

HPLC法测定二对甲苯磺酸缘生替尼原料药中的有关物质

仲艳*,李家春,李瑛光,王振中,黄文哲,萧伟*(江苏康缘药业股份有限公司,江苏连云港 222001)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)03-0412-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.03.35

摘要 目的:建立测定二对甲苯磺酸缘生替尼原料药中有关物质的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为 Waters Symmetry C₁₈,流动相为甲醇-0.01 mol/L 乙酸铵溶液(梯度洗脱),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 240 nm,柱温为 40 ℃,进样量为 10 μL。结果:在该色谱条件下,主成分峰与各杂质峰分离度均良好;杂质 A、B、C 和二对甲苯磺酸缘生替尼检测质量浓度线性范围均为 0.25~2.0 μg/mL($r \geq 0.999 0$),杂质 A、B、C 的定量限分别为 0.5、0.5、2.5 ng;精密度、稳定性、重复性试验的 RSD < 1.0%;加样回收率分别为 97.9%~102.6%、95.1%~107.7%、95.8%~107.5%,RSD 分别为 1.4%、4.2%、4.1%($n=9$)。结论:该方法专属性好,操作简便,可用于二对甲苯磺酸缘生替尼原料药中有关物质的测定。

关键词 二对甲苯磺酸缘生替尼原料药;高效液相色谱法;有关物质

Determination of Related Substances in Yunsintinib Ditosylate Active Pharmaceutical Ingredients by HPLC

ZHONG Yan, LI Jiachun, LI Yingguang, WANG Zhenzhong, HUANG Wenzhe, XIAO Wei (Jiangsu Kanion Pharmaceutical Co., Ltd., Jiangsu Lianyungang 222001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determination of related substances in yunsintinib ditosylate active pharmaceutical ingredient. METHODS: HPLC was performed on the column of Waters Symmetry C₁₈ with mobile phase of methanol-0.01 mol/L ammonium acetate solution (gradient elution), flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 240 nm, column temperature was 40 ℃, and injection volume was 10 μL. RESULTS: Under the chromatographic conditions, the main peaks and each impurity peak were well separated; The linear range of impurity A, B, C and yunsintinib ditosylate were 0.25-2.0 μg/mL ($r \geq 0.999 0$); the quantification limits of impurity A, B and C were 0.5, 0.5 and 2.5 ng, respectively; RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 1.0%; recoveries were 97.9%-102.6% (RSD=1.4%, $n=9$), 95.1%-107.7% (RSD=4.2%, $n=9$), 95.8%-107.5% (RSD=4.1%, $n=9$), respectively. CONCLUSIONS: The method is specific and simple, and can be used for the determination of related substances in yunsintinib ditosylate active pharmaceutical ingredients.

KEYWORDS Yunsintinib ditosylate active pharmaceutical ingredients; HPLC; Related substances

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤,占女性所有恶性肿瘤的 23%^[1-3]。在我国,乳腺癌发病率逐年增加,已经成为城市女性的头号癌症杀手。二甲苯磺酸拉帕替尼是葛兰素史克公司研发的一种新型的小分子靶向双重酪氨酸激酶抑制剂,于 2007 年 3 月 13 日获美国食品药品监督管理局批准上市,与抗癌药物卡培他滨联合用于治疗晚期或转移性表皮生长因子受体阳性乳腺癌。近年来,关于二甲苯磺酸拉帕替尼在其他类型肿瘤方面的研究越来越多,其有望成为一种潜在的多肿瘤靶向治疗药物^[4-8]。二对甲苯磺酸缘生替尼是我公司以二甲苯磺酸拉帕替尼为先导化合物自主研发的新药。由于本品

在合成过程中难免引入合成原料、中间体、副产物等杂质,如 6-碘喹唑啉-4-酮(杂质 A)、3-氯-4-[(3-氟苯基)甲氧基]苯胺(杂质 B)、N-[3-氯-4-(3-氟苯氧基)苯基]-6-碘-4-喹唑啉胺(杂质 C)等,因此需要建立合适的测定方法以实现对本品中有关物质的控制。本研究依据 2015 年版《中国药典》中药品质标准分析方法验证指导原则的相关规定^[9],参考相关文献^[10-12],优化高效液相色谱(HPLC)条件,建立了测定二对甲苯磺酸缘生替尼原料药中有关物质的方法。

1 材料

1.1 仪器

[8] 郭江红,姜红,赵亚萍,等.HPLC法同时测定氯霉素滴眼液中有关物质和尼泊金酯类防腐剂[J].药物分析杂志,2009,29(12):2071-2076.

[9] 谢楠,何晓英,张晓明,等.HPLC测定氯霉素滴眼液中氯

霉素及氯霉素二醇物的含量[J].华西药学杂志,2006,21(1):93-95.

[10] 区洁雯,李焕清,张蜀,等.HPLC法测定氯霉素溶液中氯霉素及氯霉素二醇物含量[J].中国抗生素杂志,2015,40(2):108-111.

(收稿日期:2016-07-29 修回日期:2016-11-11)

(编辑:刘柳)

* 高级工程师。研究方向:药物分析。E-mail:zy521-521@126.com

通信作者:高级工程师,博士。研究方向:创新药物的研发。电话:0518-81152337。E-mail:wzhzh-nj@163.net

1100型HPLC仪,包括G1329B二极管阵列检测器、G1316A自动进样器等(美国Agilent公司);BP211D型电子分析天平、PB-10型pH计(德国赛多利斯公司);ZMQS50001型超纯水机(美国Millipore公司)。

1.2 药品与试剂

二对甲苯磺酸缘生替尼对照品(批号:120701,纯度:99.8%)和杂质A、B、C对照品(批号:120803、120811、120824,纯度均为99.5%)及二对甲苯磺酸缘生替尼原料药(批号:121001、121002、121003)均由江苏康缘药业股份有限公司提供;甲醇、乙腈为色谱纯,其他试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱:Waters Symmetry C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:甲醇(A)-0.01 mol/L乙酸铵溶液(B),梯度洗脱(洗脱程序见表1);流速:1.0 mL/min;检测波长:240 nm;柱温:40 ℃;进样量:10 μL。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution program

时间, min	流动相A, %	流动相B, %
0	30	70
20	73	27
30	73	27
40	80	20
50	80	20

2.2 溶液的制备

2.2.1 空白对照溶液 以甲醇-水(50:50, V/V)作空白对照溶液。

2.2.2 杂质对照品溶液 分别取杂质A、B、C对照品各约10 mg,精密称定,置于同一10 mL量瓶中,加甲醇-乙腈溶液(50:50, V/V)溶解并稀释至刻度,摇匀,作为杂质对照品贮备液。精密量取该贮备液适量,加甲醇-水(50:50, V/V)制成每1 mL中约含杂质A、B、C各1 μg的杂质对照品溶液。

2.2.3 供试品溶液 取样品适量,精密称定,加甲醇-水(50:50, V/V)溶解并制成每1 mL中约含二对甲苯磺酸缘生替尼1 mg的供试品溶液。

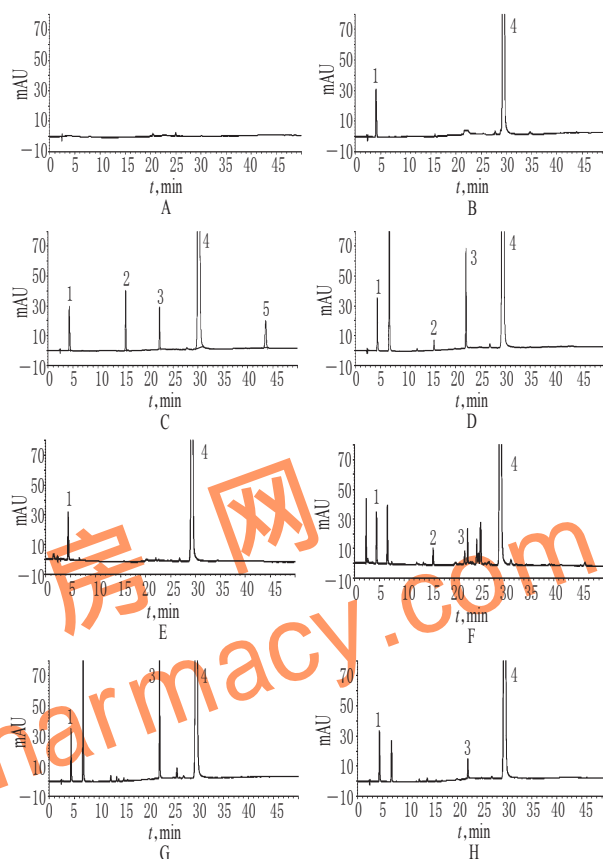
2.2.4 对照溶液 精密量取“2.2.3”项下供试品溶液1 mL,置于100 mL量瓶中,加甲醇-水(50:50, V/V)稀释至刻度,摇匀,即得对照溶液。

2.2.5 系统适用性溶液 取二对甲苯磺酸缘生替尼对照品约20 mg,精密称定,置于20 mL量瓶中,精密加入“2.2.2”项下的杂质对照品贮备液0.2 mL,再加甲醇-水(50:50, V/V)溶解并稀释制成每1 mL中约含二对甲苯磺酸缘生替尼和杂质A、B、C分别为1.10 mg、10.67 μg、10.64 μg、10.19 μg的系统适用性溶液。

2.3 专属性试验

2.3.1 系统适用性试验 精密量取“2.2”项下空白对照溶液、供试品溶液、系统适用性溶液各10 μL注入HPLC

仪进样,记录色谱,详见图1。结果表明,空白对照对样品中有关物质测定无干扰,二对甲苯磺酸、杂质A、杂质B、缘生替尼、杂质C的保留时间分别是4.242、15.519、22.335、30.164、43.565 min,主成分峰与各杂质峰的分度良好,各杂质峰间的分离度均>1.5,拖尾因子均在0.9~1.1范围内。



A.空白对照溶液;B.供试品溶液;C.系统适用性溶液;D.酸破坏样品溶液;E.碱破坏样品溶液;F.氧化破坏样品溶液;G.高温破坏样品溶液;H.光照破坏样品溶液;1.二对甲苯磺酸;2.杂质A;3.杂质B;4.缘生替尼;5.杂质C

A.blank control solution; B.test sample solution; C.system suitability solution; D.sample solution destroyed by acid; E.sample solution destroyed by alkali; F.sample solution destroyed by oxidation; G.sample solution destroyed by high temperature; H.sample solution destroyed by light; 1. ditosylate; 2. impurity A; 3. impurity B; 4. yunsintinib; 5. impurity C

图1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

2.3.2 强制降解试验 分别精密称取样品约50 mg,共5份,各置于50 mL量瓶中,一份加1 mol/L盐酸溶液10 mL,在水浴(92 ℃)中加热4 h,放冷,用1 mol/L氢氧化钠溶液调节pH至中性,加甲醇-水(50:50, V/V)稀释至刻度,摇匀,作为酸破坏样品溶液;一份加1 mol/L氢氧化钠溶液10 mL,在水浴(92 ℃)中加热8 h,放冷,用1 mol/L盐酸溶液调pH至中性,加甲醇-水(50:50, V/V)稀释至刻度,摇匀,作为碱破坏样品溶液;一份加0.3%过氧化氢溶液10 mL,在水浴(92 ℃)下加热0.5 h,放冷,加甲醇-水(50:50, V/V)稀释至刻度,摇匀,作为氧化破坏

样品溶液；一份加甲醇-水(50:50, V/V) 10 mL, 在水浴(92 ℃)下加热10 h, 放冷, 加甲醇-水(50:50, V/V)稀释至刻度, 摇匀, 作为高温破坏样品溶液；一份加甲醇-水(50:50, V/V)溶解并稀释至刻度, 在强光4 500 lx下照射10 d, 作为光照破坏样品溶液。分别精密量取10 μL上述5种破坏样品溶液注入HPLC仪测定, 记录色谱, 详见图1。结果表明, 样品在碱破坏条件下破坏不明显；在酸、氧化、高温、光照破坏条件下破坏明显, 且均能检出杂质B；在酸及氧化破坏条件下均检出杂质A。在该色谱条件下, 主成分峰与各杂质峰、各杂质峰之间均可以达到良好的分离, 证明本方法的专属性良好, 适宜进行样品的有关物质测定。

2.4 线性关系考察

取杂质A、B、C及二对甲苯磺酸缘生替尼对照品各约10 mg, 精密称定, 置于同一100 mL量瓶中, 加甲醇-水(50:50, V/V)溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为线性工作贮备液。精密量取上述贮备液适量, 分别加甲醇-水(50:50, V/V)稀释制成各成分质量浓度均约为0.25、0.5、1.0、1.5、2.0 μg/mL的系列线性工作溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定, 并以待测成分峰面积(y)为纵坐标、质量浓度(x, μg/mL)为横坐标进行线性回归, 得到杂质A、B、C及二对甲苯磺酸缘生替尼的回归方程和线性范围, 并用二对甲苯磺酸缘生替尼与杂质A、B、C的回归方程的斜率相比得校正因子, 详见表2。

表2 回归方程、线性范围和校正因子

Tab 2 Regression equations, linear range and correction factor

待测成分	回归方程	r	线性范围, μg/mL	校正因子
杂质A	$y=36.449x+0.0488$	0.999 9	0.25~2.0	0.82
杂质B	$y=35.159x-2.0165$	0.999 7	0.25~2.0	0.85
二对甲苯磺酸缘生替尼	$y=29.739x-0.514$	0.999 0	0.25~2.0	
杂质C	$y=21.48x-0.0945$	0.999 0	0.25~2.0	1.38

2.5 定量限与检测限考察

取“2.4”项下线性工作贮备液适量, 加空白对照溶液逐级稀释至一定质量浓度, 分别按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果, 当信噪比为10:1时计算得到杂质A、B、C及二对甲苯磺酸缘生替尼的定量限分别为0.5、0.5、2.5、1.0 ng；当信噪比为3:1时计算得到杂质A、B、C及二对甲苯磺酸缘生替尼的检测限分别为0.1、0.1、0.2 ng。

2.6 精密度试验

取“2.4”项下杂质A、B、C及二对甲苯磺酸缘生替尼质量浓度分别为1.0 μg/mL的线性工作溶液适量, 按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次, 记录峰面积。结果, 杂质A、B、C及缘生替尼峰面积的RSD分别为0.2%、0.3%、0.3%、0.1% (n=6), 表明仪器精密度良好。

2.7 稳定性试验

精密称取样品(批号:121001)适量, 分别按“2.2.2”和“2.2.3”项下方法制备供试品溶液和对照溶液。取上

述两种溶液各适量, 分别于室温放置0、2、4、6、8、12 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果, 对照溶液缘生替尼峰面积的RSD=0.5% (n=6), 未知最大单个杂质及杂质总和峰面积的RSD均为0.1% (n=6), 表明供试品溶液在室温放置12 h内较为稳定。

2.8 重复性试验

精密称取样品(批号:121001)适量, 分别按“2.2.2”和“2.2.3”项下方法平行制备6份供试品溶液和6份对照溶液, 分别按“2.1”项下色谱条件进样测定, 记录峰面积。结果, 未知最大单个杂质及杂质总和峰面积的RSD分别为0.1%和0.2% (n=6), 表明本方法重复性良好。

2.9 加样回收率试验

精密称取样品(批号:121001)约10 mg, 共9份, 每3份分别加入约相当于二对甲苯磺酸缘生替尼量的0.05%、0.10%、0.15%的杂质A、B、C对照品, 分别按“2.2.3”和“2.2.2”项下方法制备供试品溶液和杂质对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样测定并计算加样回收率, 结果见表3。

表3 加样回收率试验结果(n=9)

Tab 3 Results of recovery tests(n=9)

待测成分	含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %
杂质A	0	5.05	5.01	99.3	100.4	1.4
	0	5.05	4.94	97.9		
	0	5.05	5.01	99.3		
	0	10.1	10.37	102.6		
	0	10.1	10.18	100.7		
	0	10.1	10.10	100.0		
	0	15.15	15.34	101.2		
	0	15.15	15.29	100.9		
	0	15.15	15.41	101.7		
杂质B	0	5.52	5.86	106.1	100.6	4.2
	0	5.52	5.77	104.5		
	0	5.52	5.64	102.1		
	0	11.04	11.89	107.7		
	0	11.04	11.10	100.5		
	0	11.04	11.03	99.9		
	0	16.56	16.18	97.7		
	0	16.56	16.16	97.6		
	0	16.56	15.75	95.1		
杂质C	0	4.68	5.03	107.5	103.1	4.1
	0	4.68	4.84	103.4		
	0	4.68	4.97	106.2		
	0	9.36	10.01	107.0		
	0	9.36	8.97	95.8		
	0	9.36	9.83	105.0		
	0	14.04	13.81	98.4		
	0	14.04	14.75	105.1		
	0	14.04	13.96	99.4		

2.10 样品有关物质测定

取3批样品各适量, 分别按“2.2.2”和“2.2.3”项下方法制备供试品溶液和对照溶液。精密量取对照溶液10 μL注入HPLC仪中, 调节检测灵敏度, 使主成分色谱峰的峰高为满量程的20%~25%；再精密量取上述两种溶液各10 μL, 分别注入HPLC仪进样测定, 记录峰面积,

并以1%自身对照法计算样品中有关物质的含量,结果见表4。

表4 样品有关物质测定结果($n=2, \%$)

Tab 4 Determination results of related substances of samples($n=2, \%$)

成分	批号		
	121001	121002	121003
杂质A	未检出	未检出	未检出
杂质B	未检出	未检出	未检出
杂质C	未检出	未检出	未检出
其他未知最大单个杂质	0.07	0.04	0.07
杂质总和	0.12	0.09	0.16

3 讨论

3.1 检测波长的选择

因二对甲苯磺酸缘生替尼在240 nm波长处有最大吸收,且已知杂质A、B、C和强制降解产生的未知杂质均在240 nm波长处有较大吸收,综合考虑选择240 nm作为本方法的检测波长。

3.2 色谱柱的选择

通过对4个生产厂家的5根色谱柱进行考察——色谱柱1: Waters Symmetry C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、色谱柱2: Waters Symmetry Shield RP18 C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、色谱柱3: Phenomenex Luna C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、色谱柱4: Welch Polar C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)、色谱柱5: Kromasil 100-5C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm),结果表明,采用Waters Symmetry C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm)对破坏样品溶液的分度度最佳,所以最终选择该色谱柱进行试验。

3.3 流动相的选择

流动相采用甲醇-水或乙腈-水时,二对甲苯磺酸和缘生替尼均峰形差,因此考察了磷酸钾盐、磷酸铵盐和乙酸铵盐改善峰形。结果,3种无机盐均能有效改善峰形,考虑到乙酸铵为挥发性无机盐,对仪器系统的损害小,所以确定选择乙酸铵。通过考察发现,乙酸铵在0.01 mol/L浓度下,强制降解试验各破坏样品的各色谱峰均可达到有效分离,所以乙酸铵浓度确定为0.01 mol/L。而以甲醇作为有机相时缘生替尼的色谱峰形较使用乙腈时好,所以有机相确定选择甲醇。另外,采用等度洗脱时,二对甲苯磺酸色谱峰与强制降解产生的杂质峰难以分开,因此最终选择甲醇-0.01 mol/L乙酸铵溶液为流动相梯度洗脱。

3.4 方法耐用性考察

在其他色谱条件不变情况下,当分别选择柱温变化±5℃、流速变化±0.2 mL/min、流动相中甲醇比例变化±5%、流动相中乙酸铵溶液浓度变化±50%时,考察缘生替尼峰与各杂质峰的分度度,以验证方法的耐用性。结果表明,上述各种条件下缘生替尼峰与各杂质峰、各杂质峰之间的分度度均符合规定,表明本方法耐用性良好。

3.5 强制降解试验的物料平衡考察

在强制降解试验中,酸、碱、氧化、高温、光照破坏试验的样品物料平衡值均在95%~105%范围内,表明该色谱条件可以准确地测定样品中的有关物质。

3.6 有关物质限度的确定

本试验采用1%自身对照法测定有关物质,因在强制降解试验中,酸、氧化、高温及光照破坏条件下均能使样品降解出杂质B,且3批样品中未知最大单个杂质的量均在0.1%以下,杂质总量均在0.3%以下。其限度暂定为:除溶剂和二对甲苯磺酸峰外,杂质B峰面积不得大于对照溶液主峰面积的0.1倍(即0.1%),其他单个杂质峰面积不得大于对照溶液主峰面积的0.2倍(即0.2%),各杂质峰面积的和不得大于对照溶液主峰面积的1.0倍(即1.0%)。

综上所述,本方法专属性好、操作简便,可用于二对甲苯磺酸缘生替尼原料药中有关物质的测定。

参考文献

- [1] 黄哲宇,陈万青,吴春晓.中国女性乳腺癌的发病和死亡现状:全国32个肿瘤登记点2003—2007年资料分析报告[J].肿瘤,2012,32(6):435-439.
- [2] 方琼英,吴琼,张秀玲.乳腺癌的流行现状分析[J].中国社会医学杂志,2012,29(5):333-335.
- [3] 唐志柳,白洁,顾丽娜.2000—2010年我国前列腺癌和乳腺癌流行状况的系统性综述[J].中国肿瘤,2013,22(4):260-264.
- [4] 娄莹,黄韬.乳腺癌靶向治疗进展[J].肿瘤学杂志,2009,15(9):788-791.
- [5] 吴慧芳,王海琳,冯焕荣.拉帕替尼联合顺铂对人卵巢癌细胞SKOV3生长的影响[J].中国现代医药杂志,2012,14(4):12-15.
- [6] 何祥萌,张凌岩,李英.吉非替尼和拉帕替尼对HEL细胞增殖的抑制作用[J].中国实验血液学杂志,2012,20(2):372-375.
- [7] 陈伟,刘永梅.拉帕替尼:作用于表皮生长因子受体的靶向抗肿瘤新药[J].药品评价,2012,9(12):10-12.
- [8] 冯焕荣,李青,王海琳.新型靶向治疗药物拉帕替尼的研究进展[J].现代生物医学进展,2012,12(4):746-747.
- [9] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:374-377.
- [10] 仲艳,陈保来,苏倩倩.HPLC法测定二对甲苯磺酸拉帕替尼含量及其有关物质[J].中国药师,2013,16(11):1672-1675.
- [11] 徐剑华.甲磺酸拉帕替尼有关物质的HPLC法测定[J].中国医药工业杂志,2015,46(10):1113-1116.
- [12] 仲艳,傅小勤,李家春.HPLC高效液相色谱法测定二对甲苯磺酸拉帕替尼有关物质[J].中国药房,2013,24(37):3528-3530.

(收稿日期:2016-02-03 修回日期:2016-12-14)

(编辑:周 菁)