

维兰特罗关键中间体含量分析方法及其有关物质研究

王敬赫¹, 胡庆丰¹, 刘 婕¹, 许 坤², 王红磊², 张文成¹, 吴泽宇¹, 惠爱玲^{1*}

¹合肥工业大学食品与生物工程学院, 安徽 合肥

²安徽德信佳生物医药有限公司, 安徽 阜阳

收稿日期: 2023年8月17日; 录用日期: 2023年8月26日; 发布日期: 2023年9月27日

摘 要

目的: 为建立一种新的HPLC法对维兰特罗中间体5及其有关物质分析检测的方法。方法: 条件采用C18纳谱分析色谱柱(250 × 4.6 mm, 5 μm), 流动相乙腈(A)-水(B), 等度洗脱(80% A), 流速1.0 mL·min⁻¹, 检测波长220 nm, 经制备或半制备色谱分离有关物质, 通过HPLC以及LC-MS分析, 实现对中间体5及其有关物质进行定性和定量分析。结果: 研究表明, 中间体5在一定浓度范围内呈现出良好的线性关系($Y = 38705X + 21.565$), 平均加样回收率为100.61%~104.81%, RSD < 0.2%, 重复性好(RSD < 0.5%), 12 h内供试品溶液稳定(RSD < 2.0%)。利用此方法对中间体5及其有关物质含量进行测定, 中间体5含量为98.0%~99.5%, 主要杂质总含量为0.3%~0.6%, 经定性结构分析判定杂质I (RT 1.47 min)为对甲苯磺酸, 杂质III (RT 2.82 min)为中间体4, 为合成中未除净的原料。结论: 本研究为工艺优化、有效降低或去除杂质及关键中间体的质量控制提供理论和方法支撑。

关键词

维兰特罗, 有关物质, 方法学, 含量测定, 结构解析

Study on the Content Analysis Method of Key Intermediates of Vilanterol and Its Related Substances

Jinghe Wang¹, Qingfeng Hu¹, Jie Liu¹, Kun Xu², Honglei Wang², Wencheng Zhang¹, Zeyu Wu¹, Ailing Hui^{1*}

¹School of Food and Biological Engineering, Hefei University of Technology, Hefei Anhui

²Anhui Dexinjia Biopharm Co., Ltd., Fuyang Anhui

*通讯作者。

文章引用: 王敬赫, 胡庆丰, 刘婕, 许坤, 王红磊, 张文成, 吴泽宇, 惠爱玲. 维兰特罗关键中间体含量分析方法及其有关物质研究[J]. 药物化学, 2023, 11(4): 213-223. DOI: 10.12677/hjmce.2023.114026

Abstract

Objective: In order to establish a new HPLC method for the determination of intermediate 5 of vilanterol and its related substances. **Methods:** The chromatographic analysis was performed on C18 nanoscopic column (250 × 4.6 mm, 5 μm) with mobile phase acetonitrile (A)-water (B) and isodegree elution (80% A), and the flow rate was 1.0 min·mL⁻¹. The detection wavelength was 220 nm, and the related substances were separated by preparative or semi-preparative chromatography. The qualitative and quantitative analysis of intermediate 5 and its related substances was realized by HPLC and LC-MS analysis. **Results:** The results showed that the intermediate 5 showed a good linear relationship in a certain concentration range ($Y = 38705X + 21.565$), the average recovery was 100.61%~104.81%, RSD < 0.2%, and the repeatability was good (RSD < 0.5%). The solution was stable within 12 h (RSD < 2.0%). The content of intermediate 5 and its related substances was determined by this method. The content of intermediate 5 was 98.0%~99.5%, and the total content of major impurities was 0.3%~0.6%. The impurity I (RT 1.47 min) was determined to be p-toluenesulfonic acid by qualitative structural analysis, and the impurity III (RT 2.82 min) was determined to be intermediate 4. It is the raw material not cleaned in synthesis. **Conclusion:** This study provides theoretical and methodological support for process optimization, effective reduction or removal of impurities and quality control of key intermediates.

Keywords

Vilanterol, Related Substances, Methodology, Content Determination, Structural Analysis

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

维兰特罗(vilanterol, (R)-4-[2-[[[6-[(2,6-二氯苄基)氧基]-乙氧基]乙基]氨基]-1-羟基乙基]-2-羟基乙基]-2-羟甲基苯酚)是由葛兰素史克(GSK)公司研发的一种新型长效β₂-肾上腺素受体(β₂-AR)激动剂,能够舒张支气管平滑肌,作为支气管扩张剂用于慢性阻塞性肺疾病的治疗。维兰特罗由于受体亲和力、选择性以及体内活性均优于其它特罗类药物[1] [2] [3],其临床使用率高。

GSK公司于2005年公开维兰特罗的合成工艺[4] [5],其后,Laurus实验室及其它机构相继对维兰特罗及其关键中间体的合成路线进行优化[6]-[11],其降低了成本,更易于工业化生产。在维兰特罗现有合成工艺中,(5R)-5-(2,2-二甲基-4H-1,3-苯并二氧杂环己烯-6-基)-1,3-噁唑烷-2-酮(6)是关键中间体之一,该中间体多由水杨醛或2-溴-1-(2,2-二甲基-4H-1,3-苯并二氧杂环己烯-6-基)乙酮(GSK报道)为起始原料经过一系列反应而得,存在合成步骤长或原子经济性偏低等问题。安徽德信佳生物医药公司开发了一条由维兰特罗中间体5(图1)2-(2,2-二甲基-4H-1,3-苯并二氧杂环己烯-6-基)-2-羰基乙基氨基甲酸叔丁酯经环合反应得到中间体6的绿色制备工艺[12](图1)。该工艺在一定程度上能提升反应专一性,提高产率,并且实现了催化剂回收套用,减轻了环保压力,符合现代绿色工业化生产的要求。

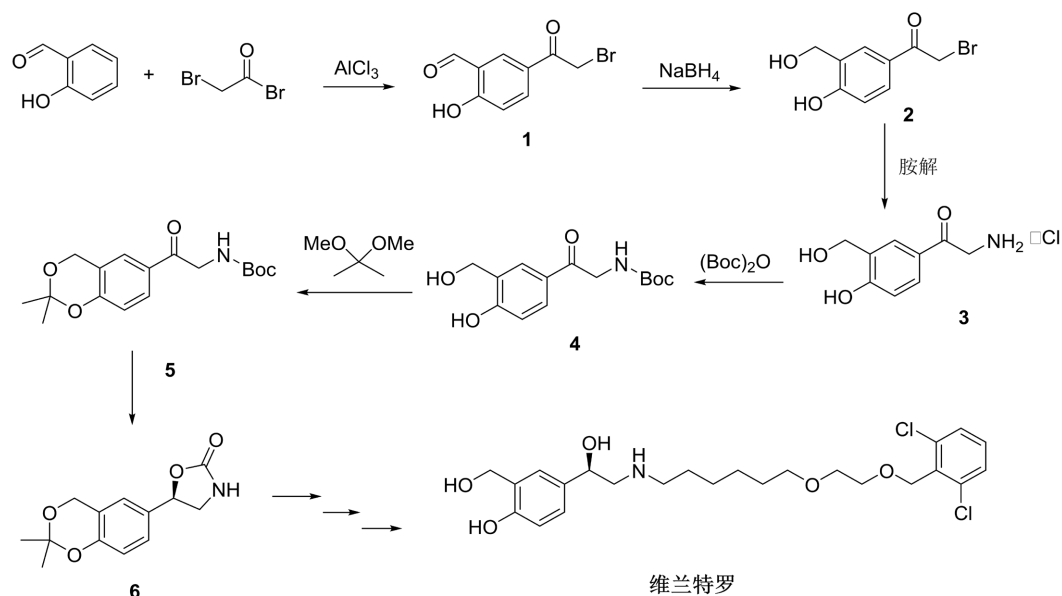


Figure 1. Synthesis process of vilanterol and its key intermediates
图 1. 维兰特罗及其关键中间体合成工艺

维兰特罗原料药的质量控制须从关键中间体及其有关物质(杂质)入手。由于原材料生产厂家、中间体生产工艺等因素影响,维兰特罗中间体 5 成品中存在 2~3 个液相色谱杂质峰[13],这些杂质有可能会伴随着进入下一步工序,并残留在最终产品维兰特罗中。为保证药物的有效和安全性,建立维兰特罗中间体 5 含量测定方法以及对有关物质定性定量分析尤为重要。HPLC 法对原料药(或中间体)及其有关物质能够实现较好的分离和测定[14] [15] [16];借助液质联用技术(LC-MS)可以实现有关物质结构推测[17]。

维兰特罗中间体 5 主成分的峰面积纯度约为 98.5%, 3 个杂质峰面积之和为 1.0%~1.5% [13],考虑到主成分的定量和杂质的定性定量检测,本文采用半制备或制备型高效液相色谱对关键中间体 5 及其杂质进行分离,一方面获得高纯中间体 5 作为定量分析的对照品,另一方面,杂质也得到了富集,可更方便地用于后续的结构分析,这为工艺优化及关键中间体的质量控制提供理论和方法支撑。

2. 材料与仪器

2.1. 试药

维兰特罗中间体 5 (安徽德信佳公司合成,峰面积纯度约为 98.5%)、磷酸二氢钾(广东汕头市西陇化工厂)、磷酸(分析纯,国药集团化学试剂有限公司)、纯化水(娃哈哈集团)、甲醇(色谱级,国药集团化学试剂有限公司)、乙腈(色谱级,国药集团化学试剂有限公司)、微孔滤膜(孔径 0.45/0.22 μm ,上海兴亚净化材料厂)、有机滤头(尼龙 66, 0.22 μm ,津腾)、一次性使用无菌注射器(河南曙光汇康生物科技有限公司)。

2.2. 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪(配二元泵、在线脱气机、自动进样器)系列; C18 纳谱分析柱(250 \times 4.6 mm, 5 μm); LC-20A 岛津制备色谱仪; C18 纳谱制备柱(250 \times 21.2 mm, 5 μm); C18 纳谱半制备柱(250 \times 10 mm, 5 μm); 液相色谱 - 四级杆静电场轨道阱质谱联用仪(Vanquish Q Exactive Plus, 德国赛默飞世尔公司); MTN-2800W 氮吹浓缩装置(天津奥特赛恩斯仪器有限公司); PHS-25 pH 计(上海仪电科学仪器股份有限公司)。

司); PWN124ZH/E 精密电子天平(奥豪斯仪器有限公司)。

3. 方法与结果

3.1. 中间体 5 提纯

3.1.1. 分析色谱条件

C18 纳谱分析柱(250 × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-水(B), 等度洗脱(80% A); 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 220 nm; 柱温 30℃; 采集时间: 10 min; 进样体积为 20 μL。

3.1.2. 制备色谱条件

C18 纳谱制备柱(250 × 21.2 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈(A)-水(B), 等度洗脱(80% A); 流速 6.0 mL·min⁻¹; 检测波长 220 nm; 柱温 30℃; 采集时间: 20 min; 进样体积为 2 mL。

3.1.3. 中间体 5 的制备色谱提纯

称取维兰特罗中间体 5 合成品 20.0 mg, 加流动相 10 mL 溶解为浓度 2.0 mg·mL⁻¹ 的溶液, 过膜, 依据“3.1.2”条件进行制备色谱分离, 按照不同成分出峰时间划分收集时间段, 用试管分段收集 0~2 min、2~4 min、4~6 min、6~8 min、8~10 min、10~11 min、11~13 min、13~18 min 时间段内的洗脱液, 各段洗脱液依据“3.1.1”条件下进行 HPLC 分析, 依次确定各段洗脱液中主成分纯度, 将纯度达到 99.5% 左右的洗脱液合并, 氮吹浓缩, 重复以上制备操作多次, 获得可用于含量测定所用的中间体 5 高纯对照品。

对三批次中间体 5 合成品及制备色谱进一步提纯得到的中间体 5 对照品进行 HPLC 检测, 如图 2 所示, 三批次中间体 5 合成品的出峰情况基本吻合, 主成分(RT 4.53 min)峰面积纯度为 98.5%~99.0%, 杂质 I (RT 1.47 min)为 0.4%~0.5%, 杂质 II (RT 2.34 min)为 0.1%~0.2%; 中间体 5 对照品的峰面积纯度由合成品中 98.5%提高至 99.5%以上, 可用于中间体 5 含量测定方法建立所用的对照品。

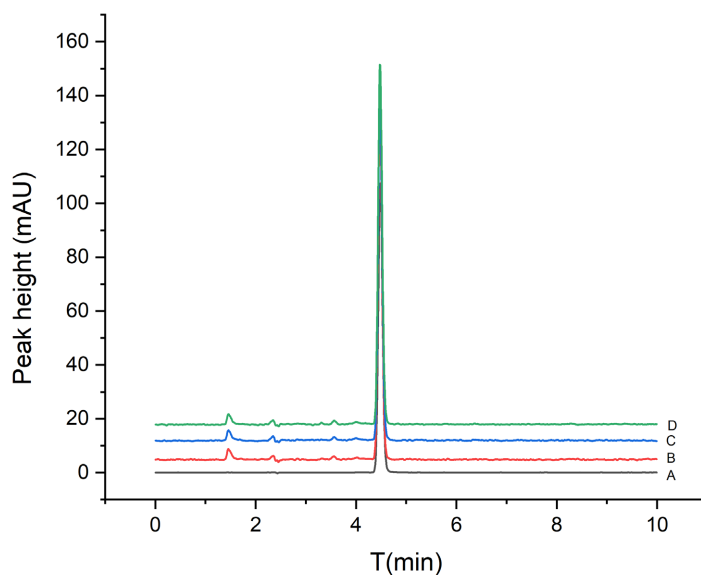


Figure 2. Chromatographic comparison map of intermediate 5 complexes before and after purification by preparation chromatography: A (Reference product after preparation chromatography purification); B (YL-5001); C (YL-5002); D (YL-5003)

图 2. 中间体 5 合成品通过制备色谱提纯前后的色谱对比图: A (制备色谱纯化后对照品); B (YL-5001); C (YL-5002); D (YL-5003)

3.2. 中间体 5 含量测定方法

3.2.1. 溶液配制

对照品储备液: 称取 2.1 项下所得中间体 5 对照品适量, 精密称定, 加入流动相溶解, 配成 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液。

供试品储备液: 称取中间体 5 合成产品适量, 精密称定, 加入流动相溶解, 配成 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液。

阴性对照溶液: 取流动相适量, 作阴性对照溶液。

对甲苯磺酸储备液: 称取对甲苯磺酸标品适量, 精密称定, 加入流动相溶解, 配成 $1.0 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液。

3.2.2. 色谱分析条件

色谱条件同 3.1.1。

3.2.3. 方法学验证

系统适应性实验: 取对照品储备液、供试品储备液用流动相稀释成 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液, 与阴性对照溶液在“3.1.1”色谱条件下用 HPLC 检测。

结果显示, 中间体 5 对照品(B)色谱图基线平稳、峰型较好(图 3), 其保留时间为 4.53 min, 空白洗脱剂溶液(A)和供试品溶液(C)中其它有关物质均不干扰中间体 5 的测定, 故“3.1.1”条件系统适应性好。

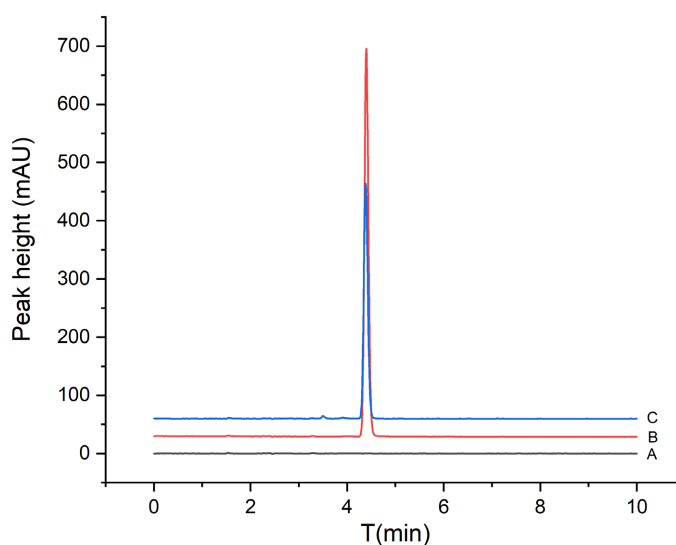


Figure 3. HPLC chromatogram map of blank solvent (A), reference product of intermediate 5 (B), and test product (C)

图 3. 空白溶剂(A)、中间体 5 的对照品(B)、供试品(C)的高效液相色谱图

线性关系取对照品储备液至容量瓶用流动相定容, 分别配制浓度为 $0.005 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $0.02 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $0.05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $0.08 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液, 作系列线性溶液, 在“3.1.1”色谱条件下用 HPLC 检测, 纵坐标(Y)为测得峰面积, 横坐标(X)为溶液浓度, 拟合线性回归方程。

中间体 5 含量检测的线性方程为 $Y = 38705X + 21.565$, $R^2 = 0.9998$, 结果表明, 中间体 5 对照品在 $0.005 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 至 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度范围内线性关系良好。

定量限和检测限: 取线性关系测定中最低点浓度以流动相逐级稀释, 在“3.1.1”色谱条件下用 HPLC

检测, 以 S/N (信噪比) = 3 的浓度作为检测限, S/N (信噪比) = 10 的浓度作为定量限。中间体 5 对照品定量限为 $0.625 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 检测限为 $0.156 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

重复性试验: 取供试品储备溶液, 用流动相将其制备成 6 份浓度为 $0.02 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的样品溶液, 在“3.1.1”色谱条件下用 HPLC 检测, 外标法计算含量, 以标示量百分数表示, 计算 RSD 值, 结果为 $RSD = 0.29\%$, 小于 2.0%, 表明本方法重复性好。

稳定性试验: 分别取同一供试液样品与对照品, 冰箱冷藏各放置 0 h、1 h、2 h、4 h、8 h、12 h 后在“3.1.1”色谱条件下用 HPLC 检测, 供试品和对照品峰面积变化 RSD% 均不超过 2.0%, 表明供试品与对照品溶液在 12 h 内稳定。

加标回收率试验: 取已知含量的供试品溶液, 作为供试样品溶液, 并取对照品适量加入至供试样品溶液, 分别配成低、中、高浓度的回收率样品溶液, 各浓度分别平行三次。在“3.1.1”色谱条件下用 HPLC 检测供试样品溶液与回收率样品溶液, 计算加标回收率。

结果显示, 平均回收率为 102.45%, $RSD < 2.0\%$, 表明该方法准确度良好, 结果如表 1。

Table 1. Test results of recovery rate

表 1. 回收率试验结果

加入的量($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	测得的量($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD (%)
5.714	5.987	104.78%		
5.714	5.987	104.78%	104.81%	0.05%
5.714	5.993	104.88%		
10.000	10.203	102.03%		
10.000	10.181	101.81%	101.93%	0.11%
10.000	10.195	101.95%		
12.300	12.386	100.70%		
12.300	12.330	100.70%	100.61%	0.17%
12.300	12.350	100.41%		

3.3. 中间体 5 相关杂质分析

3.3.1. 中间体 5 合成成品直接进行液质联用分析

液质联用条件: C18 纳谱分析柱($250 \times 4.6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$); 流动相为乙腈(A)-水(B), 等度洗脱(80% A); 流速 $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 检测波长 220 nm; 柱温 30°C ; 采集时间: 10 min; 进样体积为 $40 \mu\text{L}$, 液相色谱 - 静电场轨道阱质谱联用仪。

在以上条件下, 将浓度为 $0.02 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 中间体 5 合成成品通过 LC-MS 进行分析。

根据质谱图分析, RT 2.82 min 质谱图(图 4(a)) $[\text{M}-\text{H}]^-$ 准确离子质量为 280.1183, 与中间体 4 合成成品质谱图(图 4(b))相对应, 推测 RT 2.82 min 为中间体 4。

3.3.2. 中间体 5 中相关杂质的制备分离

半制备色谱条件: C18 纳谱半制备柱($250 \times 10 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$); 流动相为乙腈(A)-水(B), 等度洗脱(80% A); 流速 $2.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 检测波长 220 nm; 柱温 30°C ; 进样体积为 2 mL。

称取维兰特罗中间体 5 合成成品 5.0 mg, 加流动相 10 mL 配为浓度 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液, 过膜, 依据“3.1.2”所示条件进行制备色谱分离, 按照不同成分保留时间划分收集时间段, 用试管收集 0~2 min、2~4 min、4~6 min、6~8 min、8~10 min、10~11 min、11~13 min、13~18 min 时间段内的洗脱液, 各段洗脱液

依据“3.1.1”条件下进行 HPLC 分析, 依次确定各段洗脱液中杂质峰组成及相对比例, 对比确定杂质集中出现且相对含量较高的分段, 重复以上制备操作多次, 确保洗脱段的结果重现, 并可富集用于定性分析。

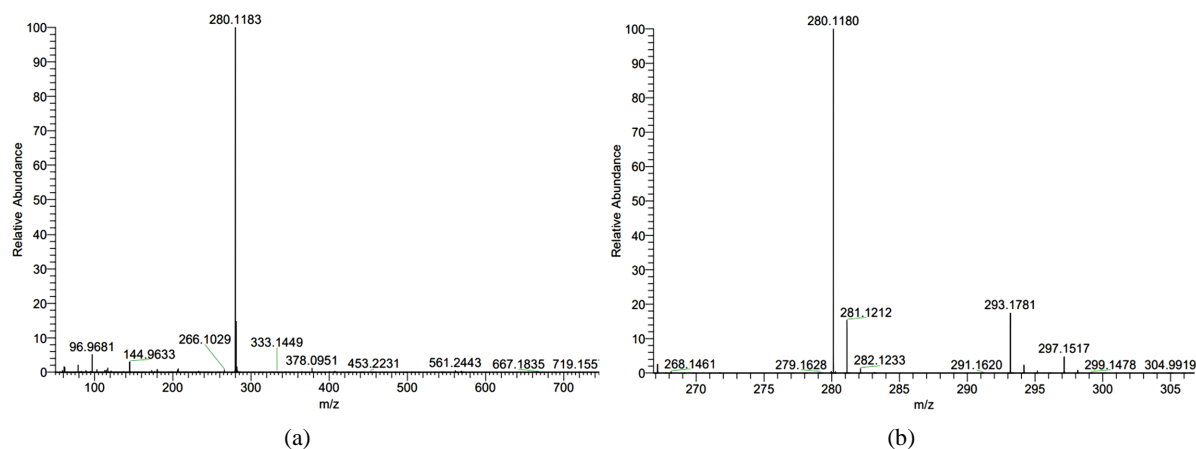


Figure 4. Comparison of synthetic quality spectra between impurity segment and intermediate 4

图 4. 杂质段和中间体 4 合成品质谱图对比

3.3.3. 杂质结构分析

1) 制备色谱分离的杂质结构分析

将富集得到的中间体 5 的杂质浓缩液在“3.3.1”条件下, 利用液质联用仪(Vanquish Q Exactive Plus)进行分析, 借鉴丁亚婷等人在研究有关物质时, 通过质谱对各个杂质的结构分析方法, 借助离子碎片信息能较为准确地确定其结构[18], 本研究在质谱分析的基础上, 结合杂质段与其相应对照品的 HPLC 保留时间对比, 进一步确证其结构准确性。

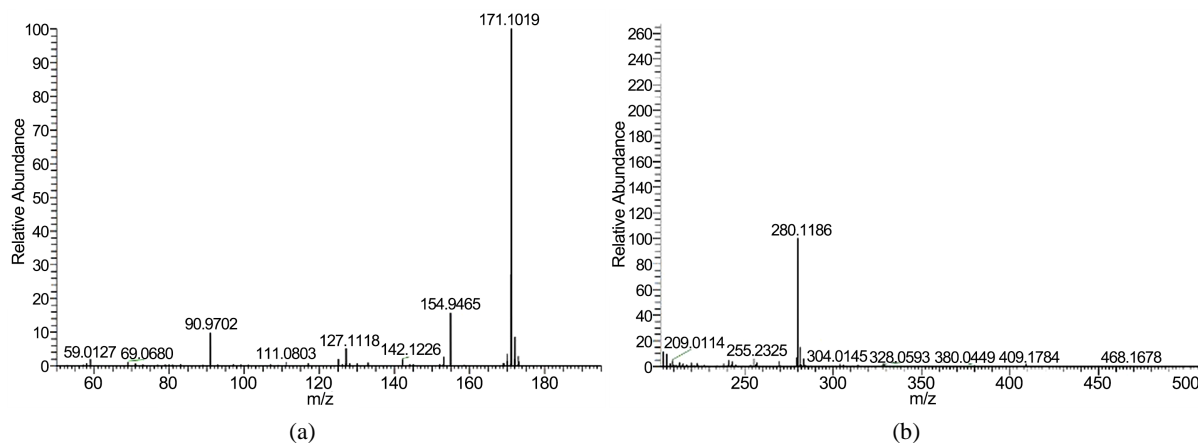


Figure 5. Mass spectra of possible impurities

图 5. 可能的杂质的质谱图

经液质联用分析 RT 1.47 min 左右的 $[M-H]^-$ 准确离子质量 $m/z = 171.1029$ (图 5(a)), 可能为中间体 5 中存在的杂质, 根据中间体 5 合成工艺, 推测其为对甲苯磺酸。在质谱分析中还检测到 RT 2.82 min (图 5(b)), 结合合成工艺与质谱图 $[M-H]^-$ 准确离子质量 $m/z = 280.1186$, 推断杂质段存在少量中间体 4。

将对甲苯磺酸对照品(A)制成与 6~8 min 杂质段样品(B)浓度相近的样品, 在“3.1.1”色谱条件下进样检测, 进行峰保留时间对比, (B)中主峰保留时间与对应的(A)主峰保留时间一致, 故进一步确认中间体 5

中杂质 I (RT 1.47 min) 为对甲苯磺酸。

将中间体 4 合成品(C)制成与 6~8 min 杂质段样品(B)浓度相近的样品, 在“3.1.1”色谱条件下检测, 进行峰保留时间对比, (B)中存在保留时间与(C)主峰保留时间一致的峰, 故进一步确证中间体 5 中杂质 III (RT 2.82 min) 为中间体 4。

经 LC-MS 技术下的质谱分析和 HPLC 保留时间对比, 判断 RT 1.47 min (杂质 I) 为对甲苯磺酸, RT 2.82 min (杂质 III) 为中间体 4, 并且通过含量对比, 判定原料药中中间体 4 残留的极少量。

3.4. 中间体 5 及有关物质含量测定

3.4.1. 中间体 5 含量测定

将 6 批中间体样品配制成 $0.02 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 在“3.1.1”色条件下用 HPLC 检测, 根据线性方程($Y = 38705X + 21.565$)计算各批次含量, 结果如表 2。

3.4.2. 杂质含量测定

不加校正因子的自身对照法: 配制浓度为 $0.25 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 6 批供试品溶液, 并且取一定量稀释 100 倍, 作为对照品溶液, 每批样品平行 3 次, 在“3.1.1”色谱条件下用 HPLC 检测, 依据不加校正因子的自身对照法, 计算杂质含量。结果如表 2。

加校正因子的自身对照法[18]: 取对甲苯磺酸储备液, 分别配制浓度为 $0.005 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $0.02 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $0.05 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $0.08 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液, 作系列线性溶液, 在“3.1.1”色谱条件下用 HPLC 检测, 纵坐标(Y)为测得峰面积, 横坐标(X)为溶液浓度, 拟合线性回归方程。校正因子(f) = r_1 (中间体 5)/ r_2 (杂质 I) (r 为线性方程斜率), 据此测定校正因子(f), 计算杂质的含量。结果如表 2。

Table 2. Determination of the content of active ingredients and impurities in 6 batches of intermediate 5
表 2. 6 批次中间体 5 中有效成分及杂质含量测定

批次	中间体 5 的含量(%)	自身对照法		加校正因子	
		杂质 I + 杂质 II (%)	杂质 I 含量(%)	杂质 I 含量(%)	杂质 I 含量(%)
YL-5001	98.43%	0.35%	0.28%	0.20%	0.20%
YL-5002	98.36%	0.41%	0.31%	0.22%	0.22%
YL-5003	98.76%	0.43%	0.32%	0.23%	0.23%
YL-5004	98.25%	0.56%	0.45%	0.32%	0.32%
YL-5005	98.09%	0.39%	0.31%	0.32%	0.32%
YL-5006	98.13%	0.41%	0.29%	0.21%	0.21%

4. 讨论

4.1. 中间体 5 HPLC 测定以及提纯洗脱条件

中间体 5 以及其提纯的色谱采用乙腈或甲醇与水、磷酸二氢钾缓冲盐洗脱体系对中间体 5 进行分析, 其液相色谱如图 6 所示, 乙腈/水或缓冲盐(A、B、C)以及甲醇/缓冲盐(E)体系下中间体 5 都可以获得较好分离, 除主成分色谱峰外, 还有 2~3 个峰形较规则的杂质峰; 在甲醇/水体系(D)下洗脱, 基线漂移, 且杂质峰形不规则。另外, 考虑到后续制备色谱分离时, 分段收集的洗脱液需进行液质分析或浓缩保存作为对照品使用。若用实验室之前的实验体系“乙腈或甲醇-缓冲盐洗脱体系”[14], 则洗脱液中缓冲盐无法除去, 影响质谱分析和对照品的制备, 因此, 选择乙腈/水 = 80:20 作为后续 HPLC 定性、定量分析和制备色谱条件。

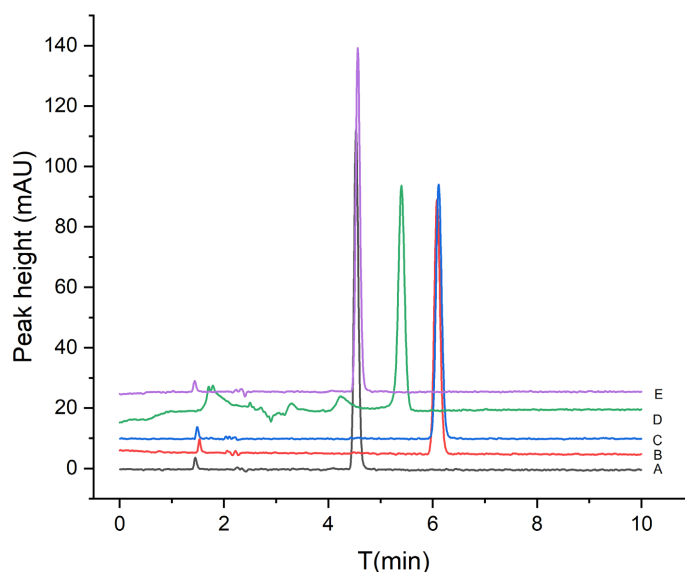


Figure 6. Effects of different mobile phase compositions and proportions on the separation effect of intermediate 5 and its impurities: A (acetonitrile:water = 80:20); B (acetonitrile:water = 70:30); C (acetonitrile:potassium dihydrogen phosphate buffer = 70:30); D (methanol:water = 80:20); E (methanol:potassium dihydrogen phosphate buffer = 80:20)

图 6. 不同流动相组成及比例对中间体 5 及其杂质分离效果的影响: A (乙腈:水 = 80:20); B (乙腈:水 = 70:30); C (乙腈:磷酸二氢钾缓冲盐 = 70:30); D (甲醇:水 = 80:20); E (甲醇:磷酸二氢钾缓冲盐 = 80:20)

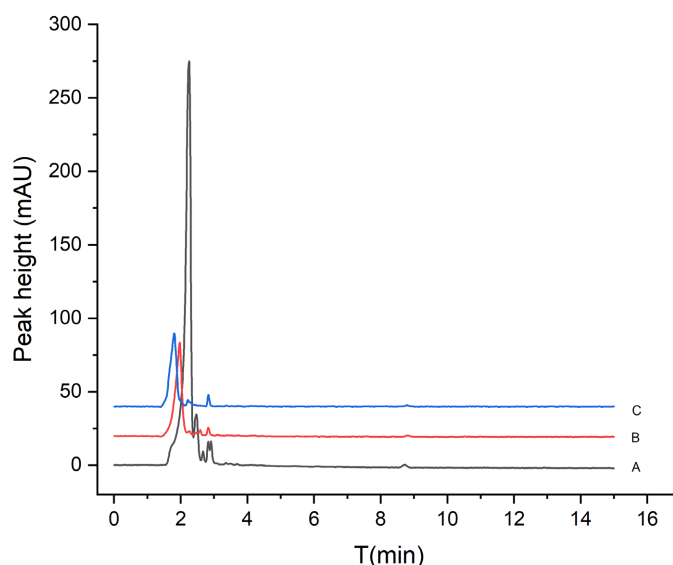
4.2. 杂质的结构分析

通过中间体 5 合成品直接进行液质联用分析,推测中间体 5 中存在中间体 4,但通过 HPLC 色谱图 RT 1.47 min、RT 2.34 min 有较明显杂质峰,推测直接对中间体 5 合成品进行 LC-MS 分析具有一定的局限性,基质干扰对杂质检测影响较大,所获得的杂质信息有限,故考虑通过制备或半制备色谱分离出各杂质段,从而对各杂质进行全面分析。

根据制备或半制备色谱各杂质收集段 HPLC 图对比,在各段收集中 6~8 min 段浓度较大,且分离的杂质除主要杂质峰(RT 1.77 min,其样品浓度越低,保留时间随之前移,与中间体 5 中 RT 1.47 min 能够对应)外,还有其他吸收较小的峰,结果如图 7 所示,对其进行分析,有利于对杂质部分进行全面分析,以测定除主要杂质外,其他含量较少或吸收较低的成分,故对 6~8 min 杂质段样品进行液质联用分析。由于在各分离段未发现 RT 2.34 min (杂质 II),故选择以 RT 1.47 min (杂质 I)为主要杂质目标。研究结合实际工业生产中所存在原料以及副产物,通过 HPLC 保留时间对比和 LC-MS 分子离子峰对比等方法进行定性分析,确证了杂质 I 和杂质 III 的结构,为中间体 5 的生产工艺优化提供了理论支撑。

4.3. 中间体 5 有关物质含量测定

杂质含量测定依据不加校正因子的自身对照法,可测得中间体 5 主要杂质的含量。杂质 I (RT 1.47 min)已经确定其为对甲苯磺酸,在已知杂质并有杂质对照品情况下,可采取加校正因子的自身对照法,按“3.2.3”中线性关系测定方法拟合对甲苯磺酸的线性方程,其线性方程为 $Y = 53802X + 13.199$, $R^2 = 0.9999$,校正因子 $f = 0.7194$,据此测定有关物质 I 的准确含量。



注: A (6~8 min); B (8~10 min); C (13~18 min)。

Figure 7. Superposition diagram of impurity segment

图 7. 杂质段叠加图

5. 结论

本实验建立了一种新的检测维兰特罗中间体 5 及其有关物质的高效液相色谱方法, 并进行了方法学验证, 结果表明, 该方法专属性强、灵敏度高、准确度高, 并能使中间体 5 与有关物质进行较好的分离, 利用半制备或制备色谱实现了有关物质的分离, 建立了对于中间体 5 的纯化方法, 对分离得到的有关物质进行定性和定量分析, 通过 LC-MS 分析, 对未知杂质 I (RT 1.47 min)、未知杂质 III (RT 2.82 min) 进行定性结构分析。本研究对维兰特罗合成中的关键中间体进行了深入研究, 为工艺优化、有效降低或去除杂质及关键中间体的质量控制提供理论和方法支撑。

致 谢

本人作为课题主要负责人, 主要负责实验操作、数据收集、整理以及分析, 撰写、修改以及投出文章。在此感特别谢我的导师惠爱玲老师, 对于整个课题实验方案的制订、实施以及论文撰写进行指导, 感谢张文成、吴泽宇老师对我论文写作方面给予修改和指导意见, 感谢刘婕师姐、胡庆丰师弟在实验上给予我的帮助, 协助我更好地完成实验工作; 感谢企业项目负责人许坤、王红磊, 在我遇到问题时, 结合实际工业生产中的因素对问题进行分析。

基金项目

安徽省阜阳市科技重大专项(FK20208015)。

参考文献

- [1] Blair, H.A. and Deeks, E.D. (2015) Umeclidinium/Vilanterol: A Review of Its Use as Maintenance Therapy in Adults with Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Drugs*, **75**, 61-74. <https://doi.org/10.1007/s40265-014-0326-1>
- [2] Rosrigo, G.J. and Plzaz, V. (2016) Once-Daily Fluticasone Furoate and Vilanterol for Adolescents and Adults with Symptomatic Asthma a Systematic Review with Meta-Analysis. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, **16**, 565-570. <https://doi.org/10.1016/j.anai.2016.03.035>

- [3] Slack, R.J., Barrett, V.J., Morrison, V.S., *et al.* (2013) *In Vitro* Pharmacological Characterization of Vilanterol, a Novel Long-Acting β_2 -Adrenoceptor Agonist with 24-Hour Duration of Action. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **344**, 218-230. <https://doi.org/10.1124/jpet.112.198481>
- [4] Glaxo, G.L., Box, P.C., Coe, D.M., *et al.* (2003) Phenethanolamine Derivatives for Treatment of Respiratory Diseases. WO, 2002GB04140. 2003-03-27.
- [5] Procopiou, P.A., Barrett, V.J., Bevan, N.J., *et al.* (2010) Synthesis and Structure-Activity Relationships of Long-Acting β_2 Adrenergic Receptor Agonists Incorporating Metabolic Inactivation: An Antedrug Approach. *Journal of Medicinal Chemistry*, **53**, 4522-4530. <https://doi.org/10.1021/jm100326d>
- [6] Perrigo Api Ltd. (2015) An Improved Process for the Preparation of Vilanterol and Intermediates Thereof. WO, EP3189053B1. 2015-08-27.
- [7] 上海医药工业研究所, 中国医药研究医药工业研究总院. 一种维兰特罗中间体及其制备方法和应用[P]. 中国专利, 201410720451.2. 2016-06-08.
- [8] 诸葛文云. 维兰特罗的合成工艺及关键中间体结晶研究[D]: [硕士学位论文]. 济南: 济南大学, 2019.
- [9] 张启龙, 诸葛文云, 高令峰, 等. 维兰特罗关键手性中间体的合成工艺优化[J]. 中国医药工业杂志, 2020, 51(10): 1262-1265.
- [10] 陈思毅. 维兰特罗手性中间体的合成及工艺改进[D]: [硕士学位论文]. 武汉: 武汉工程大学, 2018.
- [11] 安徽德信佳生物医药有限公司. 一种在混合溶剂中合成维兰特罗中间体的方法[P]. 中国专利, 201910056494. 2019-04-05.
- [12] 安徽德信佳生物医药有限公司. 一种固体酸催化合成维兰特罗中间体的方法[P]. 中国专利, 201910056310. 2019-04-05.
- [13] 王敬赫, 邓少欢, 高俊, 等. 维兰特罗关键中间体的有关物质分析方法筛选及优化[J]. 药物化学, 2021, 9(4): 125-136.
- [14] 晏海军, 陈一波, 张福利, 等. HPLC 测定盐酸氯胺酮原料药中的有关物质[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(5): 633-637.
- [15] 邵天舒, 郭雷, 李潇. HPLC 法测定复方氨基酸注射液(18AA)中胱氨酸与半胱氨酸的含量及其在药品质量评价中的应用[J]. 中国医药工业杂志, 2022, 53(10): 1494-1498.
- [16] 梁键谋, 朱坤丹, 罗英, 等. LC-MS 测定双氢青蒿素哌嗪片中阿莫西林、头孢克洛和头孢克肟的残留量[J]. 中国现代应用药学, 2022, 39(16): 2125-2129.
- [17] 丁亚婷, 邱宏春, 尹山, 等. 布地奈德缓释片有关物质方法的建立及色谱-质谱结构鉴定[J]. 药物分析杂志, 2021, 41(10): 1796-1805.
- [18] 肖亭, 王晨, 姚尚辰, 等. HPLC 校正因子法在药物分析中的应用[J]. 药学学报, 2020, 55(12): 2854-2861.