

中图分类号: R917; R927 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)20-0095-03
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.20.021



高效液相色谱法测定盐酸安罗替尼胶囊中主成分含量*

谢瑞杰¹, 黄蘭岚², 陆 晖¹, 陈仕鹏¹, 黄月灵², 卓思珺¹, 黄敏州¹

(1. 广西壮族自治区柳州市人民医院, 广西 柳州 545006; 2. 广西医科大学药学院, 广西 南宁 530021)

摘要:目的 建立测定盐酸安罗替尼胶囊中主成分含量的高效液相色谱(HPLC)法。方法 色谱柱为 Waters SunFire C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为 甲醇-乙腈-25 mmol/L 磷酸二氢钾(15:30:55, V/V/V), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 242 nm, 柱温为 40 °C, 进样量为 20 μL。结果 盐酸安罗替尼质量浓度在 24.73~395.60 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($r=0.9999, n=6$); 精密度、稳定性、重复性试验结果的 RSD 均小于 2.0%; 平均加样回收率为 97.90%, RSD 为 1.17%($n=6$)。结论 该方法操作简单、出峰时间短、准确度高、重复性好, 可用于盐酸安罗替尼胶囊主成分的含量测定。

关键词: 盐酸安罗替尼; 高效液相色谱法; 含量测定

Determination of Principal Component in Anlotinib Hydrochloride Capsules by HPLC

XIE Ruijie¹, HUANG Lanlan², LU Hui¹, CHEN Shipeng¹, HUANG Yueying², ZHUO Sijun¹, HUANG Minzhou¹

(1. Liuzhou People's Hospital, Liuzhou, Guangxi, China 545006; 2. School of Pharmacy, Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi, China 530021)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for determining the principal component in Anlotinib Hydrochloride Capsules. **Methods** The chromatographic column was Waters SunFire C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was methanol-acetonitrile-25 mmol/L potassium dihydrogen phosphate (15:30:55, V/V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 242 nm, the column temperature was 40 °C, and the injection volume was 20 μL. **Results** The linear range of anlotinib hydrochloride was 24.73-395.60 μg/mL ($r=0.9999, n=6$). The RSDs of precision, stability and repeatability tests were all lower than 2.0%. The average recovery rate of anlotinib hydrochloride was 97.90%, with an RSD of 1.17% ($n=6$). **Conclusion** This method is simple, fast, accurate and repeatable, which can be used for the determination of the main component of Anlotinib Hydrochloride Capsules.

Key words: anlotinib hydrochloride; HPLC; content determination

* 基金项目: 广西壮族自治区中医药管理局科研项目[GXZY20210227]; 广西壮族自治区药品监督管理局科研项目[桂药科(2020)Z自选01号]; 广西壮族自治区柳州市科技计划项目[2021CBC0114]。

第一作者: 谢瑞杰, 女, 硕士研究生, 副主任药师, 研究方向为临床药学、药物分析及临床药物试验质量管理规范, (电子信箱) xierj1001@163.com。

苦及 5-O-甲基维斯阿米醇苷含量[J]. 中国药业, 2017, 26(11):22-24.

[4] 申丽莎, 杨巧虹, 杨帆, 等. 高效液相色谱法同时测定射麻口服液中盐酸麻黄碱和盐酸伪麻黄碱含量[J]. 中国药业, 2021, 30(17):79-81.

[5] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020:210-211, 333-334.

[6] 崔雅慧, 金志国. 高效液相色谱法测定止咳灵注射液中盐酸麻黄碱、丁溴东莨菪碱和苦杏仁苷的含量[J]. 中国药业, 2020, 29(13):71-73.

[7] 刘易, 龚莹, 郭磊, 等. 中成药中甾苷及差向异构体的成分分析[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(6):1011-1019.

[8] 汤庆发, 谢颖, 陈飞龙, 等. 苦杏仁中苦杏仁苷的存在形式及其影响因素[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(8):107-109.

[9] 辛洁萍, 王海丽, 王敏, 等. 炒苦杏仁炮制原理研究及对炒苦杏仁质量标准的思考[J]. 中华中医药杂志, 2020, 31(3):94-98.

[10] 许秀琼, 刘建博, 张志强, 等. HPLC法测定苦杏仁苷两种差向异构体的含量[J]. 中国新药与临床药理, 2019, 30(1):94-98.

[11] 肖雄, 魏蕙珍, 张丹, 等. HPLC测定苦杏仁、桃仁、郁李仁中D-苦杏仁苷的含量[J]. 江西中医药大学学报, 2019, 31(3):76-79.

[12] 林史珍, 杜方敏, 林良静, 等. 模拟破坏苦杏仁和桃仁品质及酶活性变化研究[J]. 中国药业, 2019, 28(15):5-7.

[13] 徐东, 许秀琼, 王硕辉, 等. 苦杏仁苷两种差向异构体的稳定性研究[J]. 中国新药与临床药理, 2021, 36(7):4249-4252.

[14] 刘睿, 王宁, 刘志辉. RP-HPLC同时测定宣肺止咳口服液中盐酸麻黄碱、盐酸伪麻黄碱及苦杏仁苷含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(16):92-93.

[15] 刘斌. HPLC-DAD同时测定风热感冒颗粒中活性成分的含量[J]. 中国现代中药, 2021, 23(1):147-152.

(收稿日期:2023-09-15;修回日期:2024-04-28)

盐酸安罗替尼为多靶点受体酪氨酸激酶抑制剂,抗血管生成作用较强,已批准(或附条件批准)用于治疗肺癌、软组织肉瘤、甲状腺癌等疾病^[1],其在晚期或转移性肝癌、胃癌、胰腺癌、食管癌和结肠癌中的疗效也已得到证实^[2-5]。目前全球药典均未收录其质量标准,已查到的文献也仅有其血药浓度的测定方法^[6-13],尚未见含量测定方法的报道。在此,按2020年版《中国药典(四部)》要求^[14],建立了测定盐酸安罗替尼胶囊中盐酸安罗替尼含量的高效液相色谱法。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters e2695型液相色谱仪(美国Waters公司);XH-C型旋涡混合器(上海医大仪器有限公司);CP225D型电子天平(德国Sartorius公司,精度为0.01 mg);CQ-250型超声仪(必能信超声<上海>有限公司);PALL-Cascade-I型超纯水仪(美国PALL公司)。

1.2 试药

盐酸安罗替尼胶囊(批号分别为230316183,220615183,230315183)及其安慰剂(批号为221105183),均购于正大天晴药业集团股份有限公司,规格均为每粒10 mg;盐酸安罗替尼对照品(中国食品药品检定研究院,批号为420044-201901,含量98.9%);甲醇、乙腈均为色谱纯,磷酸二氢钾为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Waters SunFire C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-乙腈-25 mmol/L磷酸二氢钾(15:30:55, V/V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:242 nm;柱温:40 °C;进样量:20 μL。

2.2 溶液制备

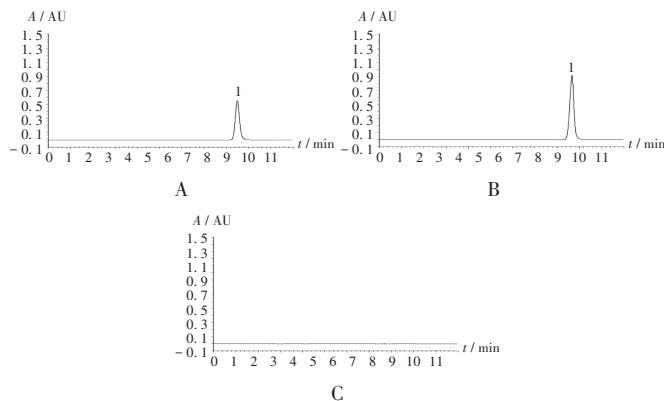
对照品溶液:取盐酸安罗替尼对照品100 mg,精密称定,置25 mL容量瓶中,用甲醇溶解并制成含盐酸安罗替尼3.956 mg/mL的对照品贮备液;精密量取适量,用甲醇稀释并制成含盐酸安罗替尼197.80 μg/mL的对照品溶液,摇匀,即得。

供试品溶液:取10粒样品内容物,精密称定,研细,取粉末适量(约相当于盐酸安罗替尼2.5 mg),精密称定,置25 mL容量瓶中,加甲醇超声(功率250 W、频率40 kHz,下同)溶解并定容,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

阴性对照品溶液:称取盐酸安罗替尼胶囊安慰剂内容物适量,精密称定,置25 mL容量瓶中,加甲醇超声溶解并定容,摇匀,过滤,取续滤液,即得。

2.3 方法学考察

专属性试验:取2.2项下对照品溶液、供试品溶液、阴性对照品溶液适量,按2.1项色谱条件进样。结果理



A. 对照品溶液 B. 供试品溶液 C. 阴性对照品溶液

图1 高效液相色谱图

A. Reference solution B. Test solution C. Negative reference solution

Fig. 1 HPLC chromatograms

论板数按盐酸安罗替尼峰计大于8 000,阴性对照无干扰,表明专属性良好。色谱见图1。

线性关系考察:精密量取2.2项下对照品贮备液0.125, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2 mL,分别置20 mL容量瓶中,用甲醇定容,摇匀,得系列对照品溶液,分别按2.1项下色谱条件进样测定,以待测成分质量浓度(μg/mL, X)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 165\ 765X - 229\ 219$ ($r = 0.999\ 9, n = 6$)。结果表明,盐酸安罗替尼质量浓度在24.73~395.60 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

精密度试验:取2.2项下对照品溶液,按2.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果的RSD为0.58% ($n = 6$),表明仪器精密度良好。

稳定性试验:取供试品溶液(批号为220615183),分别于室温放置0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h时按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果的RSD为0.78% ($n = 7$),表明供试品溶液室温放置12 h内基本稳定。

重复性试验:取同一批样品(批号为220615183),按2.2项下方法平行制备6份供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算样品含量。结果盐酸安罗替尼平均含量为5.51%, RSD为1.25% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取已知含量样品(批号为230316183)粉末(约相当于盐酸安罗替尼2.5 mg)6份,精密称定,分别置25 mL容量瓶中,分别精密加入对照品贮备液0.575 mL,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率。结果见表1。

耐用性试验:取2.2项下供试品溶液(批号为230316183),保持其他色谱条件不变,分别改变流速、柱温、检测波长、流动相比例(仅调整本文流动相中

表1 加样回收试验结果 ($n = 6$)

Tab. 1 Results of the recovery test ($n = 6$)

| 样品含量(mg) | 加入量(mg) | 测得量(mg) | 回收率(%) | \bar{X} (%) | RSD(%) |
|----------|---------|---------|--------|---------------|--------|
| 2.60 | 2.30 | 4.87 | 98.70 | 97.90 | 1.17 |
| 2.47 | 2.30 | 4.69 | 96.52 | | |
| 2.39 | 2.30 | 4.61 | 96.52 | | |
| 2.48 | 2.30 | 4.75 | 98.70 | | |
| 2.49 | 2.30 | 4.74 | 97.83 | | |
| 2.52 | 2.30 | 4.80 | 99.13 | | |

表2 耐用性试验结果

Tab. 2 Results of the durability test

| 色谱条件 | 含量(%) | RSD(%) | 色谱条件 | 含量(%) | RSD(%) | |
|------------|-------|--------|----------|-------|--------|------|
| 流速(mL/min) | 0.9 | 95.72 | 检测波长(nm) | 238 | 100.23 | |
| | 1.0 | 98.35 | | 242 | 98.35 | 1.08 |
| | 1.1 | 97.02 | | 247 | 98.40 | |
| 柱温(°C) | 35 | 98.39 | 流动相比 | 10:35 | 96.34 | |
| | 40 | 98.35 | | 15:30 | 98.35 | 1.30 |
| | 45 | 98.24 | | 20:25 | 96.02 | |

甲醇和乙腈的比例)。结果表明,各色谱条件小范围变动时样品含量无明显变化,表明耐用性良好。详见表2。

2.4 样品含量测定

分别取3批样品,均平行2份,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图,并计算样品含量。结果见表3。

表3 样品含量测定结果(%, $n = 2$)

Tab. 3 Results of the content determination of anlotinib hydrochloride in samples (%, $n = 2$)

| 批号 | 1 | 2 | 3 | 4 | \bar{X} | RSD |
|-----------|------|------|------|------|-----------|------|
| 230316183 | 5.35 | 5.37 | 5.48 | 5.37 | 5.39 | 1.10 |
| 230315183 | 5.46 | 5.48 | 5.40 | 5.38 | 5.43 | 0.88 |
| 220615183 | 5.55 | 5.50 | 5.40 | 5.40 | 5.46 | 1.37 |

3 讨论

预试验中对色谱条件进行了考察。溶剂方面,文献[5-9]中均用甲醇溶解盐酸安罗替尼,故本研究也以此作为溶剂;波长方面,经全波长扫描,盐酸安罗替尼在235.6 nm波长处有最大吸收,参考文献[10],最终选择242 nm为测定波长;柱温方面,考察了35, 40, 45 °C,结果为35 °C时有磷酸盐结晶析出,而后两柱温检测结果无明显差异,故选择40 °C;流动相方面,首先考察了盐酸安罗替尼采用甲醇-水梯度洗脱,根据出峰时间及峰形调整流动相比,因出峰时间较晚,加用乙腈调节极性,使出峰时间控制在8.5 min左右。此外,添加三乙胺、磷酸盐缓冲液等改善分离效果和峰形,结果表明,在水中加入磷酸二氢钾时峰形效果较好,各参数都满足系统适用性实验要求。

综上所述,本研究中建立的测定盐酸安罗替尼胶囊中主成分含量的HPLC法,与各自批号的检验报告书中含量测定值接近,说明该方法溶解完全,准确度高,且操作简单,重复性好,可用于盐酸安罗替尼胶囊的质量控制。

参考文献

- [1] 宋茵茵,徐文峰,胡欣,等.我国附条件批准上市抗肿瘤药物探讨[J].中国药业,2022,31(19):12-18.
- [2] 孙魏,邹玺,张微,等.安罗替尼联合替吉奥二线治疗复发转移性食管鳞癌的临床疗效[J].南方医科大学学报,2021,41(2):250-255.
- [3] 赵秧,陈倩,康马飞,等.安罗替尼治疗晚期胰腺癌疗效观察[J].中国现代医生,2020,58(1):121-123.
- [4] 戴科军,卢绪菁,周希法,等.安罗替尼胶囊联合卡培他滨片治疗结直肠癌患者的临床研究[J].中国临床药理学杂志,2022,38(7):631-634.
- [5] SUN Y, ZHOU A, ZHANG W, et al. Anlotinib in the treatment of advanced hepatocellular carcinoma: an open label phase II study (ALTER-0802 study)[J]. Hepatology Int, 2021, 15(3): 621-629.
- [6] 陆璐,徐宏江,卢琴,等.高效液相色谱-质谱联用法测定人血浆中安罗替尼浓度[J].中国临床药理学杂志,2019,35(21):2759-2763.
- [7] 周利娟,武正华,汪硕闻,等.人血浆中安罗替尼质量浓度测定方法的建立及其应用[J].中国药房,2021,32(11):1356-1361.
- [8] 张莉,江洁美,檀廷飞,等.肺癌患者血浆中安罗替尼浓度与不良反应的相关性研究[J].中国医院药学杂志,2022,42(18):1876-1881.
- [9] 沈琦,刘娟,程敏毓,等.用LC-MS/MS法测定晚期实体瘤患者血浆中安罗替尼的浓度[J].中国临床药理学杂志,2023,39(14):2089-2093.
- [10] LI ZJ, CHEN HS, SHI J, et al. A novel method for the quantification of anlotinib in human plasma using two-dimensional liquid chromatography[J]. Biomed Chromatogr, 2021, 35(12):e5218.
- [11] ZHANG J, WANG WZ, DU JQ, et al. A rapid and sensitive UPLC-MS/MS method for determination of anlotinib in plasma and dried blood spots: Method development, validation and clinical application[J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2022, 36(21):e9372.
- [12] 檀廷飞.肺癌患者细胞色素P450基因多态性与安罗替尼血药浓度及不良反应的相关性研究[D].合肥:安徽医科大学,2022.
- [13] 王文箜. UPLC-MS/MS法同时测定人血浆和干血斑中七种肺癌靶向药物浓度及其临床应用[D].郑州:郑州大学,2022.
- [14] 国家药典委员会.中华人民共和国药典(四部)[M].北京:中国医药科技出版社,2020:137-138.

(收稿日期:2023-09-21;修回日期:2024-05-22)