

# HPLC 法测定阿法替尼片中主药和有关物质的含量

李赫宇<sup>1</sup>, 赵玲<sup>2\*</sup>

(1. 天津市益倍建生物技术有限公司, 天津 300457; 2. 武汉轻工大学生物与制药工程学院, 武汉 430023)

**摘要** 目的: 建立以高效液相色谱法测定阿法替尼片中主药和有关物质含量的方法, 以控制该制剂的质量。方法: 色谱柱为 Kromasil C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙酸铵水溶液 (30 mmol/L) - 甲醇 (25: 75), 流速为 1.0 ml/min, 紫外检测波长为 254 nm, 柱温 30 °C, 进样量为 20 μl。结果: 阿法替尼检测浓度的线性范围为 60.13 ~ 600.45 μg/ml ( $r=0.9996$ ); 平均回收率为 99.41%, RSD 为 0.86%。结论: 建立的检测方法简单, 结果准确可靠, 可用于阿法替尼片的质量控制。

**关键词** 阿法替尼, 含量测定, 高效液相色谱法, 有关物质

**中图分类号:** R927.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-5687(2016)04-0022-04

## Quantitative determination of main component and related substances in afatinib tablets by HPLC

Li Heyu<sup>1</sup>, Zhao Ling<sup>2</sup>

(1. Tianjin Ubasic Health Nutrition Co Ltd, Tianjin 300457; 2. College of Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023)

**ABSTRACT** Objective: To establish an HPLC method for the determination of the main component and related substances in afatinib tablets. Methods: The determination was performed on Kromasil C<sub>18</sub> column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) with mobile phase composed of ammonium acetate solution (30 mmol/L) - methanol (25: 75) at a flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 254 nm at 30 °C. The injection size was at 20 μl. Results: The calibration curve of afatinib was linear in the range of 60.13 ~ 600.45 μg/ml ( $n=5, r=0.9996$ ), and the average recovery of afatinib was 99.41% (RSD was 0.86%). Conclusions: This method is rapid, accurate and reliable, and applicable for the quality control of afatinib tablets.

**KEY WORDS** afatinib, content determination, HPLC, related substances

阿法替尼是由德国勃林格殷格翰公司研发的多靶点抗癌新药, 于 2013 年通过美国食品药品监督管理局 (FDA) 的审批, 用以治疗非小细胞肺癌、大肠癌、乳腺癌和头颈癌的分子靶向制剂, 商品名为 Tovok/Gilotrif<sup>[1]</sup>。肺癌是临床上最常见的恶性肿瘤, 且肺癌患者里约 85% 为非小细胞肺癌, 严重危害人类的生命健康, 因此该药一经问世很快成为晚期非小细胞肺癌的一线治疗新药<sup>[2]</sup>。阿法替尼属于多靶点酪氨酸激酶 (TK) 抑制剂, 是 TK 的不可逆性抑制剂, 也是人类表皮生长因子受体 (EGFR) 抑制剂 [包括人类表皮生长因子受体 2 (HER2)、HER4 两个亚族]。阿法替尼片剂的主药以阿法替尼马来酸盐的形式存在。《美国药典》中尚未记载阿法替尼的含量测定方法, 为此, 本文尝试建立高效液相色谱 (HPLC) 法测定阿法替尼马来酸盐和有关物质含量测定的方法, 为阿法替尼片的质量控制, 以及评价其质量的一致性提供可参考的依据。

## 1 仪器与试剂

美国 agilent1260 高效液相色谱系统; 甲醇 (美国

Tedia 公司产品, 色谱纯); 乙酸铵 (天津市天力化学试剂有限公司产品, 分析纯)。阿法替尼片 (武汉轻工大学制剂室, 批号 150801、150802、150803, 规格: 每片含阿法替尼马来酸盐 59.12 mg, 相当于每片含阿法替尼 40 mg); 阿法替尼对照品 (武汉轻工大学生物与制药工程学院, 批号 150922, 质量分数: 99.82%); 阿法替尼合成方法参考文献完成<sup>[3]</sup>。

## 2 方法与结果

因阿法替尼马来酸盐在含水溶液中解离成马来酸和阿法替尼, 马来酸为不饱和烯酸, 极性较强, 在 ODS 柱上保留时间短, 先出峰, 阿法替尼为有机碱, 极性相对较弱, 后出峰。本实验按外标法以阿法替尼来计算含量。

**2.1 色谱条件** 色谱柱: Kromasil C<sub>18</sub> (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙酸铵水溶液 (30 mmol/L) - 甲醇 (25: 75), 体积流量 1.0 ml/min, 紫外检测波长为 254 nm, 柱温 25 °C, 进样量 20 μl。

## 2.2 溶液制备

**2.2.1 对照品溶液** 取阿法替尼对照品,用流动相溶解,并制成阿法替尼质量浓度为 505.75  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的溶液,作为对照品溶液。

**2.2.2 供试品溶液** 取阿法替尼片剂研细为粉末适量,约相当于阿法替尼 12.643 75 mg,精密称定,放置于 25 ml 量瓶中,用流动相乙酸铵水溶液-甲醇溶解并稀释至刻度,滤过,取续滤液作为供试品溶液。

**2.2.3 有关物质溶液制备** 取阿法替尼片粉末适量,用流动相配制成质量浓度为 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的溶液作为供试液。再用流动相稀释,配制成质量浓度为 0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的对照液。

**2.3 系统适应性试验** 精密量取“2.2.1”项下对照品溶液、供试品溶液各 20  $\mu\text{l}$ ,按照“2.1”项下色谱条件注入液相色谱仪,记录峰面积,并以流动相溶液乙酸铵水溶液(30 mmol/L)-甲醇(25:75)作为参照。以阿法替尼峰面积计算,理论塔板数为 8 478,保留时间为 11.784 min,峰形对称,见图 1。

**2.4 线性关系与检测限考查** 精密称取阿法替尼对照品适量,用流动相溶解并稀释成阿法替尼质量浓度分别为 60.13、149.89、300.19、451.09 和 600.45  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的系列溶液,精密量取各溶液 20  $\mu\text{l}$  分别注入液相色谱仪,记录色谱图。以进样的质量浓度( $C$ )为横坐标,峰面积( $A$ )为纵坐标进行线性回归,得回归方程  $A = 1.0185C + 4.1315$  ( $r = 0.9996$ )。结果表明,阿法替尼质量浓度与峰面积的线性关系良好,线性范围为 60.13 ~ 600.45  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。以信噪比  $S/N = 3$  计算,阿法替尼检测限为 0.4 ng。

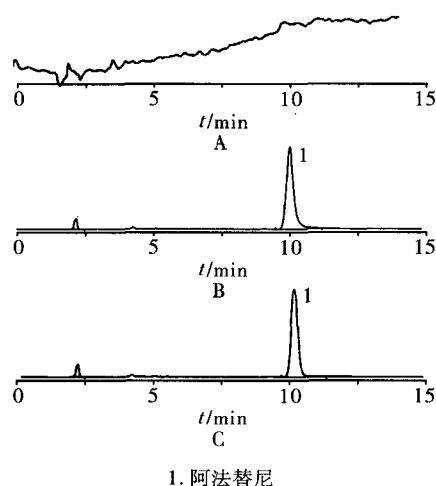


图 1 对照品(A)

供试品(B) 阴性对照(C) HPLC 色谱图

**2.5 精密度试验** 取阿法替尼对照品适量,按照“2.2.1”项下方法制备对照品溶液,精密量取 20  $\mu\text{l}$  按照“2.1”项下色谱条件,连续进样 5 次进行测定。结果

显示峰面积积分值的 RSD 为 0.68%,表明本方法精密度良好。

**2.6 重现性试验** 精密称取同一批号(批号为 150802)的阿法替尼样品 6 份,分别按照“2.2”项下的方法制备供试品溶液和对照品溶液,分别量取 20  $\mu\text{l}$  注入液相色谱仪,依“2.1”项下色谱条件下进行测定。结果显示阿法替尼的平均质量分数为 99.18%,RSD 为 0.24%,表明本方法重现性良好。

**2.7 稳定性试验** 取制备的供试品溶液 1 份,分别在 0、1、2、4 和 8 h 量取 20  $\mu\text{l}$  注入液相色谱仪,依“2.1”项下色谱条件测定,峰面积积分值的 RSD 为 0.58%,结果表明供试品溶液在 8 h 内稳定。

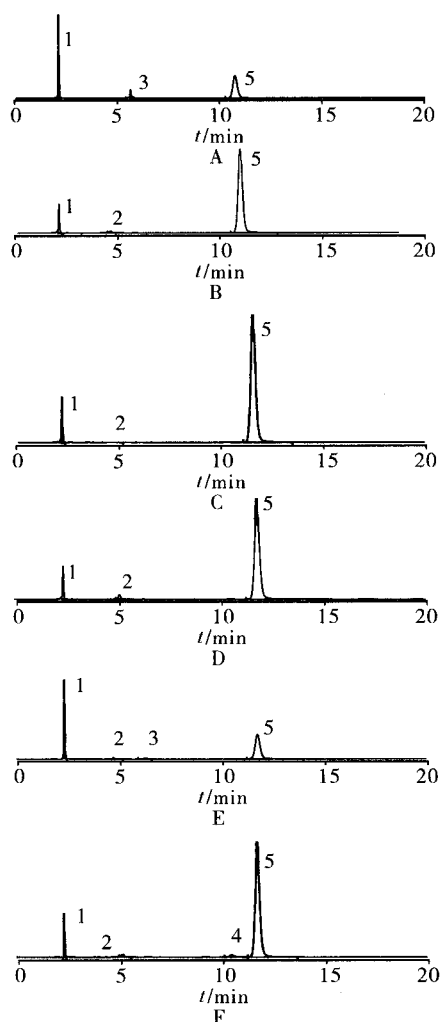
**2.8 回收率试验** 取同一批号的样品(批号 150801),按测试浓度的 80%、100% 和 120% 3 个梯度制备供试品溶液,分别加入一定质量的阿法替尼对照品,每个浓度各取 20  $\mu\text{l}$  的 3 份样品注入液相色谱仪,按照“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算回收率。结果平均回收率为 99.41%,RSD 为 0.86%,见表 1。

表 1 回收率试验结果( $n = 9$ )

样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)
40.46	40.46	80.52	99.01
40.44	40.47	80.67	99.41
40.45	40.44	80.66	99.43
50.58	50.59	100.58	99.83
50.60	50.58	101.38	100.40
50.62	50.61	101.33	100.20
60.71	60.68	120.70	98.86
60.70	60.71	121.77	100.59
60.68	60.69	120.13	97.96

**2.9 中间体分离试验及破坏性试验** 取阿法替尼对照品及中间体 6-氨基-4-[(3-氯-4-氟-苯基)氨基]-7-[(S)-(四氢呋喃-3-基)氧基]喹唑啉(中间体 I)适量,用流动相配制成阿法替尼质量浓度为 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,中间体 I 质量浓度为 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的溶液,作为中间体分离试验的供试溶液。另取阿法替尼片剂粉末(约相当于阿法替尼 200  $\mu\text{g}$ )5 份,分别放置于 10 ml 的量瓶中。第 1 份量瓶里加入 1 ml 物质的量为 0.1 mol/L 的盐酸溶液;第 2 份量瓶里加入 1 ml 物质的量为 0.1 mol/L 的氢氧化钠溶液;第 3 份量瓶里加入 1 ml 3% 的  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液。静置 2 h 后,第 1 份量瓶里加入 0.1 mol/L 的氢氧化钠溶液 1 ml 酸碱中和后,加流动相稀

释至刻度,滤过,取续滤液作为酸破坏的供试品溶液;第2份量瓶里加入0.1 mol/L的盐酸1 ml酸碱中和后,加流动相稀释至刻度,滤过,取续滤液作为碱破坏的供试品溶液;第3份量瓶里加流动相稀释至刻度,滤过,取续滤液作为氧化破坏的供试品溶液;第4份量瓶置于4 000 lx的光下照射6 h;第5份量瓶置于60 ℃水浴中加热2 h。分别量取上述各量瓶里的供试品溶液20 μl注入液相色谱仪,按照“2.1”项下色谱条件进行检测,记录色谱图。结果中间体化合物I的峰与阿法替尼峰能完全分离;5种极端条件下(酸、碱、氧化、光照和高温破坏)均有降解产物产生,而且5种降解产物都能与阿法替尼峰完全分离。中间体分离试验与5种极端条件破坏后的色谱见图2。



1. 马来酸 2. 杂质 I 3. 中间体 I 4. 杂质 II 5. 阿法替尼

图2 中间体 I (A)

酸降解(B) 碱降解(C) 热降解(D)

双氧水降解(E) 光降解(F) HPLC 色谱图

## 2.10 样品含量测定 取阿法替尼片粉末、阿法替尼

对照品适量,按“2.2”项下方法分别制备供试品溶液和对照品溶液。分别精密量取20 μl注入液相色谱仪,按照“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并按外标法以阿法替尼和阿法替尼马来酸盐的峰面积,计算含量,结果见表2。

表2 样品含量测定结果

批号	含量(%)
150801	99.71
150802	99.76
150803	99.72

2.11 样品有关物质测定 取阿法替尼片粉末适量,按“2.2”项下方法制备成供试液和对照液,量取对照液20 μl进样,调节仪器检测灵敏度,使阿法替尼峰峰高为满量程的10%~30%;再量取供试液20 μl进样,记录色谱至主峰保留时间的3倍,记录主峰和有关物质的峰面积,按1%自身对照法计算有关物质的含量。结果3批样品中有关物质含量分别为0.19%、0.21%和0.20%。

## 3 讨论

阿法替尼是FDA继吉非替尼、厄洛替尼和拉帕替尼批准上市的第4个分子靶向EGFR抑制剂,其是可逆性ATP竞争性抑制剂,已经被确认为治疗具有19和21位EGFR突变的晚期非小细胞肺癌最有效的手段,可提高肿瘤患者的生存期的生活质量。但是,对其主药的含量和有关物质测定方法还鲜有报道。探讨其主要成分的质量控制方法,可以提高进口药与国产药的质量一致性,为提高制剂水平提供依据。

3.1 检测波长的选择 前期进行了预实验,分别称取阿法替尼对照品和阿法替尼片剂粉末适量,用流动相乙酸铵水溶液-甲醇配制成质量浓度约505.75 μg/ml的对照品溶液、供试品溶液,按照最新版《中国药典》规定的紫外分光-光度法<sup>[5]</sup>操作,于200~400 nm波长内进行检测。结果显示对照品溶液、供试品溶液均于254 nm处有最大吸收,且辅料溶液在此处无吸收,故检测波长选为254 nm。

3.2 流动相的选择 通过反复配制不同浓度、不同pH的乙酸铵溶液,同时不断改变甲醇与乙酸铵溶液的比例,经过多次调整,最后发现当乙酸铵水溶液浓度为30 mmol/L,与甲醇的比例为25:75时,阿法替尼的主峰保留时间合适,峰形比较对称,其与中间体、有关物质和降解产物均能得到比较好的分离,该方法具有较强的专属性,良好的准确度和精密性,溶液在8 h内也稳定。因此,最终确定使用75:25 (下转第30页)

吸入,2次/d,疗程7d;治疗组在上述治疗基础上加用干扰素雾化吸入,<1岁,10 μg/支,1次/d;>1岁,20 μg/支,1次/d,疗程7d。两组雾化均采用氯化钠注射液2 ml稀释,置雾化装置内,每次雾化吸入时间15~20 min。

**1.4 疗效判定** ①显效:体温恢复正常,咳嗽气促情况显著缓解,肺部啰音消失;②有效:体温基本正常,咳嗽气促情况好转,肺部啰音减少;无效:发热、咳嗽气促情况无好转,肺部啰音没有减少甚至增多。

**1.5 统计学方法** 研究所得数据采用SPSS 13.0 统计分析,计数资料采用 $\chi^2$ 检验,计量数据采用 $t$ 检验,以 $P < 0.05$ 差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 两组临床症状改善情况** 经过治疗,两组患儿的病情均得到了一定的缓解,在肺部啰音消失时间、体温恢复正常时间、咳嗽消失时间和住院时间等方面,治疗组明显优于对照组,两组差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表1。

表1 两组临床症状改善情况比较 d

组别	例数	咳嗽消失时间	退热时间	肺部啰音消失时间	住院时间
治疗组	40	4.0±1.5	3.7±1.4	4.2±1.4	7.2±1.3
对照组	40	5.0±1.8	4.1±1.5	5.8±2.1	8.7±1.1

**2.2 两组临床疗效比较** 治疗组显效率明显高于对照组,两组差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表2。

表2 两组临床疗效比较 例(%)

组别	例数	显效	有效	无效
治疗组	40	33(82.5)	7(17.5)	0(0)
对照组	40	25(62.5)	15(37.5)	0(0)

**2.3 不良反应** 治疗组与对照组患儿在整个雾化过

程中均未出现与用药相关的不良反应。干扰素雾化吸入患儿中未见局部刺激、皮疹、发热、呕吐等症状。

## 3 讨论

支气管肺炎属于小儿常见多发病之一。该病发展快病势重,对小儿危害极大,病情严重者甚至导致死亡。小儿支气管肺炎病原中,病毒病原是婴幼儿肺炎的常见病原。因此在儿童支气管肺炎治疗中,多采用抗病毒和抗菌药物的综合治疗方法。而干扰素作为一种低分子糖蛋白,在不损害正常细胞功能的前提下,选择性地抑制病毒细胞的增殖,具有广谱抗病毒和调节免疫的功能<sup>[2]</sup>,目前被广泛用于临床治疗中。干扰素以往的给药途径为肌肉注射,但肌肉注射药物起效慢,肺部作用相对较弱,同时易并发发热等副作用,患儿不易接受。干扰素雾化吸入较肌肉注射肺组织药物浓度更高,早期血清药物浓度明显较肌注给药低,因而避免了药物浓度峰值所引起的机体不良反应。研究表明,干扰素可显著降低感染小鼠肺组织呼吸道合胞病毒病毒量,雾化吸入干扰素治疗呼吸道合胞病毒具有有效性和安全性<sup>[3]</sup>。

本观察通过雾化吸入干扰素方法辅助治疗小儿支气管肺炎,在常规治疗基础上,使干扰素直接作用于局部病灶区,明显增加病灶区的药物浓度,显著改善患儿临床症状和体征,明显缩短了肺部啰音消失时间、体温恢复正常时间、咳嗽消失时间和住院时间。治疗过程未见不良反应发生,患儿依从性好,操作简单,易于患儿配合,可在临床使用。

### 参考文献

- 张莹,赵顺英. 婴幼儿肺炎支原体肺炎 79 例临床分析[J]. 临床儿科杂志,2011,29(8):720-723
- 田曼,赵德育,陈荣华. 呼吸道合胞病毒和哮喘[J]. 中华儿科杂志,2005,43(6):425-428
- 孙薇,杨林,贾艳艳,等. 病毒性肺炎患儿雾化吸入重组人干扰素 a-1b 的耐受性及安全性研究[J]. 中国药房,2011,22(14):1277-1280
- 李晴晴,张庆文. 阿法替尼的合成路线图解[J]. 中国医药工业杂志,2015,46(4):422-425
- Singer T, Colbatzky F, Platz S. Utilization of inhibitors of EGFR-mediated signal transduction for the treatment of benign prostatic hyperplasia (bph)/prostatic hypertrophy: WO, 2003094921A2 [P]. 2003-11-20 中国药典[S]. 二部. 2010:附录 38

(上接第24页)

的甲醇-30 mmol/L乙酸铵水溶液作为流动相。

### 参考文献

- 刘丹,栾天,袁莹,等. 多靶点酪氨酸激酶抑制剂阿法替尼及其类似物的研究进展[J]. 中国药学杂志,2014,49(24):2145-2149
- 安富荣,王淑萍,归小龙. 晚期非小细胞肺癌一线治疗新药阿法替尼[J]. 中国药师,2015,18(1):136-138