HPLC 法测定立他司特原料药中的有关物质

李亚苹[1,2]，杨江涛[2]，林丽娅[2*]，张福利[2]，何永富[3]

（1. 上海工程技术大学化学化工学院，上海 201620；2. 上海医药工业研究院有限公司，上海 201203；3. 浙江博峭生物制药有限公司，浙江杭州 310014）

摘要：建立了 HPLC 法测定立他司特（**1**）原料药中的有关物质。采用 Fortis Diphenyl 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），以 10 mmol/L 磷酸二氢钾溶液和乙腈（95 ∶ 5）为流动相 A，以乙腈为流动相 B，梯度洗脱。流速为 1.0 mL/min，柱温为 40 ℃，检测波长为 205 nm，进样量为 5 μL。结果显示，**1** 与各杂质间的分离度均大于 1.5，并在相应浓度范围内线性关系良好。平均回收率（*n*=9）为 99.3%～ 104.1%，RSD 均≤ 5.1%。该方法操作简单，结果准确，适用于 **1** 原料药中有关物质的测定。

关键词：立他司特；高效液相色谱法；有关物质

中图分类号：R917；R988.1　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2024)11-1565-07

引用：李亚苹 , 杨江涛 , 林丽娅 , 等．HPLC 法测定立他司特原料药中的有关物质［J］．中国医药工业杂志 , 2024, 55(11): 1565-1571．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2024.11.014

Determination of the Related Substances in Lifitegrast Bulk Drugs by HPLC

LI Yaping[1,2], YANG Jiangtao[2], LIN Liya[2*], ZHANG Fuli[2], HE Yongfu[3]

(*1. School of Chemistry and Chemical Engineering, Shanghai University of Engineering and Science, Shanghai 201620; 2. Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry Co., Ltd., Shanghai 201203; 3. Zhejiang Boxiao Biopharmaceutical Co., Ltd., Hangzhou 310014*)

ABSTRACT: An HPLC method was established to determine the related substances in lifitegrast (**1**) bulk drugs. The Fortis Diphenyl column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used, and the analysis was carried out in the gradient elution mode with the mixture of 10 mmol/L potassium dihydrogen phosphate solution and acetonitrile in a volume ratio of 95 ∶ 5 as mobile phase A, and acetonitrile as mobile phase B. The flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 40 ℃, the detection wavelength was 205 nm, and the injection volume was 5 μL. The results showed that the separation degree between **1** and each related substance was greater than 1.5, and it was linear for **1** and the related substances in the corresponding concentration ranges. The average recoveries (*n*=9) of **1** and the related substances were 99.3% – 104.1%, and the RSDs were all less than 5.1%. The established method is easy to operate, accurate in results, which is suitable for the determination of relevant substances in **1** bulk drugs.

Key Words: lifitegrast; HPLC; related substance

立他司特（lifitegrast，**1**）是首个被美国 FDA 批准用于治疗干眼症的淋巴细胞功能相关抗原 -1（LFA-1）拮抗药，目前尚未在我国上市，但已被收录在第三批鼓励仿制药品目录中[1—2]。

本课题组选择了原研专利（WO 2009139817A2）[3]的路线合成 **1**（见图 1A）：5,7- 二氯 -2- 叔丁氧基羰基 -1,2,3,4- 四氢异喹啉 -6- 羧酸（**2**）与（*S*）-2- 氨基 -3- 甲磺酰基 - 苯丙酸苄酯盐酸盐（**3**）在缩合剂的作用下生成（*S*）-5,7- 二氯 -2- 叔丁氧基羰基 -1,2,3,4- 四氢异喹啉 -6- 甲酰胺基 -3-（3- 甲磺酰基苯基）丙酸苄酯（**4**），随后经盐酸脱去叔丁氧基羰基生成（*S*）-2-（5,7- 二氯 -1,2,3,4- 四氢异喹啉 -6- 甲酰胺基）-3-（3- 甲磺酰基苯基）丙酸苄酯盐酸盐（**5**），然后与苯并呋喃 -6- 羧酸（**6**）缩合成（*S*）-2-［2-（苯并呋喃 -6- 羰基）-5,7-

收稿日期：2023-03-29

作者简介：李亚苹（1998—），女，硕士研究生，专业方向：药物质量研究。

通信作者：林丽娅（1983—），女，硕士，从事药物质量研究与开发。E-mail：lly3008@163.com

二氯 -1,2,3,4- 四氢异喹啉 -6- 甲酰胺基]-3-(3- 甲磺酰基苯基) 丙酸苄酯 (**7**)，再经氢化或水解脱去苄基，生成 **1** 粗品，最后经结晶得到 **1** 精制品。**2**、**4**、**5**、**6**、**7** 作为路线的起始物料和中间体，在 **1** 中可能有残留，因此需控制以上杂质。后续处理过程中，经过酸性水溶液的多次洗涤，可有效除去剩余的 **3**，因此不必控制 **3**。

1 的结构中含有 2 个酰胺键，在酸、碱条件下可能会发生断裂。酰胺键断裂分别会生成杂质 (*S*)-2-(5,7- 二氯 -1,2,3,4- 四氢异喹啉 -6- 甲酰胺基)-3-(3- 甲磺酰基苯基) 丙酸 (**8**) 和 **6**，以及 2-(苯并呋喃 -6- 羰基)-5,7- 二氯 -1,2,3,4- 四氢异喹啉 -6- 甲酸 (**9**) 和 (*S*)-2- 氨基 -3- 甲砜基苯丙氨酸 (**10**)(如图 1B 所示)。其中 **10** 的极性极大，在后处理酸碱洗涤过程中可完全除去，因此不控制该杂质。

由于终产品的纯化过程使用了异丙醇，可能会与 **1** 发生酯缩合反应生成杂质 (*S*)-2-[2-(苯并呋喃 -6- 羰基)-5,7- 二氯 -1,2,3,4- 四氢异喹啉 -6- 甲酰胺基]-3-(3- 甲磺酰基苯基) 丙酸异丙酯 (**11**)(如图 1C 所示)。另外，使用的反应瓶以及放大生产时所用的反应釜均用乙醇清洗，如果未完全烘干，残留的乙醇可能与 **1** 发生酯缩合，生成杂质 (*S*)-2-[2-(苯并呋喃 -6- 羰基)-5,7- 二氯 -1,2,3,4- 四氢异喹啉 -6- 甲酰胺基]-3-(3- 甲磺酰基苯基) 丙酸乙酯 (**12**)(如图 1C 所示)。

为确保 **1** 的安全性，需控制药物在生产、贮存等环节中可能产生的有关物质，并建立相应的控制方法。但目前 **1** 中有关物质的分析方法尚无药典收录，也未见文献报道。本研究根据 **1** 的工艺路线、降解试验及实际样品检测结果，确立了 **1** 的杂质谱，并建立了 HPLC 法检测 **1** 及其 9 个有关物质，即杂质 **2**、**4**、**5**、**6**、**7**、**8**、**9**、**11**、**12**，并根据 ICH 指导原则对该方法进行验证 [4—5]，以期为 **1** 的质量控制研究提供参考。

1　仪器与试药

Ultimate 3000 型高效液相色谱仪 (美国 Thermo 公司)；CPA-225D 型分析天平和 PB-10 型 pH 计均购于德国 Sartorius 公司。

1 对照品 (含量 99.86%，批号 230225-4)、**1** 供试品 (含量 99.39%，批号 221015-1、230428-1、230428-2 和 230319-1)、**4** 对照品 (含量 98.55%，批号 220725-1)、**5** 对照品 (含量 99.78%，批号 221004-1)、**7** 对照品 (含量 98.43%，批号 220924)、**8** 对照品 (含量 96.84%，批号 220816-3)、**9** 对照品 (含量 99.47%，批号 220309-1)、**11** 对照品 (含量 99.04%，批号 221213)、**12** 对照品 (含量 99.94%，批号 221213) 均为自制；**2** 对照品 (宜宾市南溪区红光制药有限公司，含量 99.65%，批号 851784-82-2)；**6** 对照品 (宜宾市南溪区红光制药有限公司，含量 99.82%，批号 MS104505-220502)；磷酸为分析纯，磷酸二氢钾为优级纯，乙腈为色谱纯，水为超纯水。

2　方法与结果

2.1　色谱条件

色谱柱 Fortis Diphenyl 柱 (4.6 mm×250 mm，5 μm)，流动相 A 为 10 mmol/L 磷酸二氢钾溶液和乙腈 (95 ∶ 5，用磷酸调至 pH 3.0±0.1)，B 为乙腈，梯度洗脱 (0—58 min，A 80%—35%；58—62 min，A 35%；62—62.5 min，A 35%—80%；62.5—70 min；A 80%)；流速 1.0 mL/min；柱温 40 ℃；检测波长 205 nm；进样量 5 μL。

2.2　溶液配制

稀释剂 (空白溶液)：甲醇和水 (90 ∶ 10)。

杂质贮备液：分别取 **2**、**4**、**5**、**6**、**7**、**8**、**9**、**11**、**12** 的对照品各 20 mg，分别置 9 个不同的 20 mL 量瓶中，加入稀释剂制成 **2**、**4**、**5**、**6**、**7**、**8**、**9**、**11**、**12** 的质量浓度为 1 mg/mL 的单一杂质贮备液。

杂质混合贮备液：分别取单一杂质贮备液 500 μL，加至同一 50 mL 量瓶内，再用稀释剂稀释定容，配制成各杂质质量浓度均为 10 μg/mL 的杂质混合贮备液。

系统适用性溶液：精密称取 **1** 对照品 10 mg，置 10 mL 量瓶内，再加入上述杂质混合贮备液 1 mL，用稀释剂定容，摇匀即得。

对照品溶液：精密称取 **1** 对照品 10 mg，置 10 mL 量瓶内，用稀释剂溶解并定容，摇匀，制成质量浓度为 1 mg/mL 的对照品溶液。

供试品溶液：精密称取 **1** 供试品 10 mg，置

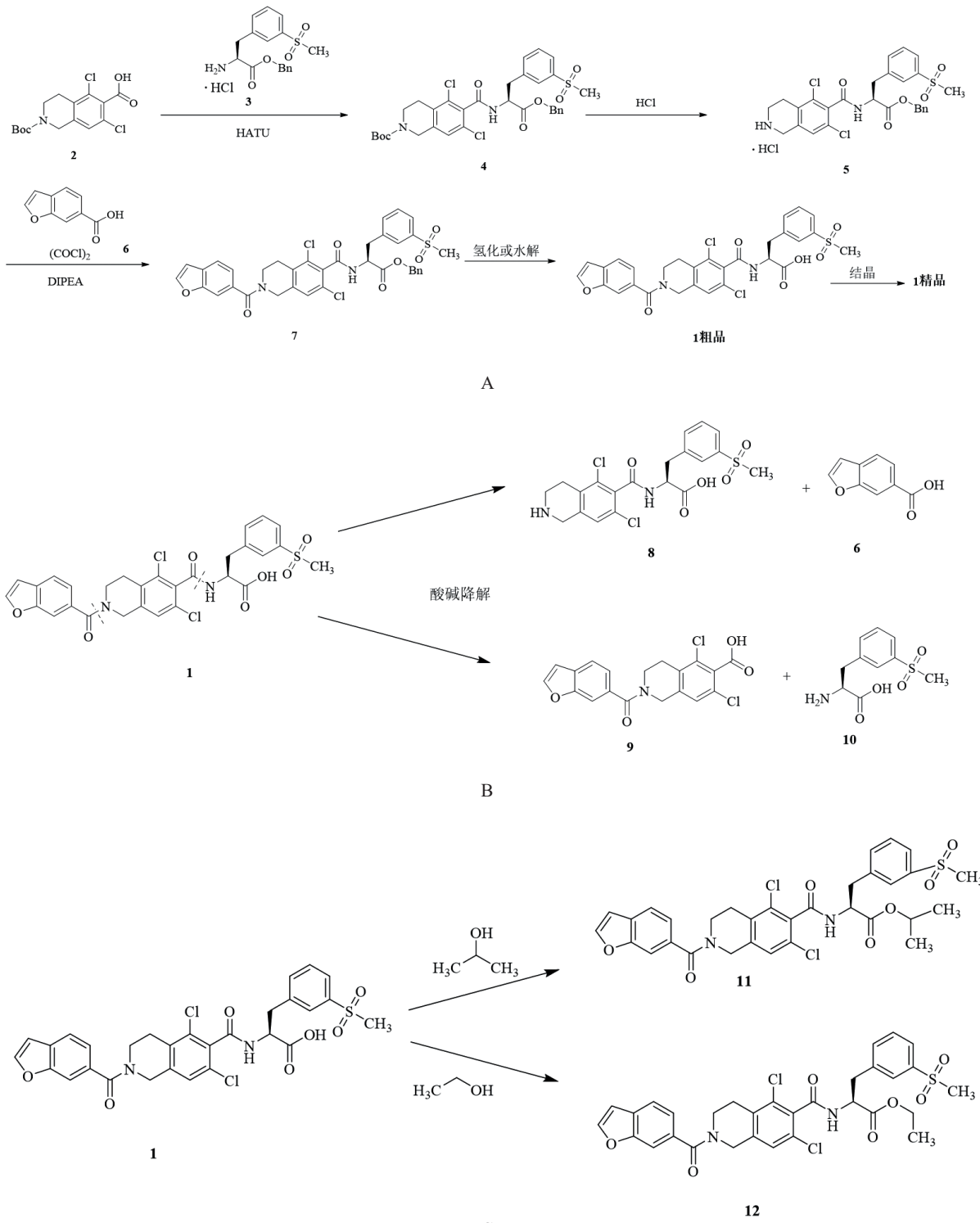


图 1　1 的合成路线（A）及杂质来源（B、C）

Fig.1　Synthetic Route (A) and Sources of Impurities (B, C) of **1**

10 mL 量瓶内，用稀释剂溶解并定容，摇匀，制成质量浓度为 1 mg/mL 的供试品溶液。

自身对照溶液：精密移取系统适用性溶液 100 μL，置 100 mL 量瓶中，加入稀释剂，定容，摇

匀即得。

2.3　系统适用性试验

取“**2.2**”项下的空白溶液和系统适用性溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进样分析，结果如图 2 所示。系统适用性溶液中各色谱峰间的分离度均≥ 1.5，按照 **1** 峰计算理论塔板数不低于 5 000，空白溶液在主峰和杂质峰处无干扰。

2.4　破坏性试验

称取 **1** 供试品 20 mg，共 6 份，进行下列试验。①未破坏：加入稀释剂溶解并定容至 20 mL，摇匀；②酸破坏：加入 0.2 mol/L 盐酸 2 mL，于 90 ℃下放置 1.5 h，加入 0.2 mol/L 氢氧化钠溶液 2 mL 中和，再用稀释剂定容至 20 mL，摇匀；③碱破坏：加入 0.2 mol/L 氢氧化钠溶液 1 mL，于 60 ℃加热 0.5 h，取出，放冷至室温，加入 0.2 mol/L 盐酸 1 mL 中和，再用稀释剂定容至 20 mL，摇匀；④氧化破坏：加入 30%过氧化氢溶液 1 mL，于 80 ℃加热 45 min，取出，放冷至室温，再用稀释剂定容至 20 mL，摇匀；⑤高温破坏：加入稀释剂 5 mL 溶解样品，于 95 ℃下放置 8 h，取出，放冷至室温，用稀释剂定容至 20 mL，摇匀；⑥光照破坏：加入稀释剂溶解并定容至 20 mL，摇匀，密封，于光照强度为 (4 500±500) lx 的光照稳定箱中放置 7 d。分别取上述破坏性试验样品，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，同时采用二极管阵列检测器（diode array detector，DAD）进行紫外扫描，检测波长范围为 190 ～ 400 nm，并记录色谱图，结果如图 3 所示。

结果表明，**1** 在酸、碱、高温、光照条件下均会降解出杂质 **8** 和杂质 **6**，在各条件下还会降解出一些未知杂质。各破坏性试验条件下所产生的降解产物与 **1** 均能良好分离，各降解产物与已知杂质之间也能较好分离。峰纯度分析显示，各破坏性试验溶液色谱图中的 **1** 均为单一峰，峰纯度大于 990，满足物料守恒性质，说明此法专属性良好，能有效检测样品中的降解产物。

2.5　线性试验

分别量取“**2.2**”项下的对照品溶液和 **2**、**4**、**5**、**6**、**7**、**8**、**9**、**11**、**12** 的单一杂质贮备液适量，加入稀释剂稀释，制成质量浓度分别为 0.3、0.5、1.0、1.5、2.0 μg/mL 的系列浓度线性试验溶液，按“**2.1**”项下色谱条件测定，以峰面积 *A* 作为纵坐标、各杂质和 **1** 的质量浓度 *c* 为横坐标，进行线性回归分析。所得线性回归方程如表 1 所示，可见 **1** 及各杂质在相应浓度范围内线性关系良好。此外，将 **1** 的回归方程斜率分别与各杂质的回归方程斜率相除，得各有关物质的相对校正因子，结果如表 1 所示，可见各有关物质的校正因子均在 0.92 ～ 1.34，表明可用加校正因子的主成分自身对照法计算已知杂质含量。

2.6　检测限和定量限

取“**2.2**”项下的对照品溶液和各杂质贮备液，

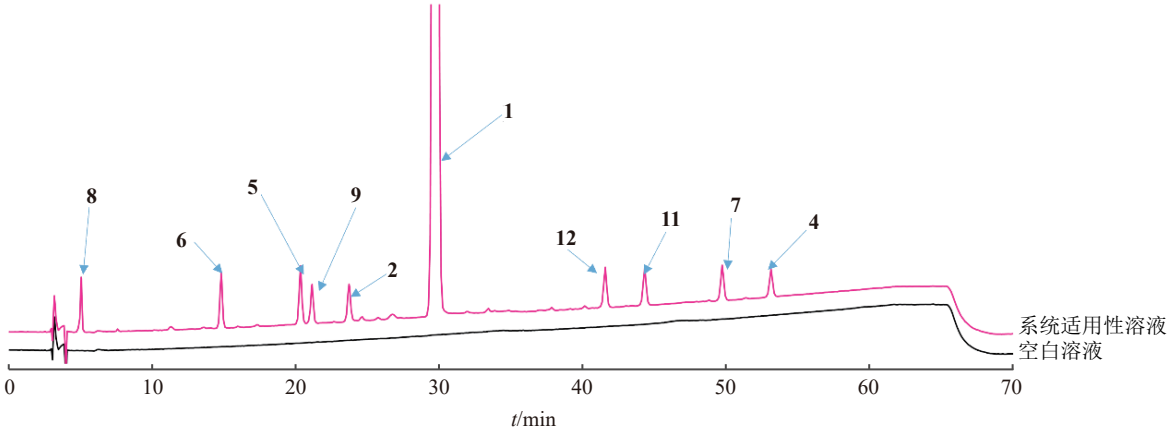
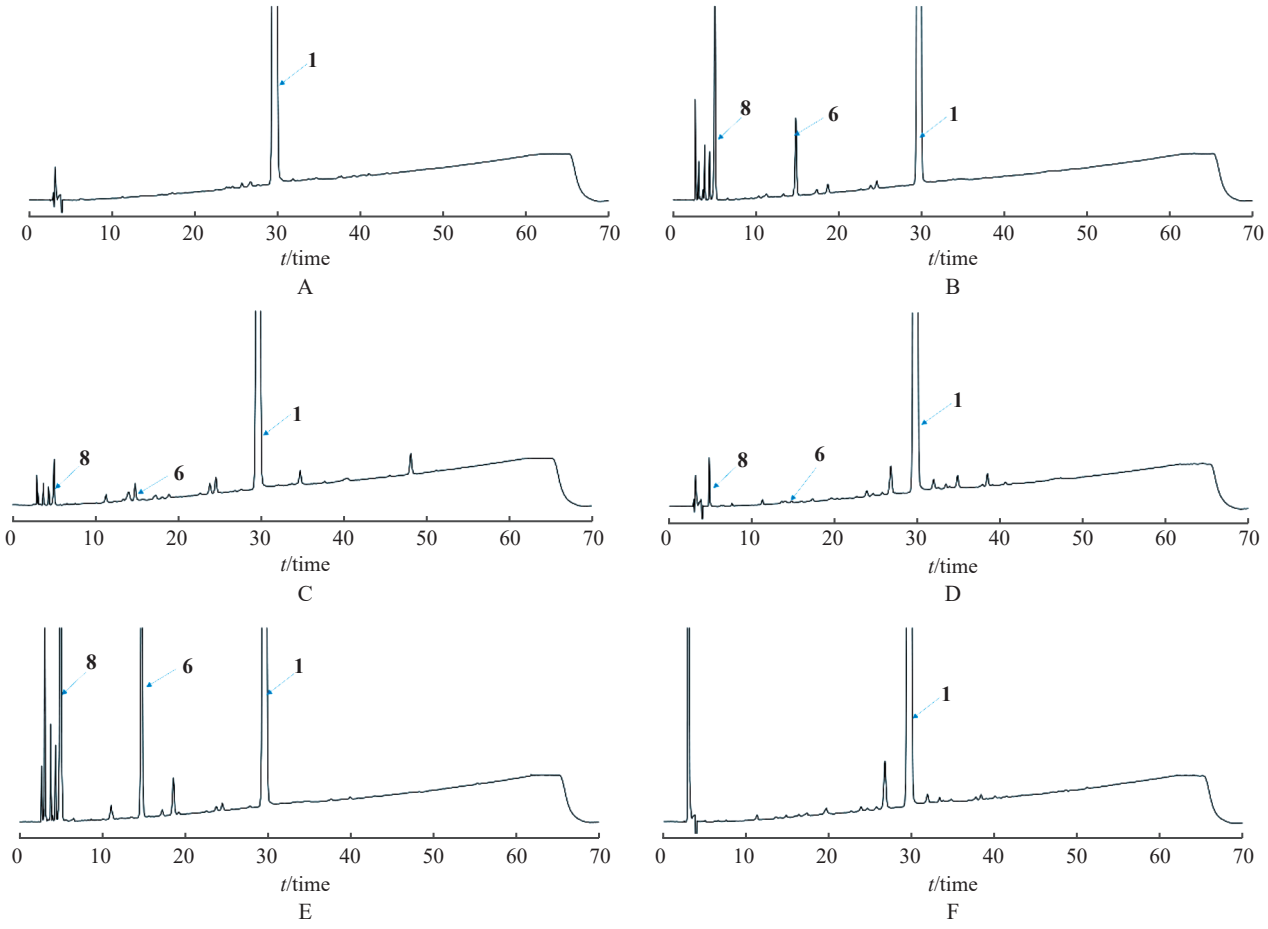


图 2　典型色谱图

Fig.2　Typical Chromatogram



A—未破坏；B—酸破坏；C—高温破坏；D—光破坏；E—碱破坏；F—氧化破坏。

图 3 破坏性试验色谱图

Fig.3 Chromatograms of Stress Tests

表 1 线性试验结果

Tab.1 Results of Linearity Test

化合物	线性方程	相关系数 r	线性范围 /μg·mL^{-1}	校正因子
1	A=0.388 0c − 0.001 7	0.999 6	0.297 8 ～ 1.985 4	—
杂质 **2**	A=0.340 4c+0.006 6	0.999 6	0.300 1 ～ 2.000 7	1.14
杂质 **4**	A=0.294 1c − 0.012 1	0.999 8	0.295 3 ～ 1.969 0	1.32
杂质 **5**	A=0.420 2c − 0.008 4	0.999 8	0.303 6 ～ 2.023 8	0.92
杂质 **6**	A=0.398 1c − 0.005 2	0.999 9	0.309 2 ～ 2.061 3	0.97
杂质 **7**	A=0.289 7c+0.004 8	0.999 8	0.303 2 ～ 2.021 3	1.34
杂质 **8**	A=0.295 4c − 0.008 2	0.999 9	0.293 2 ～ 1.954 3	1.31
杂质 **9**	A=0.322 4c − 0.007 3	0.999 7	0.300 0 ～ 2.000 1	1.20
杂质 **11**	A=0.313 6c − 0.003 8	0.999 6	0.299 7 ～ 1.998 1	1.24
杂质 **12**	A=0.335 3c+0.001 0	0.999 7	0.299 8 ～ 1.998 8	1.16

用稀释剂逐级稀释制成一定浓度的溶液，进样分析，分别按信噪比（S/N）大于 3 和 10 计算检测限和定量限。结果显示，**2**、**4**、**5**、**6**、**7**、**8**、**9**、**11**、**12** 和 **1** 的检测限分别为 0.150 1、0.147 7、0.151 8、0.154 6、0.151 6、0.146 6、0.150 0、0.149 9、0.149 9、0.148 9 μg/mL；定量限分别为0.300 1、0.295 3、0.303 6、0.309 2、0.303 2、0.293 2、0.300 0、0.299 7、0.299 8、0.297 8 μg/mL。

在各杂质的定量限下，连续进样 6 针，结果显示，**2**、**4**、**5**、**6**、**7**、**8**、**9**、**11**、**12** 和 **1** 峰面积的 RSD（n=6）分别为 1.9%、3.5%、2.6%、2.6%、3.7%、2.5%、3.5%、3.3%、3.1%、2.6%，说明该方法灵敏度良好。

2.7 回收率试验

精密称取 **1** 供试品约 20 mg，置 20 mL 量瓶中，平行 9 份，加入“**2.2**”项下的杂质混合贮备液适量，加稀释剂定容，分别配制成低、中、高浓度（各杂

质限度分别为50%、100%和200%）的加标溶液，每个浓度各3份，共9份。上述9份加标溶液分别移取100 μL，置9个100 mL量瓶中，加入稀释剂稀释定容，得到9份0.1%主成分自身对照溶液；再同法配制2份不加杂质的背景对照溶液。按“**2.1**”项下色谱条件进样分析，计算各杂质的回收率。结果显示，**2**、**4**、**5**、**6**、**7**、**8**、**9**、**11**、**12**的平均回收率（n=9）分别为102.5%、101.8%、104.1%、103.6%、102.1%、99.3%、99.6%、102.2%、97.1%；RSD分别为1.7%、2.1%、2.2%、2.9%、1.9%、5.1%、3.6%、2.5%、3.5%。

2.8 精密度试验

2.8.1 重复性试验

按“**2.7**”项下回收率试验的中浓度（100%各杂质限度）溶液的配制方法平行配制6份加标样品溶液及其0.1%自身对照溶液，作为重复性试验溶液。按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，结果显示，**2**、**4**、**5**、**6**、**7**、**8**、**9**、**11**、**12**的含量RSD（n=6）分别为4.0%、4.1%、4.6%、3.4%、3.6%、4.1%、4.0%、4.6%、0，总杂质含量的RSD（n=6）为2.9%，说明该方法重复性良好。

2.8.2 中间精密度

由不同的分析人员、使用不同的仪器、在不同的日期，重复“**2.8.1**”项下的试验操作，平行配制6份加标样品溶液及其0.1%自身对照溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进样，结果显示，2位分析人员制备的12份样品中，杂质**2**、**4**、**5**、**6**、**7**、**8**、**9**、**11**、**12**含量的RSD（n=12）分别为4.3%、4.7%、4.5%、2.4%、3.4%、3.9%、4.3%、4.7%、2.6%，总杂含量的RSD（n=12）为2.4%，说明该方法的中间精密度良好。

2.9 稳定性试验

按“**2.2**”项下方法配制系统适用性溶液和0.1%自身对照溶液，在室温条件下，分别于放置0、19、42 h时取样，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，计算在不同时间点的杂质含量。结果表明，在室温条件下，0.1%自身对照溶液在不同时间点的峰面积与0 h的峰面积比值在98.40%～103.11%，系统适用性溶液在不同稳定性时间点的单杂绝对差值≤0.02%，总杂绝对差值≤0.03%，说明系统适用性溶液在室温放置42 h的条件下稳定性良好。

2.10 耐用性试验

按“**2.2**”项下方法配制系统适用性溶液和0.1%自身对照溶液，在“**2.1**”项下色谱条件的基础上，分别考察在不同流速（1.0±0.1）mL/min、不同柱温（40±2）℃、不同波长（205±1）nm、不同起始梯度（流动相A 80%±1%）的条件下，检测结果的变化情况。结果显示，在不同的耐用性色谱条件下，系统适用性溶液中的**1**和各已知杂质峰相互之间的分离度均不小于1.5，且与“**2.1**”项下色谱条件相比，所测系统适用性溶液中的单个杂质含量的绝对差值≤0.02%，总杂的绝对差值≤0.05%。

2.11 样品检测

取3批**1**原料药，按“**2.2**”项下方法配制供试品溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定。检测结果符合要求，结果如表2所示。

表2 样品检测结果

Tab.2 Determination Results of Sample Test

杂质	限度	批次		
		230428-2	230428-1	230319-1
2	0.1	—	—	—
4	0.1	—	—	—
5	0.1	—	—	—
6	0.1	—	—	0.01
7	0.1	0.01	0.01	0.01
8	0.1	—	—	0.01
9	0.1	—	—	—
11	0.1	—	—	—
12	0.1	0.01	—	—
最大未知杂质	0.1	0.05	0.05	0.04
总杂	0.5	0.18	0.14	0.2

注：“—”表示未检出。

3 讨论

3.1 色谱条件的选择

3.1.1 检测波长的选择

采用DAD对**1**及各杂质进行全波长扫描，从各对照品溶液的DAD图谱结果可知，**1**和杂质**11**、**12**在193、205、257 nm附近处有最大吸收；杂质**4**、**5**、**7**和**8**在205 nm附近处有最大吸收，杂质**2**在203、283 nm附近处有最大吸收，杂质**6**在203、

270 nm 附近处有最大吸收；杂质 **9** 在 206、256 nm 附近处有最大吸收。

综上所述，**1** 和各杂质峰均在 205 nm 附近处均有较大吸收，且响应良好，故选择 205 nm 作为有关物质的检测波长。

3.1.2 流动相、PH 值以及盐浓度的选择

本研究考察了三氟乙酸水溶液 - 乙腈体系、磷酸水溶液 - 乙腈体系和磷酸二氢钾溶液 - 乙腈体系。结果显示，在三氟乙酸 - 水溶液体系、磷酸水溶液 - 乙腈体系下存在基线漂移、色谱峰 **1** 与 **9** 分不开的情况；在考察磷酸二氢钾 - 乙腈体系时，考察了该体系的 pH 值以及盐浓度对出峰情况的影响。

由于杂质 **9** 的 pK_a 值为 1.77±0.2，当 pH ≥ 3.0 时，杂质 **9** 主要以离子形式存在，极性变大，此时色谱峰 **1** 和 **9** 分离良好。杂质 **8** 的 pK_a 值为 3.06±0.1，当 pH ≥ 4.0 时，杂质 **8** 主要以离子形式存在，保留差，与溶剂峰分不开。当 pH 值为 3.0 时，色谱峰 **1** 与 **9** 分离良好，且杂质 **8** 有保留，与溶剂峰分离良好，因此流动相的 pH 值选择 3.0。

当磷酸二氢钾溶液浓度为 5 mmol/L 时，杂质 **8** 和溶剂峰分不开；当磷酸二氢钾溶液浓度为 10 mmol/L 时，各色谱峰之间分离情况良好，基线平稳；当磷酸二氢钾溶液浓度为 20 mmol/L 时，杂质 **5** 和杂质 **9** 分不开。

综上所述，在 10 mmol/L 磷酸二氢钾（pH 3.0±0.1）- 乙腈的流动相体系下，**1** 和各杂质，杂质与杂质间分离情况良好，且基线平稳。最终选择该流动相体系。

3.1.3 色谱柱的选择

在 YMC Triart C_{18} 柱（4.6 mm×150 mm，3 μm）上，杂质 **5** 峰形差。考虑到杂质 **5** 带有苯环，后续选用了几款苯基柱进行考察。其中，杂质 **5** 在 Thermo Hypersil Gold Phenyl 柱（4.6 mm×150 mm，3 μm）、GALAK Phenyl 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）上的峰形良好，但个别杂质峰之间分不开；在 Fortis Diphenyl 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）上，杂质 5 峰形良好，且各色谱峰之间分离良好。故最终选择 Fortis Diphenyl 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）作为试验用色谱柱。

3.2 有关物质测定方法的选择

采用加校正因子的 0.1％主成分自身对照法计算，可以解决各成分间由于所选波长等条件造成的响应问题。

参考文献：

[1] NONE. Lifitegrast (Xiidra) for dry eye disease [J]. *Jama*, 2017, **317**(14): 1473-1474.

[2] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 关于印发第三批鼓励仿制药品目录的通知 [EB/OL]. (2023-12-25) [2024-03-01]. https://www.gov.cn/zhengce/zhengceku/202312/content_6922542.htm.

[3] Sarcode Bioscience Inc. LFA-1 inhibitor and polymorph thereof: US, WO2014018748A1 [P]. 2014-01-30.

[4] International Conference of Harmonization. Q2A text on validation of analytical procedures [EB/OL]. [2023-01-10]. https://wenku.baidu.com/view/780895e75a8102d277a22f47.htmL.

[5] International Conference of Harmonization. Q2B text on validation of analytical procedures: text and methodology. [2023-01-10]. https://wenku.baidu.com/view/f60dee2c7375a417866f8f39.htmL.