

高效液相色谱法测定克唑替尼的含量和光学纯度

詹长娟¹, 王 华¹, 吴鹏程², 徐 伟¹, 王 翼¹, 查露露¹

(1. 南京理工大学泰州科技学院化工学院, 江苏 泰州 225300;

2. 江苏富泽药业有限公司, 江苏 泰州 225300)

摘要:建立了高效液相色谱法测定克唑替尼的含量和光学纯度。采用 Shim-pack VP-ODS C₁₈ 色谱柱对克唑替尼进行含量测定,以甲醇(含 0.1% 三氟乙酸)-水(含 0.1% 三氟乙酸)为流动相进行梯度洗脱;流速为 0.6 mL/min;检测波长为 268 nm;柱温为 25℃。采用岛津 CHIRALPAK® AD-H 色谱柱对克唑替尼进行光学纯度测定,以 V(正己烷):V(异丙醇):V(乙醇):V(二乙胺) = 50:25:25:0.2 为流动相,流速为 0.6 mL/min,检测波长为 268 nm,柱温为 30℃。结果表明,克唑替尼质量浓度在 0.05 ~ 2.51 mg/mL 范围内与峰面积呈良好的线性关系($r=0.9999$)。克唑替尼与其异构体杂质能完全分离。该方法简便、可靠,可用于克唑替尼的质量控制。

关键词:克唑替尼;高效液相色谱;含量;光学纯度

中图分类号:R917

文献标志码:A

文章编号:0253-4320(2016)07-0201-03

DOI:10.16606/j.cnki.issn0253-4320.2016.07.050

Determination of the content and optical purity of crizotinib by HPLC method

ZHAN Chang-juan¹, WANG Hua¹, WU Peng-cheng², XU Wei¹, WANG Yi¹, ZHA Lu-lu¹

(1. Department of Chemical Engineering, Taizhou Institute of Science and Technology, NJUST,

Taizhou 225300, China; 2. Jiangsu Furtherpharm Pharmaceutical Co., Ltd., Taizhou 225300, China)

Abstract: A HPLC method for the determination of the content and optical purity of crizotinib is established in this study. To determine the content of crizotinib, a Shim-pack VP-ODS C₁₈ column is used. The gradient elution is performed with the mixture of methanol (0.1% trifluoroacetic acid) and water (0.1% trifluoroacetic acid) as the mobile phase. The detection wavelength is set at 268 nm, the column temperature is 25 °C and the flow rate is 0.6 mL·min⁻¹. The determination of optical purity is also conducted with CHIRALPAK® AD-H as column, the mixture of *N*-hexane: isopropyl: ethanol: diethylamine (50: 25: 25: 0.2, V/V) as the mobile phase, 268 nm of the detection wavelength and 30 °C of the column temperature. The calibration curve is linear in the range of 0.05 - 2.51 mg·mL⁻¹ ($r=0.9999$). Crizonitib and its optical isomer could be successfully separated. This method is simple and reliable for the quality control of crizotinib.

Key words: crizotinib; HPLC; content; optical purity

克唑替尼 (crizotinib) 商品名为 XALKORI, 由辉瑞公司研发, 于 2011 年 8 月 26 日获 FDA 批准在美国上市^[1], 用于治疗间变性淋巴瘤激酶 (ALK) 阳性的局部晚期或转移性的非小细胞肺癌 (NSCLC) 的小分子激酶抑制剂^[2], 其化学结构式如图 1 所示。该品以 ALK、肝细胞生长因子受体 (c-met、HGFR) 和酪氨酸激酶受体 (RON) 为靶点, 通过抑制 ALK 和 c-met 磷酸化阻断肿瘤细胞生长和存活^[3]。目前, 该药品主要为进口。笔者利用高效液相色谱法检测克唑替尼的含量和光学纯度, 该方法对克唑替尼的

质量控制方法研究有一定的参考价值。

1 仪器和试剂

LC-15C 高效液相色谱仪, 日本岛津公司生产; UV-2450 型紫外可见分光光度计, 日本岛津公司生产; MS105 分析天平, 梅特勒-托利多仪器有限公司生产。

克唑替尼对照品, 质量分数为 99.8%, 江苏富泽药业有限公司生产, $ee=98.6%$; 克唑替尼消旋体对照品, 江苏富泽药业有限公司生产; 克唑替尼异构体对照品, 质量分数为 98.6%, 江苏富泽药业有限公司生产, $ee=97.5%$; 克唑替尼, 批号: 20150326、20150408、20150415, 江苏富泽药业有限公司生产; 甲醇、正己烷、异丙醇、乙醇, 均为色谱纯; 三氟乙酸、二乙胺, 均为分析纯; 水为纯化水。

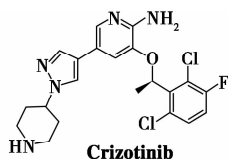


图 1 克唑替尼结构式

2 方法与结果

2.1 克唑替尼含量的测定

2.1.1 色谱条件

采用 Shim-pack VP-ODS C_{18} 色谱柱,以甲醇-水为流动相进行梯度洗脱(含体积分数为 0.1% 三氟乙酸),流速为 0.6 mL/min,检测波长为 268 nm,进样量为 20 μ L;柱温为 25 $^{\circ}$ C。

2.1.2 溶液的配制

精密称定克唑替尼对照品(克唑替尼) 50 mg,置于 50 mL 容量瓶中,加入适量甲醇,超声溶解 10 min 后冷却至室温,用甲醇稀释至刻度,摇匀,得对照品(供试品)贮备液。再用移液管精密量取 1 mL,置 10 mL 量瓶中,稀释至刻度,即得质量浓度为 0.1 mg/mL 的对照品(供试品)溶液。

2.1.3 线性关系考察

精密量取对照品贮备液 0.5、1、1.5、2、2.5 mL,分别置于 10 mL 容量瓶中,加甲醇稀释至刻度,摇匀,精密量取 20 μ L,按照 2.1.1 中所述的色谱条件进样分析,记录色谱图,以峰面积(A)对质量浓度(ρ)作线性回归,得回归方程为 $A = 2.079 \times 10^8 \rho + 2.596 \times 10^4$, $r = 0.9999$ 。结果表明,在 0.05 ~ 2.51 mg/mL 内,克唑替尼溶液质量浓度与峰面积呈良好线性关系。

2.1.4 精密度试验

取克唑替尼对照品溶液,按照 2.1.1 中所述的色谱条件重复测定 6 次,记录峰面积,相对标准偏差(RSD)为 1.2%, ($n = 6$),表明该试验测试精密度良好。

2.1.5 稳定性试验

取克唑替尼供试品溶液,分别于 0、2、4、8、12 h 按照 2.1.1 中所述的色谱条件进样测定,记录峰面积, $RSD = 1.4%$ ($n = 5$),结果表明,供试品溶液在 12 h 内稳定性良好。

2.1.6 重复性试验

取同一批次的克唑替尼样品 3 份,参照 2.1.2 中所述的方法配制供试品溶液,按照 2.1.1 中所述的色谱条件重复测定 5 次。测试结果的平均质量分数为 99.21%, $RSD = 0.81%$ ($n = 5$)。

2.1.7 回收率试验

精密称取 9 份已知质量浓度的克唑替尼样品 10 mg,分别加入克唑替尼对照品 8、10、12 mg 并置于 100 mL 容量瓶中,取适量甲醇超声溶解 20 min 后,用甲醇稀释至刻度,摇匀。得 3 种不同浓度的供

试品溶液,按照 2.1.1 所述的色谱条件进样测定,计算回收率。3 种质量浓度样品平均回收率分别为 102.0%、101.3%、100.4%, RSD 分别为 1.1%、0.7%、1.5%。

2.1.8 检测限和定量限

将克唑替尼对照品溶液进行阶梯等度稀释,取 20 μ L 进样,按照 2.1.1 中所述的色谱条件进样测定,按信噪比 $S/N = 3:1$ 和 $S/N = 10:1$ 进行计算,得出克唑替尼的检测限为 2.0 ng,定量限为 6.0 ng。

2.1.9 克唑替尼质量分数的检测

分别取 3 批克唑替尼样品,按照 2.1.2 中所述的方法配制成供试品溶液,取 20 μ L 按照 2.1.1 中所述的色谱条件进行测定,记录色谱图,按外标法计算质量分数,测定结果如表 1 所示。

表 1 克唑替尼含量

批号	w (克唑替尼)/%	RSD /%
20150326	99.2	
20150408	99.1	0.1
20150415	99.3	

2.2 克唑替尼光学纯度的测定

2.2.1 色谱条件

采用 CHIRALPAK[®] AD-H 色谱柱,以 V (正己烷): V (异丙醇): V (乙醇): V (二乙胺) = 50:25:25:0.2 为流动相,流速为 0.6 mL/min,检测波长为 268 nm,进样量为 20 μ L,柱温为 30 $^{\circ}$ C。

2.2.2 溶液配制

克唑替尼消旋体对照溶液:精密称取克唑替尼消旋体对照品 10 mg,置于 50 mL 容量瓶中,加入适量乙醇,超声溶解 20 min 后冷却至室温,用流动相稀释至刻度,摇匀,得消旋体对照品贮备液。再用移液管精密量取 1 mL,置于 10 mL 量瓶中,用流动相稀释至刻度,即得消旋体对照品溶液。

克唑替尼异构体对照品溶液及克唑替尼样品溶液配制方法同上。

2.2.3 光学纯度测定

分别取 3 批克唑替尼样品,按照 2.2.2 中所述的方法配制成供试品溶液,取 20 μ L 该供试品溶液按照 2.2.1 中所述的色谱条件进行测定,记录色谱图,计算 ee 值。测定结果如表 2 所示。

表 2 克唑替尼光学纯度

批号	ee (克唑替尼)/%	RSD /%
20150326	98.2	
20150408	97.8	0.3
20150415	98.1	

3 讨论

3.1 检测波长的选择

取克唑替尼对照品适量, 分别溶于甲醇(含体积分数为0.1% 三氟乙酸)、含体积分数为0.2% 二乙胺的正己烷、异丙醇、乙醇以及混合溶液中, 进行波长扫描, 结果测出其最大吸收峰在209、268 nm 和322 nm 处, 由于在209 nm 处是低波长, 流动相混合会对其产生干扰, 在322 nm 处吸收峰比前两处小, 故确定克唑替尼的检测波长为268 nm。

3.2 含量测定中流动相条件的选择

以不同比例的甲醇-水为流动相, 不能出峰。加入体积分数为0.1% 的三氟乙酸, 改变甲醇和水的体积比可以出峰, 但出峰时间较长, 不能满足系统适用性试验的要求。采用梯度洗脱, 流动相梯度表如表3所示, 出峰较好, 结果如图2所示。改变三氟乙酸的体积分数为0.2% 时, 出峰时间提前, 且峰型变差。

表3 梯度洗脱程序

t/min	0	10	10~20
V[水(0.1% 三氟乙酸)]/%	50	0	0
V[甲醇(0.1% 三氟乙酸)]/%	50	100	100

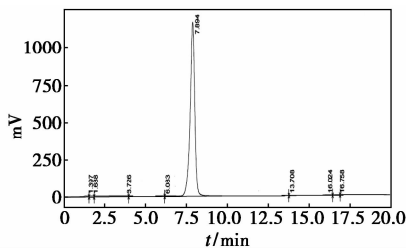


图2 克唑替尼含量测定色谱图

3.3 光学纯度测定中流动相条件的选择

采用正己烷与异丙醇为流动相, 调节体积比, 不能出峰; 将异丙醇换成极性稍大的乙醇, 调节体积比, 依旧不能出峰。

在正己烷-异丙醇的流动相中分别加入0.1%、0.2%、0.3% 二乙胺, 流速为0.6 mL/min, 结果如图3所示。由图3可知, 当二乙胺体积分数为0.1% 时, 两峰不能完全分离; 当体积分数为0.2%、0.3% 时可初步分离, 但出峰时间较长, 因此选择二乙胺体积分数为0.2%。

改变流动相的比例, 流速为0.6 mL/min, 流动相对克唑替尼及其光学异构体的影响如图4所示。随着异丙醇、乙醇体积比的增加, 出峰时间提前, 乙醇体积比的增加有利于两峰的分离, 但出峰时间

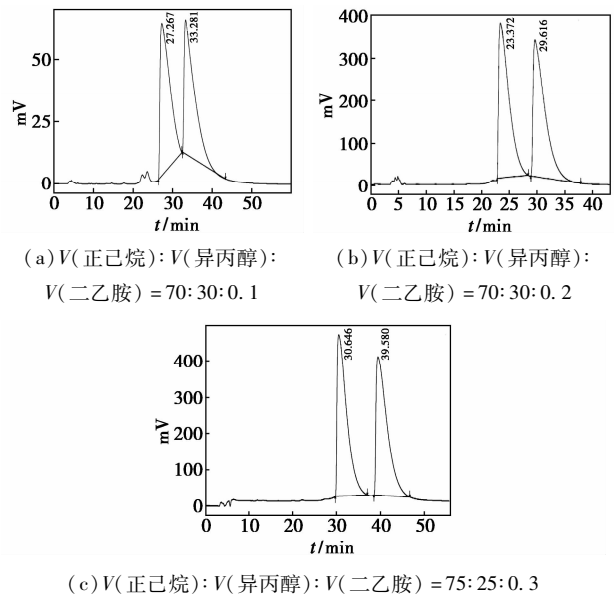


图3 二乙胺浓度对克唑替尼及其光学异构体的影响

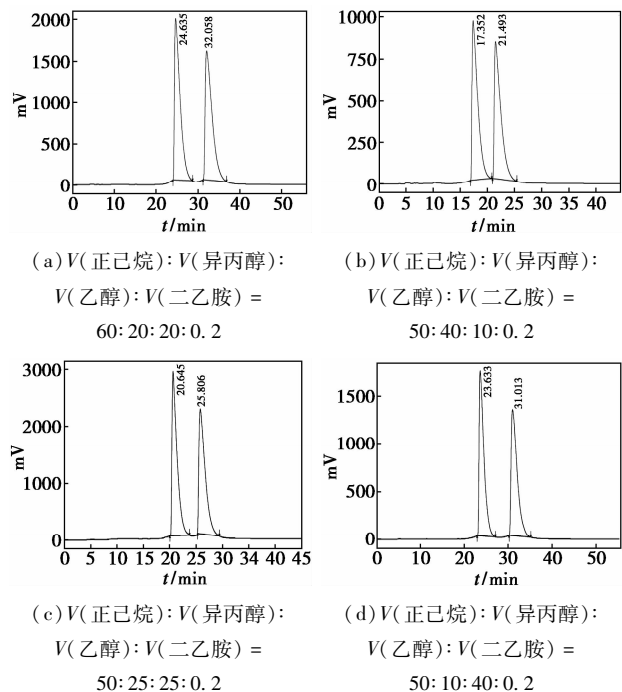


图4 流动相对克唑替尼及其光学异构体的影响

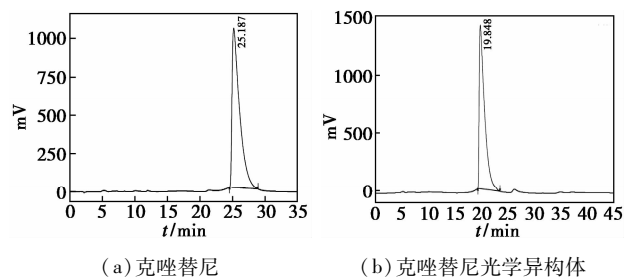


图5 克唑替尼及其光学异构体色谱图

(下转第205页)

介质分离:通过清管器能够避免同一管道输送不同介质时造成的第二次输送的介质与残留在管道中的第一次输送介质的混合。

清扫和维护:通过清管器能够有效地清除在管道建设期间残留的杂质、运行维护期间的杂质和结蜡等,提高管道的输送效率,减少因杂质造成的管道腐蚀。

检测功能:采用一些智能的清管器,能检测到管道焊缝处的裂纹、夹渣和管道堵塞等缺陷,降低管道的运行风险。

定位功能:智能清管器不仅有检测功能,还能把检测数据返回至控制室,通过数据分析能快速找到管道缺陷所在位置。

3 设计标准选取

在国内,到目前没有形成一套完善的针对清管器收发球筒的国家设计标准,20世纪90年代,清管器收发球筒的设计、制造、验收和检验标准均采用《压力容器》GB 150^[1],近年来随着陆上管道的发展,清管器收发球筒的设计标准逐渐向相连接的管道选用标准靠拢,例如《输油管道工程设计规范》GB 50253^[2]和《输气管道工程设计规范》GB 50251^[3],在这些规范中对于清管器收发球筒是作为管道附件来考虑的,并没有对清管器收发球筒的设计做

更详细地描述,设计选用该规范的目的也只是为了方便使用单位对设备和管线的统一管理。现在,尽管按照GB 150设计的清管器收发球筒还存在,笔者认为采用GB 50251和GB 50253压力管道工程设计规范设计的清管器收发球筒在未来将占据主流市场。

从目前笔者参与设计的国际项目以及其他公司完成的国际项目来看,清管器收发球筒的设计和制造标准主要是ASME B31.4^[4]和ASME B31.8^[5],同时结合ASME VIII Div 1^[6]进行快开盲板的设计。

3.1 不同设计标准选取对壁厚计算的影响

下面举一个实例对比按照GB 150、GB 50251和GB 50253 3个不同标准计算清管器收发球筒的壁厚计算结果。

例:已知压力管道直径 $D_i = 24''$ (DN600),管线设计压力 $P_c = 6.0$ MPa,设计温度 20°C ,清管器收发球筒设置在清管站场内,该清管器收发球筒设计主题材料选用Q345,计算该装置的小筒壁厚,见表1壁厚计算对比表。

从表1的计算结果分析采用3个不同标准设计,清管器收发球筒的计算壁厚相近。因此,选取不同的设计标准设计清管器收发球筒均是安全可靠的,且不会造成材料成本的显著变化。

(上接第203页)

延长,因此最终选择 V (正己烷): V (异丙醇): V (乙醇): V (二乙胺) = 50:25:25:0.2为流动相进行样品检测,结果如图5所示。

流速定为 0.6 mL/min。流速增加,系统压力增加,不利于色谱柱的保护。

4 结论

笔者建立了HPLC法测定克唑替尼的含量和光学纯度,采用Shim-pack VP-ODS C_{18} 色谱柱对克唑替尼进行含量测定,以甲醇(含 0.1% 三氟乙酸)-水(含 0.1% 三氟乙酸)为流动相进行梯度洗脱;流速为 0.6 mL/min;检测波长为 268 nm;柱温为 25°C 。克唑替尼质量浓度在 $0.05 \sim 2.51$ mg/mL范围内与峰面积呈良好的线性关系($r = 0.9999$),克唑替尼的检测限为 2.0 ng,定量限为 6.0 ng,分别取3批克唑替尼样品进行检测,平均质量分数为 99.2% , RSD

为 0.1% 。采用岛津CHIRALPAK[®] AD-H色谱柱对克唑替尼进行光学纯度测定,以 V (正己烷): V (异丙醇): V (乙醇): V (二乙胺) = 50:25:25:0.2为流动相,流速为 0.6 mL/min⁻¹,检测波长为 268 nm,柱温为 30°C ,克唑替尼与其异构体杂质能完全分离,分别取3批克唑替尼样品进行检测,光学纯度 $ee\%$ 为 98.0% , RSD 为 0.3% 。该法简便可靠,可用于克唑替尼的质量控制。

参考文献

- [1] 侯文静,胡欣,史爱欣. 克里唑替尼的药理作用及临床评价[J]. 中国临床药理学杂志,2012,28(6):469-471.
- [2] 孙亚飞,孙占莉,肖旭华. 克里唑替尼合成路线图解[J]. 中国医药工业杂志,2013,44(12):1308-1310.
- [3] Ou S H, Bartlett C H, Mino-Kenudson M, et al. Crizotinib for the treatment of ALK-rearranged non-small cell lung cancer: A success story to usher in the second decade of molecular targeted therapy in oncology[J]. Oncologist,2012,17(11):1351-1375. ■