超临界流体色谱法测定盐酸厄洛替尼原料药及片剂中的有关物质

金 薇[1,2]，张少敏[1,3]，乐 健[1,2]，杨永健[1,2]*

（1. 上海市食品药品检验研究院，上海 201203；2. 国家药品监督管理局化学药品制剂质量分析重点实验室，上海 201203；3. 复旦大学药学院，上海 201203）

摘要：采用超临界流体色谱（SFC）系统分离并测定盐酸厄洛替尼（**1**）及其 4 种有关物质。采用 Torus 2-PIC 柱（3.0 mm×100 mm，1.7 μm），以超临界二氧化碳 - 甲醇为流动相进行梯度洗脱，进样量为 1 μL，柱温为 50 ℃，流速为 1.0 mL/min。结果显示，各化合物在 7 min 内出峰并分离完全；4 种有关物质分别在 0.5 ～ 40、2 ～ 60、0.4 ～ 40、0.5 ～ 40 μg/mL 内，**1** 在 5 ～ 100 μg/mL 内，线性关系良好。**1**、杂质 A、杂质 B、杂质 C 和杂质 D 的 LOD 分别为 0.2、0.2、0.5、0.1、0.2 μg/mL；LOQ 分别为 0.5、0.5、2.0、0.4、0.5 μg/mL。各有关物质的加样回收率（n=3）在 96.0%～ 104.2%，RSD 均小于 3.0%。建立的方法快速有效、灵敏度高、绿色环保，可有效用于 **1** 原料药及片剂的质量控制。

关键词：盐酸厄洛替尼；原料药；片剂；有关物质；超临界流体色谱

中图分类号：R917 **文献标志码**：A **文章编号**：1001-8255(2024)01-0089-07

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2024.01.011

Determination of the Related Substances in Erlotinib Hydrochloride Bulk Drug and Tablets by Supercritical Fluid Chromatography

JIN Wei[1,2], ZHANG Shaomin[1,3], LE Jian[1,2], YANG Yongjian[1,2]*

(*1. Shanghai Institute for Food and Drug Control, Shanghai 201203; 2. NMPA Key Lab. for Quality Analysis of Chemical Drug Preparations, Shanghai 201203; 3. School of Pharmacy, Fudan University, Shanghai 201203*)

ABSTRACT: A supercritical fluid chromatography (SFC) method was established for the separation and determination of erlotinib hydrochloride (**1**) and its four related substances. A Torus 2-PIC column (3.0 mm×100 mm, 1.7 μm) was used with the mobile phase containing a mixture of supercritical CO_2 and methanol by gradient elution. The injection volume was 1 μL, the column temperature was 50 ℃, and the flow rate was 1.0 mL/min. The results showed that each compound peaked and was completely separated within 7 minutes. And it was linear for four related substances and **1** in the ranges of 0.5 – 40, 2 – 60, 0.4 – 40, 0.5 – 40, 5 – 100 μg/mL, respectively. The LODs of **1** and impurities A, B, C, D were 0.2, 0.2, 0.5, 0.1, 0.2 μg/mL, respectively, and the LOQs were 0.5, 0.5, 2.0, 0.4, 0.5 μg/mL, respectively. The recoveries (n=3) of four related substances were between 96.0% and 104.2%, with RSDs all less than 3.0%. The established method is rapid, effective, highly sensitive, environmentally friendly, which can be effectively used for quality control of **1** bulk drug and tablets.

Key Words: erlotinib hydrochloride; bulk drug; tablet; related substance; supercritical fluid chromatography

厄洛替尼（erlotinib）是瑞士罗氏（Roche）公司研发的第一代表皮生长因子受体酪氨酸激酶抑制剂（EGFR-TKI）抗肿瘤药[1]。目前，国内盐酸厄洛替尼（**1**）片有 9 家企业共获得 15 个批准文号。但国内外药典至今均未收载其原料药或制剂的质量标准。有关物质是质量控制的关键指标，但目前用于评价 **1** 原料药及片剂中有关物质的统一分析方法尚未建立。原友志等[2]总结了 **1** 的各种合成路线，列出了各种合成起始物料和中间体。李昌亮等[3]、梁晓东等[4]均采用 HPLC 法以梯度洗脱的方式检测

收稿日期：2023-02-15

基金项目：上海市科委资助项目（22142201800）

作者简介：金 薇（1973—），女，主任药师，从事药物分析及药品质量控制研究。

通信作者：杨永健（1964—），男，主任药师，从事药物分析及药品质量控制研究。

E-mail：yongjianyang@163.com

1 中包括合成起始物料和中间体等在内的多种有关物质，分析时间约为 60 min；此外还有采用 HPLC 法[5]和毛细管电泳（CE）法[6]检测血液样品中 **1** 代谢产物的报道。

超临界流体色谱（supercritical fluid chromatography，SFC）是主要以超临界二氧化碳（sCO_2）为流动相的色谱方法。sCO_2 的密度与液体接近，黏度接近气体，扩散系数介于两者之间，既有较好的溶剂化能力，又有较高的扩散速率，在异构体和有关物质的分离方面具有良好的应用前景[7—9]。

本研究采用 SFC 代替传统 HPLC，建立了一种绿色、高效的分析方法，能在 10 min 内分离可能存在的 4 种有关物质（化学结构如图 1 所示），分别为杂质 A［4- 氯 -6,7- 二（2- 甲氧基乙氧基）喹唑啉］、杂质 B［2- 氨基 -4,5- 二（2- 甲氧基乙氧基）苯甲酸乙酯］、杂质 C［6,7- 二（2- 甲氧基乙氧基）喹唑啉 -4- 酮］、杂质 D［［*N*-（3- 乙酰基苯基）］-6,7- 二（2- 甲氧基乙氧基）喹唑啉 -4- 胺］，以期为 **1** 的质量控制研究提供参考。

1　仪器与试药

Acquity 型超临界流体合相色谱系统（UPC^2，美国 Waters 公司）；BP211D 型精密天平（德国 Sartorius 公司）。

1 对照品（瑞士 Roche 公司，含量 99.9 %，批号 12043827）；**1** 原料药（批号 180301、180302、180303）、杂质 A 对照品（含量 92.9%，批号 171222）、杂质 B 对照品（含量 94.3%，批号 171130）、杂质 C 对照品（含量 96.3%，批号 1308001）和杂质 D 对照品（含量 100%，批号 171225）均由上海创诺制药有限公司提供；**1** 片（规格 150 mg）分别由上海创诺制药有限公司（批号 2321220601）、瑞士 Roche 公司（批号 M1145、M1146、M1150）、湖南科伦公司（批号 1R211201、1R220801、1R220802）提供；二氧化碳［液化空气（上海）压缩气体有限公司，含量 99.99%］；甲醇、乙醇、乙腈均为色谱纯，氨水、甲酸、氢氧化钠、盐酸（36.0%～ 38.0%）、过氧化氢溶液（≥ 30%）均为分析纯。

2　方法与结果

2.1　色谱条件

色谱柱 Torus 2-PIC 柱（3.0 mm×100 mm，1.7 μm）；流动相 A 为 sCO_2，B 为甲醇，梯度洗脱（0—5 min，B 2%—20%；5—7 min，B 20%；7—8 min，B 20%—2%；8—10 min，B 2%）；检测波长 240 nm；流速 1.0 mL/min；柱温 50 ℃；样品室温度 10 ℃；背压 13.8 MPa；进样量 1 μL。

2.2　溶液的配制

1 对照品贮备液：精密称取 **1** 对照品 20 mg，置 10 mL 量瓶中，加入甲醇溶解并定容，摇匀，制成质量浓度为 2.0 mg/mL 的 **1** 对照品贮备液。

混合有关物质对照品贮备液：分别精密称取 4 种有关物质对照品 4 mg，置同一 20 mL 量瓶中，加入甲醇溶解并定容，摇匀，制成含各有关物质 0.2 mg/mL 的混合有关物质对照品贮备液。

系统适用性溶液：精密量取 **1** 对照品贮备液 5 mL，置 10 mL 量瓶中，精密加入上述混合有关物

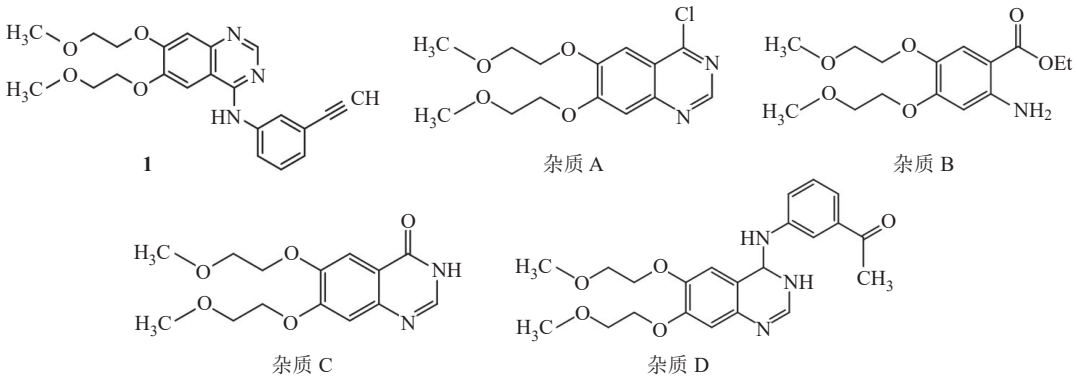


图 1　1 及其 4 种有关物质的结构式

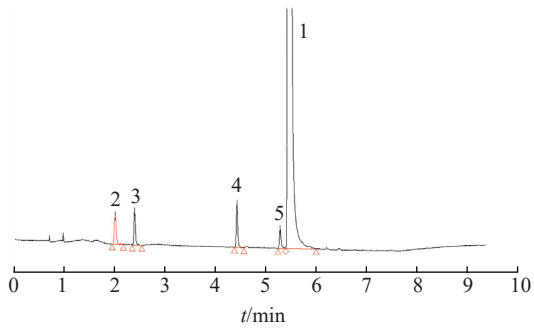
Fig.1　Chemical Structures of **1** and Its Four Related Substances

质对照品贮备液 1 mL，加甲醇定容，摇匀，制成 **1** 质量浓度为 1.0 mg/mL、各有关物质质量浓度为 20 μg/mL 的系统适用性溶液。

供试品溶液：取 **1** 片 20 片，精密称定后研细，精密称取细粉适量（相当于含 **1** 约 10 mg）或 **1** 原料药 10 mg，置 10 mL 量瓶中，加甲醇溶解，超声 5 min，放冷，加甲醇定容，离心后过 0.22 μm 滤膜，即得含 **1** 约 1 mg/mL 的供试品溶液。

2.3 系统适用性试验

取“**2.2**”项下的系统适用性溶液，按“**2.1**”项下的色谱条件进样检测，所得系统适用性色谱图如图 2 所示，各相邻色谱峰之间完全分离，分离度均大于 1.5，其中杂质 D 与 **1** 峰之间分离度为 2.54。



1—**1**；2—杂质 A；3—杂质 B；4—杂质 C；5—杂质 D。

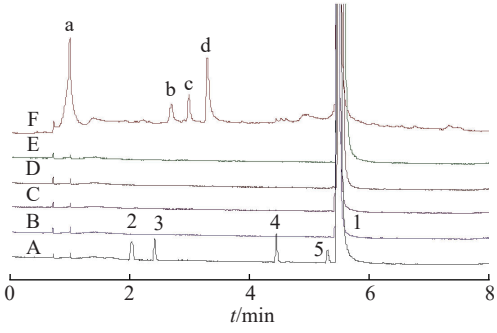
图 2 系统适用性溶液色谱图

Fig.2 Chromatogram of System Suitability Solution

2.4 破坏性试验

精密称取 **1** 片细粉适量，分别进行以下试验。①热破坏：先在 105 ℃干燥箱中放置 24 h，再用甲醇超声溶解并稀释制成主药浓度约为 1 mg/mL 的溶液。②光破坏：在 365 nm 的灯下照射 2 d 后，再用甲醇超声溶解并稀释制成主药浓度约为 1 mg/mL 的溶液。③氧化破坏：置 10 mL 量瓶中，加甲醇 1 mL 超声溶解后，加入 30%过氧化氢溶液 1 mL，混匀后于室温放置 4 h，用甲醇稀释制成主药浓度约为 1 mg/mL 的溶液。④酸 / 碱破坏：置 10 mL 量瓶中，加甲醇 1 mL 超声溶解后，加入 1 mol/L 盐酸或 1 mol/L 氢氧化钠溶液 1 mL，混匀，于室温放置 10 h 后，用甲醇稀释制成主药浓度约为 1 mg/mL 的酸 / 碱破坏性试验样品溶液。所有溶液进样前经 0.22 μm 滤膜过滤。

精密量取上述破坏性试验溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进行测定，结果如图 3 所示。在强酸、强碱、光、热破坏下，**1** 较稳定，均没有降解产物生成，仅在氧化破坏条件下，有 4 个未知降解产物 a ～ d 产生，且各降解产物峰之间、降解产物峰与目标化合物峰之间完全分离、互不干扰。破坏性试验结果说明 **1** 在正常条件下较为稳定，不易降解，贮存条件对其影响相对较小。



A—系统适用性溶液；B—热破坏性试验溶液；C—光破坏性试验溶液；D—碱破坏性试验溶液；E—酸破坏性试验溶液；F—氧化破坏性试验溶液。

1—**1**；2—杂质 A；3—杂质 B；4—杂质 C；5—杂质 D；a ～ d—氧化破坏杂质。

图 3 1 的破坏性试验样品色谱图

Fig.3 Chromatograms of **1** Samples in Forced Degradation Studies

2.5 方法学验证

2.5.1 专属性试验

“**2.4**”项下的破坏性试验结果表明，在本色谱条件下，各目标化合物之间分离度均大于 1.5，且氧化破坏条件下产生的降解产物对目标分析物的测定无干扰。此外，采用光电二极管阵列（PDA）检测器对目标分析物色谱峰进行峰含量考察，以确保目标色谱峰中没有其他有关物质共洗脱峰。峰含量试验结果显示，所有目标色谱峰的纯度角均小于纯度阈值，表明目标化合物峰为光谱纯峰，没有其他物质与其共洗脱，方法专属性好。空白溶剂对检测

也没有干扰。

2.5.2 检测限与定量限

精密量取“**2.2**”项下的混合有关物质对照品贮备液，用甲醇逐级定量稀释成 0.1 ～ 2.0 μg/mL 的溶液，检测结果以信噪比（*S*/*N*）约等于 3 和 10 时的有关物质质量浓度点分别作为该有关物质的检测限（LOD）和定量限（LOQ）。结果如表 1 所示，**1**、杂质 A 和杂质 D 的 LOD 为 0.2 μg/mL；杂质 B 的 LOD 为 0.5 μg/mL；杂质 C 的 LOD 为 0.1 μg/mL；**1** 和各有关物质的 LOQ 为 0.4 ～ 2.0 μg/mL。

2.5.3 线性试验

精密量取“**2.2**”项下的 **1** 对照品贮备液和混合有关物质对照品贮备液，用甲醇逐级定量稀释，制成 **1** 质量浓度分别为 5、10、20、25、50、100 μg/mL 的 **1** 线性试验溶液，杂质 A 和杂质 D 质量浓度分别为 0.5、1、2、10、20、40 μg/mL，杂质 B 质量浓度分别为 2、5、10、20、40、60 μg/mL，杂质 C 质量浓度分别为 0.4、1、2、10、20、40 μg/mL 的有关物质线性试验溶液。分别按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，以各峰面积（*A*）为纵坐标、相应质量浓度（*c*）为横坐标，进行线性回归。结果如表 1 所示，各有关物质和 **1** 在相应质量浓度范围内与峰面积呈良好线性关系，可用于定量分析。

2.5.4 回收率试验

精密称取 **1** 片（批号 M1145）细粉适量，共 9 份，随机分为 3 组，每组分别加入低、中、高 3 种不同质量浓度的混合有关物质对照品溶液，加甲醇超声溶解后定容，使各组有关物质质量浓度分别为 2、4、10 μg/mL，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定。结果显示，4 种有关物质在低、中、高 3 个浓度下的回收率（*n*=3）结果为 96.0%～ 104.2%，RSD 均小于 3.0%，表明方法准确度良好。

2.5.5 精密度试验和稳定性试验

将质量浓度为 100、500、2 000 μg/mL 的 **1** 对照品溶液和质量浓度为 2、10、40 μg/mL 的混合有关物质对照品溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，连续进样 6 针，记录各峰面积。结果显示，**1** 与各有关物质在 3 个质量浓度水平下峰面积的 RSD（*n*=6）为 0.16%～ 2.74%，均小于 3.0%，说明仪器精密度良好。

取以上 3 个质量浓度水平的 **1** 与有关物质对照品混合溶液，连续 3 d 进样，每天连续 3 针，记录各峰面积。结果显示，**1** 与各有关物质在 3 个质量浓度水平下峰面积的 RSD（*n*=9）为 0.91%～ 2.75%，均小于 3.0%，说明样品稳定性良好。

2.6 样品测定

取 7 批 **1** 片剂和 3 批 **1** 原料药样品，按“**2.2**”项下方法配制供试品溶液，平行配制 2 份，过 0.22 μm 滤膜后，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定。结果如图 4 所示，3 家企业的 10 批样品中均未检出杂质 A、杂质 B、杂质 C 和杂质 D，且没有检出其他未知有关物质。**1** 原料药和 **1** 片剂的杂质检测结果一致，与“**2.4**”项下的破坏性试验结果也吻合，说明 **1** 原料药和 **1** 片剂在正常条件下较为稳定，不易降解。

3 讨论

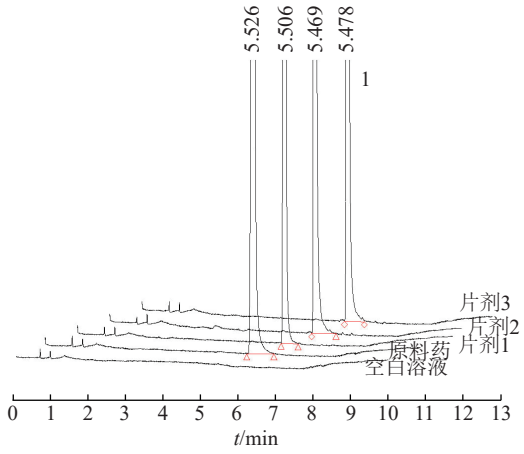
3.1 检测波长的选择

经 PAD 检测器对目标化合物进行扫描，**1** 的最大吸收波长在 245.6 nm，杂质 A、杂质 B、杂质 C 和杂质 D 的最大吸收波长分别在 238.5、219.7、237.4、245.6 nm，综合考虑不同波长处的吸光度值

表 1　1 及其 4 种有关物质的线性试验、LOD 和 LOQ 结果

Tab.1　Linearity Test, LODs and LOQs Results of **1** and Its Four Related Impurities

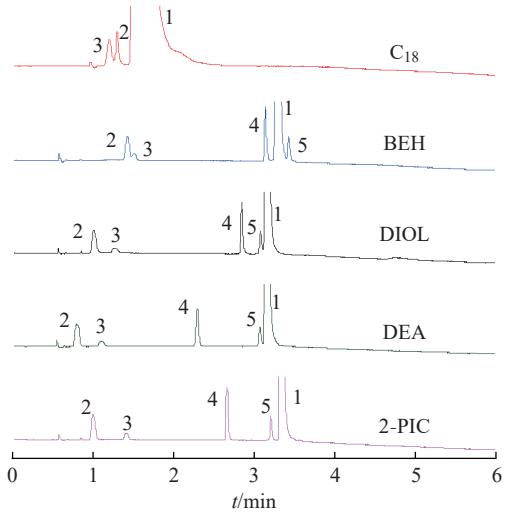
化合物	LOD/（μg·mL^{-1}）	LOQ/（μg·mL^{-1}）	线性范围/（μg·mL^{-1}）	线性方程	R^2
1	0.2	0.5	5～100	*A*=4 576.3*c*+595.1	0.999 9
杂质A	0.2	0.5	0.5～40	*A*=8 230.7*c*+1 921.1	0.999 5
杂质B	0.5	2.0	2～60	*A*=1 930.4*c*+605.7	0.999 7
杂质C	0.1	0.4	0.4～40	*A*=8 866.5*c*+1 567.9	0.999 9
杂质D	0.2	0.5	0.5～40	*A*=4 312.0*c*+875.2	0.999 7



1—**1**。

图 4 样品测定结果

Fig.4 Sample Test Results



1—**1**；2—杂质 A；3—杂质 B；4—杂质 C；5—杂质 D。

图 5 1 及其 4 种有关物质在 5 种色谱柱上的 SFC-PDA 色谱图

Fig.5 SFC-PDA Chromatograms of **1** and Its Four Related Substances on Five Columns

和灵敏度，选择 240 nm 作为该方法的检测波长。

3.2 色谱条件的优化

3.2.1 色谱柱的筛选

研究选用高密度二醇基柱［DIOL，Waters ACQUITY UPC^2 Torus DIOL（3.0 mm×100 mm，1.7 μm）］、二乙胺柱［DEA，Waters ACQUITY UPC^2 Torus DEA（3.0 mm×100 mm，1.7 μm）］、2- 氨基吡啶柱［2-PIC，Waters ACQUITY UPC^2 Torus 2-PIC（3.0 mm×100 mm，1.7 μm）］、C_{18} 柱［Waters XBridge C_{18}（4.6 mm×100 mm，2.5 μm）］和亚乙基桥杂化颗粒柱［BEH，Waters ACQUITY UPC^2 BEH（3.0 mm×100 mm，1.7 μm）］5 种不同极性的色谱柱进行考察。采用初始色谱条件：流动相 A 为 sCO_2，B 为甲醇，梯度洗脱；检测波长 240 nm；流速 1.0 mL/min；柱温 40 ℃；样品室温度 10 ℃；背压 13.8 MPa；进样量 1 μL。对系统适用性溶液中 5 个组分进行分离，得到如图 5 所示的色谱图。结果显示，在 DIOL、DEA 和 2-PIC 柱上，化合物出峰顺序一致，出峰时间相近；其中 2-PIC 柱上杂质 D 与 **1** 的分离情况比在其他 2 种色谱柱上更好，故最终选择 2-PIC 柱即 2- 氨基吡啶柱作为优化色谱柱。

3.2.2 流动相的选择

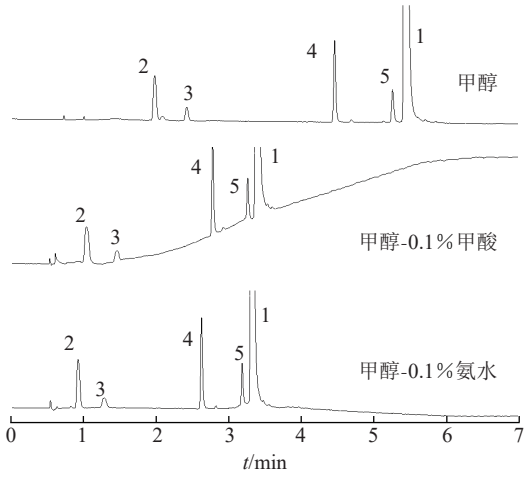
首先对改性剂（甲醇、乙醇、异丙醇和乙腈）进行考察。结果显示，以甲醇为改性剂的分离效果最好。其次对添加剂（0.1%氨水和 0.1%甲酸）进行考察，结果如图 6 所示，采用酸和碱作为添加剂时，化合物的保留时间和峰形均没有显著变化，添加 0.1%甲酸时基线严重漂移，故最终以无添加剂的甲醇作为该方法改性剂。

3.2.3 背压考察

背压考察范围为 11.0 ～ 17.2 MPa。结果显示，当背压升高时，流动相密度升高、洗脱能力增大、保留时间缩短，各目标峰之间分离度无明显改变（图 7）。但是杂质 A 与晚于其出峰的未知降解产物之间的分离度随背压升高而增大，在 11.0 MPa 时两峰基本重合，升高至 15.2 MPa 时已完全分离。此外，背压的升高会使流动相的扩散性降低、峰变宽，在色谱图中除杂质 C 外，其余化合物均出现不同程度峰高降低的现象。综合考虑分离度、柱效和灵敏度，选择 13.8 MPa 为方法优化后的背压。

3.2.4 柱温考察

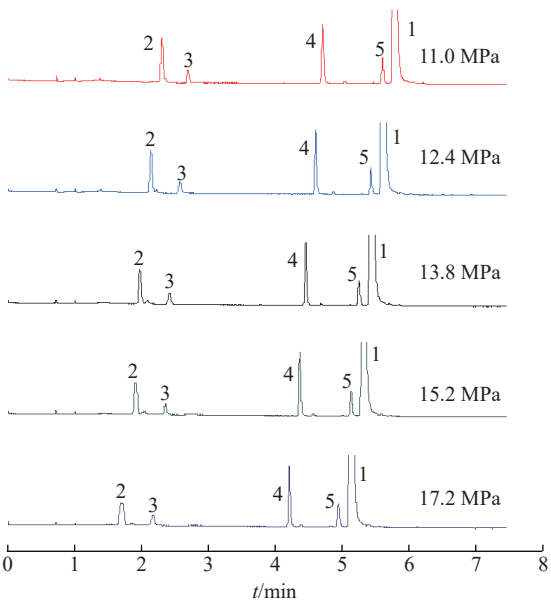
考察柱温为 35 ～ 55 ℃时对分离测定的影响，结果如图 8 所示。柱温升高，流动相的密度和黏性降低，洗脱能力降低，各化合物的保留时间延长。温度越高，杂质 D 与 **1** 峰之间分离度越小，表明低



1—**1**；2—杂质 A；3—杂质 B；4—杂质 C；5—杂质 D。

图 6　不同添加剂在 2-PIC 色谱柱上对 1 及其 4 种有关物质分离的影响

Fig.6　Effects of Different Additives on Separation of **1** and Its Four Related Substances on 2-PIC Column

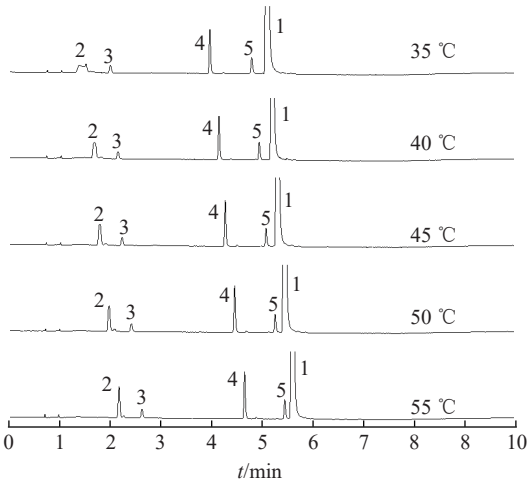


1—**1**；2—杂质 A；3—杂质 B；4—杂质 C；5—杂质 D。

图 7　背压变化对 1 及其 4 种有关物质的分离影响

Fig.7　Effect of Back Pressure on the Separation of **1** and Its Four Related Substances

柱温有利于色谱峰的分离；但是柱温越低，杂质 A 峰的峰形越差，影响柱效和峰面积的定量测定。综合考虑分离度、柱效和灵敏度，选择 50 ℃为该方法的优化柱温。



1—**1**；2—杂质 A；3—杂质 B；4—杂质 C；5—杂质 D。

图 8　柱温变化对 1 及其 4 种有关物质的分离影响

Fig.8　Effect of Column Temperature on the Separation of **1** and Its Four Related Substances

3.3　小结

本研究建立了一种 SFC 分析方法检测 TKI 抗肿瘤药 **1** 中可能存在的 4 种有关物质，并对改性剂、色谱柱、柱温和背压等色谱条件进行了考察。最终建立的方法中仅使用 2%～20%的甲醇作为改性剂，成功在 6 min 内将 **1** 及其 4 种有关物质完全分离，具有分析时间短、分离效率高、有机试剂用量少等优点。方法学验证结果表明，建立的 SFC 方法准确度和精密度良好，可为 **1** 原料药和 **1** 片剂的质量控制提供快速、高效且绿色环保的方法。本研究为 SFC 方法用于有关物质分析作出了一种新尝试和探索。

参考文献：

[1]　YU H, RIELY G, LOVLY C. Therapeutic strategies utilized in the setting of acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors [J]. *Clin Cancer Res*, 2014, **20**(23): 5898-5907.

[2]　原友志, 唐家邓, 岑均达. 盐酸厄洛替尼合成路线图解[J]. 中国医药工业杂志, 2012, **43**(2): 153-156.

[3]　李昌亮, 狄　斌, 马晓宁, 等. 高效液相色谱法检测盐酸厄洛替尼片中有关物质[J]. 中南药学, 2015, **13**(6): 644-647.

[4]　梁晓东, 李泉妙, 范国涛, 等. 盐酸厄洛替尼及其片剂中5

种有关物质的定性及定量分析[J]. 药物分析杂志, 2015, **35**(5): 927-933.

[5] SUGA T, SHIMADA M, MAEKAWA M, *et al*. A rapid and simple UHPLC-UV method for quantitative determination of erlotinib and its active metabolite OSI-420 in human serum, and its application in a non-small cell lung cancer patient [J]. *Chromatography*, 2017, **38**(3): 95-100.

[6] RODRIGUEZ J, CASTANEDA G, MUNOZ L, *et al*. Simultaneous determination of erlotinib and metabolites in human urine using capillary electrophoresis [J]. *Electrophoresis*, 2014, **35**(10): 1489-1495.

[7] SAITO M. History of supercritical fluid chromatography: Instrumental development [J]. *J Biosci Bioeng*, 2013, **115**(6): 590-599.

[8] 金 薇, 张少敏, 乐 健, 等. 超临界流体色谱法分离分析格列美脲中顺式异构体杂质[J]. 中国药学杂志, 2021, **56**(5): 411-416.

[9] ZHANG S, JIN W, YANG Y. Simultaneous identification and determination of eleven tyrosine kinase inhibitors by supercritical fluid chromatography- mass spectrometry [J]. *Anal Methods*, 2019, **11**: 2211-2222.

(上接第47页)

参考文献：

[1] 陈 璐，童荣生，吕 晶. 降眼压新药—曲伏前列素[J]. 中国药房, 2008, **19**(25): 3.

[2] Yonsung Fine Chemical Co., Ltd. Process for preparing prostaglandin derivatives: WO, 2010104344A2 [P]. 2010-09-16.

[3] ASWATHANARAYANAPPA C, SRINIVAS P V, SOUNDARARAJAN T G, *et al*. A novel process for the preparation of prostaglandins and intermediates thereof: WO, 2011055377A1 [P]. 2011-05-12.

[4] ZHU K J, JIANG M F, YE B J, *et al*. A unified strategy to prostaglandins: chemoenzymatic total synthesis of cloprostenol, bimatoprost, $PGF_{2\alpha}$, fluprostenol, and travoprost guided by biocatalytic retrosynthesis [J]. *Chem Sci*, 2021, **12**(30): 10362-10370.

[5] ALBERT M, BERGER A, DE SOUZA D, *et al*. Improved process for the production of prostaglandins and prostaglandin analogs: EP, 2143712A1 [P]. 2010-01-13.

[6] MAŁGORZATA K, CHODYŃSKI M, ANNA O, *et al*. A novel convergent synthesis of the potent antiglaucoma agent travoprost [J]. *Molecules*, 2017, **22**(2): 217.