在於二脫水半乳糖醇製劑中的雜質之存在及數量的分析方法，其包含下列步驟：
  - (a)使用在親水交互作用模式及乙烯架橋混合(BEH)技術中採用醯胺化學的逆相醯胺管柱讓該製劑接受高效液相層析術以分析二脫水半乳糖醇製劑，使用動相梯度洗提，其中第一移動相為 100%乙腈及第二移動相為 100%水，以從該製劑的半乳糖醇及其它污染物中分離二脫水半乳糖醇；及
  - (b)判定藉高效液相層析術所解析的表示二脫水半乳糖醇本身以外的化合物之一或多個峰的相對濃度。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中，該方法檢測及定量下列中之至少一者：(1)半乳糖醇；(2)二溴半乳糖醇；(3)半乳糖醇以外的雜質；及(4)二脫水半乳糖醇之分解產物。
3. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中，該流速為約 0.72 毫升/分鐘至約 0.88 毫升/分鐘。
4. 如申請專利範圍第 3 項所述之方法，其中，該流速為約 0.80 毫升/分鐘。
5. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中，該洗提方案為(1)0.00 分鐘，90%之 100%乙腈，10%之 100%水；(2)3.00 分鐘，90%之 100%乙腈，10%之 100%水；(3)20.00 分鐘，75%之 100%乙腈，25%之 100%水；(4)25.00 分鐘，50%之 100%乙腈，50%之 100%水；(5)30.00 分鐘，50%之

- 100%乙腈，50%之 100%水；(6)30.10 分鐘，90%之 100%乙腈，10%之 100%水；及(7)40.00 分鐘，90%之 100%乙腈，10%之 100%水。
6. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中，該注入體積為約 15 微升至約 35 微升。
  7. 如申請專利範圍第 6 項所述之方法，其中，該注入體積為約 25 微升。
  8. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中，該管柱溫度為約 28°C 至約 32°C。
  9. 如申請專利範圍第 8 項所述之方法，其中，該管柱溫度為約 30°C。
  10. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中，該執行執行時間為約 40 分鐘。
  11. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中，該注入器溫度為約 5°C。
  12. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中，該注入器溫度為約 20°C 至約 22°C。
  13. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中，該方法包括以 100%乙腈洗滌針頭。
  14. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中，檢測係利用蒸發光散射(ELSD)。
  15. 如申請專利範圍第 14 項所述之方法，其中，該蒸發光散射檢測包含揮發性溶劑的管柱後添加以增進任何存在的移動相之水性分量的蒸發。

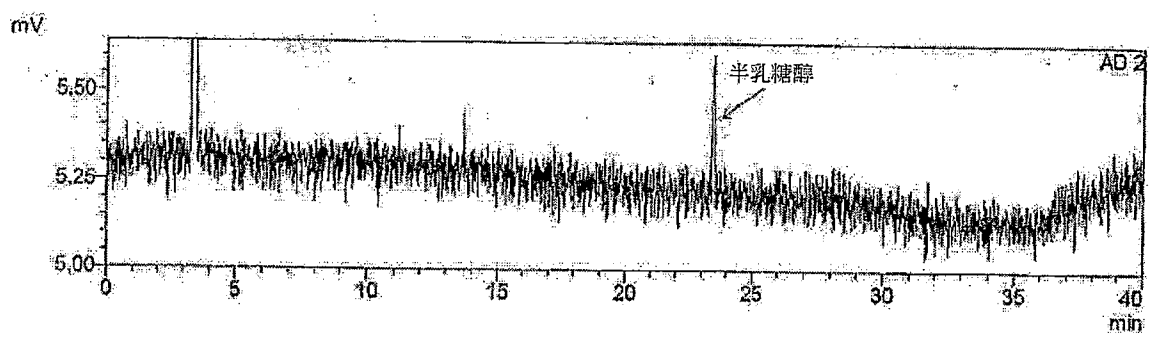
16. 如申請專利範圍第 15 項所述之方法，其中，該揮發性溶劑係選自於由甲醇、乙醇、異丙醇、及乙腈所組成的組群。
17. 如申請專利範圍第 14 項所述之方法，其中，該 ELSD 檢測條件為約 36°C 至約 44°C 之溫度，約 2.0 巴至約 3.0 巴之氣體壓力，及增益 7。
18. 如申請專利範圍第 17 項所述之方法，其中，該 ELSD 檢測條件為約 38°C 至約 42°C 之溫度，約 2.25 巴至約 2.75 巴之氣體壓力，及增益 7。
19. 如申請專利範圍第 18 項所述之方法，其中，該 ELSD 檢測條件為約 40°C 之溫度，約 2.5 巴之氣體壓力，及增益 7。
20. 如申請專利範圍第 14 項所述之方法，其中，該蒸發光散射檢測係與電噴灑 LC/MS 可相容。
21. 如申請專利範圍第 20 項所述之方法，其中，電噴灑串聯式質譜儀係經安裝及線上連結到配合 ELSD 的 HPLC 系統。
22. 如申請專利範圍第 21 項所述之方法，其中，收集針對可存在於二脫水半乳糖醇製劑中的該等雜質及降解產物各者所提供化學資訊的串聯式質譜資料。
23. 如申請專利範圍第 22 項所述之方法，其中，與 HPLC 串聯的該質譜術針對該觀察到的雜質及降解產物各者提供分子離子資訊及具有與該分子離子資訊符合一致的分子量之可能化學結構。

24. 如申請專利範圍第 22 項所述之方法，其中，至少一個雜質或降解產物係藉管柱層析術分離，接著藉至少一個純化程序獲得固體未知試樣而予以識別。
25. 如申請專利範圍第 24 項所述之方法，其中，該固體未知試樣係藉選自由下列所組成的組群中之至少一個標準分析程序特徵化加以識別：核磁共振(NMR)、質譜術(MS)、富利葉變換紅外線光譜術(FT-IR)、元素分析、藉 HPLC 之純度測定、及藉卡爾費雪(Karl Fischer)滴定法之水含量測定。
26. 如申請專利範圍第 1 項所述之分析方法，其進一步包含進行製備性 HPLC 收集存在於二脫水半乳糖醇製劑中之至少一個特定物質峰的步驟。
27. 如申請專利範圍第 26 項所述之分析方法，其中，存在於二脫水半乳糖醇製劑中之至少一個特定物質峰為雜質。
28. 如申請專利範圍第 26 項所述之分析方法，其中，存在於二脫水半乳糖醇製劑中之至少一個特定物質峰為降解產物。

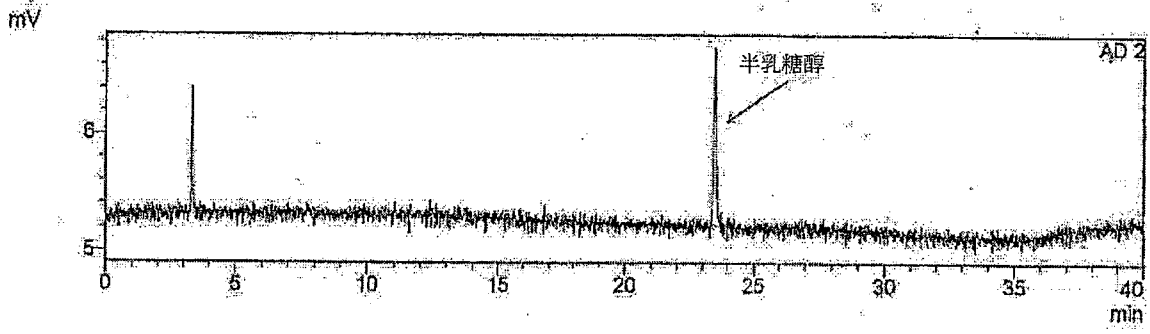
圖式



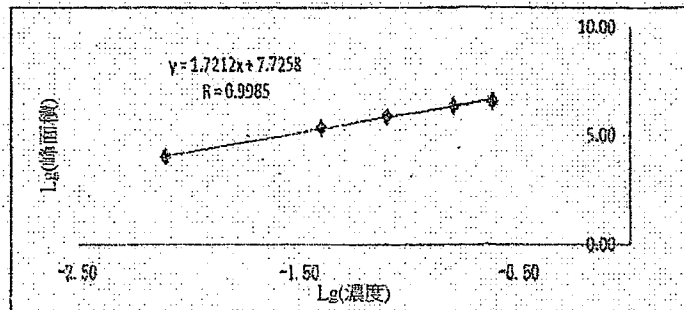
第1圖



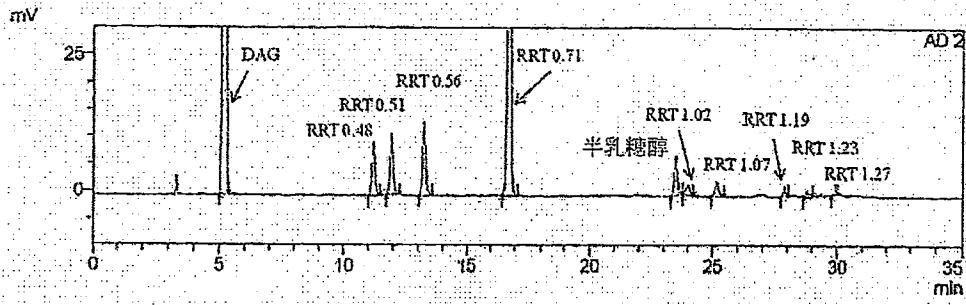
第2圖



第3圖



第4圖



第5圖