

# 《维兰特罗手性异构体的检测-液相色谱法》

## 编制说明

一、工作简况，包括任务来源、协作单位、主要工作过程、标准主要起草人及其所作的工作等；

二、标准编制原则和确定标准主要技术内容（如技术指标、参数、公式、性能要求、试验方法、检验规则等）的论据（包括试验、统计数据），修订标准时，应增列新旧标准水平的对比；

三、主要试验（或验证）的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效果；

四、采用国际标准和国外先进标准的程度及水平的对比情况；

五、与有关的现行法律、法规和国家标准的关系；

六、重大分歧意见的处理经过和依据；

七、作为团体标准的建议；

八、贯彻标准的要求和措施建议（包括组织措施、技术措施、过渡办法等内容）；

九、废止现行有关标准的建议；

十、其他应予说明的事项。

# 一、标准工作简况

## 1、任务来源

维兰特罗是葛兰素史克公司研发的新型 $\beta_2$ -受体激动剂，具有起效快、作用时间持久等优点，对 $\beta_2$ -受体的亲和力较对 $\beta_1$ -受体和 $\beta_3$ -受体高 1000 倍，具有高度选择性，可作为多款上市药品如荒地溴铵的原料药或有效成分进行使用，具有广阔的需求市场。原料药需要确定合适的手性异构体检测技术与检测条件来落实和确认质量的合格和数据的有效性，但目前维兰特罗没有公开的检测技术标准。

### 1.1 维兰特罗的来源

广东莱佛士制药公司通过创新的合成工艺实现了维兰特罗的高效绿色制造，并提供给药品生产企业用于药品生产。莱佛士公司根据原料药质量和中国药典的指导原则建立了维兰特罗质量和检测方法的企业标准。由于目前国内围绕维兰特罗药物已经构成了原料药生产、原料药市场交易和药品生产的团体，急需对维兰特罗手性异构体检测方法进行深入研究，并将维兰特罗手性异构体检测方法企业标准上升为团体标准，使之成为团体共同使用可以互相验证互相承认的标准，这对于药物绿色制造和药品市场监管、制药行业的标准化具有重要价值。

### 1.2 维兰特罗手性异构体

维兰特罗有一个手性中心，存在两种手性异构体，分别是 *R* 型维兰特罗和 *S* 型维兰特罗。*R* 型维兰特罗作为药剂原材料，发挥出治疗的效果。*S* 型维兰特罗为合成路线中得到的副产物。

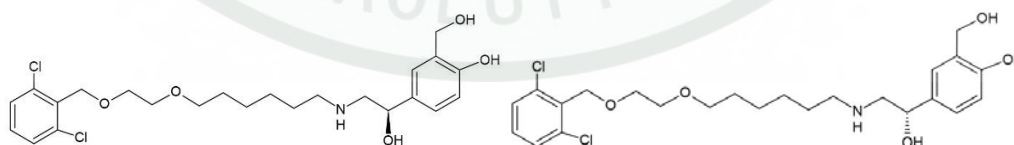


图 1 维兰特罗手性异构体分子结构示意图：（左）*(R)*-VL、（右）*(S)*-VL

### 1.3 结构及手性拆分情况

关于维兰特罗的检测方法国内外仅有少数几篇文献有研究报道，均采用高效液相色谱法进行样品分离，检测手段有紫外、荧光和质谱<sup>[1-5]</sup>。Yajun 等<sup>[6]</sup>采用高效液相色谱分离维兰特罗对映体，在 Chiralpak ID 柱上使用正己烷-乙醇-乙醇胺(75:25:0.1, v/v/v)作为流动相，紫外检测波长为 220 nm，对映体分离度达到 3.3，(R)-维兰特罗检出限为 0.30 µg/mL，线性范围为 3-30 µg/mL，相关系数为 0.9998，方法回收率在 98.5-101.7% 之间，方法精密度较高。Chundela 等<sup>[7]</sup>采用高效液相色谱-质谱分离检测维兰特罗，在 Zorbax Eclipse XDB-C8 色谱柱和 Zorbax Eclipse XDB-C8 柱上进行分离。流动相为乙腈-0.1%乙酸(95:5, v/v)，方法检出限(LOD)为 2 pg/mL。对于维兰特罗原料药质量检测方法而言，由于其纯度高，相对于检测方法灵敏度而言，更重要的是方法的准确性、稳定性及设备的通用性、普及性，因此采用高效液相色谱加紫外检测作为维兰特罗的检测方法对于其团体标准开发而言适用性较好。

### 1.4 维兰特罗研究目的及意义

由于目前国内围绕维兰特罗药物已经构成了原料药生产、原料药市场交易和药品生产的团体，急需对维兰特罗手性异构体检测方法进行深入研究，并将维兰特罗检测方法企业标准上升为团体标准，使之成为团体共同使用可以互相验证互相承认的标准，这对于药物绿色制造和药品市场监管、制药行业的标准化具有重要价值。

## 2、协作单位

本标准于2022年由广东省药学会药物手性专业委员会提出，广东省药学会团体标准委员会归口，在广东省药学会药物手性专业委员会组织下，由广东莱佛士制药技术有限公司进行起草、修订，华南师范大学、广东朗斯姆生化技术有限公司协助修订。

## 4、主要工作过程

2022 年\*月\*日，广东省药学会药物手性专委会提出了手性色谱检测的团体标准计划项目。

2022 年 5 月 1 日，由广东莱佛士制药技术有限公司、华南师范大学、广东朗斯姆生化技术有限公司三家单位发起《维兰特罗手性异构体的检测-液相色谱法》团体标准

的立项申请，并由广东莱佛士制药技术有限公司作为主要起草单位，开始标准准备工作。

2022年5月11日，广东省药学会团体标准委员会专家进行了该团标的立项评审，并批准立项。标委会提出该团标补充了现行技术标准的不足，对学科发展起到积极的推动作用，检测方法具有一定的应用价值，对相关产品的安全性有指导意义，并要求起草单位按照《广东省药学会团体标准管理办法(试行)》有关要求，严格把控标准质量关,切实提高标准制定的质量和水平，增加标准的适用性和实效性，按期完成标准编制的相关工作。

2023年6月25日，项目主持单位组织专家成立了标准编制工作组，并负责编制起草工作，确定标准的主要技术内容，制定了工作计划，安排相应的实验内容，并组织标准起草工作。

2024年\*月\*日，起草小组拟定了《维兰特罗手性异构体的检测-液相色谱法》（工作组讨论初稿）和编制说明。团体标准工作组召开会议，针对该讨论稿进行讨论，提出修改意见。

2024年\*月\*日，按照团体标准起草工作会讨论意见，整理并确定了相关特征性理化指标值，并达成一致意见，最终形成标准的（工作组讨论初稿）。

2024年\*月\*日，工作组向广东省药学会团体标准委员会提出申请。

在广泛的调查研究和必要的试验验证的工作基础上，根据 GB/T 1.1-2009《标准化工作导则第一部份：标准的结构和编写规则》及 GB/T 20001.4-2001《标准编写第四部份：化学分析方法》所规定的内容和格式编写完成标准草案，现已形成征求意见稿。



## 二、标准编制原则和标准主要技术内容

### 1、编制原则

本标准按照 GB/T 1.1-2020 给出的规则起草。

本标准规定了高效液相色谱法测定维兰特罗手性异构体检测的术语和定义、试剂和材料、仪器与设备、测定步骤和结果分析。

本标准采用手性固定相-高效液相色谱（CPS-HPLC）方法对较高纯度的维兰特罗标准品或原料分析。适用于合成的维兰特罗原料或对照品等的手性异构体的种类判定和含量的测定。本标准的编写制定过程以提高测试方法选择性、精密度、灵敏度、准确度和分析效率，降低分析成本为总原则，力求反映科学技术的先进成果和先进经验。遵循了标准制定过程中的先进性、经济性和适用性原则。

### 2、标准研制目的

目前，市场上的维兰特罗(Velanterol, VL)原料主要来源于工业合成，通常是(S)-VL 和(R)-VL 的混合物，其中主要成分和具有 $\beta_2$ -受体激动剂药理效果的为(R)构型。基于前期研究、广泛调研和验证基础上的考虑，结合实际，建立合理的维兰特罗手性异构体的检测和含量测定方法，以规范维兰特罗药品的生产秩序。

本标准针对纯度较高（纯度 $\geq 98\%$ ）的维兰特罗标准品或原料产品制定，采用高效液相方法，检测识别这类高纯度产品的异构体判定和对映体过量或分配，标准名称定为《维兰特罗手性异构体的检测-液相色谱法》。

### 3、技术要求

采用高效液相色谱法，在选定的工作条件下，通过手性色谱柱对样品中(R)-VL 和(S)-VL 分离，用紫外吸收检测器检测，用外标法定量，计算试样中(R)-VL 的质量分数。

在现有文献方法的基础上，对维兰特罗的液相分析方法进行改进和优化，该方法可有效测定(R)-VL 含量。

#### 3.1 定性确认

液相色谱仪进行定性测定，在试验条件下注入适量(S)-VL 和(R)-VL 参比物质来测

定分离度，分离度不小于 1.5。

在试验条件下对样品进行定性测定，如果检出样品中(S)-VL 或(R)-VL 色谱峰的保留时间与标准品一致，且该物质的紫外吸收谱图与标准品的紫外吸收谱图一致，则可初步确认样品中存在。

### 3.2 质量分数测定

试样中(R)-VL的含量按式（1）计算：

$$X_i = \frac{C_i \times V \times 1000}{m \times 1000} \dots\dots\dots (1)$$

式中：

$X_i$ -----试样中被测组分的含量，单位为 g/g；

$C_i$ -----从标准曲线上得到的待测溶液中(R)-VL 的浓度，单位为毫克每毫升（mg/mL）；

$V$ -----样品溶解总体积，单位为毫升（mL）；

$m$ -----试样的质量，单位为克（mg）。

### 3.3 重复性

在重复条件下，取两次独立测定的算术平均值作为结果，其绝对差值不得超过算术平均值的 10%。

## 4、试验方法

### 4.1 样品溶液的配制

#### 4.1.1 (S)-VL 标准储备溶液和(R)-VL 标准储备溶液的配制

取(S)-VL 对照品 20 mg、(R)-VL 对照品 20 mg，精密称定，分别置于 20 mL 量瓶中，乙醇稀释至刻度，分别配成约 1 mg/mL 的(S)-VL 标准储备溶液和约 1 mg/mL 的(R)-VL 标准储备溶液，储备液于 0~8 °C 保存。

#### 4.1.2 混合对照品标准储备溶液的配制

取(S)-VL 对照品 20 mg、(R)-VL 对照品 20 mg，精密称定，置于同一 20 mL 量瓶中，加乙醇至刻度，配成约每 1mL 约含 1 mg (S)-VL 和 1 mg 的(R)-VL 混合对照品标准

储备溶液，储备液于 0~8 °C 保存。

#### 4.1.3 标准工作曲线溶液的配制

精密量取(R)-VL 对照品标准储备溶液（见 4.1.1）一定体积，置于 10 mL 量瓶中，加入乙醇稀释至刻度，摇匀，配制成系列标准混合工作溶液：0.005、0.01、0.02、0.04、0.05、0.06、0.08、0.10 mg/mL，分别编号 1、2、3、4、5、6、7、8。

#### 4.1.4 系统适用性溶液配制

精密量取(R)-VL 对照品标准储备溶液（见 4.1.1）200  $\mu$ L，置于 10 mL 量瓶中，加入乙醇稀释至刻度，配成每 1 mL 约含 0.02 mg (R)-VL 的溶液；精密量取(S)-VL 对照品标准储备溶液（见 4.1.1）200  $\mu$ L，置于 10 mL 量瓶中，加入乙醇稀释至刻度，配成每 1 mL 约含 0.02 mg (S)-VL 的溶液，将两份溶液各取 500  $\mu$ L 混合，作为系统适用性溶液。

#### 4.1.5 定量限溶液的配制

精密量取(R)-VL 对照品标准储备溶液（见 4.1.1）200  $\mu$ L，置于 20 mL 量瓶中，加入乙醇稀释至刻度，摇匀，再精密量取(R)-VL 稀释液 4.0 mL 置于 10 mL 量瓶中，加入乙醇稀释至刻度，作为定量限溶液。

#### 4.1.6 精密度溶液的配制

精密量取(R)-VL 对照品标准储备溶液（见 4.1.1）0.2 mL、0.5 mL、0.6 mL，分别置于 10 mL 量瓶中，加入乙醇稀释至刻度，配制成 0.02 mg/mL（40%浓度）、0.05 mg/mL（100%浓度）、0.06 mg/mL（120%浓度）三个浓度的维兰特罗溶液，按照色谱条件进行测定。

#### 4.1.7 方法准确度溶液的配制

取 (R)-VL 对照品 10 mg、(S)-VL 对照品 10 mg，精密称定，分别置于 10 mL 量瓶中，乙醇稀释至刻度，分别配成约 1 mg/mL 的(R)-VL 溶液和约 1 mg/mL 的(S)-VL 溶液。

5% (R)-VL 和 95% (S)-VL 的准确度溶液的配制：取上述(R)-VL 溶液 1  $\mu$ L，(S)-VL 溶液 19  $\mu$ L，置于同一 5 mL 量瓶中，加入乙醇稀释至刻度，摇匀，同法制备三份。

50% (R)-VL 和 50% (S)-VL 的准确度溶液的配制：取上述(R)-VL 溶液 10  $\mu$ L，(S)-VL 溶液 10  $\mu$ L，置于同一 5 mL 量瓶中，加入乙醇稀释至刻度，摇匀，同法制备三份。

95% (R)-VL 和 5% (S)-VL 的准确度溶液的配制：取上述(R)-VL 溶液 19  $\mu\text{L}$ ，(S)-VL 溶液 1  $\mu\text{L}$ ，置于同一 5mL 量瓶中，加入乙醇稀释至刻度，摇匀，同法制备三份。

#### 4.1.8 稳定性溶液的配制

精密量取(R)-VL 标准储备溶液 100  $\mu\text{L}$ ，分别置于 10 mL 量瓶中，加入乙醇稀释至刻度，制备两份，分别置于常温和 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存，作为(R)-VL 稳定性溶液。

#### 4.1.9 供试品溶液的配制

取供试品约 20 mg，精密称定，置于 20 mL 量瓶，加入乙醇稀释至刻度，摇匀，作为供试品储备溶液。精密量取供试品储备溶液 100  $\mu\text{L}$ ，置于 10 mL 量瓶中，加入乙醇稀释至刻度，作为供试品待测液。

### 4.2 高效液相色谱测定

#### 4.2.1 液相色谱分析条件

按高效液相色谱操作规程开机预热，调节温度及流量，达到分析条件并基线平稳后进样分析。推荐的色谱柱及典型色谱操作条件见表 1，其他能达到等同分离程度的色谱柱和色谱操作条件均可使用。

测定：精密量取上述各浓度溶液，分别注入液相色谱仪，记录色谱图。

表 1 色谱柱和典型色谱操作条件

|      |                                                                                                                  |
|------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 色谱柱  | 纤维素三-(4-氯-3-甲基苯基氨基甲酸酯) 硅胶为填充剂<br>(Phenomenex, Lux Cellulose-4 4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 $\mu\text{m}$ 或效能相当的色谱柱) |
| 流动相  | 正己烷:乙醇:二乙胺:三氟乙酸=800:200:0.5:1 (v/v)，等度洗脱                                                                         |
| 柱温   | 30 $^{\circ}\text{C}$                                                                                            |
| 流速   | 1 mL/min                                                                                                         |
| 检测波长 | 230 nm                                                                                                           |
| 进样量  | 25 $\mu\text{L}$                                                                                                 |
| 运行时间 | 20 min                                                                                                           |

#### 4.2.2 标准工作曲线测定

将上述系列标准混合工作溶液按色谱条件（见4.1.3）进行测定，以样品峰面积为y轴，对应的样品浓度为x轴，绘制标准工作曲线。



### 4.2.3 试样测定

将样品溶液按色谱条件进行测定，记录色谱峰的保留时间和峰面积，由色谱峰面积从标准曲线上求出相应的(*R*)-VL的浓度。样品溶液中被测物质的响应值应在仪器测定的线性范围内，超出线性范围的应稀释或浓缩后再进样分析。

### 4.2.4 平行试验

按以上步骤，对同一试样进行平行试验测定，以算术平均值作为结果，其绝对差值不得超过算术平均值的10%。

## 5、试剂与设备

### 5.1 试剂

- (1) 正己烷：色谱纯。
- (2) 无水乙醇：色谱纯。
- (3) 二乙胺：色谱纯
- (4) 三氟乙酸（TFA）。
- (5) 参比物质1（对照品）：*(S)*-维兰特罗，化学纯度：96.3%（HPLC），由深圳市恒丰万达医药科技有限公司提供。
- (6) 参比物质2（对照品）：*(R)*-维兰特罗，化学纯度：99.6%（HPLC），由广东莱福士制药技术有限公司提供。

### 5.2 仪器和设备

- (1) 高效液相色谱仪：配二级管阵列检测器（DAD）或紫外检测器（UV），其灵敏度及稳定性应符合GB/T 16631。
- (2) 色谱柱：纤维素三-（4-氯-3-甲基苯基氨基甲酸酯）硅胶填充剂色谱柱（Phenomenex, Lux Cellulose-4 4.6 mm×250 mm, 5 μm）。
- (3) 分析天平：感量0.1 mg。
- (4) 量瓶：100 mL、20 mL、10 mL。
- (5) 微量移液器：100-1000 μL 量程、20-200 μL 量程。

### 三、主要试验（或验证）的分析、综述报告，技术经济论证，预期的经济效果；

#### 1. 方法的确定

高效液相色谱分析方法学验证项目汇总如表 2 下：

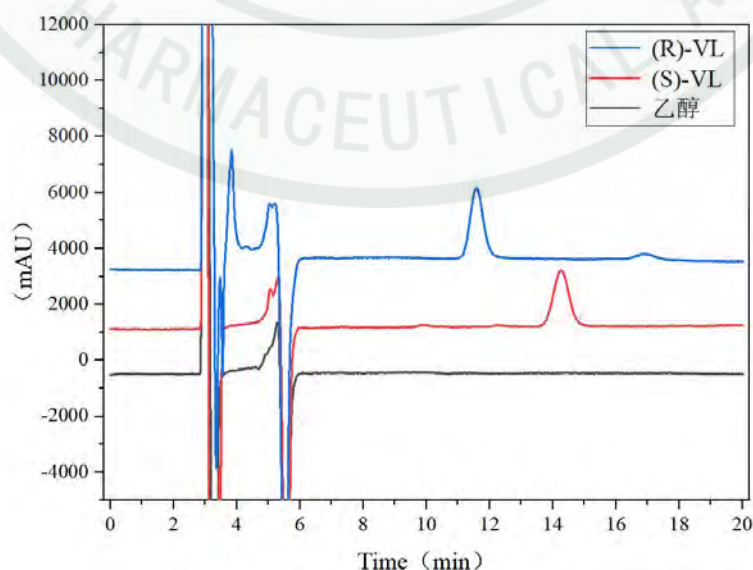
表 2 《维兰特罗手性异构体检测 液相色谱法》验证结果概要

| 项目    |       | 预期目标                                                                                                        | 验证结果                                                                                                                                                                                                                      |
|-------|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 专属性   |       | 空白溶液应不干扰(S)-VL 和(R)-VL 的检查；                                                                                 | 空白溶剂对(S)-VL 和(R)-VL 不产生干扰。                                                                                                                                                                                                |
| 系统适用性 |       | (S)-VL 和(R)-VL 的分离度应符合要求， $R_s \geq 1.5$ ；                                                                  | 在此系统条件下(R)-VL 和(S)-VL 的分离度为 2.69，表明在该液相色谱条件下，系统适应性参数符合含量测定要求，且方法精密度良好。                                                                                                                                                    |
| 定量限   |       | 要求信噪比 $S/N \approx 10$ 时的检测浓度，证明方法具有足够低的定量检测能力；所测三份溶液的主成分保留时间 $RSD \leq 2.0\%$ ，峰面积 $\leq 5.0\%$ 。          | 在本色谱条件下，信噪比约为 10 时，(R)-VL 进样浓度为 $0.5 \mu\text{g/mL}$ 。                                                                                                                                                                    |
| 线性和范围 |       | 在 $0.005 \sim 1.000 \text{ mg/mL}$ 范围内，线性方程的相关系数 $\geq 0.990$ ，Y 轴截距应在 100% 响应值的 25% 以内，响应因子的 RSD 应不大于 10%。 | (R)-VL、(S)-VL 峰面积与浓度线性关系良好。在 $0.005 \sim 0.100 \text{ mg/mL}$ 范围内，(R)-VL 含量线性关系良好，回归方程 $y = 0.92x - 0.014$ ， $R^2 = 0.9998$ ，响应因子 RSD 为 0.93%；(S)-VL 含量线性关系良好，回归方程 $y = 0.78x - 0.53$ ， $R^2 = 0.9995$ ，响应因子 RSD 为 2.27%。 |
| 准确度   |       | 回收率应为 80%~120%                                                                                              | 由实验结果可知，(R)-VL、(S)-VL 的方法准确度良好。(R)-VL 的回收率为 95.39%-107.40%，平均回收率为 100.9%，RSD 为 4.22%，方法准确度良好；(S)-VL 的回收率为 98.68%-112.5%，平均回收率为 104.2%，RSD 为 4.53%，方法准确度良好。                                                                |
| 精密度   | 系统精密度 | 配制 3 种不同浓度精密度溶液，每个浓度制备三份进行测定，对照溶液中的各成分峰面积 $RSD \leq 2.0\%$ ，保留时间 $RSD \leq 2.0\%$ 。                         | 由实验结果可知，本法的系统精密度和日内精密度良好。系统精密度考察中，(R)-VL、(S)-VL 在 $0.02 \text{ mg/mL}$ 、 $0.05 \text{ mg/mL}$ 、 $0.06 \text{ mg/mL}$ 三个浓度时，峰面积和保留时间 RSD 均小于 2%。日间精密度考察中，连续 3 天考察(R)-VL、(S)-VL 三个浓度保留时间的 RSD 均小于 5%，峰面积的 RSD 小于 5%。        |
|       | 日间精密度 | 同一分析人员连续三天用同一仪器检查系统精密度的 3 个浓度，各成分峰面积 $RSD \leq 5.0\%$ ，保留时间 $RSD \leq 5.0\%$ 。                              |                                                                                                                                                                                                                           |
|       | 重复性   | 取供试品称样 6 份，(R)-VL 检测结果的 RSD 小于 2%。                                                                          | 上述结果显示，在同一实验室，由同一操作者使用相同仪器设备，按相同的前处理方法和测试方法对供试品进行了 6 次测定，供试品中(R)-                                                                                                                                                         |

|     |                                                                                 |                                                                                                                                                                                                                               |
|-----|---------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                                                                                 | VL测定结果的RSD为0.61%，小于2%，说明该方法的重复性良好。                                                                                                                                                                                            |
| 耐用性 | 检测方法的色谱条件发生微小变化时，系统适用性溶液中的(S)-VL和(R)-VL分离度 $R_s \geq 1.5$ ，不同参数的获得的峰面积的RSD<10%； | 当调节TFA含量比例变化 $\pm 0.5\%$ 、柱温变化25~35℃时，系统适用性溶液中维兰特罗手性异构体的峰面积RSD小于5%。当流动相比比例变化 $\pm 2\%$ 时，分离度和峰面积检出量差异不大，但保留时间RSD>20%，说明溶剂比例对样品的保留时间非常敏感。当检测波长变化 $\pm 5$ nm、流速变化 $\pm 0.1$ 时，分离度均符合规定，峰面积检出量差异较大。因此在色谱条件中，应注意控制流动相比比例、检测波长和流速； |
| 稳定性 | (R)-VL、(S)-VL对照品溶液在常温及冷藏条件下放置一段时间后，峰面积百分含量的RSD（相对标准偏差） $\leq 5.0\%$ 。           | (R)-VL、(S)-VL在0-9 h内的常温稳定性考察中，面积的相对标准偏差RSD<2%，线性回归方差分析显示 $0.01 < P < 0.05$ ，具有显著性差异；在0-7天的4℃保存条件下考察，(R)-VL、(S)-VL的应稳定性较好（RSD $\leq 2\%$ ），回归不显著（对于95%置信水平， $P > 0.05$ ）。说明0-7天的4℃保存条件下，(R)-VL、(S)-VL具有较好的稳定性；                 |
| 结论  | 经过对(R)-VL和(S)-VL检测方法进行验证，方法的准确度高、灵敏度及精密度良好，适用于维兰特罗手性异构体的检测。                     |                                                                                                                                                                                                                               |

## 1.1 专属性实验

进行空白溶剂干扰实验，取乙醇空白溶液、0.01 mg/mL(S)-VL标准溶液、0.01 mg/mL(R)-VL标准储备溶液，按液相色谱条件（见二、标准编制原则和标准主要内容下的4.2.1项）分别进行测试，记录色谱图，空白溶液和标准品溶液色谱图见图1。



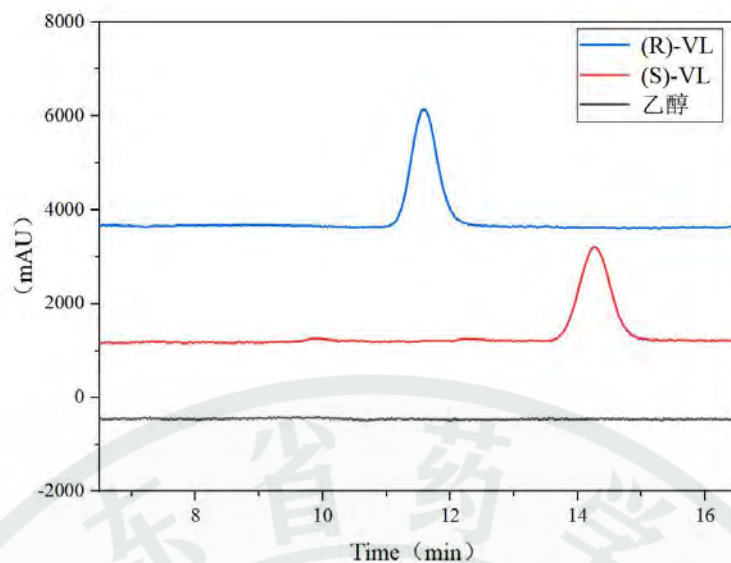


图 1 专属性实验液相色谱图：(a) (R)-VL；(b) (S)-VL；(c) 空白溶液

结论：空白溶剂对(S)-VL 和(R)-VL 不产生干扰。

## 1.2 系统适应性试验

取系统适用性溶液（见二、标准编制原则和标准主要技术内容下的 4.1.5 项），按色谱条件（见 4.2.1）进行系统适用性试验测定，记录(R)-VL 的保留时间（min）、峰面积（mAU）、拖尾因子（T）、理论塔板数（N），分离度（Rs）。记录数据见表 3、图 2。

表 3 系统适用性参数

| 样品名称   | 保留时间/min | 理论塔板数/N | 拖尾因子/T | 分离度/Rs |
|--------|----------|---------|--------|--------|
| (R)-VL | 12.29    | 3563    | 1.05   |        |
| (S)-VL | 14.72    | 3558    | 1.07   | 2.69   |

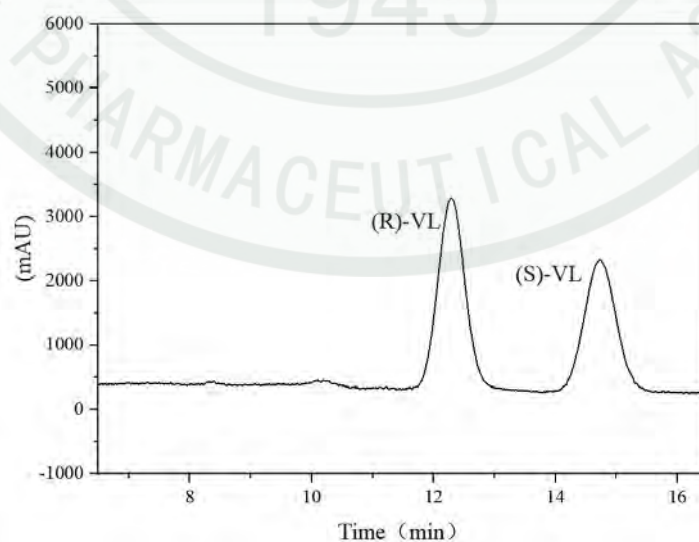


图 2 系统适用性液相色谱图

结论：在此系统条件下(R)-VL 的保留时间分别为 12.29 min；(R)-VL 的理论塔板数



大于 3000；(R)-VL 的拖尾因子为 1.05。(R)-VL 和(S)-VL 的分离度为 2.69。表明在该液相色谱条件下，系统适应性参数符合含量测定要求，且方法精密度良好。

1.3 定量限（LOQ）检测

取定量限溶液（见二、标准编制原则和标准主要技术内容下的 4.1.6 项）按色谱条件（见 4.2.1）进行测定，检测(R)-VL 信噪比，当 S/N=10 时为 LOQ 浓度，记录色谱图，计算峰面积及保留时间的相对标准偏差。结果见表 4、表 5，液相色谱图见图 3。

表 4 维兰特罗手性异构体的定量限

| 样品     | 浓度<br>(mg/mL) | 信噪比<br>S/N | 保留时<br>间/min | 平均保留<br>时间 | 保留时间<br>RSD (%) | 峰面积<br>( $\times 10^4$ m<br>AU) | 平均峰<br>面积 | 峰面积 RSD<br>(%) |
|--------|---------------|------------|--------------|------------|-----------------|---------------------------------|-----------|----------------|
| (R)-VL | 0.0005        | 10.86      | 12.18        | 12.15      | 0.43            | 4429                            | 4291      | 2.91           |
|        |               | 10.93      | 12.18        |            |                 | 4258                            |           |                |
|        |               | 10.51      | 12.09        |            |                 | 4186                            |           |                |

表 5 维兰特罗手性异构体的定量限

| 样品     | 浓度<br>(mg/mL) | 信噪比<br>S/N | 保留时<br>间/min | 平均保留<br>时间 | 保留时间<br>RSD (%) | 峰面积<br>( $\times 10^4$ m<br>AU) | 平均峰<br>面积 | 峰面积 RSD<br>(%) |
|--------|---------------|------------|--------------|------------|-----------------|---------------------------------|-----------|----------------|
| (S)-VL | 0.0005        | 10.38      | 14.09        | 14.08      | 0.22            | 3678                            | 3678      | 0.53           |
|        |               | 10.25      | 14.05        |            |                 | 3659                            |           |                |
|        |               | 10.27      | 14.11        |            |                 | 3698                            |           |                |

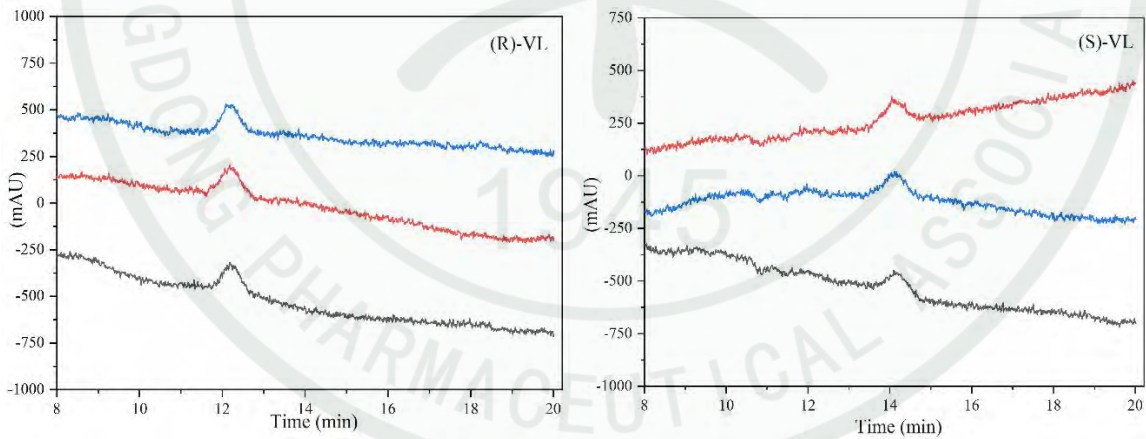


图 3 维兰特罗手性异构体的定量限液相色谱图：(a) (R)-VL、(b) (S)-VL；

结论：在本色谱条件下，信噪比约为 10 时，(R)-VL、(S)-VL 进样浓度为 0.0005 mg/mL。

1.4 标准工作曲线测定

取标准工作曲线溶液（见二、标准编制原则和标准主要技术内容下的4.1.3项）按色谱条件（见4.2.1）进行测定。以样品峰面积为 y 轴、对应的样品浓度为 x 轴，进行

线性回归分析，得标准曲线方程及相关系数，见表6、表7，含量线性关系图见图4、图5。

表 6 (R)-VL 线性关系实验结果

|                          |                 |      |       |                   |       |       |        |       |
|--------------------------|-----------------|------|-------|-------------------|-------|-------|--------|-------|
| 标准液编号                    | 1               | 2    | 3     | 4                 | 5     | 6     | 7      | 8     |
| $C_{(R)-VL}$<br>(mg/L)   | 5               | 10   | 20    | 40                | 50    | 60    | 80     | 100   |
| 峰面积<br>( $\times 10^4$ ) | 4.48            | 9.25 | 18.36 | 37.23             | 45.66 | 55.63 | 75.06  | 90.86 |
|                          | 4.57            | 9.04 | 18.41 | 36.87             | 45.83 | 55.12 | 74.31  | 92.22 |
| 平均峰面积                    | 4.53            | 9.15 | 18.39 | 37.05             | 45.75 | 55.38 | 74.69  | 91.54 |
| 响应因子                     | 9060            | 9150 | 9155  | 9262              | 9150  | 9230  | 9336   | 9154  |
| 响应因子 RSD (%)             | 0.93            |      |       | Y 轴截距/100%响应值 (%) |       |       | 0.03   |       |
| 线性方程                     | $y=0.92x-0.014$ |      |       | 相关系数              |       |       | 0.9998 |       |

表 7 (S)-VL 线性关系实验结果

|                          |                |      |       |                   |       |       |        |       |
|--------------------------|----------------|------|-------|-------------------|-------|-------|--------|-------|
| 标准液编号                    | 1              | 2    | 3     | 4                 | 5     | 6     | 7      | 8     |
| $C_{(S)-VL}$<br>(mg/L)   | 5              | 10   | 20    | 40                | 50    | 60    | 80     | 100   |
| 峰面积<br>( $\times 10^4$ ) | 3.63           | 7.67 | 15.08 | 30.02             | 37.78 | 45.21 | 61.37  | 77.49 |
|                          | 3.60           | 7.60 | 15.21 | 31.13             | 36.34 | 45.98 | 62.06  | 78.04 |
| 平均峰面积                    | 3.62           | 7.64 | 15.15 | 30.56             | 37.06 | 45.60 | 61.72  | 77.76 |
| 响应因子                     | 7240           | 7640 | 7575  | 7640              | 7412  | 7600  | 7715   | 7776  |
| 响应因子 RSD (%)             | 2.27           |      |       | Y 轴截距/100%响应值 (%) |       |       | 1.42   |       |
| 线性方程                     | $y=0.78x-0.53$ |      |       | 相关系数              |       |       | 0.9995 |       |

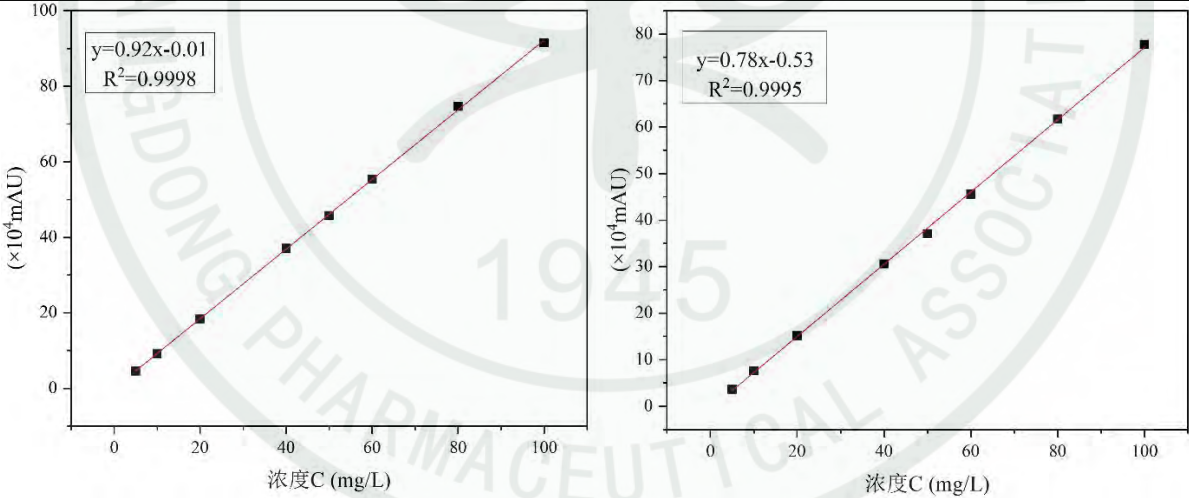


图 4 (R)-VL、(S)-VL 的含量线性关系图

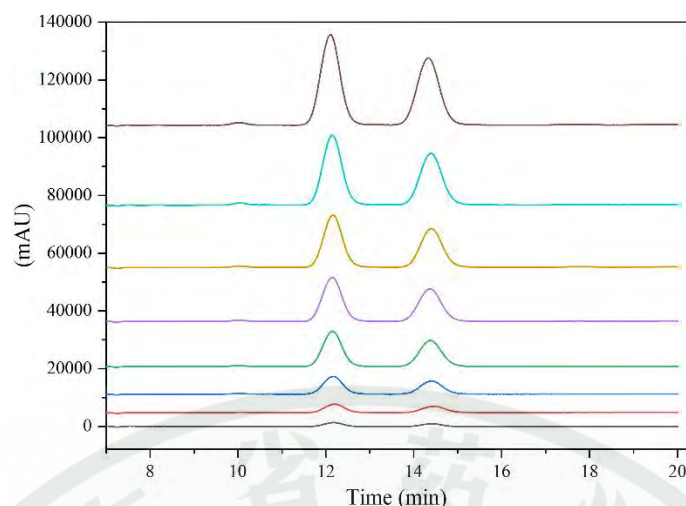


图 5 (R)-VL、(S)-VL 的含量线性关系色谱图

结论：(R)-VL、(S)-VL 的峰面与浓度线性关系良好。在 0.005-0.100 mg/mL 范围内，(R)-VL 的含量线性关系良好，回归方程  $y=0.92x-0.014$ ， $R^2=0.9998$ ，响应因子 RSD 为 0.93%；在 0.005-0.100 mg/mL 范围内，(S)-VL 的含量线性关系良好，回归方程  $y=0.78x-0.53$ ， $R^2=0.9995$ ，响应因子 RSD 为 2.27%。

## 1.5 准确度试验

精密量取方法准确度溶液（见二、标准编制原则和标准主要技术内容下的 4.1.8 项）各 25  $\mu$ L，分别注入液相色谱仪，记录色谱图，按公式（2）进行计算，实验结果见表 8。

$$\text{回收率} = \frac{\text{检出量}}{\text{实际加入量}} \times 100\% \quad \text{..... (2)}$$

表 8 (R)-VL、(S)-VL 准确度测试结果

| (R)-VL 浓度 |   | 检出量<br>(mg) | 投入量<br>(mg) | 回收率<br>(%) | 平均回收率<br>(%) | RSD<br>(%) |
|-----------|---|-------------|-------------|------------|--------------|------------|
| 5%        | 1 | 0.0081      | 0.008       | 101.3      | 100.9        | 4.22       |
|           | 2 | 0.0083      |             | 103.8      |              |            |
|           | 3 | 0.0079      |             | 98.75      |              |            |
| 50%       | 1 | 0.085       | 0.080       | 106.3      |              |            |
|           | 2 | 0.086       |             | 107.4      |              |            |
|           | 3 | 0.083       |             | 101.4      |              |            |
| 95%       | 1 | 0.148       | 0.152       | 97.37      |              |            |
|           | 2 | 0.145       |             | 95.39      |              |            |
|           | 3 | 0.147       |             | 96.71      |              |            |

| (S)-VL 浓度 |   | 检出量<br>(mg) | 投入量<br>(mg) | 回收率<br>(%) | 平均回收率<br>(%) | RSD<br>(%) |
|-----------|---|-------------|-------------|------------|--------------|------------|
| 5%        | 1 | 0.0089      | 0.008       | 112.5      | 104.2        | 4.53       |
|           | 2 | 0.0085      |             | 106.3      |              |            |
|           | 3 | 0.0088      |             | 110.0      |              |            |
| 50%       | 1 | 0.083       | 0.080       | 104.2      |              |            |
|           | 2 | 0.081       |             | 101.4      |              |            |
|           | 3 | 0.083       |             | 104.2      |              |            |
| 95%       | 1 | 0.150       | 0.152       | 98.68      |              |            |
|           | 2 | 0.151       |             | 99.49      |              |            |
|           | 3 | 0.153       |             | 100.9      |              |            |

结论：由实验结果可知，(R)-VL、(S)-VL 的方法准确度良好。(R)-VL 的回收率为 95.39%~107.40%，平均回收率为 100.9%，RSD 为 4.22%，方法准确度良好；(S)-VL 的回收率为 98.68%~112.5%，平均回收率为 104.2%，RSD 为 4.53%，方法准确度良好。

## 1.6 系统精密度和日间精密度试验

取精密度溶液（见二、标准编制原则和标准主要技术内容下的 4.1.7 项）按色谱条件（见 4.2.1）进行测定，一天内连续进样 3 次，考察日内精密度，以及连续 3 天分别进样 3 次，考察日间精密度。计算其峰面积、保留时间的相对标准偏差，结果见表 9。

表 9 维兰特罗手性异构体的日内、日间精密度 (mean±SD, n=3)

| 样品浓度<br>(mg/mL) | $t_R$ (min)<br>(n=3) | A<br>( $\times 10^4$ mAU)<br>(n=3) | 日内精密度 RSD(%) |      |           |      |           |      | 日间精密度<br>RSD (n=6) |      |
|-----------------|----------------------|------------------------------------|--------------|------|-----------|------|-----------|------|--------------------|------|
|                 |                      |                                    | 第一天          |      | 第二天       |      | 第三天       |      | $t_R$ (%)          | A(%) |
|                 |                      |                                    | $t_R$ (%)    | A(%) | $t_R$ (%) | A(%) | $t_R$ (%) | A(%) |                    |      |
| 0.2             | 11.89±0.22           | 18.72±0.23                         | 0.15         | 0.83 | 0.07      | 1.45 | 0.10      | 1.26 | 1.61               | 1.69 |
| (R)-VL 0.5      | 11.89±0.38           | 46.56±0.22                         | 0.06         | 0.39 | 0.05      | 0.46 | 0.09      | 0.56 | 1.72               | 0.45 |
| 0.6             | 11.90±0.24           | 56.34±0.35                         | 0.05         | 0.60 | 0.06      | 0.55 | 0.18      | 0.44 | 1.83               | 0.55 |
| 样品浓度<br>(mg/mL) | $t_R$ (min)<br>(n=3) | A<br>( $\times 10^4$ mAU)<br>(n=3) | 日内精密度 RSD(%) |      |           |      |           |      | 日间精密度<br>RSD (n=6) |      |
|                 |                      |                                    | 第一天          |      | 第二天       |      | 第三天       |      | $t_R$ (%)          | A(%) |
|                 |                      |                                    | $t_R$ (%)    | A(%) | $t_R$ (%) | A(%) | $t_R$ (%) | A(%) |                    |      |



|        |     |            |            | $t_R(\%)$ | A(%) | $t_R(\%)$ | A(%) | $t_R(\%)$ | A(%) | $t_R(\%)$ | A(%) |
|--------|-----|------------|------------|-----------|------|-----------|------|-----------|------|-----------|------|
|        | 0.2 | 14.05±0.25 | 15.61±0.24 | 0.07      | 1.10 | 0.15      | 0.87 | 0.05      | 1.32 | 1.59      | 1.33 |
| (S)-VL | 0.5 | 14.04±0.27 | 36.86±0.17 | 0.05      | 0.47 | 0.07      | 0.38 | 0.14      | 0.86 | 1.78      | 0.41 |
|        | 0.6 | 14.06±0.22 | 46.10±0.47 | 0.11      | 0.73 | 0.05      | 1.28 | 0.23      | 0.58 | 1.95      | 0.89 |

结论：由实验结果可知，本法的日间精密度和日内精密度良好。日间精密度考察中，(R)-VL 在 0.02 mg/mL、0.05 mg/mL、0.06 mg/mL 三个浓度时，峰面积和保留时间 RSD 均小于 2%。在日间精密度考察中，连续 3 天考察(R)-VL 三个浓度保留时间 RSD 均小于 5%，峰面积 RSD 均小于 5%。

## 1.7 重复性实验

依照供试品溶液制备方法（见二、标准编制原则和标准主要技术内容下的 4.1.10 项），制备六份供试品溶液，按色谱条件（见 4.2.1）进行重复性试验测定，记录色谱图，实验结果见表 10。

表 10 (R)-VL 重复性实验结果

| 样品编号 | 质量分数(g/g) | 平均值   | RSD(%) |
|------|-----------|-------|--------|
| 1    | 0.760     | 0.760 | 0.61   |
| 2    | 0.762     |       |        |
| 3    | 0.766     |       |        |
| 4    | 0.762     |       |        |
| 5    | 0.755     |       |        |
| 6    | 0.754     |       |        |

结论：上述结果显示，在同一实验室，由同一操作者使用相同仪器设备，按相同的前处理方法和测试方法对供试品进行 6 次测定，供试品中(R)-VL 测定结果的 RSD(%) 为 0.61%，小于 1%，说明该方法的重复性良好，在样品溶液中未检测出(S)-VL 的峰。

## 1.8 耐用性考察

取供系统适用性溶液，考察液相色谱条件发生微小变动时（流动相比率、流速、柱温、检测波长），对测试结果的影响程度，以保留时间、拖尾因子、理论塔板数和含量百分比做评估，试验方案见表 11。

表 11 维兰特罗手性异构体耐用性试验方案

| 耐用性研究项目                  | 实验方法条件  | 确认耐用性范围                         | 考察指标                         |
|--------------------------|---------|---------------------------------|------------------------------|
| 检测波长(nm)                 | 230     | 检测波长变化 $\pm 5$ nm               |                              |
| TFA 含量比例(%)              | 0.10    | TFA 含量比例变化 $\pm 0.5$ %          | 峰面积 ( <i>A</i> )             |
| 柱温( $^{\circ}\text{C}$ ) | 30      | 温度变化 $\pm 5$ $^{\circ}\text{C}$ | 保留时间( <i>t<sub>R</sub></i> ) |
| 流动相比比例(%)                | 800:200 | 流动相比比例变化 $\pm 2$ %              | 理论塔板数( <i>N</i> )            |
| 流速(mL/min)               | 1.0     | 流速变化 $\pm 0.1$ mL/min           | 拖尾因子( <i>T</i> )             |

### 1.8.1 检测波长变化 $\pm 5$ nm

调节高效液相色谱仪的检测波长，分别为 225 nm、230 nm、235 nm，测试系统适用性溶液，实验数据见表 10，记录色谱图（图 6）。

表 12 维兰特罗含量检测耐用性实验—检测波长变化色谱数据

| 检测波长变化 | <i>t<sub>R</sub></i> /min | <i>A</i> / $\times 10^4$ mAU | <i>N</i> | <i>T</i> | <i>R<sub>S</sub></i> |
|--------|---------------------------|------------------------------|----------|----------|----------------------|
| (R)-VL | 225 nm                    | 12.17                        | 13.54    | 3382     | 1.05                 |
|        | 230 nm                    | 12.18                        | 9.45     | 3379     | 1.06                 |
|        | 235 nm                    | 12.20                        | 4.74     | 3458     | 1.00                 |
|        | RSD (%)                   | 0.13                         | 1.31     | 3.10     |                      |
| (S)-VL | 225 nm                    | 14.43                        | 10.75    | 3593     | 1.03                 |
|        | 230 nm                    | 14.45                        | 7.63     | 3626     | 0.97                 |
|        | 235 nm                    | 14.44                        | 3.62     | 3671     | 1.03                 |
|        | RSD (%)                   | 0.07                         | 1.08     | 3.43     | 0.61                 |

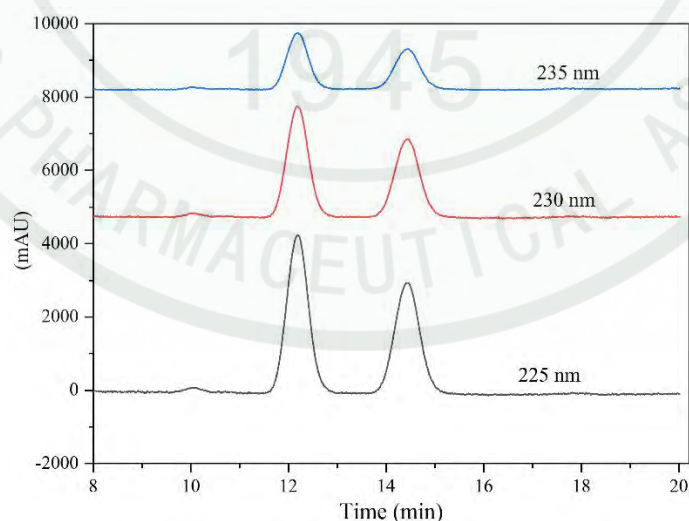


图 6 维兰特罗含量检测耐用性实验—检测波长变化液相色谱图

由上表可知，当检测波长调整量在 $\pm 5$  nm 范围内变动时，对(R)-VL、(S)-VL 的保留时间、拖尾因子、理论塔板数变化比较小， $\text{RSD} < 5\%$ ，符合规定；但是对峰面积大小

影响比较大。

### 1.8.2 TFA 含量比例变化 $\pm 0.05\%$

分别配制 TFA 含量为 0.05%、0.10%、0.15% 的色谱流动相，脱气，测试系统适用性溶液，记录色谱图（见图 7），实验数据见表 13。

表 13 维兰特罗含量检测耐用性实验——TFA 比例变化色谱数据

| TFA 含量变化 | $t_R$ /min | $A/\times 10^4 \text{mAU}$ | $N$   | $T$  | $R_S$ |
|----------|------------|----------------------------|-------|------|-------|
| (R)-VL   | 0.05%      | 11.75                      | 10.09 | 3073 | 1.05  |
|          | 0.10%      | 12.18                      | 9.45  | 3379 | 1.06  |
|          | 0.15%      | 11.98                      | 9.42  | 3339 | 1.01  |
|          | RSD (%)    | 1.80                       | 3.92  | 5.10 | 2.54  |
| (S)-VL   | 0.05%      | 13.85                      | 7.95  | 3361 | 1.03  |
|          | 0.10%      | 14.45                      | 7.36  | 3676 | 0.97  |
|          | 0.15%      | 14.22                      | 7.51  | 3652 | 0.97  |
|          | RSD (%)    | 2.14                       | 4.03  | 4.92 | 3.50  |

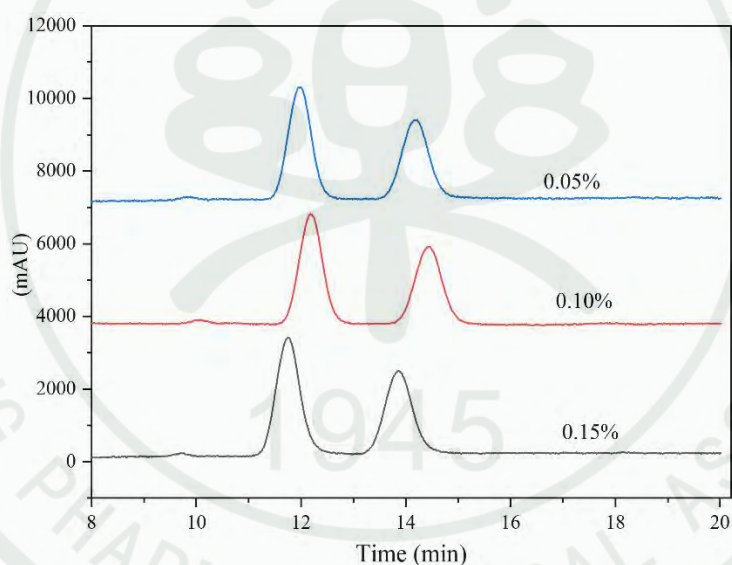


图 7 维兰特罗含量检测耐用性实验——TFA 比例变化色谱图

由表 13 和色谱图可知，当 TFA 含量比例调整量在 $\pm 0.05\%$ 范围内变动，峰面积、保留时间、拖尾因子、理论塔板数较小，RSD 大约在 5%左右，综上所述 TFA 含量变化对(R)-VL、(S)-VL 的含量检测结果影响较小。

### 1.8.3 柱温变化 $\pm 5^\circ\text{C}$

调节高效液相色谱仪的柱温，分别为  $25^\circ\text{C}$ 、 $30^\circ\text{C}$ 、 $35^\circ\text{C}$ ，测试系统适用性溶液，记录色谱图（见图 8）。实验数据表 14。

表 14 维兰特罗含量检测耐用性实验——柱温变化色谱数据

|        | 柱温变化    | $t_R/min$ | $A/$ | $N$  | $T$  | $R_S$ |
|--------|---------|-----------|------|------|------|-------|
| (R)-VL | 25 °C   | 12.33     | 9.44 | 3086 | 0.97 |       |
|        | 30 °C   | 12.18     | 9.45 | 3379 | 1.06 |       |
|        | 35 °C   | 11.71     | 9.32 | 3326 | 1.08 |       |
|        | RSD (%) | 2.68      | 0.77 | 4.78 | 5.65 |       |
| (S)-VL | 25 °C   | 14.71     | 7.56 | 3381 | 0.98 | 2.51  |
|        | 30 °C   | 14.45     | 7.63 | 3676 | 0.97 | 2.53  |
|        | 35 °C   | 13.76     | 7.37 | 3735 | 1.08 | 2.40  |
|        | RSD (%) | 3.43      | 1.79 | 5.27 | 6.02 | 2.82  |

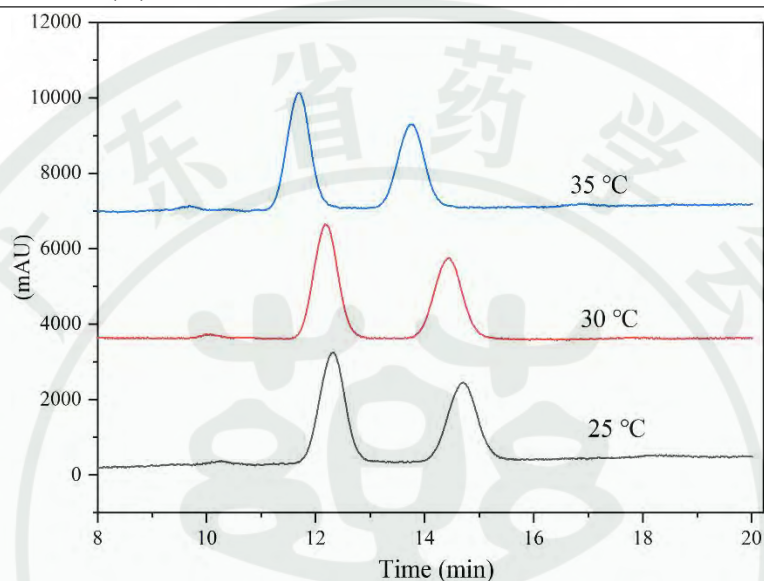


图 8 维兰特罗含量检测耐用性实验——柱温变化色谱图

由表 14 和色谱图可知，当柱温调整量在 $\pm 5^\circ\text{C}$ 范围内变动，保留时间和峰面积变化很小， $\text{RSD} < 5\%$ ；对理论拖尾因子、塔板数有一定的影响， $\text{RSD} < 8\%$ ，在  $25\sim 35^\circ\text{C}$  范围内，随着温度升高，柱效先增高后减小。

#### 1.8.4 流动相比比例变化 $\pm 2\%$

取供系统适用性溶液，分别用以下比例正己烷：乙醇：二乙胺：三氟乙酸流动相：780:220:0.5:1 (v/v)、800:200:0.5:1 (v/v)、820:180:0.5:1 (v/v)进行测试，记录色谱图（见图 9）。实验数据见表 15。

表 15 维兰特罗含量检测耐用性实验——流动相比比例变化色谱数据

|        | 流动相比比例变化      | $t_R/min$ | $A/\times 10^4\text{mAU}$ | $N$  | $T$  | $R_S$ |
|--------|---------------|-----------|---------------------------|------|------|-------|
| (R)-VL | 780:220:0.5:1 | 10.09     | 9.93                      | 3713 | 1.07 |       |
|        | 800:200:0.5:1 | 12.18     | 9.45                      | 3379 | 1.06 |       |
|        | 820:180:0.5:1 | 14.60     | 9.67                      | 3642 | 1.05 |       |
|        | RSD (%)       | 18.36     | 2.48                      | 4.92 | 0.94 |       |
| (S)-VL | 780:220:0.5:1 | 11.78     | 7.60                      | 3713 | 1.07 | 2.24  |
|        | 800:200:0.5:1 | 12.27     | 7.63                      | 3626 | 0.97 | 2.53  |



|               |       |      |      |      |       |
|---------------|-------|------|------|------|-------|
| 820:180:0.5:1 | 17.53 | 7.36 | 4017 | 1.00 | 2.82  |
| RSD (%)       | 23.00 | 1.97 | 5.42 | 5.06 | 11.46 |

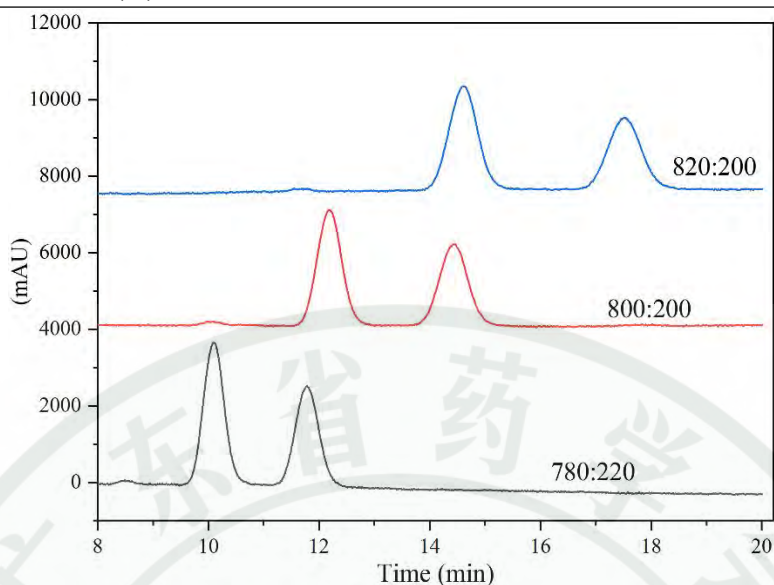


图9 维兰特罗含量检测耐用性实验——流动相比比例变化色谱

由上表 15 和色谱图可知，当流动相调整量在 $\pm 2\%$ 范围内变动，(R)-VL 的峰面积变化很小， $RSD < 2\%$ ；拖尾因子、理论塔板数有一定的变化， $RSD < 10\%$ ；保留时间差异较大， $RSD > 20\%$ ，说明溶剂比例对样品的保留时间非常敏感。随乙醇的比例增加，维兰特罗的保留时间减小，同时理论塔板数和分离度也在不断减小，综合考虑柱效和分离度等，选取正己烷（0.1%TFA）和乙醇的比例为 80:20 v/v 作为检测流动相。

### 1.8.5 流速变化 $\pm 0.1$ mL/min

调节流速为 0.9 mL/min、1.0 mL/min、1.1 mL/min，测试系统适用性溶液，记录色谱图（见图 10）。实验数据见表 16。

表 14 维兰特罗含量检测耐用性实验——流速变化色谱数据

| 流速变化 (mL/min) | $tR/min$ | $A/\times 10^4\text{mAU}$ | $N$   | $T$  | $R_S$ |      |
|---------------|----------|---------------------------|-------|------|-------|------|
| (R)-VL        | 0.9      | 13.22                     | 10.90 | 3492 | 1.05  |      |
|               | 1.0      | 12.18                     | 9.45  | 3379 | 1.06  |      |
|               | 1.1      | 10.78                     | 9.38  | 3093 | 1.04  |      |
|               | RSD (%)  | 10.15                     | 8.66  | 6.19 | 0.95  |      |
| (S)-VL        | 0.9      | 15.65                     | 8.82  | 3724 | 1.03  | 2.53 |
|               | 1.0      | 14.45                     | 7.63  | 3626 | 0.97  | 2.53 |
|               | 1.1      | 12.76                     | 7.19  | 3394 | 0.98  | 2.40 |
|               | RSD (%)  | 10.16                     | 10.70 | 4.73 | 3.24  | 3.02 |

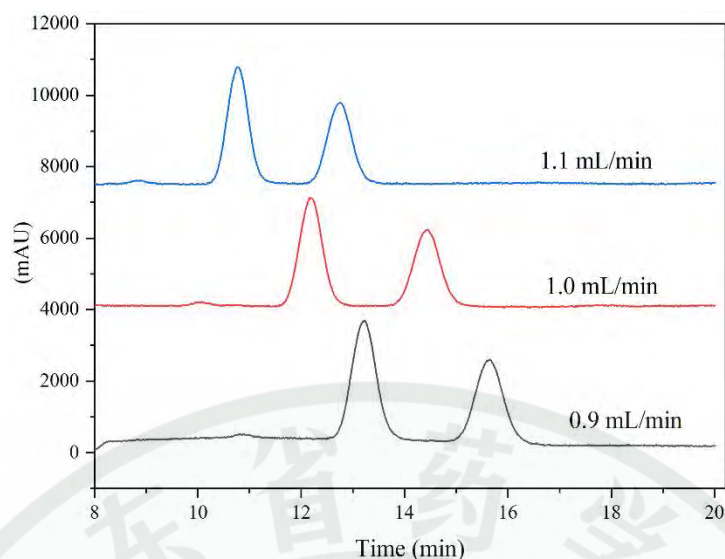


图 10 维兰特罗含量检测耐用性实验—流速变化色谱

由表 16 和色谱图可知，当流速调整量在 $\pm 0.1$  mL/min 范围内变动时，对维兰特罗的各个参数都有一定影响。

## 1.9 对照品溶液稳定性试验

取稳定性溶液（见二、标准编制原则和标准主要技术内容下的 4.1.9 项），分别考察样品的常温稳定性和 4℃稳定性。常温稳定性按 0 h、3 h、6 h、9 h 取样测试，记录色谱图，实验数据见表 17。另外考察样品溶液在 4℃的稳定性情况，放置 0~7 天，每天取样测试，记录色谱图，实验数据见表 17、18、19、20。参考《JJF 1343-2012 标准物质定值的通用原则及统计学原理》中稳定性研究方法，采用 Excel 中的线性回归方差分析表对稳定性实验数据进行统计学分析，将显著性（P 值）与显著性水平 $\alpha$ （0.01、0.05）比较，评估回归是否显著或极其显著，从而判断其稳定性变化是否有显著性差异。

表 17 维兰特罗手性异构体常温稳定性实验数据

| 时间（h）   | 峰面积（ $\times 10^4$ mAU） |
|---------|-------------------------|
|         | (R)-VL                  |
| 0       | 9.32                    |
| 3       | 9.14                    |
| 6       | 9.07                    |
| 9       | 9.05                    |
| 平均值     | 9.15                    |
| RSD (%) | 1.37                    |

表 18 维兰特罗手性异构体常温稳定性实验数据

| 时间 (h)  | 峰面积 ( $\times 10^4 \text{mAU}$ ) |
|---------|----------------------------------|
|         | (S)-VL                           |
| 0       | 7.61                             |
| 3       | 7.56                             |
| 6       | 7.41                             |
| 9       | 7.23                             |
| 平均值     | 7.45                             |
| RSD (%) | 2.29                             |

\* 对于 95%置信水平,  $0.01 < P < 0.05$ , 具显著性差异;

由表 17、18 知, (R)-VL 在 0-9 h 内的常温稳定性考察中, 面积的相对标准偏差  $\text{RSD} < 2\%$ , 线性回归方差分析显示  $0.01 < P < 0.05$ , 具有显著性差异; (S)-VL 在 0-9 h 内的常温稳定性考察中, 面积的相对标准偏差  $\text{RSD} < 3\%$ , 线性回归方差分析显示  $0.01 < P < 0.05$ , 具有显著性差异。

表 19 维兰特罗手性异构体 4 °C 稳定性实验数据

| 时间 (天)  | 峰面积 ( $\times 10^4 \text{mAU}$ ) |
|---------|----------------------------------|
|         | (R)-VL                           |
| 1       | 9.02                             |
| 2       | 9.07                             |
| 3       | 9.33                             |
| 4       | 9.31                             |
| 5       | 9.36                             |
| 6       | 9.27                             |
| 7       | 9.24                             |
| 平均值     | 9.23                             |
| RSD (%) | 1.43                             |

表 20 维兰特罗手性异构体 4 °C 稳定性实验数据

| 时间 (天) | 峰面积 ( $\times 10^4 \text{mAU}$ ) |
|--------|----------------------------------|
|        | (S)-VL                           |
| 1      | 7.47                             |
| 2      | 7.61                             |
| 3      | 7.56                             |

|         |      |
|---------|------|
| 4       | 7.58 |
| 5       | 7.62 |
| 6       | 7.31 |
| 7       | 7.74 |
| 平均值     | 7.56 |
| RSD (%) | 1.79 |

由表 19、20 可知，在 0-7 天的 4 °C 保存条件下考察，(R)-VL、(S)-VL 的应稳定性较好（RSD≤2%），回归不显著（对于 95%置信水平， $P>0.05$ ）。说明 0-7 天的 4 °C 保存条件下，(R)-VL 具有较好的稳定性。

因此，在后续样品测试中，应临用新制，或置于 4 °C 冷藏条件下，现取现用。

### 1.10 待测样品含量测定

取供试品溶液（见二、标准编制原则和标准主要技术内容下的 4.1.10 项），按照色谱条件（见 4.2.1）进行测定，并按照标准线性回归方程计算试验样品质量分数，检测数据见表 21，其中样品 1 由福莱士公司提供。

表 21 (R)-VL 含量测定结果

| 样品批号 | 样品 1  | 样品 2  |
|------|-------|-------|
| 含量   | 0.754 | 0.670 |

以上数据表明，不同厂家的维兰特罗(R)-VL 的含量存在差异。

## 2、各实验室验证

为进一步确证《维兰特罗手性异构体检测 液相色谱法》的检测方法能够在其他实验室也能够重现，现组织了 3 个实验室，即广东莱佛士制药技术有限公司（实验室 1）、华南师范大学化学学院（实验室 2）、广东朗斯姆生化技术有限公司（实验室 3），由不同操作人员使用不同的仪器，对样品 1 平行测定 6 次，分别计算(R)-VL、(S)-VL 的平均值、标准偏差、相对标准偏差等各项参数，对本方法进行验证。各单位检测结果概要如表 22 所示。



表 22 各单位检测结果概要

| 项目            | 预期目标                                                                                                                       | 验证结果                                                                                                                                               |
|---------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 系统适用性和仪器精密度试验 | 由 3 家实验室分别取系统适用性溶液，连续进样六次，对照溶液中的各成分峰面积 $RSD \leq 2.0\%$ ，保留时间 $RSD \leq 2.0\%$ 。(S)-VL 和(R)-VL 的分离度应符合要求， $R_s \geq 1.5$ 。 | 在此系统条件下，三个实验室的检测(R)-VL、(S)-VL 保留时间、理论塔板数、分离度和拖尾因子的重现性和精密度，保留时间 $RSD$ 均小于 1%，峰面积 $RSD$ 小于 2%， $R_s \geq 2.5$ 。表明在该液相色谱条件下，系统适应性参数符合含量测定要求，且方法精密度良好。 |
| 线性和范围         | 3 家实验室在 0.005~1.000 mg/mL 范围内，线性方程的相关系数 $\geq 0.990$ ，Y 轴截距应在 100% 响应值的 25% 以内，响应因子的 $RSD$ 应不大于 10%。                       | 对于(R)-VL、(S)-VL 标准曲线，三家实验室在 0.005~1.000 mg/mL 范围内含量线性关系均良好，相关系数 $R^2 \geq 0.993$ ，Y 轴截距/100%响应值 $< 2\%$ ，响应因子 $RSD < 3\%$ 。                        |
| 再现性           | 由 3 家实验室对样品 1 进行 6 次测试，每家(R)-VL 检测结果的 $RSD$ 小于 10%。重复性标准偏差与均值比值 $< 10\%$ ，再现性标准偏差与均值的比值小于 10%。                             | 再现性实验中，(R)-VL 含量测定的重复性标准偏差与均值比值 $< 1\%$ ，再现性标准偏差与均值的比值小于 1%，表明实验室内和实验室间测试结果的变异性较小。                                                                 |
| 结论            | 3 家单位含量测定的重复性和重现性精密度良好，能够满足维兰特罗样品中(R)-VL 含量测定的需要。                                                                          |                                                                                                                                                    |

## 2.1 各实验室系统适用性和精密度验证

系统适用性和精密度溶液的配制同标准编制原则和标准主要技术内容 4.1.5 项，连续进样六次，记录平均保留时间(min)、峰面积(mAU)、拖尾因子(T)、理论塔板数(N)，分离度( $R_s$ )。分别由起草单位（1）广东莱佛士制药技术有限公司、（2）华南师范大学化学学院、（3）广东朗斯姆生化技术有限公司三个实验室完成，由不同的分析人员在不同仪器、不同色谱柱、不同实验室检测，其系统适用性检测数据见表 23。

表 23 (R)-VL 系统适用性和仪器精密度实验数据

| 实验室* |        | $t_R/\text{min}$ | 理论塔板数/N | 拖尾因子/T | 分离度/ $R_s$ | 保留时间 RSD | 峰面积 RSD | 色谱柱型号                     |
|------|--------|------------------|---------|--------|------------|----------|---------|---------------------------|
| (1)  | (R)-VL | 12.39            | 3744    | 0.95   |            | 0.07     | 1.18    | Phenomenex, Lux Cellulose |
|      | (S)-VL | 14.58            | 3877    | 0.98   | 2.51       | 0.03     | 1.35    | Phenomenex, Lux Cellulose |
| (2)  | (R)-VL | 12.29            | 3563    | 1.05   |            | 0.08     | 1.24    | Phenomenex, Lux Cellulose |
|      | (S)-VL | 14.72            | 3558    | 1.07   | 2.69       | 0.05     | 1.13    | Phenomenex, Lux Cellulose |
| (3)  | (R)-VL | 10.70            | 4659    | 0.40   |            | 0.04     | 0.46    | Phenomenex, Lux Cellulose |
|      | (S)-VL | 12.52            | 4107    | 0.36   | 2.58       | 0.04     | 0.49    | Phenomenex, Lux Cellulose |

\* (1) 广东莱佛士制药技术有限公司；(2) 华南师范大学化学学院；(3) 广东朗斯姆生化技术有限公司。

结论：在此系统条件下，三个实验室的检测保留时间、理论塔板数、分离度和拖尾因子的重现性和精密度，保留时间 RSD 均小于 1%，峰面积 RSD 也小于 2%。表明在该液相色谱条件下，系统适应性参数符合含量测定要求，且方法精密度良好。

2.2 各实验室标准曲线测定

三个实验室标准工作曲线配制方法同二、标准编制原则和标准主要技术内容下的 4.1.3 项，实验数据汇总如表 24 所示。

表 24 各个实验室下的标准工作曲线

| 实验室* | 组分     | 线性范围/<br>(mg/mL) | 线性回归方程         | 相关系<br>数 $R^2$ | 响应因子<br>RSD<br>(%) | Y 轴截距<br>/100%响<br>应值 |
|------|--------|------------------|----------------|----------------|--------------------|-----------------------|
| (1)  | (R)-VL | 0.005-0.100      | $y=0.89x+0.08$ | 0.9997         | 1.18               | 0.26                  |
|      | (S)-VL | 0.005-0.100      | $y=0.72x+0.73$ | 0.9991         | 1.34               | 0.54                  |
| (2)  | (R)-VL | 0.005-0.100      | $y=0.92x-0.14$ | 0.9998         | 0.93               | 0.03                  |
|      | (S)-VL | 0.005-0.100      | $y=0.78x-0.53$ | 0.9995         | 2.27               | 1.42                  |
| (3)  | (R)-VL | 0.005-0.100      | $y=0.44x-0.49$ | 0.9935         | 0.89               | 0.02                  |
|      | (S)-VL | 0.005-0.100      | $y=0.32x-0.35$ | 0.9936         | 0.99               | 0.02                  |

\* (1) 广东莱佛士制药技术有限公司；(2) 华南师范大学化学学院；(3) 广东朗斯姆生化技术有限公司。

结论：对于(R)-VL、(S)-VL 标准曲线而言，三家实验室在 0.005~1.000 mg/mL 范围内含量线性关系均良好，相关系数  $R^2 \geq 0.993$ ，Y 轴截距/100%响应值为均 <2%，响应因子 RSD <3 %。

2.3 各实验室再现性检测

分别在三家实验室进行再现性实验，测试数据及统计结果见表 23 及表 24。供试品溶液的配制同二、标准编制原则和标准主要技术内容下的 4.1.10 项，平行制备六份，进行重复性实验测定，每份供试品溶液重复进样 2~3 次，取峰面积平均值，并按照标准线性回归方程计算试验样品浓度和质量分数。

2.3.1 数据汇总

本实验由 6 个实验室对样品 1 做 6 次测试，测试原始数据及统计结果见表 25 及表 26。单位为质量分数 (m/m)，以 g/g 表示。

表 25 (R)-VL 含量测定实验室间原始数据表 (单位: g/g)

| 实验室 | 平行测试  |       |       |       |       |       |
|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|     | 1     | 2     | 3     | 4     | 5     | 6     |
| (1) | 0.664 | 0.654 | 0.658 | 0.663 | 0.661 | 0.652 |
| (2) | 0.674 | 0.668 | 0.672 | 0.666 | 0.662 | 0.675 |
| (3) | 0.638 | 0.644 | 0.651 | 0.645 | 0.643 | 0.645 |

表 26 (R)-VL 含量测定实验室间单元平均值和标准差

| 实验室 | 平均值 (g/g) | 标准差 (SD%) | RSD (%) | n |
|-----|-----------|-----------|---------|---|
| (1) | 0.659     | 0.49      | 0.74    | 6 |
| (2) | 0.670     | 0.46      | 0.69    | 6 |
| (3) | 0.645     | 0.52      | 0.81    | 6 |

### 2.3.2 异常值的检验

#### (1) 曼德爾的 $h$ 图和曼德爾 $k$ 图

采用曼德爾  $h$  统计量表征不同实验室间测试结果平均值的一致性, 采用曼德爾  $k$  统计量表征实验室内测试结果的变异性, 计算方法和临界值参考 GB/T 6379.2-2004。

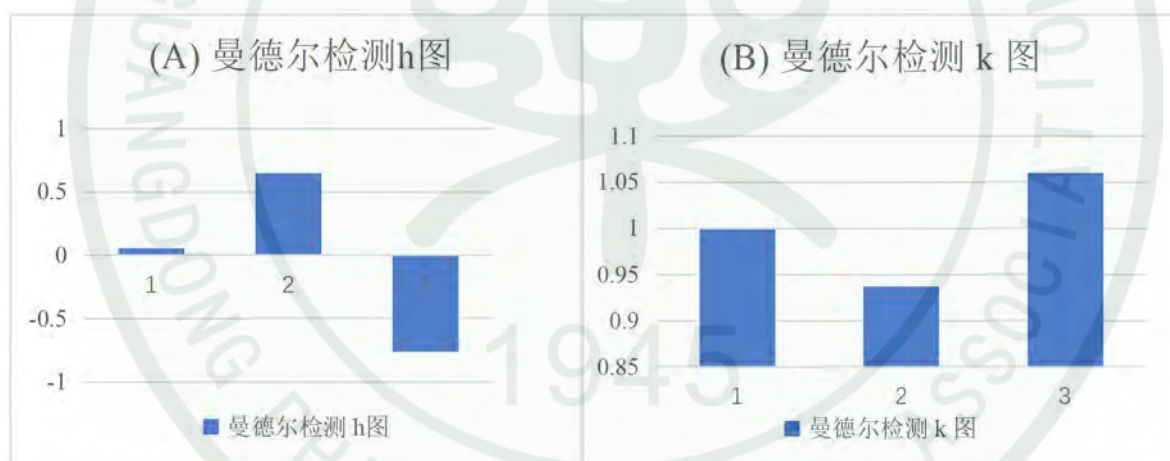
图 11 曼德爾检测  $h$  图和  $k$  图

图 11 (A) 为 (R)-VL 含量检测的实验室间测试结果的曼德爾  $h$  图, 可以看出 3 家实验室测试 (R)-VL 含量的  $h$  统计量均小于显著性水平为 5% 时的临界值 1.49 ( $p = 3, n = 6$ ), 表明实验室间测试结果的均值一致性较好。图 11 (B) 为 (R)-VL 含量检测的实验室内测试结果的曼德爾  $k$  图, 可以看出 3 家实验室测试 (R)-VL 含量的  $k$  统计量大于显著性水平为 5% 时的临界值 1.37 ( $p = 3, n = 6$ ), 表明实验室间测试结果的均值一致性较好。

#### (2) Cochran 检验

采用 Cochran 检验评价实验室内测试结果的变异性, 查 GB/T 6379.2-2004 中表 4



“Cochran 检验临界值”可知，对于  $p=3$ ， $n=6$  时，在 1%显著水平下的 Cochran 检验临界值为 0.793，5%显著水平下的 Cochran 检验临界值为 0.707。

表 27 Cochran 检验结果

| 检测化合物                        | $s_{max}^2$ | $\sum s^2$ | $C_{cal}$ | $C_{0.05, 6, 6}$ | $C_{0.01, 6, 6}$ |
|------------------------------|-------------|------------|-----------|------------------|------------------|
| (R)-VL                       | 0.0021      | 0.0072     | 0.292     | 0.707            | 0.793            |
| $C_{cal} < C_{0.05, 6, 6}$ 值 |             |            |           |                  |                  |

由表 27 可知，检测(R)-VL 为正常值。

### (3) Grubbs 检验

依据格拉布斯 (Grubbs) 检验计算公式，计算格拉布斯检验统计量  $G_p$ ，判定实验项目的接受值。由 GB/T 6379.2-2004 附录 B 表 5 “Grubbs 检验临界值”查的，单侧 Grubbs 检验的临界值为 1.155 (1%显著水平， $p=3$ ) 和 1.155 (1%显著水平， $p=3$ )。

表 28 Grubbs 检验结果

| 检测样品   | $G_L$ 最低值 | $G_p$ 最高值 | 单侧检验 5%临界值 ( $p=3$ ) | 单侧检验 1%临界值 ( $p=3$ ) |
|--------|-----------|-----------|----------------------|----------------------|
| (R)-VL | 1.084     | 0.921     | 1.155                | 1.155                |

由表 28 可知，在各实验室的单元平均值中，用 Grubbs 检验未发现歧离值与离群值。单元平均值的 Grubbs 检验表明 3 个实验室测定结果的一致性较好，数据是可信的。

### 2.3.3 $\hat{m}$ , $S_r$ , $S_R$ 的计算

按照 GB/T 6379.2-2004 规定的方法，计算总平均值 ( $\hat{m}_j$ )、重复性标准偏差 ( $S_r$ )、再现性标准偏差 ( $S_R$ )。结果见表 29。

表 29 重复性标准偏差和再现性标准偏差

| 检测样品   | $p$ | $\hat{m}$ | $S_r$ | $S_R$ | $S_r/\hat{m}$ (%) | $S_R/\hat{m}$ (%) |
|--------|-----|-----------|-------|-------|-------------------|-------------------|
| (R)-VL | 3   | 0.658     | 0.007 | 0.006 | 1.064             | 0.912             |

由表 29 可知，由表可知，(R)-VL 重复性标准偏差与均值比值  $<2\%$ ，表明实验室内测试结果的变异性较小，再现性标准偏差与均值的比值  $<1\%$ ，表明实验室测试结果的变异性较小。

## 4、预期的经济效果

手性化合物的对映异构体在生物活性及毒理学等方面存在立体选择性，仅仅停留于消旋体的研究、开发与应用水平，已不符合国际、国内对手性化合物研究及应用的



需求。开展手性药物的手性分离技术及对映体检测方法研究，具有极大的市场前景。

本标准采用高效液相色谱法，对维兰特罗手性异构体进行了定性和定量的识别，可用于维兰特罗手性异构的种类判定、组成比例和含量的测定。该标准可广泛应用于维兰特罗原料药生产企业、维兰特罗标准品生产企业、或药品、食品、保健品等使用企业，用于指导维兰特罗生产企业的研发、生产和检测，促进原料和制剂的质量控制标准的提升，预期可产生较大的经济效益。

#### 四、采用国际标准和国外先进标准的程度及水平的对比情况

本标准是国内首次制定的专门针对维兰特罗手性异构体检测的基础标准，没有国际标准和国外先进标准参考。

#### 五、与有关的现行法律、法规和国家标准的关系

本标准与相关法律、法规和国家标准体系中的其他标准在技术内容上协调一致。

#### 六、重大分歧意见的处理经过和依据

无

#### 七、作为团体标准的建议

本标准可用于指导维兰特罗生产企业的研发、生产和检测，在条件成熟的情况下，建议尽快申请转化为推荐性国家标准。

#### 八、贯彻标准的要求和措施建议（包括组织措施、技术措施、过渡办法等内容）

本标准填补了维兰特罗质量控制的空白，且与国家相关标准保持协调一致，建议尽快发布本标准，并于发布后立即实施。

#### 九、废止现行有关标准的建议；

无

十、其他应予说明的事项。

无



## 参考文献:

- [1] McKeage K. Fluticasone Furoate/Vilanterol: A Review of Its Use in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Drugs*, 2014, 74(13) : 1509-1522.
- [2] Syed Y. Fluticasone Furoate/Vilanterol: a Review of Its Use in Patients with Asthma. *Drugs*, 2015, 75(4) : 407-418.
- [3] Daley-Yates P., Keppler B., Baines A., Bardsley G., Fingleton J. Metabolomic changes related to airway inflammation, asthma pathogenesis and systemic activity following inhaled fluticasone furoate/vilanterol: a randomized controlled trial. *Respir. Res.*, 2022, 23(1).
- [4] Braithwaite I., Williams M., Power S., Pilcher J., Weatherall M., Baines A., Moynihan J., Kempsford R., Beasley R. Randomised, double-blind, placebo-controlled, cross-over single dose study of the bronchodilator duration of action of combination fluticasone furoate/vilanterol inhaler in adult asthma. *Lancet Respir. Med.*, 2016, 119: 115-121.
- [5] Patel D., Namdev K., Verma K., Gururani R., Tiwari A., Kumar P., Dewangan R., Wabaidur S., Sharma S., Dwivedi J. HPLC-UV and spectrofluorimetric methods for simultaneous estimation of fluticasone furoate and vilanterol in rabbit plasma: A pharmacokinetic study. *J. Chromatogr. B*, 2019, 1132: 121842.
- [6] Guo Y., Yang Y., Peng J., Zhu X., Ji Z. Enantiomeric separation of vilanterol trifenate by chiral liquid chromatography. *Chirality*, 2019, 31(10): 813-817.
- [7] Chundela Z., Große, J. Olodaterol and vilanterol detection in sport drug testing. *Drug Test Anal.*, 2015, 7(11-12): 980-982.