

# 吉非替尼片中氧化杂质的结构确证及 HPLC 法测定

叶国健<sup>1,2</sup>, 牛亚伟<sup>1</sup>, 胡巧红<sup>1</sup>, 秦凌浩<sup>1\*</sup>

(1. 广东药科大学药学院, 广东广州 510006; 2. 佛山市南海区卫生职业技术学校, 广东佛山 528211)

**摘要:** 本研究通过破坏试验, 追踪吉非替尼的降解产物, 并对氧化杂质进行合成和定性定量分析。其结构经 <sup>1</sup>H NMR、<sup>13</sup>C NMR 和 MS 确证为 4-[(3-氯-4-氟)苯胺基]-6-[3-(吗啉-4-基)丙氧基]-7-甲氧基-1-氧代喹唑啉(氧化杂质 A)。通过调节流动相配比和 pH 值, 建立了特异性检测吉非替尼片中氧化杂质的 HPLC 条件。使用 C<sub>18</sub> 色谱柱, 以乙腈: 1% 乙酸铵溶液(用冰乙酸调至 pH 6.0)(38 : 62)为流动相, 检测波长 253 nm。氧化杂质 A 在 0.5 ~ 2.0 μg/ml 范围内线性关系良好, 定量限为 0.15 μg/ml。本法能高效准确地测定吉非替尼片中的氧化杂质含量, 可为其质量标准的建立提供参考。

**关键词:** 吉非替尼; 高效液相色谱法; 氧化杂质

中图分类号: O657.7<sup>+</sup>2; TQ460.7<sup>+</sup>2

文献标志码: A

文章编号: 1001-8255(2018)02-0224-06

DOI: 10.16522/j.cnki.cjph.2018.02.017

吉非替尼(gefitinib, **1**)是以表皮生长因子受体(EGFR)为靶点的小分子酪氨酸激酶抑制剂, 由英国阿斯利康制药有限公司开发, 商品名为易瑞沙, 临床研究表明本品在亚裔人种晚期非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)治疗中效果显著<sup>[1-4]</sup>。

前期研究中, 本课题组通过强制降解试验发现 **1** 极易被氧化降解, 通过查阅相关片剂药品标准和相关研究信息发现, 未对其氧化杂质进行定性说明及限量规定。鉴于此, 本试验对 **1** 片的主要氧化降解产物进行定性定量分析, 并建立了 HPLC 法进行检测, 为本品的质量控制提供参考。

## 1 仪器与试药

Chromaster 系列高效液相色谱仪(包括 5110 型四元泵, 5310 型柱温箱, 5410 型 UV 检测器, 5210 型自动进样器, 日本 Hitachi 公司)。

**1** 原料药(广东药科大学药物化学系合成, 纯度 99.91%); 易瑞沙(英国 Astra Zeneca 公司, 规格 250 mg,

批号 KK429、KK597 和 KK638); **1** 薄膜衣片剂(本院自制, 规格 250 mg); 间氯过氧苯甲酸(mCPBA, 郑州阿尔法化工有限公司, 批号 20150803); 3-氯-4-氟苯胺(**2**, 南京奇可医药化工有限公司, 批号 141212)。乙腈为色谱纯, 其他试剂均为分析纯, 水为自制重蒸水。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液配制

强制降解试验溶液: 精密称取 **1** 原料药 1 mg, 共 5 份, 各置 25 ml 量瓶中。其中 2 份分别加入 1 mol/L 盐酸和 1 mol/L 氢氧化钠溶液各 2 ml, 水浴加热 2 h, 冷却至室温, 用 1 mol/L 氢氧化钠溶液或 1 mol/L 盐酸中和, 加乙腈: 0.2% 乙酸(40 : 60, 即溶剂 A)定容, 即得酸、碱破坏样品溶液各 1 份; 1 份加入 30% 过氧化氢 1 ml, 振摇后室温放置 30 min, 加溶剂 A 定容, 即得氧化破坏样品溶液; 1 份于 80 °C 破坏 20 h 后用溶剂 A 溶解并定容, 即得高温破坏样品溶液; 1 份置光照强度 4 500 lx 破坏 48 h, 加溶剂 A 定容, 即得光照破坏样品溶液。

对照溶液: 精密称取 **1** 原料药 1 mg, 置 25 ml 量瓶中, 用溶剂 A 溶解并定容, 即得 (0.04 mg/ml)。

### 2.2 强制降解试验

取强制降解试验溶液和对照溶液, 按 **1** 原料药质量标准分别进行 HPLC 测定<sup>[5]</sup>, 结果见图 1。其中, 2 ~ 3 min 为溶剂色谱峰, **1** 的保留时间约为 10 min。可见, 在强酸、强碱、光照和高温条件下,

收稿日期: 2017-06-03

基金项目: 广东省战略性新兴产业核心技术攻关计划项目(2012A080800012)

作者简介: 叶国健(1990—), 男, 硕士研究生, 专业方向: 药物新剂型与新技术。

Tel: 18814099493

通信联系人: 秦凌浩(1980—), 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事药物新剂型与新技术研究。

E-mail: dor\_qin@163.com

**1** 稳定性较好；而在氧化破坏 30 min 后，约 5 min 处出现 1 个新的有关物质峰。鉴于该有关物质在氧化条件下极易产生且含量较高，为保证 **1** 片质量，对该杂质进行定性、定量研究，并将其命名为氧化杂质 A。

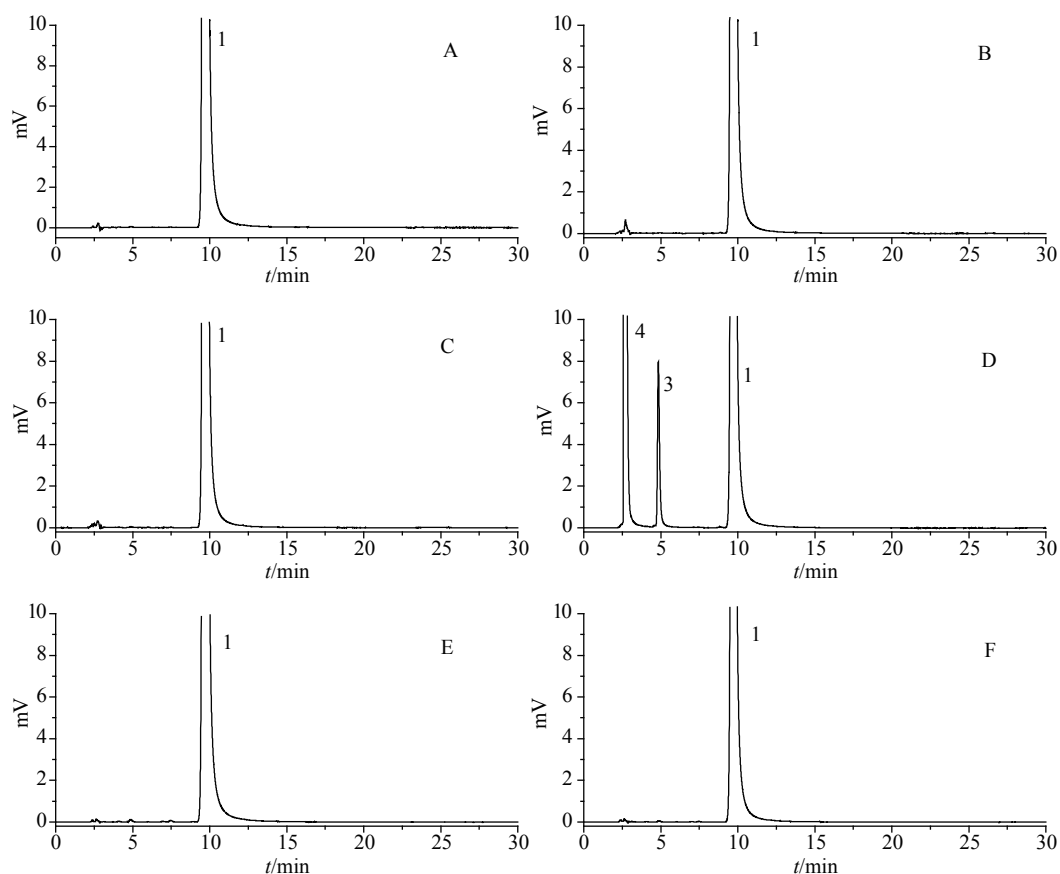
### 2.3 氧化杂质 A 的合成及结构确证

合成路线：准确称取 **1** 2 g，加至 100 ml 单口圆底烧瓶中，加入氯仿 50 ml，甲醇 8 ml，mCPBA 0.8 g，室温搅拌 30 min 后加入 3% 氢氧化钠溶液 10 ml，并再次剧烈搅拌 10 min，将混合液倒入分液漏斗中静置分层。收集氯仿层，加入无水硫酸钠 2 g，过滤并减压蒸发除去约 70% 的溶剂，得析出固体，冷却过滤，用少量氯仿洗涤滤饼，室温减压干燥 12 h，即得产物 A (1.2 g)，HPLC 纯度 99.5%。

取产物 A 适量，经 HPLC 分析可知（图 2），所得产物与氧化破坏生成的杂质 A 出峰时间一致且为单一色谱峰，提示两者为同一物质，**1** 已全部转化为氧化产物 A。氧化产物 A 和 **1** 的  $^1\text{H}$  NMR、 $^{13}\text{C}$  NMR 和 MS 表征结果如下。

氧化产物 A：ESI $^+$  ( $m/z$ ): 463。 $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 9.69 (s, 1H), 8.51 (s, 1H), 8.22 (dd, 1H), 8.19 (s, 1H), 7.93 (ddd, 1H), 7.45 (t, 1H), 7.20 (s, 1H), 4.35 (t, 2H), 4.07 ~ 4.19 (m, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.66 (dt, 2H), 2.95 (d, 2H), 2.35 (p, 2H)。  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 156.2, 154.5, 152.7, 152.1, 147.6, 146.9, 137.0, 123.3, 122.2, 116.6, 116.4, 108.8, 107.3, 103.8, 67.6, 67.2, 63.7, 61.0, 55.9, 20.8。

**1**：ESI $^+$  ( $m/z$ ): 447。 $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,



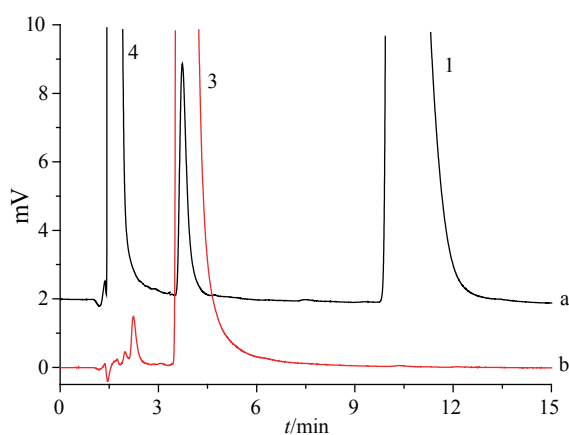
A：对照溶液，B：强酸破坏，C：强碱破坏，D：氧化破坏，E：高温破坏，F：光照破坏

1-1；3- 氧化杂质 A；4- 过氧化氢

图 1 **1** 强制降解试验色谱图

Fig.1 Chromatograms of **1** by Forced Degradation Test

DMSO- $d_6$   $\delta$ : 9.45 (s, 1H), 8.44 (s, 1H), 8.11 (dd, 1H), 7.76 ~ 7.80 (m, 2H), 7.43 (t, 1H), 7.19 (s, 1H), 4.18 (t, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.58 (t, 4H), 2.39 ~ 2.50 (m, 6H), 1.99 (t, 2H)。 $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$ : 163.7, 156.8, 155.1, 153.2, 148.8, 147.5, 137.6, 123.7, 122.7, 122.5, 116.9, 116.6, 109.5, 107.8, 67.8, 65.4, 56.4, 55.1, 52.7, 27.7。



a: 1 氧化破坏样品; b: 氧化产物  
1-1; 3- 氧化杂质 A; 4- 过氧化氢

图 2 1 氧化杂质色谱图

Fig.2 Chromatograph of 1 Oxidative Impurity

据此推测该氧化杂质 A 为 1 分子结构上基团被氧化, 即 1 的氮氧化物, 化学名为 4-[(3-氯-4-氟)-苯胺基]-6-[3-(吗啉-4-基)丙氧基]-7-甲氧基-1-氧代喹啉。反应见图 3。

## 2.4 色谱条件考察

参考 1 片进口注册标准中的系统适用性试验, 2 为质量标准系统适用性试验中选用的唯一杂质, 是合成 1 的重要原料, 其出峰时间与 1 相近, 因此

选择 2 作为氧化杂质 A 色谱分离条件的参考物。

### 2.4.1 检测波长的选择

分别取适量氧化杂质 A 和 2, 用溶剂 A 溶解, 在 200 ~ 400 nm 扫描 UV 光谱, 结果显示, 1 和氧化杂质 A 的吸收光谱行为基本一致, 在 250 nm 附近均具有较强吸收峰; 而 2 UV 吸收较弱, 仅在 230 nm 附近有一肩峰。综合考虑, 选定其次强吸收峰 253 nm 作为检测波长。

### 2.4.2 流动相 pH 值和比例的考察

考察不同 pH 值以及不同流动相比例 (乙腈: 1% 乙酸铵溶液) 条件下 1 与氧化杂质 A 的分离情况 (见图 4), 可见, 1 的保留时间随着 pH 值的下降而缩短, 氧化杂质 A 和 2 的保留时间则不随 pH 值变化; pH 6 时, 1 与氧化杂质 A 达到基线分离, 且保留时间适中, 因此选定该 pH 值作为分析条件。1 与氧化杂质 A 的保留时间随流动相中有机相的比例升高而减少, 当乙腈的比例提高至 40% 时, 1 的出峰时间提前至 9 min, 与 2 仅能达到基线分离。若降低乙腈比例至 36%, 1 色谱峰展宽, 且峰高较小, 不利于氧化杂质 A 的分析。因此选择乙腈: 1% 乙酸铵溶液 (38 : 62) 为流动相。

综上, 最终拟定色谱条件为: 色谱柱 Hypersil C<sub>18</sub> 柱 (4.6 mm×250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相 乙腈: 1% 乙酸铵溶液 (用冰乙酸调至 pH 6.0, 38 : 62); 柱温 40  $^{\circ}\text{C}$ ; 流速 1 ml/min; 检测波长 253 nm; 进样量 5  $\mu\text{l}$ 。

## 2.5 氧化杂质 A 检测方法的验证

### 2.5.1 溶液配制

1 贮备液: 精密称取 1 原料药 100 mg, 置 100 ml 量瓶中, 用溶剂 A 溶解并定容, 即得 (1 mg/ml)。

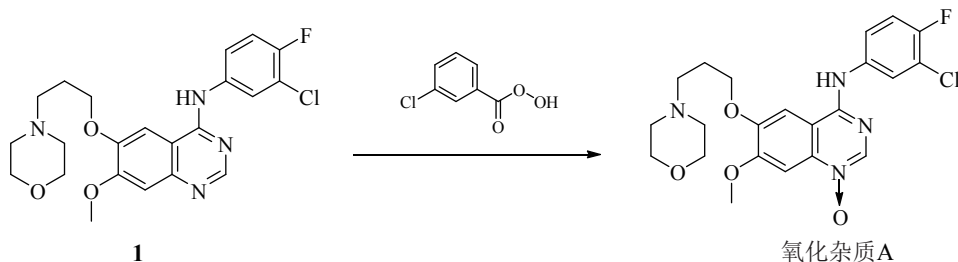


图 3 1 氧化杂质 A 的生成路线

Fig.3 Synthetic Route of 1 Oxidative Impurity A

氧化杂质 A 贮备液：精密称取氧化杂质 A 10 mg，置 100 ml 量瓶中，用溶剂 A 溶解并定容，即得 (0.1 mg/ml)。

2 贮备液：精密称取 250 mg，置 100 ml 量瓶中，用溶剂 A 溶解并定容，即得 (0.5 mg/ml)。

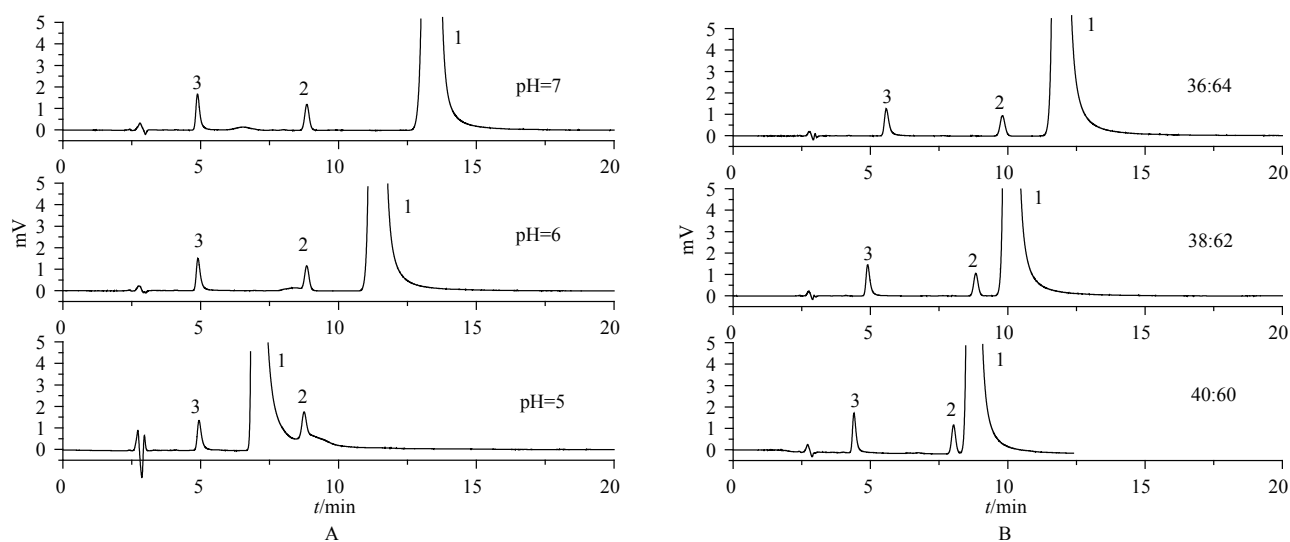
### 2.5.2 系统适用性试验

分别取氧化杂质 A 贮备液和 1、2 贮备液各 1 ml，置 100 ml 量瓶中，用溶剂 A 溶解并定容，得系统适用性溶液。进样测定，结果见图 5。可见空白溶剂不干扰 1 和杂质的测定，分离度均大于 3.0，

理论板数大于 5 000，系统适用性良好。

### 2.5.3 线性试验

分别准确移取氧化杂质 A 贮备液 0.5、0.6、0.8、1.0、1.2、1.5 和 2.0 ml，各置 100 ml 量瓶中，用溶剂 A 稀释定容，即得 0.5、0.6、0.8、1.0、1.2、1.5 和 2.0  $\mu\text{g/ml}$  的系列浓度溶液。分别按“2.4”项下色谱条件进样测定。以浓度  $c$  为横坐标，峰面积  $A$  为纵坐标，进行线性回归。得回归方程  $A=14\,946c-640$ ， $r=0.999\,2$ 。结果表明氧化杂质 A 在 0.5 ~ 2.0  $\mu\text{g/ml}$  范围内线性关系良好。检测限 (LOD) 为

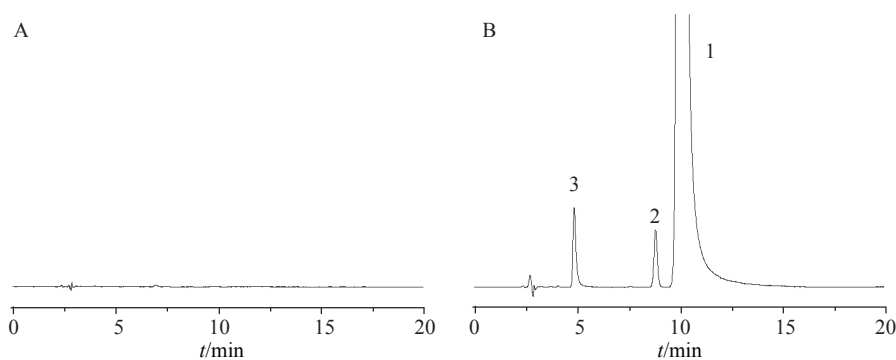


A：pH 值的影响，B：流动相比比例（乙腈：1%乙酸铵溶液）

1-1；2-2；3-氧化杂质 A

图 4 流动相条件对氧化杂质 A 分离的影响

Fig.4 Effects of Mobile Phase on Separation of Oxidative Impurity A



A：空白溶剂，B：系统适用性溶液

1-1；2-2；3-氧化杂质 A

图 5 系统适用性溶液色谱图

Fig.5 Chromatograms of System Suitability Test

0.05  $\mu\text{g/ml}$ , 定量限 (LOQ) 为 0.15  $\mu\text{g/ml}$ 。

#### 2.5.4 精密度、重复性和稳定性试验

准确移取氧化杂质 A 贮备液 1 ml, 置 100 ml 量瓶中, 用溶剂 A 稀释定容, 即得 1  $\mu\text{g/ml}$  的氧化杂质 A 溶液, 连续进样 6 次, 记录峰面积, 计算得 RSD 为 0.36%。

同上制备 1  $\mu\text{g/ml}$  的氧化杂质 A 溶液, 共 6 份, 分别进样测定, 计算得峰面积的 RSD 为 1.03%。

同上制备 1  $\mu\text{g/ml}$  的氧化杂质 A 溶液, 分别在 0、2、4、6、8、10、12 h 进样测定, 结果峰面积的 RSD 为 1.13%, 表明氧化杂质 A 溶液在 12 h 内稳定性良好。

#### 2.5.5 回收率试验

精密称取 1 片中各辅料 (乳糖、微晶纤维素、交联羧甲基纤维素钠、羟丙基纤维素和硬脂酸镁) 适量, 共 9 份, 各置 100 ml 量瓶中, 分别移取氧化杂质 A 贮备液 0.8、1 和 1.2 ml, 各 3 份, 超声溶解 (18 kHz, 30 min), 冷却后用溶剂 A 定容, 配制成高、中、低浓度质控溶液, 分别进样测定, 结果氧化杂质 A 的平均回收率为 99.87% ( $n=9$ ), RSD 为 0.99%。

#### 2.5.6 耐用性试验

分别改变色谱条件中的流速 ( $\pm 0.2$  ml/min), 水相的 pH 值 ( $\pm 0.05$ ) 和流动相比比例 ( $\pm 2\%$ ), 结果 1 与杂质的分离度均大于 2, 色谱峰峰形良好, 表明本法耐用性良好。

### 2.6 1 片中氧化杂质 A 的含量测定

3 批 1 片各取 1 片, 除去包衣膜后研碎, 精密称取 200 mg, 用溶剂 A 25 ml 溶解过滤, 按上述拟定杂质检测方法测定氧化杂质 A 的含量。结果 3 批制剂中均检出该杂质, 含量分别为 0.002%、0.002% 和 0.004%, 均小于 0.01%。

### 3 讨论

根据《化学药物杂质研究技术指导原则》, 一般以强力破坏后主成分的含量约占 90% 为宜。如果样品在一定条件下稳定, 则不必再提高条件的剧烈程度进行重复试验。采用过氧化氢作为氧化剂, 60  $^{\circ}\text{C}$  水浴 2 h 后, 药物已被完全氧化为新的杂质, 本试验通过条件筛选优化, 减少过氧化氢的用量,

降低破坏温度及破坏时间, 拟定了较合适的氧化破坏条件。

mCPBA 作为过氧化物, 具有与过氧化氢类似的强氧化性。该物质在三氯甲烷中的溶解度较好, 而 1 则在甲醇中的溶解度较大, 因此反应体系选择三氯甲烷和甲醇的混合溶剂, 以保证两者能在单相体系中充分反应。碱化反应液使 mCPBA 及其氧化产物间氯苯甲酸成盐, 溶于水相, 而氧化杂质留在有机相中, 得以分离。经验证, 该方法所得的氧化杂质收率和纯度均较理想。

已有研究报道了 1 杂质的合成方法和检查方法<sup>[4-8]</sup>, 当采用不同的分析体系时对多个杂质的分离检测有显著的影响。本试验主要侧重于 1 的氧化杂质, 且相关研究中均未见氧化杂质的定性报道。1 为弱碱性药物, 出峰时间会随 pH 值的降低而提前, 当采用碱性流动相时, 其出峰时间会显著延长, 同时峰形变宽, 对分析的准确度和效率有影响。同时, 本试验选用了色谱柱为 5  $\mu\text{m}$  填料的 ODS 反相色谱柱, 并非相关标准中的 3  $\mu\text{m}$  ODS 填料色谱柱, 预试验结果显示, 在偏碱性条件下, 色谱柱的柱效不稳定, 波动较大, 而在 pH 6 条件下, 针对氧化杂质 A 的出峰时间、分离效果均满足要求。因此, 本试验选择该条件, 与之前的报道有所不同<sup>[5,9]</sup>。本试验建立的方法灵敏度高, 分离度良好, 结果准确可靠, 为 1 片中氧化杂质的质量控制研究提供参考。

#### 参考文献:

- [1] Jemal A, Siegel R, Ward E, *et al.* J. Cancer Statistics, 2008 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2008, **58**(2): 71—96.
- [2] Yang L, Parkin DM, Ferlay J, *et al.* Estimates of cancer incidence in China for 2000 and projections for 2005 [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2005, **14**(1): 243—250.
- [3] Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, *et al.* Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib [J]. *New Engl J Med*, 2004, **350**(21): 2129—2139.
- [4] 吴立红, 张彦巧, 梁敏, 等. 吉非替尼有关物质的合成[J]. 中国医药工业杂志, 2014, **45**(6): 513—516.
- [5] 吴学昊, 罗安, 叶连宝, 等. 反相液相色谱法同时测定原



- 料药中吉非替尼及其有关物质的含量[J]. 分析测试学报, 2016, 35(1): 35—41.
- [6] Chandrashekara KA, Udupi A, Reddy CG. Separation and estimation of process-related impurities of gefitinib by reverse-phase high-performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr Sci*, 2014, 52(8): 799—805.
- [7] 梁晓东, 马小涛, 和 龙, 等. HPLC法测定吉非替尼原料药的含量和有关物质[J]. 中国药房, 2015, 26(15): 2138—2141.
- [8] 陈 帅, 袁崇均, 罗 森, 等. HPLC测定易瑞沙中的吉非替尼及有关物质[J]. 华西药理学杂志, 2013, 28(2): 205—206.
- [9] 叶连宝, 杨杰波, 吴 杰, 等. HPLC测定吉非替尼中的有关物质[J]. 华西药理学杂志, 2016, 31(5): 526—528.

## Structure Elucidation and Determination of Oxidative Impurity in Gefitinib Tablet by HPLC

YE Guojian<sup>1,2</sup>, NIU Yawei<sup>1</sup>, HU Qiaohong<sup>1</sup>, QIN Linghao<sup>1\*</sup>

(1. School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006; 2. Vocational Technical School of Nanhai, Foshan 528211)

**ABSTRACT:** The degradation products of gefitinib through stressing test were traced. Among them, the oxidative impurity (named as oxidative impurity A) was synthesized, and then qualitatively and quantitatively determined. Its structure was elucidated by <sup>1</sup>H NMR, <sup>13</sup>C NMR and MS as 4-[(3-chloro-4-fluoro)phenylamino]-7-methoxy-6-[3-(morpholin-4-yl)propoxy] quinazolin-1-oxide. The HPLC method was optimized by changing the mobile phase ratio and pH value of aqueous phase. A Hypersil C<sub>18</sub> column was used, with the mobile phase of acetonitrile : 1% ammonium acetate buffer (adjusted to pH 6.0 by acetate acid) (38 : 62), at the detection wavelength of 253 nm. It was linear for oxidative impurity A in the range of 0.5—2.0 μg/ml, with LOQ of 0.15 μg/ml. It indicated that the oxidative impurity in gefitinib tablets could be effectively and accurately determined by the established HPLC method, which provided a reference for the establishment of the quality standard for gefitinib tablets.

**Key Words:** gefitinib; HPLC; oxidative impurity

