HPLC 法测定 *N*- 叔丁氧羰基 -5,7- 二氯 -1,2,3,4- 四氢异喹啉 -6- 羧酸中的有关物质

李亚苹[1,2]，刘　絮[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. 浙江博峪生物制药有限公司，浙江杭州 310014）

摘要：建立了 HPLC 法测定立他司特的关键起始物料 *N*- 叔丁氧羰基 -5,7- 二氯 -1,2,3,4- 四氢异喹啉 -6- 羧酸（**1**）中的有关物质。采用 Thermo Acclaim™ Mixed-Mode WAX-1 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），以 30 mmol/L 磷酸二氢钾溶液和乙腈（体积比 95 ∶ 5）为流动相 A，以乙腈和四氢呋喃（体积比 80 ∶ 20）为流动相 B，梯度洗脱。流速为 0.9 mL/min，柱温为 30 ℃，检测波长为 205 nm，进样量为 50 μL。结果显示，主成分与各杂质间分离度良好，且在相应浓度范围内线性关系良好。平均回收率（*n*=9）为 96.4%～ 105.6%，RSD 均≤ 5.1%。该方法操作简单、准确、可靠，适用于 **1** 中有关物质的测定。

关键词：*N*- 叔丁氧羰基 -5,7- 二氯 -1,2,3,4- 四氢异喹啉 -6- 羧酸；立他司特；高效液相色谱；有关物质
中图分类号：R917　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2024)01-0107-06
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2024.01.014

Determination of Related Substances in *N-tert*-Butoxycarbonyl-5,7-dichloro-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-6-carboxylic Acid by HPLC

LI Yaping[1,2], LIU Xu[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 *N-tert*-butoxycarbonyl-5,7-dichloro-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-6-carboxylic acid (**1**), a key starting material for lifitegrast. A Thermo Acclaim™ Mixed-Mode WAX-1 column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used, and the analysis was carried out in the gradient elution mode with 30 mmol/L potassium dihydrogen phosphate solution-acetonitrile (95∶5) as mobile phase A, and acetonitrile-tetrahydrofuran (80∶20) as mobile phase B. The flow rate was 0.9 mL/min, the column temperature was 30 ℃, the detection wavelength was 205 nm, and the injection amount was 50 μL. The results showed that the separation between the main component and various impurities was good, and it was linear for the main component and various impurities in the corresponding concentration ranges. The average recoveries (*n*=9) were 96.4% – 105.6%, with the RSDs less than 5.1%. This method is easy to operate, accurate, and reliable, which is suitable for the determination of related substances in **1**.

Key Words: *N-tert*-butoxycarbonyl-5,7-dichloro-1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-6-carboxylic acid; lifitegrast; HPLC; related substance

干眼症也称干燥性角结膜炎或干眼综合征，是一种与眼表炎症相关的多因素疾病，其特征为泪液减少或泪膜蒸发增加，影响眼表和泪腺。立他司特（lifitegrast）是一种新型小分子整合素抑制剂，可抑

收稿日期：2023-01-29
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

制参与干眼症发病机制特定的 T 细胞所介导的炎症途径[1]。*N*- 叔丁氧羰基 -5,7- 二氯 -1,2,3,4- 四氢异喹啉 -6- 羧酸（**1**）是立他司特合成路线的关键起始物料[2]。**1** 的合成路线及其杂质来源如图 1 所示。通过分析该合成路线，**1** 可能存在的有关物质包括：①工艺杂质，**7** 中残留的 **6** 与盐酸反应生成 **5** 和 **10**；**5** 随着反应的进行最终生成 **9**；在最后一步反应中，**8** 未反应完全，导致 **1** 中有少量 **8**；②降解杂质，**1** 在酸、碱、氧化、高温、光照条件下均会生成杂质 **8**。

目前未见关于 **1** 中有关物质的分析方法研究。本研究根据 **1** 的工艺路线及样品检测，确立了相应的杂质谱，并根据 ICH 指导原则[3—4]对方法进行了验证。通过采用加校正因子的主成分自身对照法计算杂质含量，建立了 HPLC 法检测 **1** 中的有关物质，以期为 **1** 的质量研究提供参考。

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 Satorius 公司。

1 对照品（含量 99.50%，批号 220805）、**5** 对照品（含量 92.93%，批号 220621）、**8** 对照品（含量 92.70%，批号 220728）、**9** 对照品（含量 99.36%，批号 211201）、**1**（含量 99.52%，批号 220909）均为自制；**10** 对照品（上海麦克林生化科技有限公司，含量≥ 99%，批号 C12966072）；乙腈、四氢呋喃为色谱纯，氢氧化钾为分析纯，磷酸二氢钾为优级纯，水为超纯水。

2　方法与结果

2.1　色谱条件

色谱柱 Thermo Acclaim™ Mixed-Mode WAX-1 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相 A 为 30 mmol/L 磷酸二氢钾溶液和乙腈（体积比 95 ∶ 5，用氢氧化钾溶液调至 pH 6.0±0.1），B 为乙腈和四氢呋喃（体积比 80 ∶ 20），梯度洗脱（0—5 min，A 70%；5—28 min，A 70%—40%；28—45 min，A 40%；45—45.1 min；A 40%—70%；45.1—60 min，A 70%）；

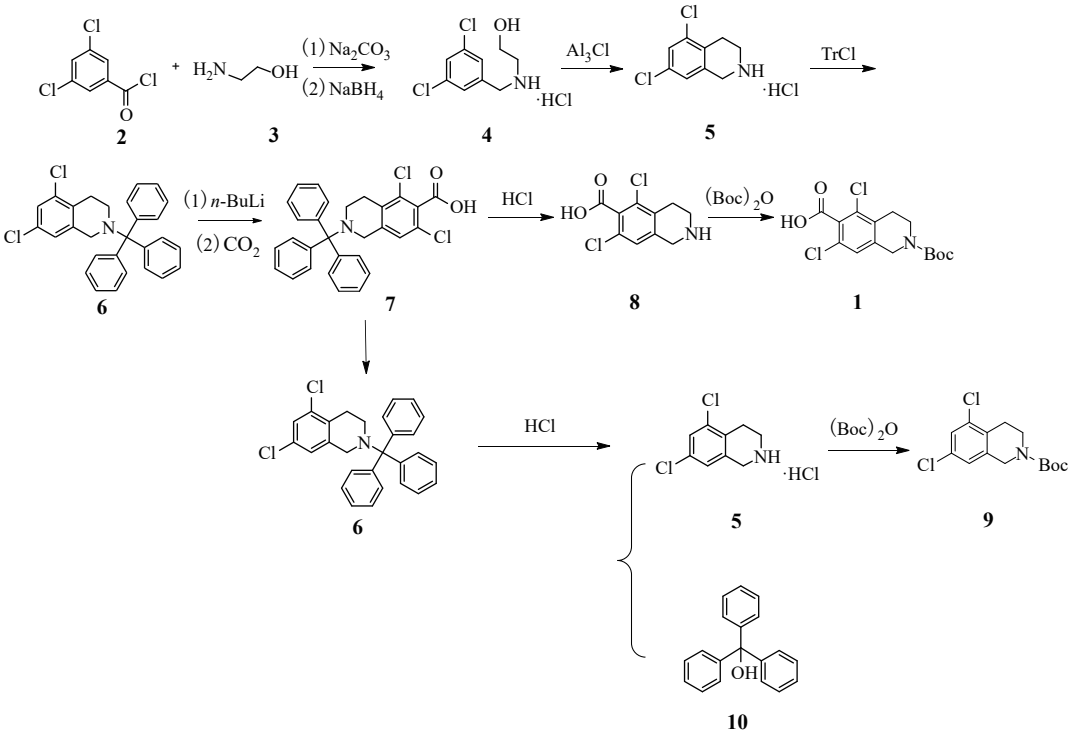


图 1　1 的合成路线及杂质来源

Fig.1　Synthetic Route and Sources of Impurities of **1**

流速 0.9 mL/min；柱温 30 ℃；检测波长 205 nm；进样量 50 μL。

2.2 溶液配制

稀释剂：乙腈和水（体积比 80 ∶ 20）为稀释剂 a（也作为空白溶液）；水和乙腈（体积比 80 ∶ 20）为稀释剂 b。

杂质 **5**、**8**、**9**、**10** 贮备液：称取 **8** 对照品 2.5 mg，置 5 mL 量瓶中，加入稀释剂 b，溶解并制成质量浓度为 0.5 mg/mL 的杂质 **8** 贮备液；分别称取 **5**、**9**、**10** 对照品 5 mg，各置不同的 5 mL 量瓶中，再分别加入稀释剂 a 溶解并定容，摇匀，配制成质量浓度为 1 mg/mL 的杂质 **5**、**9**、**10** 贮备液。

杂质混合贮备液：分别取杂质 **8** 贮备液 400 μL，杂质 **5**、**10** 贮备液各 200 μL，杂质 **9** 贮备液 2 mL，置同一 20 mL 量瓶中，加稀释剂 a 定容，摇匀，配制成每 1 mL 中约含杂质 **5**、**10**、**8**、**9** 分别为 10、10、10、100 μg 的杂质混合贮备液。

1 对照品溶液：称取 **1** 对照品 10 mg，置 10 mL 量瓶内，加入稀释剂 a 溶解并定容，摇匀，即得。

供试品溶液：称取 **1** 10 mg，置 10 mL 量瓶内，用稀释剂 a 溶解并定容，摇匀即得。

系统适用性溶液：称取 **1** 10 mg，置 10 mL 量瓶内，再加入杂质混合贮备液 1 mL，用稀释剂 a 溶解并定容，摇匀即得。

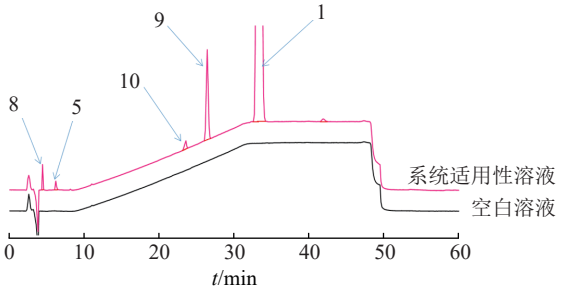
对照溶液（1%自身对照溶液）：精密移取系统适用性溶液 100 μL，置 10 mL 量瓶中，加入稀释剂 a 定容，摇匀即得。

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。本色谱条件下，按 **1** 峰计，理论塔板数不低于 5 000，各色谱峰之间的分离度均大于 1.5，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** 20 mg，共 6 份，分别进行下列试验。①未破坏：加入稀释剂 a 溶解并定容至 20 mL，摇匀。②酸破坏：加入 0.1 mol/L 盐酸 2 mL，常温放置 6 h，然后加入 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 2 mL 中和，再用稀释剂 a 定容至 20 mL，摇匀。③高温破坏：加入稀释剂 a 5 mL 使溶解，于 90 ℃加热 16 h，取出，放冷至室温，用稀释剂 a 定容至 20 mL，摇匀。④光照破坏：加入稀释剂 a 溶解并定容至 20 mL，摇匀，密封，置光照强度为（4 500±500）lx 的光照稳定箱中，静置 7 d。⑤碱破坏：加入 0.1 mol/L 氢氧化钠溶液 1 mL，于 90 ℃加热 5 h，取出，放冷至室温，加入 0.1 mol/L 盐酸 1 mL 中和，再用稀释剂 a 定容至 20 mL，摇匀。⑥氧化破坏：加入 3%过氧化氢溶液 1 mL，于 60 ℃加热 2 h，取出，放冷至室温，再用稀释剂 a 定容至 20 mL，摇匀。取上述样品，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，结果如图 3 所示。同时采用二极管阵列检测器（DAD）进行紫外吸收光谱扫描，波长扫描范围为 190 ～ 400 nm，并记录色谱图。



1—**1**；5—**5**；8—**8**；9—**9**；10—**10**。

图 2 典型色谱图

Fig.2 Typical Chromatogram

结果表明，**1** 在酸、高温破坏条件下均会降解出杂质 **8**；在氧化、光照、碱破坏条件下，除了降解出杂质 **8** 以外，还会降解产生一些未知杂质。各破坏条件下所产生的降解产物与 **1** 均能良好分离，与已知杂质之间也能较好分离。峰纯度分析结果显示，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，满足物料守恒条件。上述结果说明此法专属性良好，能有效检测样品中的降解产物。

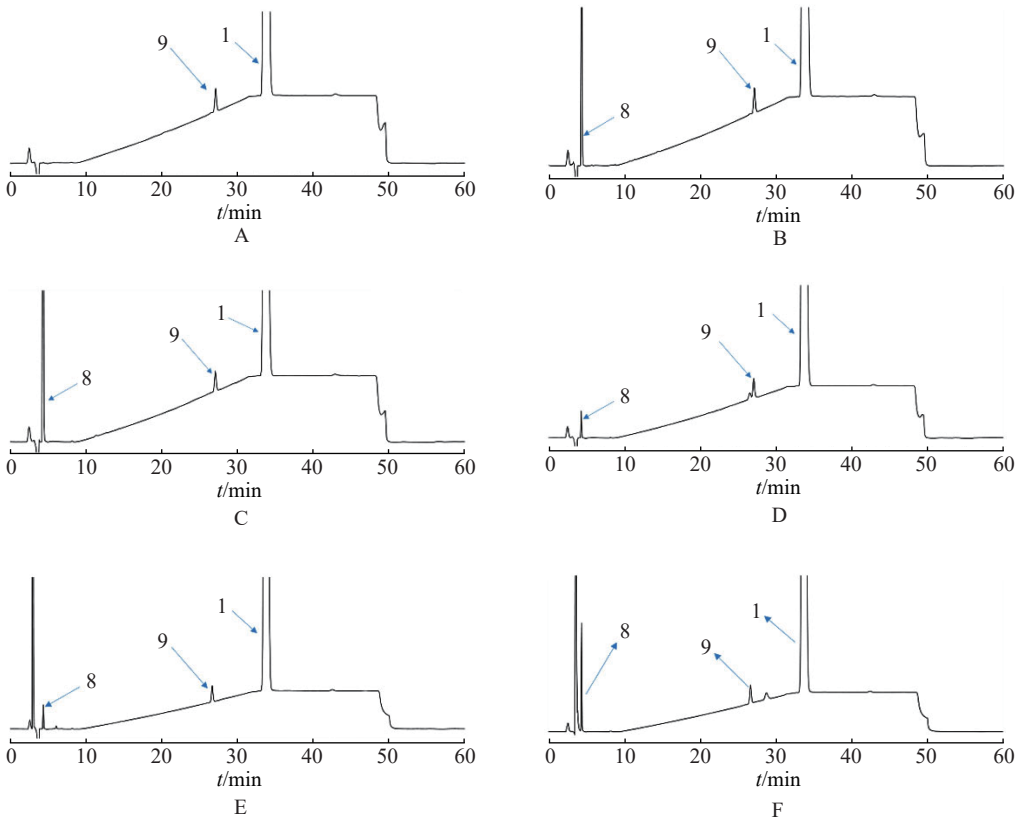
2.5 线性试验

分别量取“**2.2**”项下的 **1** 对照品溶液和杂质 **5**、**8**、**9**、**10** 贮备液适量，加入稀释剂 a 逐步稀释，制成杂质 **8** 的质量浓度分别为 0.1、0.3、0.5、1.0、1.5、

2.0 μg/mL，**1** 和杂质 **5**、**9**、**10** 的质量浓度分别为 0.3、0.5、1.0、1.5、2.0 μg/mL 的系列线性混合溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，以峰面积（*A*）为纵坐标、各物质的质量浓度（*c*）为横坐标，进行线性回归分析，计算线性方程和相关系数 *r*。结果如表 1 所示，**1** 及各杂质在相应浓度范围内线性关系良好。

2.6　检测限和定量限

取“**2.2**”项下的 **1** 对照品溶液和各杂质贮备液，用稀释液 a 逐级稀释，并进样分析，分别按信噪比（*S*/*N*）为 3 和 10 计算检测限和定量限。结果显示，杂质 **5**、**8**、**9**、**10**，以及原料 **1** 的检测限分别为 0.143 5、0.041 7、0.151 0、0.154 1、0.150 2 μg/mL；定量限分别为 0.287 1、0.083 4、0.302 1、0.308 2、0.300 4 μg/mL。取定量限溶液连续进样 6 针，结果显示，杂质 **5**、**8**、**9**、**10**，以及原料 **1** 峰面积的 RSD（*n*=6）分别为 3.3%、4.3%、4.6%、3.2%、3.9%，



A—未破坏样品；B—酸破坏样品；C—高温破坏样品；D—光照破坏样品；E—碱破坏样品；F—氧化破坏样品。1—**1**；8—**8**；9—**9**。

图 3　破坏性试验色谱图

Fig.3　Chromatograms of the Stressing 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*=5.474 7*c* − 0.066 4	0.999 9	0.300 4～2.091 2	—
杂质**5**	*A*=4.960 8*c* − 0.076 4	0.999 7	0.287 1～1.967 3	1.10
杂质**10**	*A*=8.265 0*c* − 0.093 5	0.999 6	0.305 2～2.034 8	0.66
杂质**8**	*A*=9.142 8*c*+0.022 5	0.999 7	0.083 4～1.618 6	0.60
杂质**9**	*A*=5.310 1*c*+0.303 5	0.999 8	0.302 1～20.081 5	1.03

表明本方法灵敏度良好。

2.7 回收率试验

精密称取 **1** 20 mg，共 9 份，置 20 mL 量瓶中，分别加入“**2.2**”项下的杂质 **5**、**10**、**8**、**9** 贮备液适量，加稀释剂 a 定容，分别配制成低、中、高 3 个浓度水平（50%、100%和 200%各杂质限度）的加标溶液，每个浓度水平各 3 份，再配制 2 份不加杂质的对照溶液，并为每份溶液配制 1%自身对照溶液。按“**2.1**”项下色谱条件进样分析，计算回收率。结果显示，杂质 **5**、**10**、**8**、**9** 的平均回收率（n=9）分别为 101.6%、96.4%、97.9%、105.6%；RSD 分别为 3.7%、5.1%、1.5%、2.1%。

2.8 精密度试验

2.8.1 重复性试验

按“**2.7**”项下中浓度水平（100%各杂质限度）溶液的配制方法平行配制 6 份样品溶液，并为每份溶液配制 1%自身对照溶液，得到重复性试验溶液。按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，计算单杂和总杂含量，并计算其 RSD。结果显示，杂质 **5**、**10**、**8**、**9** 含量的 RSD（n=6）分别为 3.8%、3.2%、1.9%、1.5%，总杂质含量的 RSD（n=6）为 1.6%，说明该方法重复性良好。

2.8.2 中间精密度

由不同的分析员、使用不同的仪器、在不同的日期，对“**2.8.1**”项下相同批次的样品进行分析。按“**2.7**”项下回收率试验的中浓度水平（100%各杂质限度）溶液的配制方法平行配制 6 份样品溶液，并为每份溶液配制 1%自身对照溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进样，计算各单杂和总杂含量，计算 2 个分析员制备的 12 份样品的 RSD。结果显示，2 个分析员制备的 12 份样品中，杂质 **5**、**10**、**8**、**9** 含量的 RSD（n=12）分别为 8.9%、2.7%、2.4%、3.3%，总杂含量的 RSD（n=12）为 3.1%，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 1%自身对照溶液，在 5 ℃条件下分别放置 6、23、54、70 h，定时取样后按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，记录 **1** 及各杂质的峰面积。结果在 5 ℃条件下：1%自身对照溶液在不同时间点与 0 h 时的峰面积比值为 99.37%～104.21%；系统适用性溶液在各个时间点与 0 h 时的峰面积相比，单杂的绝对差值≤ 0.02%，总杂的绝对差值≤ 0.03%。上述结果说明系统适用性溶液和 1%自身对照溶液在 5 ℃条件下放置 70 h 内稳定。

2.10 耐用性试验

按“**2.2**”项下方法配制系统适用性溶液和 1%自身对照溶液，分别在不同流速（0.9±0.1）mL/min、不同柱温（30±2）℃、不同波长（205±1）nm、不同流动相比例（流动相 A 中乙腈比例 5% ±1%）的条件下，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，计算各杂质含量。结果显示，在不同耐用性色谱条件下，系统适用性溶液中的 **1** 和各杂质、杂质与杂质之间的分离度均大于 1.5，杂质 **8** 与空白溶剂的分离度良好；与“**2.1**”项下色谱条件相比，所测样品溶液单杂的绝对差值≤ 0.02%，总杂绝对差值≤ 0.03%。

2.11 样品检测

取 3 批 **1**，按“**2.2**”项下方法配制供试品溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进样分析。结果如表 2 所示，未检出含量大于 0.1%的未知杂质。

表 2 样品检测结果

Tab.2 Sample Test Results

1批号	杂质检测结果/%				总杂/%
	5	**10**	**8**	**9**	
220825	—	—	—	0.29	0.39
220802	—	—	—	0.14	0.24
220909	—	—	—	0.49	0.58

注：“—”表示未检出。

3 讨论

3.1 色谱条件

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：杂质 **8** 在 205 nm 处有最大吸收，**1** 及其他杂质在 199 或 200 nm 附近有最大吸收，但 199 或 200 nm 处基线漂移比较严重；而各峰在 205 nm 处响应良好，所以综合

考虑，选择 205 nm 作为有关物质的检测波长。

3.1.2 色谱柱和流动相

杂质 **8** 同时具有羧基和氨基 2 个极性基团，pK_a 值为 1.45±0.2，极性很大，只在偏酸性的流动相下才会有较好的保留特性，但由于 **1** 在酸性条件下不稳定，会降解生成杂质 **8**，所以选择在偏中性的 pH 6.0 流动相体系下筛选固定相。

在 pH 6.0 的条件下，杂质 **8** 主要以羧基阴离子形式存在，在 Waters XSelect CSH C_{18} 柱、YMC Triart C_{18} 柱、GALAK Phenyl 柱、Thermo ODS-2 Hypersil 柱等色谱柱中均无保留；本研究也尝试使用可以改善化合物保留行为的辛烷磺酸钠 - 乙腈离子对体系，但杂质 **8** 仍无保留。混合模式柱基于新型混合模式硅胶填料，具有带可电离末端的烷基长链，兼具疏水性和弱阴离子交换性能，因而杂质 **8** 在该色谱柱中有良好的保留效果。使用该色谱柱，**1**、杂质 **8** 以及其余各杂质的出峰情况和分离度均良好。

在流动相组成上，曾考察乙酸铵 - 乙腈、磷酸二氢钾 - 乙腈等不同体系，观察到 **1** 和各杂质的分离度、**1** 的峰形不理想；最终，在磷酸二氢钾 - 乙腈体系下，加入四氢呋喃可有效改善 **1** 的峰形，且其余各峰的峰形和分离度良好。

3.2 有关物质测定方法的选择

采用加校正因子的 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] PEREZ V L, PFLUGFELDER S C, ZHANG S, *et al*. Lifitegrast, a novel integrin antagonist for treatment of dry eye disease［J］. *Ocul Surf*, 2016, **14**(2): 207-215.

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

[3] ICH. Q2A text on validation of analytical procedures［EB/OL］. ［2022-10-10］. https://wenku. baidu. com/view/780895e75a8102d277a22f47. htmL.

[4] ICH. Q2B text on validation of analytical procedures: text and methodology［EB/OL］. ［2022-10-10］. https://wenku. baidu. com/view/f60dee2c7375a417866f8f39. htmL.