

高效液相色谱法监控左旋甲状腺素钠生产中的偶联反应

张文雯^{*1,2}, 郑树娜², 罗放², 陈绘如¹, 李锐², 吉民²

(1. 常州工程职业技术学院 制药与生物工程技术系, 江苏 常州 213164;

2. 东南大学 化学化工学院, 江苏 南京 210096)

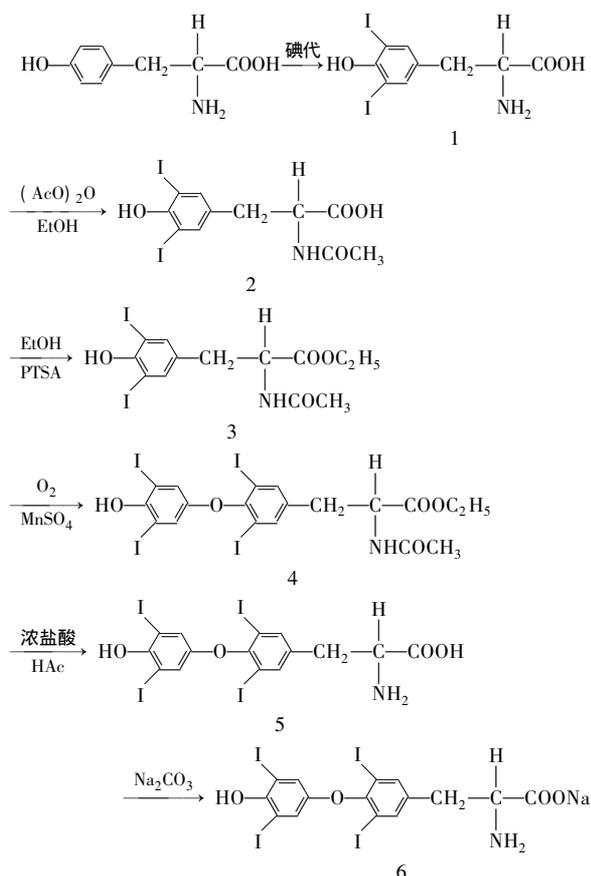
摘要: 提出了用高效液相色谱法监控左旋甲状腺素钠合成关键步骤偶联反应。色谱条件: YMC-Pack Pro C18 反相色谱柱 (4.6 mm × 100 mm 5 μm); 甲醇-1%磷酸水溶液为流动相 梯度洗脱; 检测波长 225 nm; 流速 1.0 mL/min。偶联反应液在 0.05 ~ 0.25 mg/mL 范围内线性关系良好 (相关系数 $r = 0.9997$); 加标回收率为 99.79% ~ 100.05%; 重复进样的平均 RSD 为 1.35%。方法的准确度高 精密度好 实际应用效果好。

关键词: 左旋甲状腺素钠; 偶联反应; 高效液相色谱法; 监控

中图分类号: O657.7 文献标识码: A 文章编号: 0258-3283(2011)10-0945-03

左旋甲状腺素钠是 Sandoz 公司开发的甲状腺激素类药物, 主要用于治疗由各种原因引起的甲状腺功能减退症, 于 2004 年 6 月获准美国 FDA 许可上市。该药可作为人体甲状腺激素缺失的替代品, 具有较大的市场需求。

以 *L*-酪氨酸为起始原料, 如下图所示经 6 步反应合成左旋甲状腺素钠是目前生产企业普遍采



左旋甲状腺素钠合成路线

The synthesis of *L*-thyroxine

用的工艺路线^[1,2]。由中间体 3 (*N*-Ac-diI-Tyr-OEt) 与氧气在常压下偶联合成中间体 4 (*L*-*N*-Ac-T₄-OEt) 是该工艺路线的关键反应。由于偶联收率仅 40% 左右, 使得左旋甲状腺素钠的合成总收率较低^[2], 造成该工艺路线生产成本居高不下。实验研究表明, 偶联反应收率低的主要原因是反应原料 *N*-Ac-diI-Tyr-OEt 利用率低, 本文参考美国药典^[3], 利用反相高效液相色谱监控偶联反应, 建立 RP-HPLC 分析法, 及时判断反应进行程度, 适时调控反应条件, 使偶联反应原料转化率有了较大提高, 节约了左旋甲状腺素钠的生产成本。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

Series 200 高效液相色谱仪、200 紫外分光光度检测器 (美国 Perkin-Elmer 公司); TCWS 色谱工作站。

N-Ac-diI-Tyr-OEt 标准物、*L*-*N*-Ac-T₄-OEt 标准物 (苏州东南药物研发有限公司); 无水甲醇 (色谱纯, 美国 Fisher 公司); 磷酸 (分析纯, 国药集团化学试剂苏州有限公司); 超纯水 (上海屈臣氏公司)。

1.2 色谱条件

色谱柱: 4.6 mm × 100 mm 5 μm, YMC-Pack

收稿日期: 2010-10-21

基金项目: 常州市工业科技攻关项目 (CE20090019)。

作者简介: 张文雯 (1968-), 女, 江苏昆山人, 硕士, 副教授, 从事有机化学及有机合成的教学与研究, E-mail: wzwzhang@email.czic.net。

Pro C18 反相柱; 流动相 A: 甲醇、B: 1% 的磷酸水溶液, 梯度洗脱见表 1; 检测波长 225 nm; 进样量 2 μ L; 室温操作, 标准加入法定量。

表 1 流动相梯度表

Tab. 1 Gradient elution of mobile phase

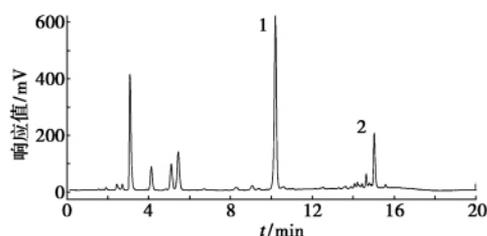
时间/min	A 相/%	B 相/%	流速/(mL \cdot min $^{-1}$)
0~5	50	50	1.0
5~13	50~95	50~5	1.0
13~15	95~50	5~50	1.0
15~20	50	50	1.0

1.3 监控方法

准确称取 0.075 0 g (准确到 0.000 1 g) *N*-Ac-diI-Tyr-OEt 标准物, 用 20 mL 甲醇溶解并转移至 50 mL 容量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为储备液待用。

用移液管准确移取 1 mL 偶联反应液于 10 mL 容量瓶中, 用流动相 ($V_A:V_B = 13:7$) 配制成溶液, 稀释至刻度后, 作为样品摇匀待用。

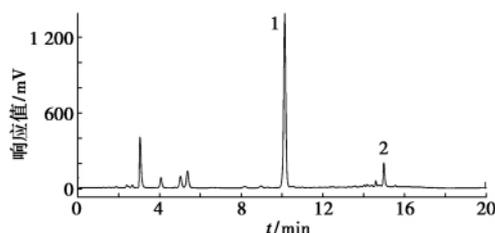
用移液管移取 1 mL 样品于样品瓶中, 按色谱条件以 2 μ L 进样量分析, 所得色谱图见图 1。再由移液管移取 1 mL 样品于 10 mL 容量瓶中, 加入 5 mL 标样储备液, 用流动相 ($V_A:V_B = 13:7$) 稀释至刻度, 摇匀。用移液管移取 1 mL 于样品瓶中, 在相同条件下以 2 μ L 进样分析, 所得色谱图见图 2。



1. *N*-Ac-diI-Tyr-OEt; 2. *L*-*N*-Ac-T₄-OEt

图 1 偶联反应液 HPLC 色谱图

Fig. 1 Chromatogram of sample



1. *N*-Ac-diI-Tyr-OEt; 2. *L*-*N*-Ac-T₄-OEt

图 2 加入标样后偶联反应液 HPLC 色谱图

Fig. 2 Chromatogram of sample and standard

比较图 1、2: 加入标准物后, *N*-Ac-diI-Tyr-OEt 峰面积明显上升。测定所得峰面积与标准样加入

量的值, 按下式计算反应液中 *N*-Ac-diI-Tyr-OEt 含量。

$$\omega_i = [(\Delta\omega_i / (A_i' / A_i - 1))] / m_i$$

式中 $\Delta\omega_i$ 为加入 *N*-Ac-diI-Tyr-OEt 标样的量; A_i' 为加入标样后 *N*-Ac-diI-Tyr-OEt 的峰面积; A_i 为未加标样时 *N*-Ac-diI-Tyr-OEt 的峰面积; m_i 为反应液质量。

2 结果与讨论

2.1 固定相和流动相的选择

N-Ac-diI-Tyr-OEt 和 *L*-*N*-Ac-T₄-OEt 均为非水溶性化合物, 采用反相液相色谱法, 以非极性的十八烷基键合硅胶作固定相, 以极性较大的溶剂甲醇、水作为流动相, 试验了 1) 不同配比的甲醇-水溶剂系统; 2) 在甲醇-水系统中加入磷酸以调整峰形。流速均控制在 1.0 mL/min, 经过反复优化, 得到了流动相 A、B 的梯度洗脱条件, 此时分析时间较短, 分离度亦达到要求。

2.2 检测波长的选择

N-Ac-diI-Tyr-OEt 和 *L*-*N*-Ac-T₄-OEt 在 225 nm 处均有较强吸收峰, 且为了兼顾终产品及其他杂质的检测灵敏度, 选用 225 nm 作为检测波长。

2.3 工作曲线与检出限

分别移取标样储备液 1、3、5、7、9 mL 于 10 mL 容量瓶中, 加入甲醇定容至刻度, 混合均匀后, 按上述 1.2 的条件进样分析, 将所得结果以峰面积对标样质量浓度作线性回归。同样按试验方法配制一定浓度的偶联反应液, 分别取 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5 mL 于 10 mL 容量瓶中, 用流动相 ($V_A:V_B = 13:7$) 定容至刻度, 混合均匀后, 按 1.2 的条件进样分析, 将所得结果以峰面积对工作液质量浓度作线性回归。标样及反应液标准曲线线性方程、相关系数及线性范围结果见表 2。方法的检出限为 3 μ g/L。

表 2 标准样及偶联反应液的线性方程、相关系数及线性范围

Tab. 2 The linear equation, correlation coefficient and linear range

名称	线性方程	相关系数	线性范围/(mg \cdot mL $^{-1}$)
标准样	$Y = 110\,859.254 + 4.181\,41 \times 10^6 X$	0.999 9	0.3~2.7
偶联反应液	$Y = 161\,251.019 + 4.438\,72 \times 10^7 X$	0.999 7	0.05~0.25

2.4 精密度与重复性试验

取偶联反应液样品测试 8 次平行样, 计算样品中含 *N*-Ac-diI-Tyr-OEt 的量, 求其精密度, 结果

见表 3。从表 3 的 8 次测定的重复性数据来看, 标准偏差在 1.35%。

表 3 重复性试验结果

Tab.3 Results of repeatability test

测定值 ω/mg	平均值 $\bar{\omega}/\text{mg}$	平均 RSD/%
51.00 53.00 53.00 52.50 , 52.25 52.25 51.75 51.50	52.16	1.35

2.5 回收率试验

采用加标回收法, 取 5 批样品, 分别加入 *N*-Ac-diI-Tyr-OEt 按 1.2 色谱条件及实验方法测定加入标样后测得的 *N*-Ac-diI-Tyr-OEt 质量, 计算回收率, 结果列于表 4。

表 4 加标回收率试验结果

Tab.4 Results of recovery test

序号	标识量 ω/mg	加入量 ω/mg	实测量 ω/mg	回收率/%
1	10.43	9.00	19.40	99.84
2	10.43	9.00	19.39	99.79
3	10.43	9.00	19.44	100.05
4	10.43	9.00	19.41	99.90
5	10.43	9.00	19.45	100.10

2.6 偶联反应液测定

按 1.2 的色谱条件及 1.3 的监控方法对反应液进行高效液相色谱分析, 测定不同反应时间 *N*-Ac-diI-Tyr-OEt 在偶联反应液中的含量, 考察偶联反应进行的程度, 详见图 3。

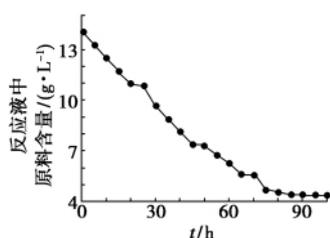


图 3 不同反应时间偶联反应液中 *N*-Ac-diI-Tyr-OEt 含量

Fig.3 Contents of *N*-Ac-diI-Tyr-OEt in coupling reaction liquid under different time

结果显示, 反应在 25、50、70 h 3 个时间段, 原料转化率出现了明显减缓, 通过及时调整反应条件, 偶联反应进行顺利, 至 85 h 后, 反应液中原料含量基本保持不变, 此时动态平衡趋于完成, 可视

为偶联反应达到了终点。

3 结论

本文建立了用高效液相色谱法对左旋甲状腺素钠生产过程中的关键步骤偶联反应进行监控的方法。生产实践表明该方法能实时监测反应进程, 为反应条件的适时调节, 从而使偶联反应原料达最大利用率提供依据, 对左旋甲状腺素钠合成总收率的提高起到了有效的指导作用。

参考文献:

- [1] 印其山, 蒋伯康, 毛子奇, 等. *L*-甲状腺素的合成 [J]. 化学世界 2001, 42(1): 29-33.
- [2] PAUL F, COE. Process for producing sodium *L*-thyroxine comprising the oxidative coupling of a diiodo-*L*-tyrosine catalysed by a manganese salt in the presence of an amine: US 5 917 087 [P]. 1999-06-29.
- [3] USP28 美国药典 [S]. 2005.

Monitoring the coupling reaction of levothyroxine sodium of production process by HPLC ZHANG Wen-wen^{*1,2}, ZHENG Shu-na², LUO Fang², CHEN Hui-tu¹, LI Rui², JI Min² (1. Department of Pharmaceutical Technology and Biological Engineering, Changzhou Institute of Engineering Technology, Changzhou 213164, China; 2. College of Chemistry and Chemical Engineering, Southeast University, Nanjing 210096, China) Huaxue Shiji 2011, 33(10): 945~947

Abstract: HPLC was applied to monitor the coupling reaction, which is an important reaction in the synthesis of levothyroxine sodium. Chromatography conditions: YMC-Pack Pro C18 RP column (4.6 mm × 100 mm, 5 μm); mobile phase: methanol-1% phosphoric acid solution by gradient elution; detection wavelength: 225 nm; flow rate: 1.0 mL/min. The calibration curve was linear in the range of 0.05 ~ 0.25 mg/mL of coupling reaction mixture with $r = 0.9997$; The recovery was 99.79% ~ 100.05% while the relative standard deviation for repetitions was 1.35%. This method has the advantages of quick, correct, reappearing.

Key words: levothyroxine sodium; coupling reaction; high performance liquid chromatography; monitoring

请您继续支持关心本刊, 共同进步