



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115308347 A

(43) 申请公布日 2022. 11. 08

(21) 申请号 202211071982.4

(22) 申请日 2022.09.01

(71) 申请人 江苏知原药业股份有限公司

地址 214194 江苏省无锡市锡山区锡北镇
工业园区泾新路35号

(72) 发明人 冯杰 刘永波 蔡蓓蕾

(51) Int. Cl.

G01N 30/06 (2006.01)

G01N 30/34 (2006.01)

G01N 30/60 (2006.01)

G01N 30/72 (2006.01)

G01N 30/86 (2006.01)

权利要求书1页 说明书7页 附图5页

(54) 发明名称

一种托吡司特中氮氧化物杂质的分析方法

(57) 摘要

本发明公开了托吡司特中氮氧化物杂质(杂质F)的分析方法,包括以下步骤:(1)配制杂质F标准溶液;(2)采用液质联用仪定量检测杂质F,进样分析,记录色谱图;以杂质F溶液浓度(x)为横坐标、杂质F峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得线性回归方程和线性图;(3)用步骤(2)得到的线性回归方程或线性图对供试品中杂质F进行外标法定量。本发明采用三重四级杆液质联用仪定量检测杂质F,对测定条件进行了优化,确定了最佳的溶剂体系和流动相等条件,杂质F的线性关系良好,灵敏度高、检测准确,可以更好地控制托吡司特的药品质量,保证临床上用药的安全性。

1. 一种托吡司特中氮氧化物杂质的分析方法,其特征包括以下步骤:

(1) 配制杂质F标准溶液,将杂质F溶解在甲醇-甲酸的水溶液中,配制1.84 ng/mL~37.5 ng/mL的线性溶液;

(2) 采用液质联用仪定量检测杂质F,进样分析,记录色谱图;以杂质F溶液浓度(x)为横坐标、杂质F峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得线性回归方程和线性图;

(3) 用步骤(2)得到的线性回归方程或线性图对供试品中杂质F进行外标法定量。

2. 根据权利要求1所述的托吡司特中氮氧化物杂质的分析方法,其特征是:步骤(1)中标准溶液的浓度为1.84ng/mL、3.75 ng/mL、9.375 ng/mL、18.75 ng/mL、28.125 ng/mL、37.5 ng/mL。

3. 根据权利要求1所述的托吡司特中氮氧化物杂质的分析方法,其特征是:步骤(3)配制供试品时,将供试品用甲醇-甲酸的水溶液超声溶解并稀释,离心,过滤,取续滤液作为供试品溶液。

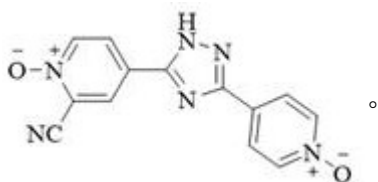
4. 根据权利要求3所述的托吡司特中氮氧化物杂质的分析方法,其特征是:甲醇-甲酸的水溶液中,甲醇和甲酸的水溶液的体积比为30:70~10:90,甲酸的水溶液中甲酸浓度为0.05%~2.0%。

5. 根据权利要求1所述的托吡司特中氮氧化物杂质的分析方法,其特征是:步骤(2)以杂质F溶液浓度(x)为横坐标、杂质F峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得线性回归方程 $y = 1190x - 22.886$ 。

6. 根据权利要求1所述的托吡司特中氮氧化物杂质的分析方法,其特征是:步骤(1)中1.84ng/mL为定量限。

7. 根据权利要求1所述的托吡司特中氮氧化物杂质的分析方法,其特征是:采用液质联用仪检测杂质F时,色谱柱为五氟苯基丙基为固定相的色谱柱;用流动相A 0.2%甲酸的水溶液、流动相B乙腈进行梯度洗脱。

8. 根据权利要求1至7之一所述的托吡司特中氮氧化物杂质的分析方法,其特征是:杂质F的化学结构如下:



一种托吡司特中氮氧化物杂质的分析方法

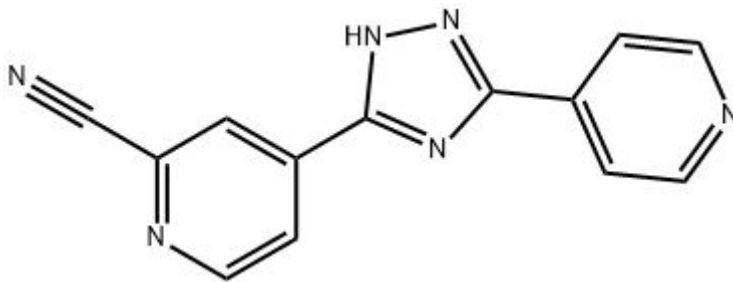
技术领域

[0001] 本发明涉及一种杂质的分析检测方法,具体涉及一种托吡司特中氮氧化物杂质的分析方法。

[0002]

背景技术

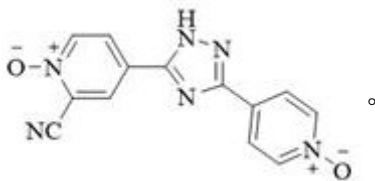
[0003] 托吡司特,英文名称为Topiroxostat,化学名称为4-[5-(吡啶-4-基)-1H-1,2,4-三唑-3-基]吡啶-2-甲腈,分子式为 $C_{13}H_8N_6$,分子量为248.24,CAS号为577778-58-6,化学结构如下:



托吡司特是一种治疗痛风及高尿酸血症的药物,通过抑制黄嘌呤氧化还原酶,抑制尿酸的生成。

[0004] 药品在临床使用中产生的不良反应除了与主成分的药理活性有关外,与药品中存在的杂质也有很大关系。为保证临床用药的安全性,需要严格控制药品中的杂质。

[0005] 托吡司特的化学结构中具有2个吡啶环,吡啶环上的氮很容易被氧化生成氮氧化物(杂质F),化学结构如下:



[0006] 根据药品审评专家马磊发表的文章《遗传毒性杂质的警示结构》(中国新药杂质,2014年第23卷第48期,2106-2111),N-氧化芳香化合物是遗传毒性致癌性杂质,需要在原料药和成品中进行严格的控制,因此需要建立准确的定量方法,设定安全的控制限度。

[0007] 托吡司特片每日最大使用剂量为160mg,根据ICH M7(R1),基于TTC计算杂质F可接受摄入量时,单个致突变杂质每人每天摄入1.5 μ g时其风险认为是可以忽略的(终生暴露情况下理论患癌风险小于十万分之一),杂质F的限度为9.375ppm。

[0008] 中国专利文献CN 113466378A(申请号202110798127.2)公开了一种托吡司特中两个基因毒性杂质的分离和测定方法,包括以下步骤:(1)取托吡司特适量,置于容量瓶中,加稀释剂溶解并稀释,作为供试品溶液;分别取TP02-IMP-A和TP-IMP-A对照品适量,置于容量瓶中,用稀释剂溶解并稀释,作为对照品溶液;(2)精密量取供试品溶液和对照品溶液各50 μ L,分别注入高效液相色谱仪,记录色谱图;(3)分别取托吡司特、TP02-IMP-A和TP-IMP-A对

照品各适量,置于容量瓶中,用稀释剂溶解并稀释,作为系统适用性溶液;(4)精密量取50 μ L系统适用性溶液,注入液相色谱仪,记录色谱图,相邻色谱峰之间的分离度应不小于1.5。

[0009] 中国专利文献CN112379006A(申请号 202011029616.3)公开了一种托吡司特片中杂质C、杂质D和杂质E的检测方法,包括以下步骤:(1)溶液的配制:取托吡司特片细粉适量,加0.1%磷酸水溶液-乙腈(90:10)超声溶解并定量稀释制成浓度为0.15mg/ml的溶液,摇匀,滤过,取续滤液作为供试品溶液;精密量取供试品溶液适量,用0.1%磷酸水溶液-乙腈(90:10)定量稀释制成浓度为0.3 μ g/ml的溶液,作为对照溶液;(2)色谱条件:以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂,采用紫外检测器,采用梯度洗脱程序,A相为0.4%磷酸水溶液,B相为乙腈,洗脱程序为0~15min B相由10%变化为50%,15~37minB相由20%变化为50%,37~42min B相为50%,42min~43min B相由50%变化为10%,43min~50minB相为10%。

[0010] 中国专利文献CN 114527213A(申请号 202210161296.X)公开了一种用于托匹司他的质量检测方法,取起始原料II A、起始原料II B、中间体III、中间体IV、杂质A、杂质B、杂质C、杂质D及成品托匹司他各适量,加甲醇溶解并用起始比例流动相稀释至适宜浓度,在上述流动相条件下依次进样记录色谱图。

[0011] 中国专利文献CN 105301126B(申请号 201510649224.X)公开了一种托匹司他有关物质的分析方法,采用反相高效液相色谱法,以十八烷基硅烷键合硅胶为色谱填料,采用紫外检测器,采用梯度洗脱程序,A相为磷酸氢二钠缓冲溶液,磷酸氢二钠摩尔浓度为0.002mol/L,并用磷酸调节pH为3.4,B相为乙腈,梯度洗脱程序为0~30min,B相比例从10%变为50%,30~31min,B相比例从50%变为10%,31~40min,B相比例为10%。

[0012] 上述文献均未公开托吡司特中氮氧化物杂质的检测方法,但是氮氧化物杂质含量的准确检测和有效控制对于原料药的质量控制又非常重要。上述文献均采用高相液相色谱仪进行托吡司特相关杂质的检测,灵敏度低,无法满足杂质F的检测需求。为了解决杂质F的准确检测问题,需要使用一种高灵敏度的方法。

发明内容

[0013] 本发明所要解决的技术问题是提供一种灵敏度高、检测准确的托吡司特中氮氧化物杂质的分析方法。

[0014] 实现本发明目的的技术方案是一种托吡司特中氮氧化物杂质的分析方法,包括以下步骤:

(1)配制杂质F标准溶液,将杂质F溶解在甲醇-甲酸的水溶液中,配制1.84 ng/mL~37.5 ng/mL的线性溶液。

[0015] (2)采用液质联用仪定量检测杂质F,进样分析,记录色谱图;以杂质F溶液浓度(x)为横坐标、杂质F峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得线性回归方程和线性图。

[0016] (3)用步骤(2)得到的线性回归方程或线性图对供试品中杂质F进行外标法定量。

[0017] 步骤(1)中标准溶液的浓度为1.84ng/mL、3.75 ng/mL、9.375 ng/mL、18.75 ng/mL、28.125 ng/mL、37.5 ng/mL。

[0018] 步骤(3)中配制供试品时,将供试品托吡司特,用甲醇-甲酸的水溶液超声溶解并稀释,离心,过滤,取续滤液作为供试品溶液。

[0019] 作为优选的,甲醇-甲酸的水溶液中,甲醇和甲酸的水溶液的体积比为30:70~10:

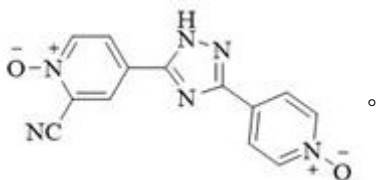
90, 甲酸的水溶液中甲酸浓度为0.05%~2.0%。

[0020] 步骤(2)中以杂质F溶液浓度(x)为横坐标、杂质F峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得线性回归方程 $y = 1190x - 22.886$ 。

[0021] 步骤(1)中1.84ng/mL为定量限。

[0022] 采用液质联用仪检测杂质F时,色谱柱为五氟苯基丙基为固定相的色谱柱;用流动相A 0.2%甲酸的水溶液、流动相B 乙腈进行梯度洗脱。

[0023] 上述杂质F的化学结构如下:



[0024] 本发明具有积极的效果:本发明的采用三重四级杆液质联用仪定量检测杂质F,对测定条件进行了优化,确定了最佳的溶剂体系和流动相等条件,杂质F的线性关系良好,灵敏度高、检测准确,可以更好地控制托吡司特的药品质量,保证临床上用药的安全性。

附图说明

[0025] 图1为1.84ng/mL的杂质F对照品溶液的色谱图。

[0026] 图2为3.75ng/mL的杂质F对照品溶液的色谱图。

[0027] 图3为9.375 ng/mL的杂质F对照品溶液的色谱图。

[0028] 图4为18.75 ng/mL的杂质F对照品溶液的色谱图。

[0029] 图5为28.125 ng/mL的杂质F对照品溶液的色谱图。

[0030] 图6为37.5 ng/mL的杂质F对照品溶液的色谱图。

[0031] 图7为杂质F的线性曲线。

[0032] 图8为杂质F的UV吸收曲线。

[0033] 图9为对比例1中杂质F对照品溶液的液相色谱图。

[0034] 图10为对比例1中杂质F对照品贮备液的液相色谱图。

具体实施方式

[0035] (实施例1)

本实施例的托吡司特中氮氧化物杂质的分析方法包括以下步骤:

①杂质F对照品贮备液配制。精密称取杂质F对照品18.75mg,置100mL容量瓶中,用体积比30:70的甲醇-0.2%甲酸的水溶液超声溶解并稀释至刻度,移取1mL至100mL容量瓶中,用体积比30:70的甲醇-0.2%甲酸的水溶液稀释至刻度,摇匀,作为杂质F对照品贮备液(1.875 μ g/mL)。

[0036] 在本发明中,杂质F用甲醇-甲酸的水溶液溶解,甲醇与甲酸的水溶液的体积比为30:70~10:90,甲酸的水溶液中甲酸浓度为0.05%~2.0%;本实施例中使用的是体积比30:70的甲醇-0.2%甲酸的水溶液。

[0037] ②杂质F对照品溶液配制。移取1mL杂质F对照品贮备液至100mL容量瓶中,用体积比30:70的甲醇-0.2%甲酸的水溶液稀释至刻度,摇匀,作为杂质F对照品溶液(18.75ng/

mL)。

[0038] ③供试品溶液配制。精密称取供试品托吡司特,用体积比30:70的甲醇-0.2%甲酸的水溶液超声溶解并稀释制成每1mL含2mg的溶液,离心,过滤,取续滤液作为供试品溶液(2mg/mL)。

[0039] ④仪器及参数。

[0040] 仪器:岛津LC-MS8050,配ESI离子源。

[0041] 色谱柱:Phenomenex Luna PFP (2) (100*4.6mm,3 μ m);五氟苯基丙基为固定相的色谱柱。

[0042] 流动相A:0.2%甲酸的水溶液,流动相B:乙腈。

[0043] 洗脱模式:梯度。

[0044] 流速:0.3ml/min。

[0045] 柱温:40℃。

[0046] 电离模式:正离子模式扫描。

[0047] 事件模式:SIM。

[0048] 雾化器流量:3L/min。

[0049] 加热气流量:7L/min。

[0050] 接口温度:300℃。

[0051] DL温度:150℃。

[0052] 加热块温度:400℃。

[0053] 干燥器流量:13L/min。

[0054] 事件:m/z281,驻留时间200ms,Q1 Pre -10V,Q3 Pre -17V。

[0055] 进样量:2 μ L。

[0056] 梯度洗脱程序:

时间 (min) ↕	A (%) ↕	B (%) ↕
0↕	90↕	10↕
4↕	50↕	50↕
6↕	90↕	10↕
7↕	90↕	10↕

[0057] ⑤定量限试验

在上述(四)所述条件下,将杂质F对照品溶液,用体积比30:70的甲醇-0.2%甲酸的水溶液不断稀释,然后进样分析,直至获得信噪比不小于10的溶液,作为杂质F定量限溶液。

[0058] 定量限试验结果如下:

定量限溶液浓度 (ng/mL) ↕	与供试品溶液浓度的比值 (%) ↕
1.84↕	0.000092%↕

[0059] ⑥线性试验

精密移取杂质F对照品贮备液0.2mL、0.5mL、1.0mL、1.5mL、2.0mL,分别置不同的100mL容量瓶中,用体积比30:70的甲醇-0.2%甲酸的水溶液稀释至刻度,配制成浓度为3.75 ng/mL、9.375 ng/mL、18.75 ng/mL、28.125 ng/mL、37.5 ng/mL的线性溶液,进样分析,记录色谱图。定量限溶液1.84ng/mL、3.75 ng/mL、9.375 ng/mL、18.75 ng/mL、28.125 ng/mL、37.5 ng/mL杂质F对照品溶液的色谱图见图1至图6。

[0060] 以杂质F溶液浓度(x)为横坐标、杂质F峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,线性回归方程为 $y = 1190x - 22.886$,线性相关系数 $R=0.999$,线性关系良好。线性结果如下,线性图见图7:

线性溶液 [Ⓔ]	溶液浓度 (ng/mL) [Ⓔ]	峰面积 [Ⓔ]
定量限溶液 [Ⓔ]	1.84 [Ⓔ]	2349 [Ⓔ]
20%线性溶液 [Ⓔ]	3.75 [Ⓔ]	4718 [Ⓔ]
50%线性溶液 [Ⓔ]	9.375 [Ⓔ]	11314 [Ⓔ]
100%线性溶液 [Ⓔ]	18.75 [Ⓔ]	21348 [Ⓔ]
150%线性溶液 [Ⓔ]	28.125 [Ⓔ]	33089 [Ⓔ]
200%线性溶液 [Ⓔ]	37.5 [Ⓔ]	45257 [Ⓔ]

[0061] 用线性回归方程或线性图对供试品中托吡司特进行定量。

[0062] ⑦准确度试验

称取托吡司特样品200mg,置100mL容量瓶中,作为回收率基质样品。以杂质F的含量(相当于供试品溶液浓度的0.0009375%)为基准100%,精密移取杂质F对照品贮备液0.8mL、1mL、1.2mL,分别置于盛有基质样品的100mL容量瓶中,混匀,用甲醇-0.2%甲酸的水溶液(体积比30:70)超声溶解并稀释至刻度,配制成杂质F 80%、100%、120%的回收率溶液,每个浓度平行配制三份,见下表:

样品名称 [Ⓔ]	托吡司特样品量 [Ⓔ]	溶液配制方法 [Ⓔ]
基质样品 [Ⓔ]	200mg [Ⓔ]	样品→100mL,用甲醇-0.2%甲酸的水溶液(30:70)超声溶解并稀释至刻度。 [Ⓔ]
80%回收率溶液 (15ng/mL, 7.5ppm) [Ⓔ]	200mg [Ⓔ]	样品→100mL,加入0.8mL杂质F对照品贮备液,用甲醇-0.2%甲酸的水溶液(30:70)超声溶解并稀释至刻度。 [Ⓔ]
	200mg [Ⓔ]	
	200mg [Ⓔ]	
100%回收率溶液 (18.75ng/mL, 9.375ppm) [Ⓔ]	200mg [Ⓔ]	样品→100mL,加入1.0mL杂质F对照品贮备液,用甲醇-0.2%甲酸的水溶液(30:70)超声溶解并稀释至刻度。 [Ⓔ]
	200mg [Ⓔ]	
	200mg [Ⓔ]	
120%回收率溶液 (22.5ng/mL, 11.25ppm) [Ⓔ]	200mg [Ⓔ]	样品→100mL,加入1.2mL杂质F对照品贮备液,用甲醇-0.2%甲酸的水溶液(30:70)超声溶解并稀释至刻度。 [Ⓔ]
	200mg [Ⓔ]	
	200mg [Ⓔ]	

[0063] 精密量取杂质F对照溶液、基质样品溶液、回收率溶液各2 μ L,分别注入液质联用仪,记录色谱图。

[0064] 以各回收率溶液中杂质F的峰面积(应扣除基质样品溶液中杂质F的峰面积),按外标法计算各回收率溶液中杂质F的回收率,试验结果如下:

回收率计算公式:

$$\text{理论加入量} = W_s \times P_s \times 10^6 \times V_s / (100 \times 100 \times 100)$$

$$\text{实际回收量} = A \times F_s$$

$$\text{回收率}(\%) = \text{实际回收量} / \text{理论加入量} \times 100\%$$

式中: W_s :杂质F的称样量(mg), P_s :杂质F对照品的含量, V_s 杂质F对照品贮备液的移

取体积(mL),A:回收率溶液中杂质F的峰面积, F_s :杂质F对照品溶液的浓度与峰面积比。

[0065] 回收率试验结果如下:

样品名称	杂质F峰面积	理论量 (ng/mL)	回收量 (ng/mL)	回收率 (%)
基质样品	1155	/	/	/
80%回收率溶液 (15ng/mL, 7.5ppm)	17978	15.024	14.633	97.4
	17949	15.024	14.949	99.5
	17992	15.024	15.054	100.2
100%回收率溶液 (18.75ng/mL, 9.375ppm)	22050	18.780	19.212	102.3
	21607	18.780	18.480	98.4
	22229	18.780	18.630	99.2
120%回收率溶液 (22.5ng/mL, 11.25ppm)	26398	22.536	22.874	101.5
	26928	22.536	22.468	99.7
	26719	22.536	22.108	98.1
平均回收率 (%)	99.6			
RSD (%)	1.6			

[0066] 从上表可以看出,杂质F的平均回收率为99.6%,RSD为1.6%。

[0067] ⑧溶液稳定性试验

称取托吡司特样品200mg,置100mL容量瓶中,用甲醇-0.2%甲酸的水溶液(体积比30:70)超声溶解并稀释至刻度,作为供试品溶液,然后置于室温条件下进行溶液稳定性考察。分别在0小时、4小时、8小时、12小时、24小时,精密量取供试品溶液2 μ L,注入液质联用仪,记录色谱峰面积。

[0068] 溶液稳定性试验结果如下:

考察时间(小时)	杂质F峰面积
0	1155
4	1065
8	1109
12	1087
24	1176
平均值	1118
RSD (%)	4.1

[0069] 从上表可以看出,供试品溶液在室温下放置24小时,杂质F的含量无明显变化,说明本发明配制的供试品溶液稳定。

[0070] (对比例1、采用液相色谱仪进样分析杂质F对照品溶液)

仪器和方法参数:

仪器:安捷伦1260 II,配紫外检测器。

[0071] 色谱柱:Phenomenex Luna PFP (2) (100*4.6mm,3 μ m)。

[0072] 流动相A:0.2%甲酸的水溶液,流动相B:乙腈。

[0073] 洗脱模式:梯度。

[0074] 流速:0.3mL/min。

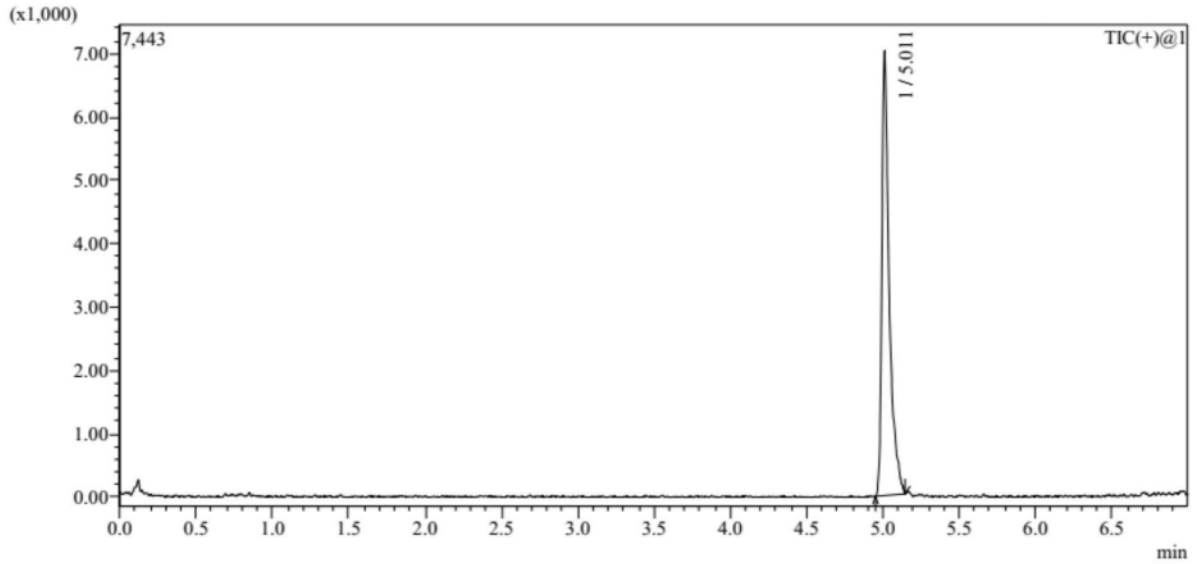
[0075] 柱温:40 $^{\circ}$ C。

[0076] 梯度洗脱程序:

时间 (min)	A (%)	B (%)
0	90	10
15	80	20
37	50	50
42	50	50
43	90	10
50	90	10

[0077] 根据杂质F的UV吸收曲线(见图8),选择最大吸收波长220nm为检测波长。

[0078] 精密量取杂质F对照品贮备液和对照品溶液各20 μ L,分别注入液相色谱仪,记录色谱图,见图9和图10,谱图显示杂质F对照品溶液中杂质F未出峰,因此无法采用液相色谱仪完成托吡司特原料药中杂质F的检测。

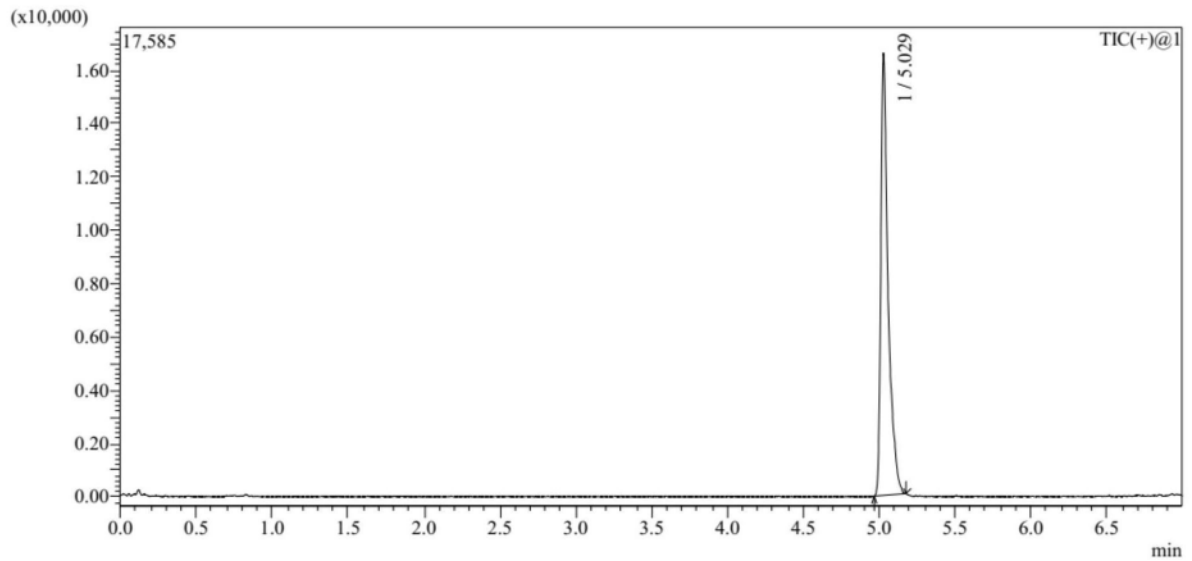


<MS定量表>

MS定量表

ID#	化合物名称	保留时间	m/z	面积	峰高
1	托吡司特杂质F	5.011	281	2349	7029
总计				2349	7029

图1

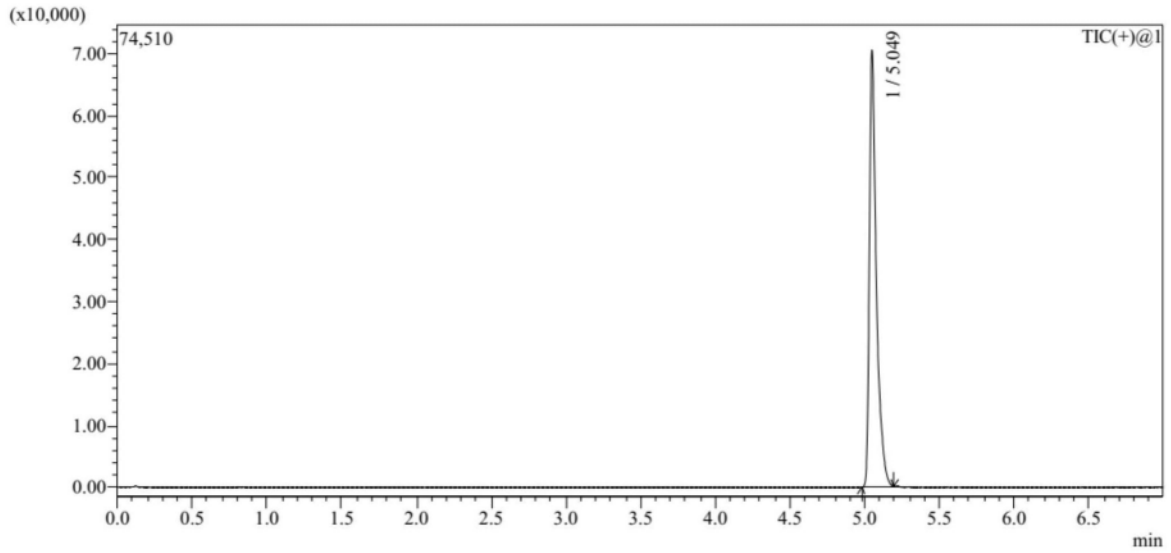


<MS定量表>

MS定量表

ID#	化合物名称	保留时间	m/z	面积	峰高
1	托吡司特杂质F	5.029	281	4718	16624
总计				4718	16624

图2

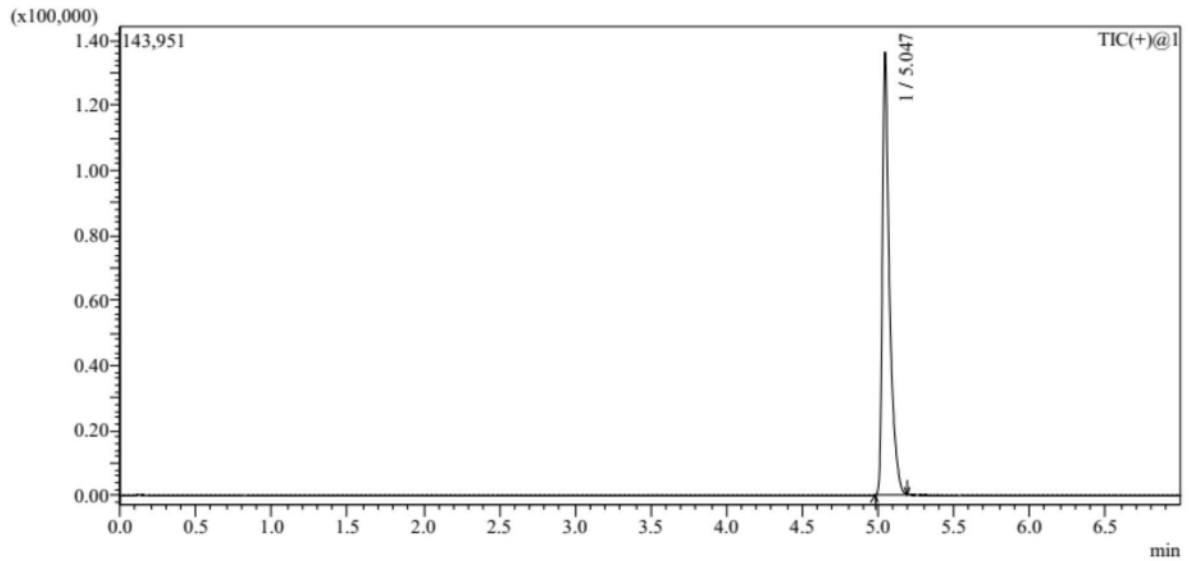


<MS定量表>

MS定量表

ID#	化合物名称	保留时间	m/z	面积	峰高
1	托吡司特杂质F	5.049	281	11314	70516
总计				11314	70516

图3

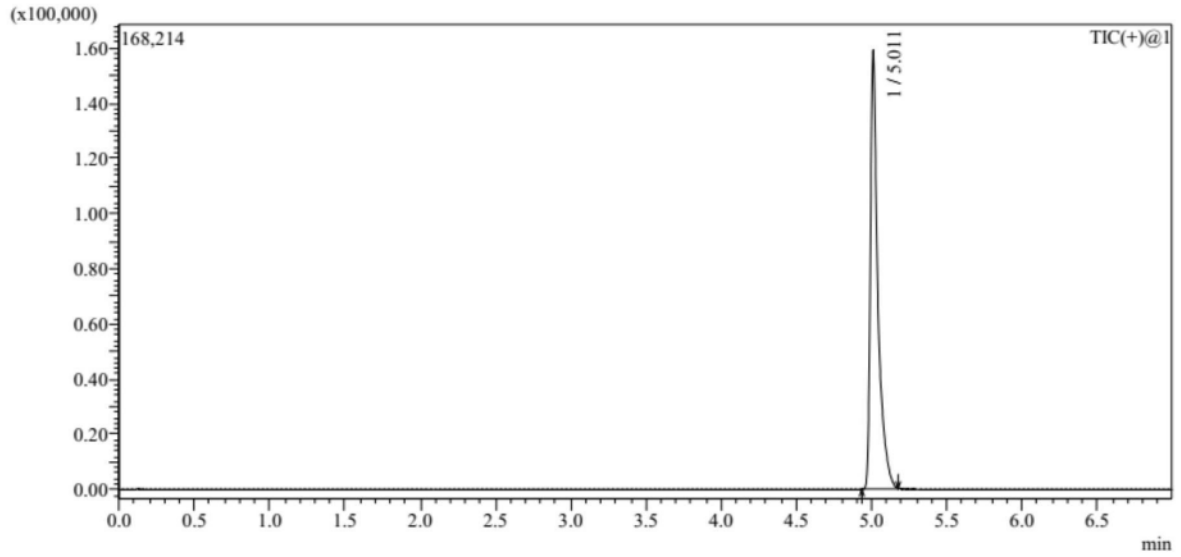


<MS定量表>

MS定量表

ID#	化合物名称	保留时间	m/z	面积	峰高
1	托吡司特杂质F	5.047	281	21348	136169
总计				21348	136169

图4

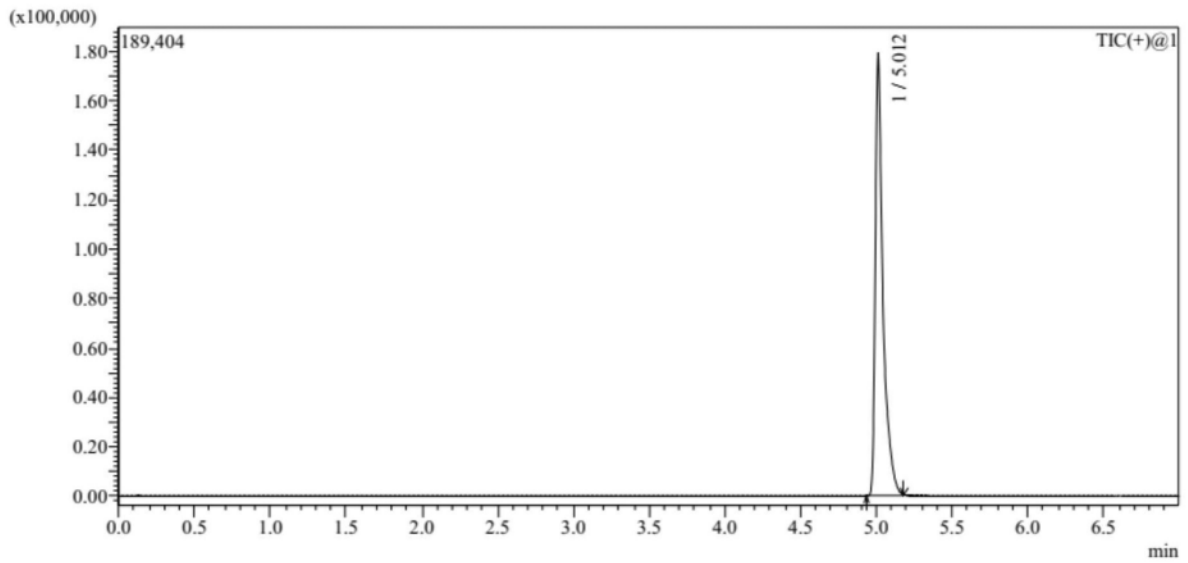


<MS定量表>

MS定量表

ID#	化合物名称	保留时间	m/z	面积	峰高
1	托吡司特杂质F	5.011	281	33089	159129
总计				33089	159129

图5



<MS定量表>

MS定量表

ID#	化合物名称	保留时间	m/z	面积	峰高
1	托吡司特杂质F	5.012	281	45257	179211
总计				45257	179211

图6

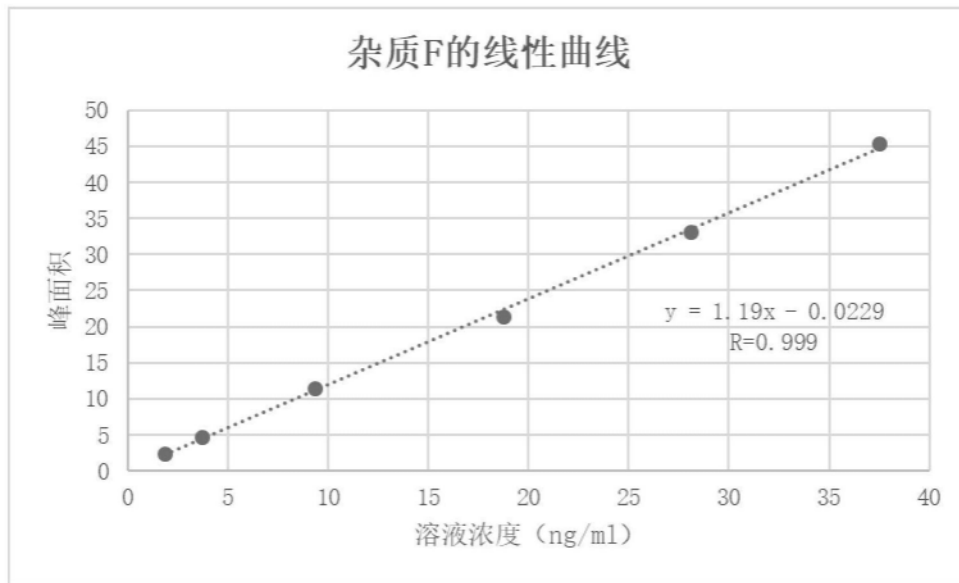


图7

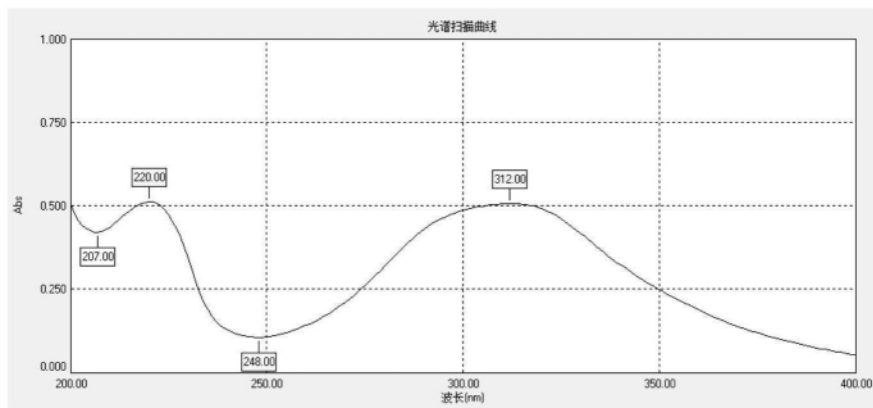


图8

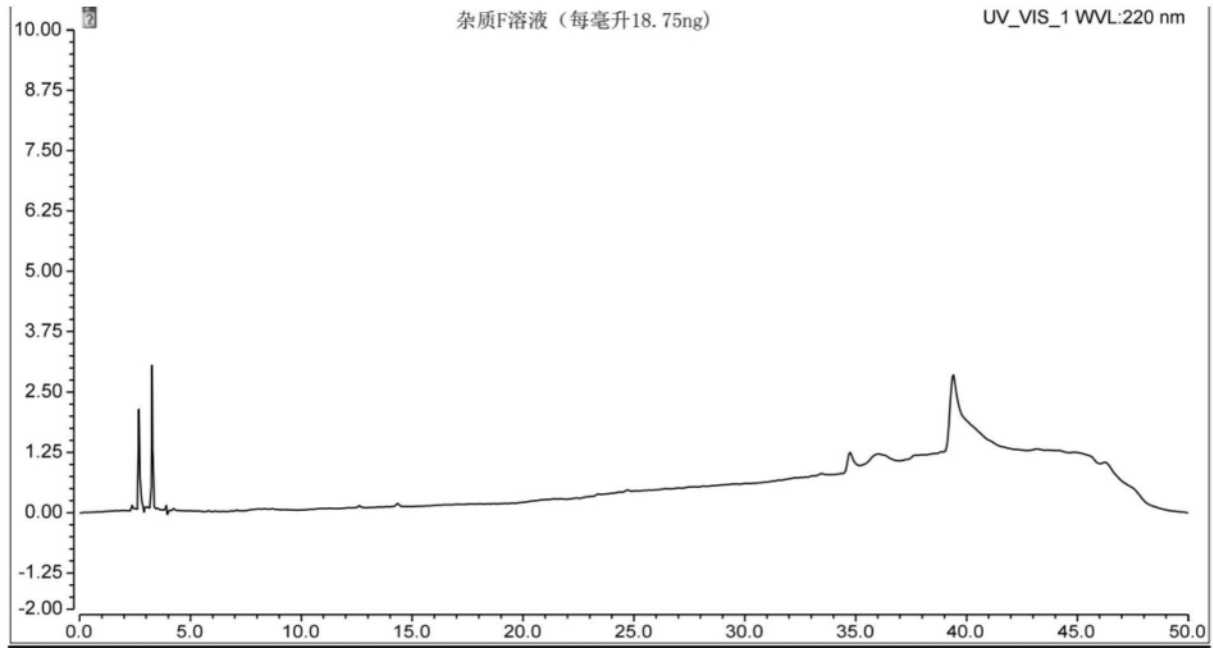


图9

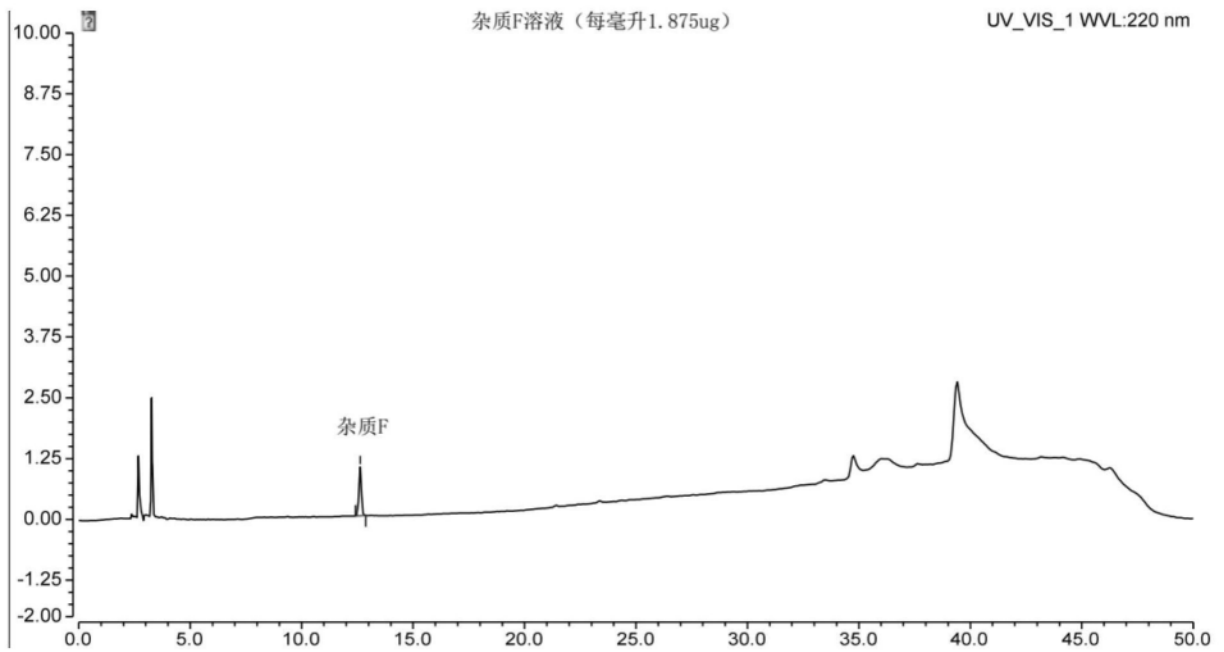


图10