研究论文

枸橼酸托法替布的精制工艺和杂质研究

谢福佳[1,2]，方志杰[1*]，周志慧[2]，冯玲玲[2]，陆　俊[2]
（1. 南京理工大学，江苏南京 210094；2. 江苏正大清江制药有限公司，江苏淮安 223001）

摘要：文章报道了改进的枸橼酸托法替布精制方法，并对关键有关物质进行了分析和控制。以乙腈和水的混合溶剂精制托法替布粗品，产品纯度大于99.0%；以纯化水为结晶溶剂精制枸橼酸托法替布粗品，产品纯度大于99.9%，最大单杂小于0.05%。并合成了有关物质K、U、V、R等，经^{1}H NMR、^{13}C NMR和ESI-MS确证结构，这些有关物质在粗品和原研制剂中均有检出。

关键词：托法替布；精制工艺；有关物质；合成
中图分类号：TQ460.6　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2023)08-1182-05
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.08.005

Study on Refining Process and Impurities of Tofacitinib Citrate

XIE Fujia[1,2], FANG Zhijie[1*], ZHOU Zhihui[2], FENG Lingling[2], LU Jun[2]
(*1. Nanjing University of Science and Technology, Nanjing 210094; 2. Jiangsu Chiatai Qingjiang Pharmaceutical Co., Ltd., Huaian 223001*)

ABSTRACT: In this study, an improved refining process of tofacitinib citrate was reported, and the critical related substances were analyzed and controlled. Tofacitinib was purified in the acetonitrile-water mixed solvent, and the purity of the product was greater than 99.0%. Tofacitinib citrate was recrystallized in water, and the product purity was greater than 99.9%, with maximum single impurity less than 0.05%. The critical related substances of K, U, V and R (detected in the crude product and reference preparation) were synthesized, and their structures were confirmed by ^{1}H NMR, ^{13}C NMR and ESI-MS.

Key Words: tofacitinib; refining process; related substance; synthesis

枸橼酸托法替布（tofacitinib citrate，**1**），化学名为3-[(3*R*,4*R*)-4-甲基-3-[甲基(7*H*-吡咯并[2,3-*d*]嘧啶-4-基)氨基]哌啶-1-基]-3-氧代丙腈枸橼酸盐，是一种口服小分子Janus激酶（Janus kinase，JAK）抑制剂，可有效抑制JAK1和JAK3的活性，阻断多种炎症细胞因子的信号转导，对中度和重度类风湿关节炎的疗效显著，且安全性高[1—3]。2012年被美国FDA批准上市，2017年在中国获批进口。江苏正大清江制药有限公司于2021年获批生产**1**的原料药及其制剂。

1的合成路线如图1所示。制备**1**时，可将含托法替布（**2**）的反应液直接与枸橼酸成盐制得[4—5]；也可先结晶得到**2**粗品，再与枸橼酸成盐[6]。前法的不足在于反应液中有较多杂质，尤其是有关物质E和K（有关物质E、K、U、V、R均为本公司内部编号，化学结构如图2所示）含量较高，会参与后续的成盐反应，导致成品纯度较差；后法所得的成品中有关物质E较多（约1.5%），也不适于作为最终的精制方法。本研究考察用水、乙腈、甲醇、丙酮、异丙醇以及乙腈和水混合溶剂等纯化**2**，结果显示用乙腈和水（质量比1∶1.6）混合溶剂常

收稿日期：2023-02-16
作者简介：谢福佳(1988—)，男，硕士研究生，专业方向：药物化学。
通信作者：方志杰(1957—)，男，研究员，从事药物及其中间体的合成研究。
E-mail：zjfang@njust.edu.cn

温打浆精制，对有关物质 E 和 V 的去除能力较好，放大批次产品中有关物质 E 含量可由 3.5%降至约 0.6%，有关物质 V 可降低至 0.05%以下。

终产物 **1** 在有机溶剂中的溶解性很低，尚无较好的结晶精制方法。本研究用水重结晶，结果显示该体系对有关物质 E、V、K 和其他未知的少量杂质的去除效果均较好，放大批次产品中有关物质 E、V 和 K 均可控制在 0.10%以下，其他未知杂质总量不超过 0.05%，收率 >85%，**1** 纯度 >99.9%。此法成本低廉、对环境友好，已申请中国专利 108358929[7]。

1 目前尚未列入任何国家药典。本研究基于 **1** 的主流合成工艺[8—9]，结合已报道的有关物质研究文献[10—12]，合成了 4 个关键有关物质 K、U、V 和 R，

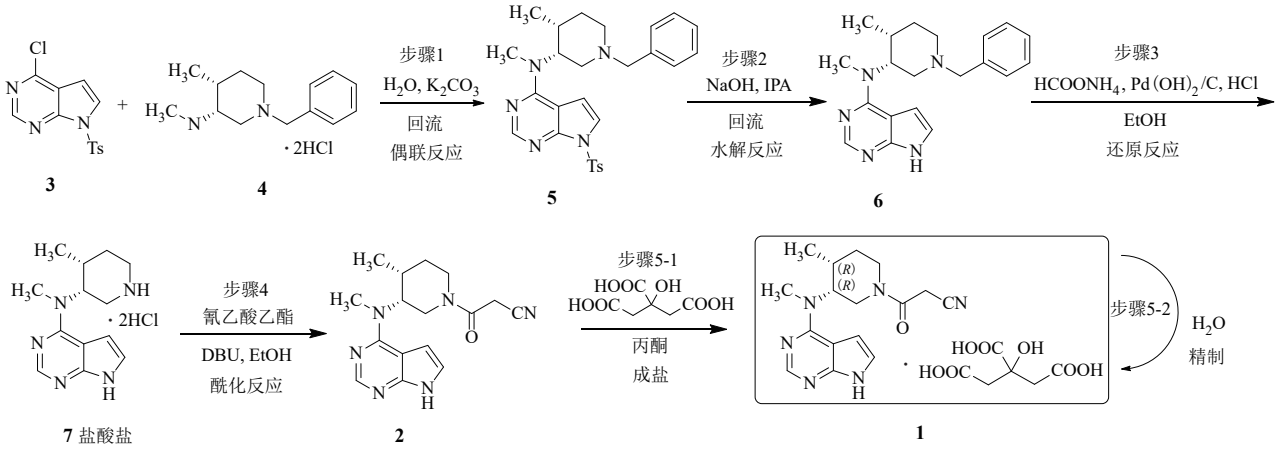


图 1　1 的合成路线

Fig.1　Synthetic Route of **1**

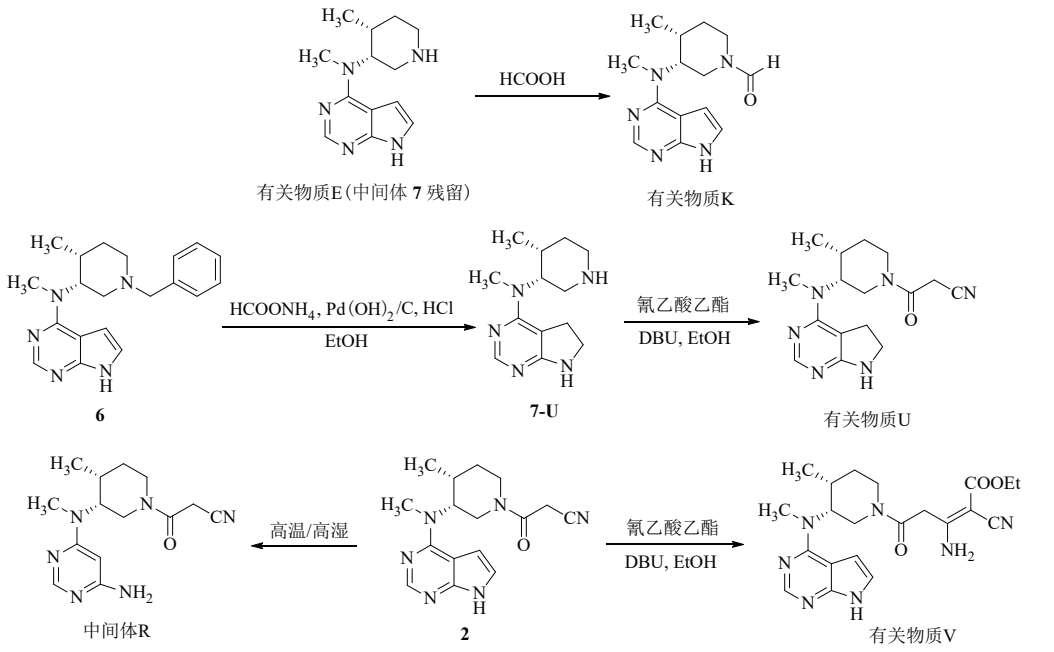


图 2　有关物质的来源分析

Fig.2　Source Analysis of the Related Substances

并在多批自制放大批产品中进行跟踪检测，同时与多批原研制剂做质量对比，检出情况如表 1 所示。

根据各有关物质的来源分析（图 2），有关物质 E 为反应不完全的中间体（3*R*,4*R*）-4- 甲基 -3-［甲基（7*H*- 吡咯［2,3-*d*］嘧啶 -4- 基）氨基］哌啶（**7**）残留；有关物质 K 为中间体 **7** 发生甲酰化反应产生的副产物；有关物质 U 为中间体（3*R*,4*R*）-1- 苯甲基 -4- 甲基 -3-［甲基（7*H*- 吡咯［2,3-*d*］嘧啶 -4- 基）氨基］-哌啶（**6**）过度还原产生的副产物 **7**-U，再经过酰化反应得到；有关物质 V 为 **2** 继续与氰乙酸乙酯反应产生的副产物；有关物质 R 为中间体 **2** 的降解杂质，其合成路线如图 3 所示。

实验部分

托法替布（**2**）

将无水乙醇（5.70 kg）和 **7** 盐酸盐（江苏正大清江制药有限公司，1.90 kg，5.97 mol）加至 30 L 玻璃反应釜中，加入 1,8- 二氮杂二环十一碳 -7- 烯（DBU，2.74 kg，18.00 mol），25 ℃搅拌溶清，于 15 ℃加入氰乙酸乙酯（1.35 kg，11.94 mol），于（10±5）℃搅拌反应 26 ～ 27 h，HPLC 监测反应（**7** 含量低于 10.0% 视为反应终点）。于 15 ℃加入纯化水（15.20 kg），加毕于（10±5）℃搅拌结晶 16 h，抽滤，滤饼用水洗涤至洗液呈中性，加至纯化水（3.80 kg）中，转入 30 L 玻璃反应釜中，再加入乙腈（3.00 kg），于（20±5）℃搅拌打浆 8 h，抽滤，用少量乙腈洗涤，于（60±5）℃减压干燥 12 h（水分≤ 3.0%），得白色固体 **2**（1.39 kg，74.7%），mp 157.2 ～ 160.2 ℃。纯度 99.33%［HPLC 归一化法：色谱柱 Kromasil C_{18} 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相 A 为 0.03 mol/L 磷酸二氢钾溶液和乙腈（体积比 90 ∶ 10），B 为乙腈，梯度洗脱（0—5 min：A 100%—90 %，5—25 min：A 90 % —80 %，25—35 min：A 80%—50%，35—45 min：A 50%，45—46 min：A 50%—100%，46—55 min：A 100%）；检测波长 287 nm；流速 1.0 mL/min；柱温 30 ℃］。

枸橼酸托法替布（**1**）

将丙酮（45.00 kg）和 **2**（1.00 kg，3.2 mol）加至 100 L 搪瓷反应釜中，开启搅拌并升温至（55±2）℃，

表 1　多批次自制品和原研制剂中杂质的检出情况 [1)]/%

Tab.1　Detection of the Impurities in Multiple Batches of the Self-produced Products and Reference Listed Drug/%

名称	批号	有关物质 E	有关物质 U	有关物质 K	有关物质 V	有关物质R	总杂
自制品	批次 1	0.02	NA	0.06	NA	NA	0.08
	批次 2	NA	NA	0.03	NA	NA	0.03
	批次 3	0.03	NA	0.02	NA	NA	0.05
	批次 4	NA	NA	0.03	NA	NA	0.03
	批次 5	NA	NA	0.01	NA	NA	0.01
	批次 6	0.01	NA	0.01	NA	NA	0.02
原研制剂	S33324	0.04	0.15	0.03	0.04	NA	0.37
	S13073	0.03	0.17	0.03	0.03	NA	0.37
	W06458	0.02	0.17	0.02	0.03	NA	0.33

* 注：[1)]NA 表示未检出。

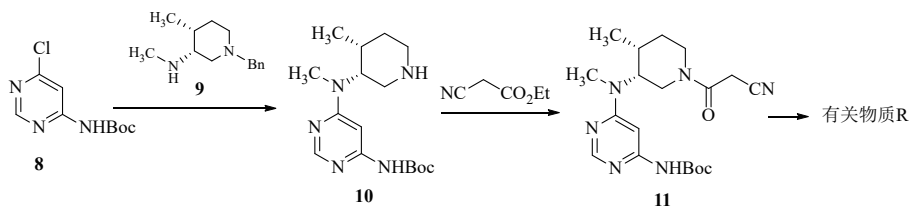


图 3　有关物质 R 的合成路线

Fig.3　Synthetic Route of Related Substance R

过滤，滤液转至 100 L 搪瓷反应釜中，于 (40±2)℃加入含枸橼酸 (0.74 kg，3.52 mol) 的丙酮 (3.00 kg) 溶液，同温搅拌成盐 2 h，后降温至 10 ～ 20 ℃搅拌结晶 3 h，抽滤至干得湿品。

将上述湿品和纯化水 (30.00 kg) 混合后加至 100 L 搪瓷反应釜中，搅拌升温至 (90±5)℃，溶清，趁热过滤，滤液转至 100 L 钛材反应釜中，降温至 10～20 ℃，搅拌结晶 30 min，抽滤，滤饼于 (60±5)℃减压干燥 10 h（干燥失重≤ 0.5%），得白色粉末状固体 **1**(1.37 kg，85.0 %)，mp 196.7 ～ 198.1 ℃。纯度 99.97%（HPLC 条件同 **2**，加入校正因子计算纯度，有关物质 E、K、U、V 和 R 的校正因子分别为 0.72、0.60、1.01、0.52 和 5.29)。^{1}H NMR (500 MHz, DMSO-d_6) δ: 11.66(s, 1H), 10.10(br s, 3H), 8.16(d, *J*=5.0 Hz, 1H), 7.17(d, *J*=3.0 Hz, 1H), 6.59(d, *J*=3.0 Hz, 1H), 4.90(s, 1H), 4.10 ～ 4.13(m, 2H), 3.93 ～ 4.09(m, 1H), 3.65 ～ 3.92(m, 2H), 3.39 ～ 3.47(m, 1H), 3.29(d, *J*=5.0 Hz, 3H), 2.81(d, *J*=15.0 Hz, 2H), 2.71(d, *J*=15.5 Hz, 2H), 2.38 ～ 2.41(m, 1H), 1.83 ～ 1.87(m, 1H), 1.56 ～ 1.63(m, 1H), 1.01(d, *J*=7.0 Hz, 3H)；^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d_6) δ: 174.73, 171.38, 161.66, 161.49, 156.97, 151.52, 151.46, 150.33, 120.94, 116.23, 116.18, 102.42, 102.32, 101.95, 101.89, 72.55, 53.68, 52.89, 45.33, 42.88, 42.60, 41.96, 38.25, 34.20, 34.07, 31.25, 31.01, 30.10, 24.97, 24.92, 13.83, 13.48；MS(*m/z*): 313.2[M+H]$^+$。

(3*R*,4*R*)-4- 甲基 -3-[甲基 (7*H*- 吡咯 [2,3-*d*]- 嘧啶 -4- 基) 氨基] 哌啶 -1- 甲醛（有关物质 K)

向 100 mL 三口瓶中加入 **7** 盐酸盐 (5.0 g，15.7 mmol)、无水乙醇 (15.0 g) 和 DBU(7.2 g，47.3 mmol)，搅拌溶清，加入甲酸乙酯 (2.3 g，31.4 mmol)。25 ℃搅拌反应 6 h，TLC[(展开剂：二氯甲烷和甲醇（体积比 10 ∶ 1)] 跟踪反应。反应液浓缩至干，加入水 (20 mL) 和二氯甲烷 (20 mL)，分层，水相再用二氯甲烷 (10 mL) 萃取，合并有机相，于 45 ℃减压浓缩至干，剩余物经柱色谱纯化 [(洗脱剂：石油醚和乙酸乙酯（体积比 1 ∶ 1)]，得黄色粉末状固体有关物质 K(2.6 g，60.6%)，mp 122.5 ～ 127.1 ℃；纯度 99.38%（HPLC 条件同 **2**，相对保留时间 0.81)。^{1}H NMR(500 MHz, DMSO-d_6) δ: 11.63(s, 1H), 8.12(d, *J*=5.5 Hz, 1H), 8.05(d, *J*=10.0 Hz, 1H), 7.14(d, *J*=1.5 Hz, 1H), 6.56(d, *J*=3.0 Hz, 1H), 4.86 ～ 4.88(m, 1H), 3.77 ～ 3.83(m, 1H), 3.62 ～ 3.69(m, 1H), 3.37 ～ 3.50(m, 2H), 3.29(d, *J*=7.5 Hz, 3H), 2.39 ～ 2.42(m, 1H), 1.56 ～ 1.77(m, 2H), 1.03(dd, *J*=7.0、5.5 Hz, 3H)；^{13}C NMR (125 MHz, DMSO-d_6) δ: 161.05, 160.86, 156.94, 156.92, 151.60, 150.31, 150.29, 120.72, 120.70, 102.19, 102.15, 101.62, 53.66, 52.36, 44.89, 41.75, 34.22, 33.90, 31.99, 31.71, 31.46, 29.98, 13.85, 13.70；MS(*m/z*): 274.1[M+H]$^+$。

[(3*R*,4*R*)-3-[(6,7- 二氢 -5*H*- 吡咯 [2,3-*d*] 嘧啶 -4- 基)(甲基) 氨基]-4- 甲基哌啶 -1- 基]-3- 氧代丙腈（有关物质 U)

将 **7** 盐酸盐 (10 g，31.4 mmol)、乙醇 (100 mL) 和雷尼镍 (1 g) 加至高压反应釜中，用氢气置换 3 次，在氢气压 0.6 MPa、室温下反应 24 h，过滤，滤液浓缩，得中间体 **7**-U 粗品。

将上述 **7**-U 粗品、二氯甲烷 (50 mL)、DBU (14.4 g，94.6 mmol) 和氰乙酸乙酯 (7.1 g，62.8 mmol) 加至 250 mg 反应瓶中，室温反应 24 h，浓缩至干，剩余物经柱色谱纯化（洗脱剂同有关物质 K)，得淡黄色固体有关物质 U(0.5 g，5.1%)，mp 149.2 ～ 153.1 ℃。纯度 97.05%（HPLC 条件同 **2**，相对保留时间 0.70)。^{1}H NMR(400 MHz, $CDCl_3$) δ: 8.02(t, *J*=6.8、3.6 Hz, 1H), 4.77 ～ 4.82(m, 1H), 4.61 ～ 4.74(m, 1H), 3.71 ～ 4.02(m, 2H), 3.53 ～ 3.62(m, 5H), 3.40 ～ 3.48(m, 1H), 3.29(t, *J*=24.0、11.6 Hz, 2H), 3.14(d, *J*=7.6 Hz, 3H), 2.29 ～ 2.43(m, 1H), 1.66 ～ 1.86(m, 1H), 1.09(dd, *J*=16、9.6 Hz, 3H)；MS(*m/z*): 315.1[M+H]$^+$。

(*E*)-3- 氨基 -2- 氰基 -5-[(3*R*,4*R*)-4- 甲基 -3-[甲基 (7*H*- 吡咯 [2,3-*d*] 嘧啶 -4- 基) 氨基] 哌啶 -1- 基]-5- 氧代 -2- 戊烯酸乙酯（有关物质 V)

将 **2**(10 g，31.4 mmol)、氰乙酸乙酯 (10.65 g，94.2 mmol) 和 DMSO(100 mL) 加至 250 mL 反应瓶中，升温至 140 ℃反应 5 h，加入水 (100 mL) 和二

氯甲烷（100 mL），分层，水相用二氯甲烷（100 mL）萃取，合并有机相，减压浓缩至干，剩余物经低压制备型液相色谱（洗脱剂同有关物质 K）分离，得白色固体有关物质 V（0.4 g，3.0%），mp 129.3 ～ 134.0 ℃。纯度 99.78%（HPLC 条件同 **2**，相对保留时间 1.65）。^{1}H NMR（400 MHz, $CDCl_3$）δ: 9.05（d, *J*=13.4 Hz, 1H）, 8.77（s, 1H）, 8.09（d, *J*=5.16 Hz, 1H）, 7.13（d, *J*=3.4 Hz, 1H）, 6.55（m, *J*=3.24 Hz, 1H）, 5.73（s, 1H）, 4.82（m, 1H）, 4.11（dd, *J*=14.16、7.0 Hz, 2H）, 3.81 ～ 3.96（m, 2H）, 3.67（s, 2H）, 3.52 ～ 3.62（m, 2H）, 3.28（d, *J*=18.16 Hz, 3H）, 2.40 ～ 2.42（m, 1H）, 1.58 ～ 1.85（m, 2H）, 1.19（dd, *J*=13.64、7.04 Hz, 3H）, 1.01 ～ 1.03（m, 3H）；MS（*m/z*）: 426.6［M+H］$^+$。

3-［（3*R*,4*R*）-3-［（6- 氨基嘧啶 -4- 基）（甲基）- 氨基］-4- 甲基哌啶 -1- 基］-3- 氧代丙腈（有关物质 R）

将（6- 氯嘧啶 -4- 基）氨基甲酸叔丁酯（**8**，上海毕业医药科技股份有限公司，10.0 g，43.5 mmol）、（3*R*,4*R*）-1- 苯甲基 -*N*,4- 二甲基哌啶 -3- 胺（**9**，上海皓元医药股份有限公司，9.5 g，43.5 mmol）、碳酸钾（6.0 g，43.5 mmol）和水（100 mL）加至 250 mL 反应瓶中，升温至回流反应 24 h，冷却至室温，过滤，滤饼加至高压反应釜中，加入水（50 mL）、乙醇（50 mL）和氢氧化钯炭（0.2 g），用氢气置换 3 次，于氢压 0.3 MPa 条件下反应 12 h，过滤，滤液浓缩，得化合物 **10** 粗品。

将上述化合物 **10** 粗品、二氯甲烷（50 mL）和氰乙酸乙酯（9.8 g，87.0 mmol）加至 250 mL 反应瓶中，室温反应 24 h，浓缩至干，得化合物 **11** 粗品。

将化合物 **11** 粗品和 2 mol/L 盐酸（100 mL）加至反应瓶中，室温搅拌 8 h，加饱和碳酸钠溶液调至 pH 8，用乙酸乙酯（100 mL×2）萃取，浓缩至干，剩余物经柱色谱［洗脱剂：乙酸乙酯和甲醇（体积比 1 ∶ 1）］纯化，得白色固体有关物质 R（2.1 g，16.7%），mp 163.4 ～ 167.3 ℃。纯度 96.72%（HPLC 条件同 **2**，相对保留时间 0.40）。^{1}H NMR（500 MHz, $CDCl_3$）δ: 7.92（d, *J*=6.8 Hz, 1H）, 6.15（s, 2H）, 5.46（d, *J*=7.2 Hz, 1H）, 4.58（s, 1H）, 3.95 ～ 4.14（m, 2H）, 3.36 ～ 3.80（m, 4H）, 2.82（d, *J*=15.2 Hz, 3H）, 2.22（d, *J*=5.6 Hz, 1H）, 1.24 ～ 1.76（m, 2H）, 0.93（d, *J*=7.2 Hz, 3H）；^{13}C NMR（400 MHz, DMSO-d_6）δ: 164.04, 163.97, 161.99, 161.54, 161.31, 157.00, 116.21, 116.16, 81.45, 81.26, 52.11, 51.36, 45.51, 42.51, 41.95, 38.25, 31.84, 31.73, 31.21, 30.94, 30.75, 29.97, 24.80, 13.83, 13.55；MS（*m/z*）: 289.2［M+H］$^+$。

参考文献：

［1］ 杨玉慧, 许秀丽, 张 波. 治疗类风湿性关节炎新药托法替布[J]. 临床药物治疗杂志, 2018, **16**(12): 53-60.

［2］ 张春燕, 范小冬, 秦 元, 等. JAK抑制剂托法替布治疗类风湿性关节炎效果的meta分析[J]. 第三军医大学学报, 2018, **40**(6): 543-550.

［3］ 范忠晓, 吴培埕, 宋明辉. 托法替布对中重度类风湿关节炎患者的影响[J]. 中外医学研究, 2021, **19**(2): 8-10.

［4］ PRICE K E, LARRIVÉE-ABOUSSAFY C, LILLIE B M, *et al*. Mild and effcient DBU-catalyzed amidation of cyanoacetates［J］. *Org Lett*, 2009, **11**(9): 2003-2006.

［5］ 鲁格里S G, 霍金斯J M, 马科夫斯基T M, 等. 吡啶并[2,3-*d*]嘧啶衍生物、其中间体和合成方法: 中国, 101233138［P］. 2006-07-17.

［6］ 肖 灿, 徐镜人, 蔡 伟, 等. 一种枸橼酸托法替布的工业化生产方法: 中国, 107793418［P］. 2017-10-24.

［7］ 谢福佳, 张 勇, 孟繁柯, 等. 一种枸橼酸托法替布的精制方法: 中国, 108358929［P］. 2017-11-03.

［8］ 曹运华, 陈建丽, 林 峰, 等. 托法替尼合成路线图解[J]. 中国新药杂志, 2015, **24**(11): 1298-1303.

［9］ PATIL Y S, BONDE N L, KEKAN A S, *et al*. An improved and efficient process for the preparation of tofacitinib citrate［J］. *Org Process Res Dev*, 2014, **18**(12): 1714-1720.

［10］ WU X, ZENG X, WANG L, *et al*. Identification of related substances in tofacitinib citrate by LC-MS techniques for synthetic process optimization［J］. *J Pharm Biomed Anal*, 2017, **143**: 17-25.

［11］ 刘 帅, 唐 超, 隋 强, 等. 托法替布枸橼酸盐有关物质的合成[J]. 中国医药工业杂志, 2017, **48**(3): 382-386.

［12］ 孙丽姣, 吕明明, 高 爽, 等. RP-HPLC法测定枸橼酸托法替尼含量及有关物质[J]. 沈阳药科大学学报, 2018, **35**(2): 131-136.