

# HPLC 法测定瑞卢戈利中间体 M-I 的有关物质



王 帆<sup>1</sup>, 刘 敏<sup>1</sup>, 杨海霞<sup>1</sup>, 张宗磊<sup>2</sup>, 刘延新<sup>3</sup>, 廉贞霞<sup>1</sup>, 王 静<sup>1</sup>, 李 霞<sup>1</sup>

1. 山东省药科学院分析测试中心 (济南 250101)
2. 山东省药科学院化学药物研究所 (济南 250101)
3. 山东省药科学院生物药物研究所 (济南 250101)

**【摘要】目的** 建立 HPLC 法测定瑞卢戈利中间体 M-I 的有关物质。**方法** 色谱柱为 Waters XBridge C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 柱; 流动相为乙腈-磷酸盐缓冲液, 梯度洗脱; 流速为 1.5 mL/min; 柱温为 30 °C; 检测波长为 225 nm; 进样体积为 20 μL。**结果** 瑞卢戈利中间体 M-I 中的杂质均能有效检出, M-I、2,6-二氟氯苄、M-I-SM、M-I-中间体 I、杂质 ZY1、杂质 36、杂质 45 及杂质 46 的检测限分别为 0.059、0.020、0.035、0.041、0.055、0.077、0.062、0.054 μg/mL, 定量限分别为 0.197、0.099、0.117、0.136、0.183、0.257、0.207、0.182 μg/mL。主峰与各杂质间分离度良好, 满足系统适用性要求。在定量分析中, 主峰及 7 个杂质在各自线性范围内均呈现良好的线性关系 ( $r \geq 0.9990$ )。7 种杂质的平均回收率在 97.77%~108.42% 之间 ( $RSD \leq 2.11\%$ ,  $n=9$ )。**结论** 该方法专属性强、灵敏度高、准确度高, 适用于瑞卢戈利中间体 M-I 有关物质的测定。

**【关键词】** 高效液相色谱法; 有关物质; 瑞卢戈利中间体 M-I

**【中图分类号】** R927.2

**【文献标识码】** A

## Determination of related substances in the Intermediate M-I of relugolix by HPLC

WANG Fan<sup>1</sup>, LIU Min<sup>1</sup>, YANG Haixia<sup>1</sup>, ZHANG Zonglei<sup>2</sup>, LIU Yanxin<sup>3</sup>, LIAN Zhenxia<sup>1</sup>, WANG Jing<sup>1</sup>, LI Xia<sup>1</sup>

1. Analysis and Test Center, Shandong Academy of Pharmaceutical Sciences, Jinan 250101, China
  2. Institute of Chemical Drugs, Shandong Academy of Pharmaceutical Sciences, Jinan 250101, China
  3. Institute of Biological Drugs, Shandong Academy of Pharmaceutical Sciences, Jinan 250101, China
- Corresponding author: LI Xia, Email: lixia.56@163.com

**【Abstract】Objective** To establish a method for the determination of related substances in the Intermediate M-I of relugolix by HPLC. **Methods** The HPLC method was performed on a Waters XBridge C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm) column. Gradient elution was carried out using acetonitrile and phosphate buffer as the mobile phase at a flow rate of 1.5 mL/min. The column temperature was 30 °C, the detection wavelength was 225 nm, and the injection volume was 20 μL. **Results** The impurities in intermediate M-I of relugolix can be effectively detected. The detection limits of M-I, 2,6-difluorobenzyl chloride, M-I-SM, M-I-intermediate I, Impurity ZY1, Impurity 36, Impurity 45, and Impurity 46 were 0.059, 0.020, 0.035, 0.041, 0.055, 0.077, 0.062, and 0.054 μg/

DOI: 10.12173/j.issn.2097-4922.202605019

基金项目: 山东省企业技术创新项目计划 (2025637130000058)

通信作者: 李霞, 硕士, 工程师, Email: lixia.56@163.com

mL, and the quantification limits were 0.197, 0.099, 0.117, 0.136, 0.183, 0.257, 0.207, and 0.182  $\mu\text{g/mL}$ . The main compound and the impurities were well separated, meeting the system suitability requirements. In the quantitative analysis, the main compound and the seven impurities all exhibited good linearity within their respective concentration ranges ( $r \geq 0.999\ 0$ ). The mean recoveries of the seven impurities ranged from 97.77% to 108.42%, with  $RSDs \leq 2.11\%$  ( $n=9$ ). **Conclusion** The established method demonstrates good specificity, high sensitivity and satisfactory accuracy, and is suitable for the determination of related substances in the Intermediate M-I of relugolix.

**【Keywords】**HPLC; Related substances; Intermediate M-I of relugolix

瑞卢戈利是一种新型的口服非肽小分子促性腺激素释放激素受体拮抗剂,能竞争结合促性腺激素释放激素受体,降低黄体生成素和促卵泡激素的浓度,使女性卵巢中雌激素和孕激素的产生减少<sup>[1-2]</sup>。瑞卢戈利由日本武田制药公司研发,于2019年获批在日本上市,用于改善子宫肌瘤引起的月经过多等症状<sup>[3-4]</sup>。2020年瑞卢戈利在美国获批上市,用于治疗晚期前列腺癌,其作用机制是减少黄体生成素的释放,最终降低睾丸激素释放<sup>[5-7]</sup>。2021年瑞卢戈利复方制剂在美国获批上市,用于治疗子宫肌瘤引起的月经过多<sup>[8]</sup>。

2-[(2,6-二氟苄基)正丙氧基羰基氨基]-4-[(二甲基氨基)甲基]-5-(4-硝基苯基)噻吩-3-甲酸乙酯(以下简称“M-I”)是合成瑞卢戈利的重要中间体。专利CN118837477A<sup>[9]</sup>报道了瑞卢戈利的制备路线,由M-I经5步化学反应得到瑞卢戈利。也有研究以M-I为起始物料,经水解、缩合、环合、氢化、缩合成脲制备瑞卢戈利<sup>[10]</sup>。M-I的质量控制影响终产品的质量,测定M-I的有关物质对于M-I及瑞卢戈利的质量控制均有重要意义。专利CN110194776A中由2-氨基-4-甲基-5-(4-硝基苯基)噻吩-3-甲酸乙酯(以下简称“M-I-SM”)先合成2-乙氧基羰基氨基-4-甲基-5-(4-硝基苯基)噻吩-3-甲酸乙酯(以下简称“M-I-中间体I”),再与2,6-二氟氯苄反应,4位甲基溴代,再由二甲胺取代,合成2-[(2,6-二氟苄基)乙氧基羰基氨基]-4-[(二甲基氨基)甲基]-5-(4-硝基苯基)噻吩-3-甲酸乙酯(M-I类似物)<sup>[11]</sup>。专利CN112321602A<sup>[12]</sup>中以M-I-SM为起始物料,用氯甲酸丙酯取代高毒、高度易燃的氯甲酸乙酯,与起始物料反应,再经过三步反应合成M-I。本文建立HPLC法测定M-I有关物质,参照《中国药典》2020年版四

部中9101分析方法验证指导原则<sup>[13]</sup>进行了方法学验证,对M-I中可能存在的2,6-二氟氯苄、M-I-SM、M-I-中间体I、2-[(2,6-二氟苄基)正丙氧基羰基氨基]-4-甲基-5-(4-硝基苯基)噻吩-3-甲酸乙酯(以下简称“杂质45”);2-[(2,6-二氟苄基)正丙氧基羰基氨基]-4-溴甲基-5-(4-硝基苯基)噻吩-3-甲酸乙酯(以下简称“杂质46”)及副产物杂质ZY1及杂质36等进行控制,所建立的方法专属性强、灵敏度高、准确度高,适用于M-I有关物质的测定,主要用于控制合成过程中可能引入的工艺相关杂质。

## 1 仪器与试药

### 1.1 主要仪器

Waters e2695 高效液相色谱仪,包括自动进样器、柱温箱及2998PDA检测器、Empower 3 色谱工作站均购自美国沃特世公司;XS 205 DU 十万分之一电子分析天平、XPR10 百万分之一电子分析天平和Seven Excellence pH计均购自瑞士梅特勒-托利多公司。

### 1.2 主要药品与试剂

M-I样品(甘肃瀚聚药业有限公司,批号:HJ0187-20220302、HJ0187-20230301、HJ0187-20230801M);M-I-SM(批号:HJ0040-20220702,纯度99.94%);M-I-中间体I(批号:HJ0328-20221201,纯度99.76%)均购自浙江科聚生物医药有限公司;2,6-二氟氯苄(百灵威科技有限公司,批号:L7C0V05,纯度99.89%);杂质ZY1(深圳卓越生物医药科技有限公司,批号:20211026,纯度99.36%);杂质36(批号:46610,纯度97.05%);杂质45(批号:45657,含量:98.26%);杂质46(批号:46611,纯度98.63%)均购自深圳振强生物科技有限公司;乙腈为色谱纯;其余试剂均为分析纯;水为纯化水。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱为 Waters XBridge C<sub>18</sub> 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相 A 为磷酸盐缓冲液 (0.015 mol/L 的磷酸二氢钾溶液, 用 10 mol/L 的氢氧化钾溶液调节 pH 至 7.0), 流动相 B 为流动相 A-乙腈 (20 : 80), 梯度洗脱 (洗脱程序见表 1); 流速为 1.5 mL/min; 柱温为 30 °C; 检测波长为 225 nm; 进样体积为 20 μL。

表 1 梯度洗脱程序

Table 1. Programme of gradient elution

| 时间 (min) | 流动相 A (%) | 流动相 B (%) |
|----------|-----------|-----------|
| 0~2      | 52→50     | 48→50     |
| 2~5      | 50        | 50        |
| 5~40     | 50→0      | 50→100    |
| 40~60    | 0         | 100       |
| 60~61    | 0→52      | 100→48    |
| 61~70    | 52        | 48        |

### 2.2 溶液的配制

#### 2.2.1 供试品溶液

取本品适量, 精密称定, 加乙腈溶解并稀释制成每 1 mL 中约含 1 mg 的溶液, 即得。

#### 2.2.2 对照溶液

精密量取供试品溶液适量, 用乙腈稀释制成每 1 mL 中约含 10 μg 的溶液, 即得。

#### 2.2.3 系统适用性溶液

分别精密称取 M-I-SM、M-I-中间体 I、2,6-二氟氯苄、杂质 ZY1、杂质 36、杂质 45 及杂质 46 对照品 1.974、1.899、1.978、1.962、2.079、2.010、1.948 mg, 置于不同 10 mL 量瓶中, 加乙腈溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为 M-I-SM、M-I-中间体 I、2,6-二氟氯苄、杂质 ZY1、杂质 36、杂质 45 及杂质 46 对照品贮备液①。

分别精密量取 M-I-SM、M-I-中间体 I、2,6-二氟氯苄、杂质 ZY1、杂质 45 及杂质 46 对照品贮备液①各 1.5 mL 及杂质 36 对照品贮备液① 1.0 mL, 置于不同 10 mL 量瓶中, 用乙腈稀释至刻度, 摇匀, 作为 M-I-SM、M-I-中间体 I、2,6-二氟氯苄、杂质 ZY1、杂质 45、杂质 46 及杂质 36 对照品贮备液②。

分别精密量取上述杂质对照品贮备液②各 0.5 mL, 置于同一 10 mL 量瓶中, 用乙腈稀释至

刻度, 摇匀, 作为系统适用性溶液。

### 2.3 方法学验证

#### 2.3.1 专属性及系统适用性试验

取 M-I 10 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加乙腈适量使溶解, 分别精密量取 M-I-SM、M-I-中间体 I、2,6-二氟氯苄、杂质 ZY1、杂质 36、杂质 45 及杂质 46 对照品贮备液②各 0.5 mL, 置于上述量瓶中, 用乙腈稀释至刻度, 摇匀, 作为混合溶液。

精密量取空白溶剂、系统适用性溶液、混合溶液及供试品溶液各 20 μL, 照“2.1”项下色谱条件测定, 色谱图见图 1。结果表明, 空白溶剂对有关物质的测定无干扰; 系统适用性溶液色谱图中, 2,6-二氟氯苄、M-I-SM、杂质 ZY1、杂质 36、杂质 45、杂质 46 及 M-I-中间体 I 依次出峰, 杂质 36 与杂质 45 之间的分离度为 6.34, 杂质 45 与杂质 46 之间的分离度为 4.66; 主峰与前后杂质分离良好, 方法专属性良好。

#### 2.3.2 检测限与定量限

分别精密称取 2,6-二氟氯苄、M-I-SM、M-I-中间体 I、杂质 ZY1、杂质 36、杂质 45 及杂质 46 对照品 9.960、2.339、1.812、1.842、1.766、2.105、1.843 mg, 置于不同 10 mL 量瓶中, 加乙腈溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为 2,6-二氟氯苄、M-I-SM、M-I-中间体 I、杂质 ZY1、杂质 36、杂质 45 及杂质 46 对照品贮备液①。精密称取 M-I 9.83 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 加乙腈溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为 M-I 溶液。

取上述各杂质对照品贮备液及 M-I 溶液稀释至合适浓度, 照“2.1”项下色谱条件测定, 以信噪比约为 10 : 1 时的溶液浓度作为定量限, 以信噪比约为 3 : 1 时的溶液浓度作为检测限。计算得 M-I、2,6-二氟氯苄、M-I-SM、M-I-中间体 I、杂质 ZY1、杂质 36、杂质 45 及杂质 46 的检测限分别为 0.059、0.020、0.035、0.041、0.055、0.077、0.062、0.054 μg/mL, 定量限分别为 0.197、0.099、0.117、0.136、0.183、0.257、0.207、0.182 μg/mL。

#### 2.3.3 线性关系与校正因子

取“2.3.2”项下的定量限溶液作为线性 1 号溶液。精密量取“2.3.2”项下的杂质 ZY1、杂质 45、杂质 46、M-I-SM、M-I-中间体 I 贮备液①各 1.5 mL, 杂质 36 贮备液① 1.0 mL, 置于同一

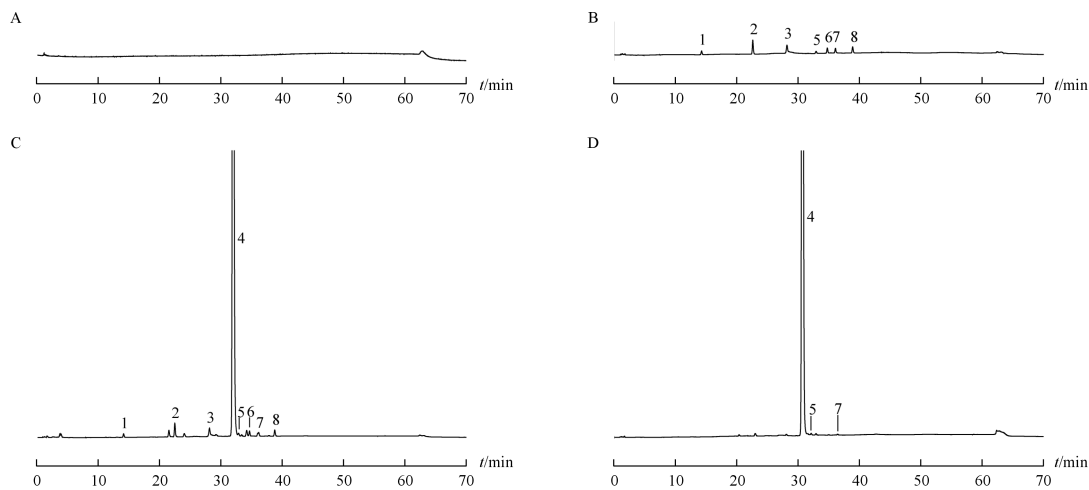


图 1 专属性及系统适用性试验 HPLC 图

Figure 1. HPLC chromatogram of specificity and system suitability test

注：A. 空白溶剂；B. 系统适用性溶液；C. 混合溶液；D. 供试品溶液；1. 2,6-二氟氯苄；2. M-I-SM；3. 杂质 ZY1；4. M-I；5. 杂质 36；6. 杂质 45；7. 杂质 46；8. M-I-中间体 I。

10 mL 量瓶中，用乙腈稀释至刻度，摇匀，作为混合贮备液。精密量取“2.3.2”项下的 M-I 溶液 2.0 mL，置于 10 mL 量瓶中，用乙腈稀释至刻度，摇匀，作为 M-I 贮备液。精密量取“2.3.2”项下的 2,6-二氟氯苄对照品贮备液① 0.1 mL，置于 10 mL 量瓶中，用乙腈稀释至刻度，摇匀，作为 2,6-二氟氯苄对照品贮备液②。分别精密量取混合贮备液及 M-I 贮备液各 0.3 mL、2,6-二氟氯苄对照品贮备液② 1.0 mL，置于同一 10 mL 量瓶中，用乙腈稀释至刻度，摇匀，作为线性 2 号溶液。分别精密量取混合贮备液及 M-I 贮备液各 0.5 mL、2,6-二氟氯苄对照品贮备液② 1.5 mL，置于同一 10 mL 量瓶中，用乙腈稀释至刻度，摇匀，作为线性 3 号溶液。分别精密量取混合贮备液及 M-I 贮备液各 0.7 mL、2,6-二氟氯苄对照品贮备液② 2.0 mL，置于同一 10 mL 量瓶中，用乙腈稀释至刻度，摇匀，作为线性 4 号溶液。分别

精密量取混合贮备液及 M-I 贮备液各 1 mL、2,6-二氟氯苄对照品贮备液② 3.0 mL，置于同一 10 mL 量瓶中，用乙腈稀释至刻度，摇匀，作为线性 5 号溶液。分别精密量取线性 1~5 号溶液，照“2.1”项下色谱条件测定，记录色谱图，以浓度为横坐标 ( $C$ ,  $\mu\text{g/mL}$ )、峰面积为纵坐标 ( $A$ ) 进行线性回归分析，计算线性回归方程及校正因子 (M-I 回归方程斜率与各杂质回归方程斜率的比值即为各杂质的校正因子)，结果见表 2。结果表明，各杂质浓度在一定范围内与峰面积之间的线性关系良好。

2.3.4 精密度试验

精密量取“2.3.2”项下的线性 3 号溶液 20  $\mu\text{L}$ ，照“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次，计算得 2,6-二氟氯苄、M-I-SM、杂质 ZY1、M-I、杂质 36、杂质 45、杂质 46 及 M-I-中间体 I 峰面积的  $RSD$  分别为 0.34%、0.88%、0.35%、

表 2 各组分的线性回归方程、相关系数及线性范围

Table 2. The linear regression equations, correlation coefficients, and linear ranges of each component

| 组分        | 线性回归方程                | $r$     | 线性范围 ( $\mu\text{g/mL}$ ) | 校正因子 |
|-----------|-----------------------|---------|---------------------------|------|
| 2,6-二氟氯苄  | $A=19\,218C-610.97$   | 0.999 9 | 0.099 49~2.984 7          | 1.25 |
| M-I-SM    | $A=63\,817C-1\,500.7$ | 0.999 8 | 0.116 88~3.506 4          | 0.38 |
| 杂质 ZY1    | $A=45\,415C-963.31$   | 0.999 0 | 0.183 20~2.745 3          | 0.53 |
| M-I       | $A=23\,983C-1\,525.5$ | 1.000 0 | 0.215 50~19.591           | —    |
| 杂质 36     | $A=24\,380C-791.97$   | 0.999 8 | 0.257 09~1.713 9          | 0.98 |
| 杂质 45     | $A=25\,454C+58.657$   | 0.999 9 | 0.206 84~3.102 6          | 0.94 |
| 杂质 46     | $A=27\,166C-175.28$   | 0.999 9 | 0.181 78~2.726 6          | 0.88 |
| M-I-中间体 I | $A=40\,110C-642.33$   | 1.000 0 | 0.135 57~2.711 5          | 0.60 |

注：“—”表示无需校正。

0.21%、1.16%、0.78%、0.65%、0.52% ( $n=6$ )。表明仪器精密度良好。

### 2.3.5 准确度试验

分别精密量取“2.3.2”项下的2,6-二氟氯苄对照品贮备液①0.3 mL, 杂质36对照品贮备液①1.0 mL, M-I-SM、M-I-中间体 I、杂质 ZY1、杂质45及杂质46对照品贮备液①各1.5 mL, 置于同一10 mL量瓶中, 用乙腈稀释至刻度, 摇匀, 作为杂质对照品混合贮备液。精密量取0.5 mL, 置于10 mL量瓶中, 用乙腈稀释至刻度, 摇匀, 作为杂质对照品混合溶液。

精密称取本品9.68 mg, 置于10 mL量瓶中, 加乙腈溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。

分别精密称取本品10.47、10.54、10.56、10.14、10.43、10.49、10.48、10.76、10.37 mg, 置于不同10 mL量瓶中, 加乙腈适量使溶解, 其中3份加入杂质对照品混合贮备液0.4 mL、3份加入0.5 mL、3份加入0.6 mL, 用乙腈稀释至刻度, 摇匀, 作为回收率低、中、高浓度样品。

分别精密量取杂质对照品混合溶液、供试品溶液和回收率低、中、高浓度样品, 照“2.1”项下色谱条件测定。以外标法计算回收率, 计算公式如下:

回收率 (%) = (测得量 - 原有量) / 加入量 × 100%

测得量 (mg) =  $A_x/A_s \times m_s \times$  对照品含量 / 稀释体积 × 10

原有量 (mg) =  $A/A_s \times m_s \times$  对照品含量 / 稀释体积 × 10 /  $m \times m_x$

加入量 (mg) =  $m_s \times$  对照品含量 / 稀释体积 ×  $V_{加}$

式中,  $A_x$  为回收率样品中杂质的峰面积,  $A_s$  为杂质对照品混合溶液中杂质的峰面积,  $m_s$  为杂质对照品质量 (mg),  $A$  为供试品溶液中杂质的峰面积,  $m$  为供试品质量 (mg),  $m_x$  为回收率样品的供试品质量 (mg),  $V_{加}$  为杂质对照品混合贮备液的加入体积 (mL)。

各杂质的准确度试验结果见表3。7个杂质的平均回收率均在90%~110%范围内, 表明方法准确度良好。

### 2.3.6 重复性试验与中间精密度试验

取同一批样品 (批号: HJ0187-20230801M), 照“2.2”项下方法平行配制6份供试品溶液, 并

表3 各杂质的准确度试验结果 ( $n=9$ )

Table 3. Results of accuracy tests for individual impurities ( $n=9$ )

| 组分        | 平均回收率 (%) | RSD (%) |
|-----------|-----------|---------|
| 2,6-二氟氯苄  | 97.77     | 0.83    |
| M-I-SM    | 99.48     | 0.72    |
| 杂质 ZY1    | 103.15    | 2.11    |
| 杂质36      | 107.06    | 1.88    |
| 杂质45      | 102.95    | 0.94    |
| 杂质46      | 108.42    | 0.93    |
| M-I-中间体 I | 100.23    | 1.19    |

照“2.1”项下色谱条件测定, 按加校正因子的主成分自身对照法计算杂质含量, 计算公式如下:

杂质含量 (%) =  $A_x/A_{1\%} \times 1\% \times$  校正因子

式中,  $A_x$  为杂质的峰面积,  $A_{1\%}$  为 M-I 对照溶液的主峰面积, 2,6-二氟氯苄、M-I-SM、杂质 ZY1、杂质36、杂质45、杂质46及 M-I-中间体 I 的校正因子见表2, 未知杂质的校正因子按1.0计算。

结果2,6-二氟氯苄、M-I-SM、杂质 ZY1、杂质45及 M-I-中间体 I 均未检出, 杂质36均为0.03%, 杂质46均为0.01%, 其他最大单个杂质的相对保留时间为0.67, 其他最大单个杂质及杂质总量的平均值分别为0.14%及0.46%, RSD分别为3.78%及2.96% ( $n=6$ ), 表明该方法重复性良好。

取同一批 (批号: HJ0187-20230801M) 样品, 由另一名试验人员于不同时间、使用不同仪器, 同法测定。统计2名试验人员测定的12份结果, 2,6-二氟氯苄、M-I-SM、杂质 ZY1、杂质45及 M-I-中间体 I 均未检出, 杂质36均为0.03%, 杂质46均为0.01%, 其他最大单个杂质的相对保留时间为0.68, 其他最大单个杂质及杂质总量的平均值分别为0.14%及0.46%, RSD分别为4.75%及3.41% ( $n=12$ ), 表明该方法中间精密度良好。

### 2.3.7 稳定性试验

精密称取本品 (批号: HJ0187-20230801M) 9.96 mg, 置于10 mL量瓶中, 加乙腈溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。取室温放置的供试品溶液, 分别于配制后0、3.5、6、8.5、12、16、20、24.5 h, 照“2.1”项下色谱条件测定, 2,6-二氟氯苄、M-I-SM、杂质 ZY1、杂质45及 M-I-中间体 I 均未检出, 杂质36、杂质46及主峰峰面积的 RSD 分别为1.45%、1.29%、0.72%

( $n=8$ ), 无新杂质产生, 表明供试品溶液室温 24.5 h 内稳定性良好。

精密量取供试品溶液 0.5 mL, 置 50 mL 量瓶中, 用乙腈稀释至刻度, 摇匀, 作为对照溶液。取室温放置的对照溶液, 分别于配制后 0、2.5、4.5、7、10.5、16、20、24.5 h 照“2.1”项下色谱条件测定, 峰面积的  $RSD$  为 0.80% ( $n=8$ ), 表明对照溶液室温 24.5 h 内稳定性良好。

2.3.8 耐用性试验

取系统适用性溶液, 以杂质 36 与杂质 45、杂质 45 与杂质 46 峰之间的分离度为考察指标, 考察不同检测波长、流速、流动相初始比例、柱温、缓冲盐浓度及缓冲盐 pH 值等色谱条件的影响。结果在不同条件下, 杂质 36 与杂质 45 之间分离度的范围为 3.25~7.42, 杂质 45 与杂质 46 之间分离度的范围为 4.54~4.95, 均符合要求, 表明方法耐用性良好。

2.4 样品测定

分别取 3 批 M-I (批号: HJ0187-20220302、HJ0187-20230301、HJ0187-20230801M), 照“2.2”项下方法制备供试品溶液、对照溶液及系统适用性溶液, 并照“2.1”项下色谱条件测定, 按加校正因子的主成分自身对照法计算杂质含量, 计算公式如下:

杂质含量 (%) =  $A_x/A_{1\%} \times 1\% \times \text{校正因子}$

式中,  $A_x$  为杂质的峰面积,  $A_{1\%}$  为 M-I 对照溶液的主峰面积, 2,6-二氟氯苄、M-I-SM、杂质 ZY1、杂质 36、杂质 45、杂质 46 及 M-I-中间体 I 的校正因子见表 2, 未知杂质的校正因子按 1.0 计算。

表 4 结果显示, 3 批中其他最大单个杂质

表 4 样品测定结果 (%)

Table 4. Determination results of the samples (%)

| 杂质名称      | HJ0187-20220302 | HJ0187-20230301 | HJ0187-20230801M |
|-----------|-----------------|-----------------|------------------|
| 2,6-二氟氯苄  | 未检出             | 未检出             | 未检出              |
| M-I-SM    | 未检出             | 未检出             | 未检出              |
| 杂质 ZY1    | 未检出             | 未检出             | 未检出              |
| 杂质 36     | 未检出             | 未检出             | 0.03             |
| 杂质 45     | 未检出             | 未检出             | 未检出              |
| 杂质 46     | 未检出             | 0.01            | 0.01             |
| M-I-中间体 I | 未检出             | 未检出             | 未检出              |
| 其他最大单个杂质  | 0.11            | 0.05            | 0.13             |
| 杂质总量      | 0.43            | 0.18            | 0.44             |

相对保留时间为 0.66~0.67, 推测为同一杂质, 可能为 M-I 合成过程中引入的工艺杂质或 M-I 储存过程中产生的降解杂质。3 批 M-I 样品的杂质检出情况存在批间差异, 初步表明本研究所建立的方法可用于监测不同批次样品的杂质差异。

3 讨论

M-I 是合成瑞卢戈利的重要中间体, M-I 的质量控制影响终产品的质量, 测定 M-I 的有关物质具有重要意义。目前未检索到 M-I 有关物质测定的文献, 本文建立了 HPLC 法测定 M-I 的有关物质, 并进行了方法学验证, 能够对工艺杂质进行有效的检测和控制。

3.1 色谱条件的优化

3.1.1 色谱柱的选择

用 Agilent ZORBAX Eclipse XDB C<sub>18</sub> 柱进行分离时, 杂质 36 与杂质 45 不能完全分离; 用 Inert Sustain C<sub>18</sub> 柱进行分离时, 杂质 45 与杂质 46 不能完全分离; 用 Waters XBridge C<sub>18</sub> 柱进行分离时, 杂质 36 与杂质 45、杂质 45 与杂质 46 均能良好分离, 故选择 Waters XBridge C<sub>18</sub> 柱。

3.1.2 检测波长的选择

M-I 在 225 nm 及 252 nm 处有最大吸收, 杂质 2,6-二氟氯苄在 225 nm 处有最大吸收, 在 252 nm 处吸收较弱, 故选择 225 nm 作为检测波长。

3.1.3 流动相的选择

由于检测波长选择了 225 nm, 故有机相选择截止波长较低的乙腈, 缓冲盐选择磷酸盐, 避免基线噪音大、影响检测灵敏度; 为避免缓冲盐浓度过高、混合时析出, 选择了较低的缓冲盐浓度 0.015 mol/L; 待测物含有二甲基氨基及 (2,6-二氟苄基) 正丙氧基羰基氨基结构, 为兼顾待测物峰形及色谱柱使用寿命, 选择流动相 pH 为 7.0; 为避免缓冲盐与高比例有机相混合时析出, 流动相 B 采用缓冲盐与乙腈按体积比 20:80 混合的方式配制。

3.1.4 柱温的选择

分别尝试了柱温为 30、35、40 °C, 随着柱温升高, 杂质 45 与杂质 36 的分离变差, 对其他峰的分离影响不大, 柱温为 40 °C 时, 二者分离度为 1.51; 柱温为 35 °C 时, 二者分离度为 3.64, 但杂

质45与M-I供试品中的一个未知杂质分离不完全;柱温为30℃时,各杂质分离良好;因此柱温选择30℃。

### 3.2 小结

本文建立了测定瑞卢戈利中间体M-I有关物质的HPLC方法,对M-I中可能存在的起始物料(2,6-二氟氯苄及M-I-SM)、中间体(M-I-中间体I、杂质45、杂质46)及副产物(杂质ZY1及杂质36)等杂质进行了控制,并进行了方法学验证。验证结果表明,空白不干扰测定,杂质与主成分之间及各杂质之间分离良好,M-I、2,6-二氟氯苄、M-I-SM、M-I-中间体I、杂质ZY1、杂质36、杂质45及杂质46的检测限分别为0.059、0.020、0.035、0.041、0.055、0.077、0.062、0.054 μg/mL,主成分及7个杂质在各自的线性范围内线性关系良好( $r \geq 0.9990$ ),7个杂质平均回收率为97.77%~108.42%,色谱条件有微小变动时杂质之间的分离不受影响。所建立的方法专属性强,灵敏度高,准确度高,耐用性好,为M-I的工艺杂质控制及瑞卢戈利原料药的过程控制提供了技术保证。

### 参考文献

- 1 杨家,汤欣雨,张漫,等.瑞卢戈利治疗子宫肌瘤的研究进展[J].实用药物与临床,2023,26(8):764-768.[Yang J, Tang XY, Zhang M, et al. Research progress on relugolix in the treatment of uterine fibroids[J]. Practical Pharmacy and Clinical Remedies, 2023, 26(8): 764-768.] DOI: 10.14053/j.cnki.ppcr.202308018.
- 2 Fragkoulis C, Glykas I, Dellis A, et al. Relugolix: a new kid on the block among gonadotrophin-releasing hormone antagonists[J]. Arab J Urol, 2021, 19(4): 460-463. DOI: 10.1080/2090598X.2021.1994231.
- 3 李振,赵国权,徐峰.瑞卢戈利合成路线图解[J].中国药物化学杂志,2024,34(6):492-497.[Li Z, Zhao GQ, Xu F. Graphical synthetic routes of Relugolix[J]. Chinese Journal of Medicinal Chemistry, 2024, 34(6): 492-497.] DOI: 10.14142/j.cnki.cn21-1313/r.2024.06.009.
- 4 杨茵,许佑君.瑞卢戈利[J].中国药物化学杂志,2021,31(12):1025.[Yang Y, Xu YJ. Relugolix[J]. Chinese Journal of Medicinal Chemistry, 2021, 31(12): 1025.] DOI: 10.14142/j.cnki.cn21-1313/r.2021.12.012.
- 5 US FDA. Drug Approval Package: Orgovyx[EB/OL]. (2020-12-18) [2026-04-07]. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2020/214621Orig1s000TOC.html](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2020/214621Orig1s000TOC.html).
- 6 陈本川.靶向激素依赖性失衡所致晚期前列腺癌治疗新药——瑞卢戈利(relugolix)[J].医药导报,2021,40(7):984-991.[Chen BC. New drug to treat advanced prostate cancer caused by hormone-dependent imbalance——(relugolix)[J]. Herald of Medicine, 2021, 40(7): 984-991.] DOI: 10.3870/j.issn.1004-0781.2021.07.029.
- 7 Markham A. Relugolix: first global approval[J]. Drugs, 2019, 79(6): 675-679. DOI: 10.1007/s40265-019-01105-0.
- 8 US FDA. Drug Approval Package: Myfembree[EB/OL]. (2021-05-26) [2026-04-24]. [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2021/214846Orig1s000TOC.html](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2021/214846Orig1s000TOC.html).
- 9 应述欢,舒晓明,叶方国,等.一种瑞卢戈利中有关物质的检测方法:中国专利,CN118837477A[P].2024-10-25.
- 10 张宗磊,张宁,蔡文卿,等.瑞卢戈利的合成工艺研究[J/OL].中国药物化学杂志,1-8(2026-05-27).[Zhang ZL, Zhang N, Cai WQ, et al. Study on synthetic process of relugolix[J/OL]. Chinese Journal of Medicinal Chemistry, 1-8(2026-05-27).] DOI:10.14142/j.cnki.cn21-1313/r.20260028.
- 11 万华,斯涛,周平,等.一种瑞卢戈利的合成方法:中国专利,CN110194776A[P].2019-09-03.
- 12 李丕旭,王鹏,谷向永,等.一种瑞卢戈利药物中间体的制备方法:中国专利,CN112321602A[P].2021-02-05.
- 13 中国药典2020年版.四部[S].2020:480-483.

收稿日期:2026年05月09日 修回日期:2026年08月07日

本文编辑:周璐敏 沈静怡