

梯度洗脱HPLC法测定盐酸厄洛替尼片的含量[△]

张宇佳^{*},相莉,陈少华,郑稳生[#](中国医学科学院、北京协和医学院药物研究所,药物传输技术及新型制剂北京市重点实验室,北京 100050)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)45-4282-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.45.18

摘要 目的:建立测定盐酸厄洛替尼片含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Kromasil C₁₈,流动相为30 mmol/L乙酸铵-乙腈,梯度洗脱,流速为1.0 ml/min,检测波长为342 nm,柱温为60 ℃,进样量为10 μl。另将本法与同条件下流动相等度洗脱法进行比较。结果:盐酸厄洛替尼检测质量浓度线性范围为5~300 μg/ml($r=0.9999$),平均回收率为100.27% (RSD=0.11%, $n=3$)。在等度色谱条件下,只检出1个杂质峰;在梯度条件下,检出3个杂质峰,且各峰间分离较好。结论:建立的方法灵敏、准确、可靠,可用于盐酸厄洛替尼片的含量测定。

关键词 盐酸厄洛替尼片;含量测定;高效液相色谱法;杂质

Content Determination of Erlotinib Tablets by HPLC with Gradient Elution

ZHANG Yu-jia, XIANG Li, CHEN Shao-hua, ZHENG Wen-sheng (Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences& Peking Union Medical College, Beijing City Key Laboratory of Drug Delivery Technology and Novel Formulations, Beijing 100050, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish the method for the content determination of Erlotinib tablets. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on a Kromasil C₁₈ column, with mobile phase consisted of 30 mmol/L ammonium acetate-acetonitrile at the flow rate of 1.0 ml/min by gradient elution. The detective wavelength was set at 342 nm, the sample size was 10 μl and the column temperature was 60 ℃. The separate effects were compared between the isocratic elution and gradient elution. RESULTS: The linear rang of erlotinib was 5~300 μg/ml($r=0.9999$) with an average recovery of 100.27% (RSD=0.11%, $n=3$). Only one impurity peak was detected under the condition of isocratic gradient, but 3 impurity peaks were detected under the condition of gradient elution and with good separation among each peak. CONCLUSIONS: The method is sensitive, accurate, and reliable. It can be applied for the content determination of Erlotinib tablets.

KEYWORDS Erlotinib tablets; Content determination; HPLC; Impurity

盐酸厄洛替尼(Erlotinib)是近年上市的治疗晚期非小细胞肺癌药^[1],是一种分子靶向治疗药,在抗癌过程中可特异性地针对肿瘤细胞发生作用,通过抑制人体细胞内表皮生长因子上的一种特定酶的活性^[2~4],进而抑制肿瘤细胞的形成、生长或促进肿瘤细胞凋亡而达到抗肿瘤作用。它是目前唯一被证实对晚期非小细胞肺癌具有可靠疗效的国家级最新抗癌产品,能有效提高患者的带瘤生存率^[5~6]。已有文献^[7~8]报道采用高效液相色谱(HPLC)测定其含量的方法,但该法为流动相等度洗脱法,不能分离出杂质。故笔者建立了流动相梯度洗脱测定盐酸厄洛替尼片含量的HPLC法,结果表明,建立的方法操作简便、结果准确,可用于该制剂中厄洛替尼的定量分析。

1 材料

1.1 仪器

△ 基金项目:“重大新药创制”科技重大专项课题资助项目(No.2009ZX09301-003)

*助理研究员,硕士。研究方向:新药研发。电话:010-63165233。E-mail:zhyj@imm.ac.cn

#通信作者:副研究员,博士。研究方向:药物制剂及质量。电话:010-63165233。E-mail:zhengwensheng@imm.ac.cn

HP8453紫外分光光度计(美国惠普公司);515泵、2487紫外检测器、717自动进样器、HPLC仪(美国Waters公司)。

1.2 药品与试剂

厄洛替尼对照品(美国Selleck公司,批号:S2826,纯度:99%);厄洛替尼片(自制,批号:110918、110919、110920,规格:每片150 mg);厄洛替尼片参比制剂(上海罗氏制药有限公司,批号:H20120101、H20120102,规格:每片150 mg);乙腈和乙酸铵均为色谱纯;水为娃哈哈纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

经检索,现有文献采用等度方法进行分离,笔者参考等度方法所用的30 mmol/L乙酸铵-乙腈系统,波长等检测条件与等度方法相同^[7~8],试验梯度洗脱方法对本品的分离效果。

色谱柱:Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:A为30 mmol/L乙酸铵,B为乙腈,梯度洗脱,流速:1.0 ml/min;检测波长:342 nm;柱温:60 ℃;进样体积:10 μl。梯度洗脱程序见表1。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液。精密称取对照品15 mg,置于100 ml量瓶

中,加流动相稀释至刻度,摇匀,即得。

表1 流动相梯度洗脱表

Tab 1 The mobile phase gradient elution

时间, min	流动相A, %	流动相B, %
0	75	25
15	55	45
30	25	75
35	75	25

2.2.2 供试品溶液。取厄洛替尼片,置于研钵中研细,精密称取适量,加流动相稀释成每1 ml中含厄洛替尼0.15 mg的溶液,滤过,即得。

2.2.3 空白溶液。取处方量辅料,精密称定,置于100 ml量瓶中,加流动相溶解,滤过,即得。

2.3 专属性试验

2.3.1 流动相等度洗脱与梯度洗脱法比较。精密量取供试品溶液(批号:110918)注入色谱仪,分别用梯度和等度方法洗脱,记录色谱图。结果表明,在等度色谱条件下,只出现1个杂质峰;在梯度条件下,可检出3个杂质峰,且溶剂峰、辅料峰、杂质峰均可检出,与主峰之间均有较好的分离,互不干扰测定,详见图1。

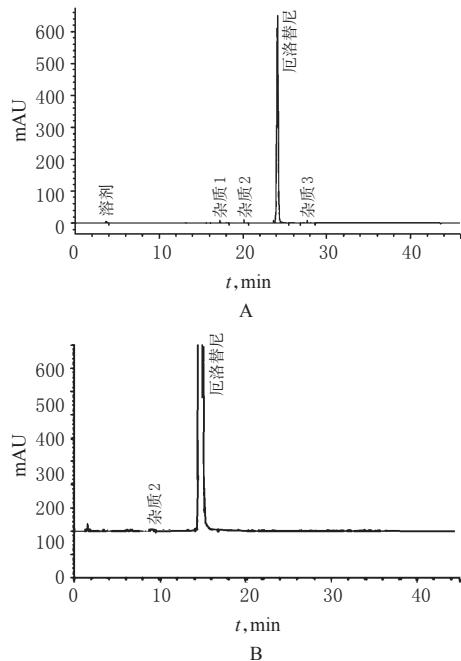


图1 两种流动相洗脱条件下溶液高效液相色谱图

A.梯度洗脱;B.等度洗脱

Fig 1 HPLC chromatograms of solutions under 2 mobile phase elution conditions

A.gradient elution;B.isocratic elution

2.3.2 破坏性试验。取样品(批号:110918)共5份,置于100 ml量瓶中,其中2份分别加入0.1 mol/L盐酸、0.1 mol/L氢氧化钠,85 ℃水浴进行酸、碱破坏,然后再分别用0.1 mol/L氢氧化钠和0.1 mol/L盐酸中和至pH为7.0;另1份加10%过氧乙酸10 ml,反应2 min后加流动相稀释至刻度。再取2份,1份置于电热恒温干燥箱中,60 ℃温度下放置10 d;另1份放置于光照仪器内,在照度为(4 500±500) lx的条件下放置2 d。经

高温、酸、碱、光照和氧化破坏,将破坏后样品制成供试品溶液依法进行检测,结果同样显示杂质峰、辅料杂质峰与主峰均有较好的分离,且互不干扰测定,结果见图2、表2。

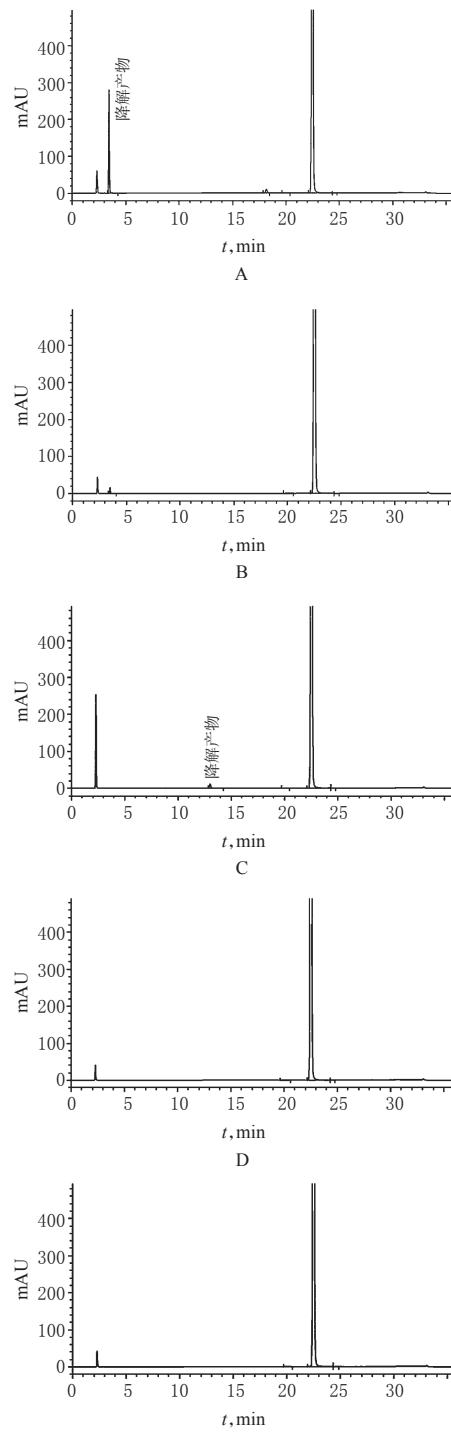


图2 破坏试验高效液相色谱图

A.酸破坏样品;B.碱破坏样品;C.氧化破坏样品;D.高温破坏样品;E.光照破坏样品

Fig 2 HPLC chromatograms of destructive tests

A.sample destructed by acid; B.sample destructed by alkali; C.sample destructed by oxidation; D.sample destructed by high temperature; E.sample destructed by light

表2 破坏性试验结果

Tab 2 The results of destructive tests

样品	主峰保留时间, min	主峰与相邻杂质峰分离度	物料平衡, %
未破坏	20.375	1.25、2.44	100.00
酸破坏	20.625	1.39、2.53	100.01
碱破坏	20.400	1.26、2.44	99.99
氧化破坏	20.817	1.15、2.46	100.01
高温破坏	20.525	1.18、2.51	100.00
光照破坏	20.408	1.23、2.47	100.00

图2结果表明,本品在酸和氧化破坏条件下产生的降解产物明显,但均不干扰主峰的检出;空白辅料不干扰杂质的检出。表明本方法可准确有效地检出目标分析物。

2.4 线性关系考察

精密吸取厄洛替尼对照品溶液适量,分别加流动相溶解并稀释制成5、10、20、40、60、80、150、250、300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的溶液,分别进样10 μl ,记录峰面积。以峰面积(y)为纵坐标、质量浓度(x, mg/ml)为横坐标进行线性回归,得回归方程 $y=37.428x+221$ ($r=0.9999$)。表明厄洛替尼检测质量浓度线性范围为5~300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

2.5 精密度、重复性试验

取“2.4”项下80、150、250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溶液,每个质量浓度重复测定6次,记录色谱图,计算平均峰面积的RSD分别为0.44%、0.51%、0.49%($n=3$)。表明本法精密度、重复性良好。

2.6 稳定性试验

取供试品溶液,室温放置,分别在0、1、2、4、6、8、10、12、24 h测定,记录色谱图,计算得峰面积的RSD为0.79%($n=3$)。表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.7 回收率试验

精密称取盐酸厄洛替尼对照品适量,按处方比例称取混合辅料,配制成相对标示量浓度为80%、100%、120%的回收率测定溶液。依法测定含量,计算回收率,结果见表3。

表3 回收率试验结果($n=3$)Tab 3 Results of recovery tests($n=3$)

加入量, μg	检出量, μg	回收率, %	平均回收率, %	RSD, %
24	24.17	100.72		
24	24.17	100.70		
24	24.18	100.73		
30	30.23	100.77		
30	30.09	100.31	100.27	0.11
30	30.09	100.29		
36	35.87	99.65		
36	35.85	99.57		
36	35.88	99.66		

2.8 样品含量测定

称取3批厄洛替尼自制片与1批参比制剂,制成供试品溶液进样分析测定,结果见表4。

表4 样品含量测定结果(%)

样品	批号	等度洗脱法	梯度洗脱法
自制片	110918	102.89	100.64
	110919	103.11	100.61
	110920	102.43	100.53
参比制剂	H20120101	103.83	101.68

表4结果表明,自制片和参比制剂的含量测定结果均在95.0%~105.0%,符合规定。

3 讨论

本法参考等度洗脱方法所用的30 mmol/L 乙酸铵-乙腈系统,波长等检测条件均与等度方法相同。前期结果试验表明,等度洗脱时,破坏试验中,氧化破坏产生的杂质不能与主峰很好地分离;而梯度洗脱时,峰形、分离度均良好,氧化破坏产生的2个杂质峰与主峰分离度大于1。故采用梯度洗脱的方法可全面检测样品中的可能杂质,对厄洛替尼片的质量控制和质量标准的提高提供了依据。

综上,建立的方法灵敏、准确、可靠,可用于盐酸厄洛替尼片的含量测定。

参考文献

- [1] 吴一龙,陆舜,周清华,等.2010中国肺癌临床指南[M].北京:人民卫生出版社,2010:78.
- [2] 侯晓茹.厄洛替尼治疗吉非替尼失败后晚期非小细胞肺癌的疗效观察[J].中外医疗,2013,32(19):108.
- [3] 陈文婷,吉兆宁.厄洛替尼治疗晚期非小细胞肺癌的机理与展望[J].临床和实验医学杂志,2013,12(13):1076.
- [4] 邱书珺,吴俊兰,李勇,等.立体定向放射治疗联合厄洛替尼治疗晚期非小细胞肺癌的疗效与安全性[J].武警医学,2013,24(7):608.
- [5] 陈卫松,朱丹,陈慧,等.厄洛替尼在晚期非小细胞肺癌中的临床应用分析[J].中国现代医生,2013,51(34):80.
- [6] 甄振华,申传厚,陶雄飞,等.厄洛替尼联合放疗治疗晚期肺癌脊髓转移1例报道[J].肿瘤基础与临床,2013,26(5):454.
- [7] 胡剑锋.HPLC法测定厄洛替尼片的含量[J].中国药房,2013,24(5):458.
- [8] 李翔,刘皈阳,王明媚,等.HPLC法测定人血浆中吉非替尼的浓度[J].中国药物应用与监测,2012,9(3):136.

(收稿日期:2014-05-23 修回日期:2014-07-16)