中图分类号：R917；R927　　文献标志码：A　　文章编号：1006－4931(2025)10－0087－05
doi:10.3969/j.issn.1006－4931.2025.10.018

苹果酸卡博替尼 4 种潜在基因毒性杂质含量测定*

王潞娜，王红芳，游蓉丽，宋小飞，宋荧荧，李　昆△

（山西振东制药股份有限公司，山西 长治　047100）

摘要：目的　建立同时测定苹果酸卡博替尼 4 种潜在基因毒杂质含量的高效液相色谱法。**方法**　色谱柱为 Agilent ZORBAX SB－C_{18} 柱(250 mm×4.6 mm，5 μm)，流动相为 10 mmol/L 磷酸氢二钾溶液(用磷酸调 pH 至 5.5)－乙腈(梯度洗脱)，流速为 1.0 mL/min，检测波长为 220 nm，柱温为 30 ℃，进样量为 20 μL。**结果**　杂质 A、B、C、D 质量浓度分别在 0.103 0～10.300 0 μg/mL、0.100 5～10.050 0 μg/mL、0.104 0～10.400 0 μg/mL、0.100 4～10.040 0 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好(r=1.000 0)；定量限分别为 0.103 0，0.100 5，0.104 0，0.100 4 μg/mL；检测限分别为 0.030 9，0.030 2，0.031 2，0.030 1 μg/mL；精密度、稳定性、重复性试验结果的 *RSD* 均小于 4.0%；平均加样回收率分别为 97.50%，94.32%，100.05%，97.83%，*RSD* 分别为 1.68%，3.64%，2.65%，1.57%(n=9)。**结论**　所建方法操作简便，结果准确可靠，专属性强、重现性好，可用于苹果酸卡博替尼 4 种潜在基因毒性杂质的质量控制。

关键词：苹果酸卡博替尼；基因毒性杂质；含量测定

Content Determination of Four Potential Genotoxic Impurities in Cabozantinib Malate

WANG Luna, WANG Hongfang, YOU Rongli, SONG Xiaofei, SONG Yingying, LI Kun

(Shanxi Zhendong Pharmaceutical Co., Ltd., Changzhi, Shanxi, China　047100)

Abstract: Objective　To establish high performance liquid chromatography method for simultaneous determination of four potential genotoxic impurities in cabozantinib malate. **Methods**　The chromatography column was Agilent ZORBAX SB－C_{18} column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was 10 mmol/L dipotassium hydrogen phosphate solution (pH adjusted to 5.5 with phosphoric acid)－acetonitrile (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 220 nm, the column temperature was 30 ℃, and the injection volume was 20 μL. **Results**　The linear ranges of impurities A, B, C, and D were in the range of 0.103 0－10.300 0 μg/mL, 0.100 5－10.050 0 μg/mL, 0.104 0－10.400 0 μg/mL, 0.100 4－10.040 0 μg/mL, respectively (r=1.000 0). The limits of quantification were 0.103 0, 0.100 5, 0.104 0, 0.100 4 μg/mL, respectively. The limit of detection were 0.030 9, 0.030 2, 0.031 2, 0.030 1 μg/mL, respectively. The *RSD*s of precision, stability and repeatability tests were all lower than 4.0%. The average recovery rates of the above four components were 97.50%, 94.32%, 100.05%, 97.83%, with

*基金项目：山西省科学技术厅中试基地项目[2022D100014070417320341163987]。
第一作者：王潞娜，女，大学本科，工程师，研究方向为药品研发与质量评价，(电子信箱)wangluna@zdjt.com。
△通信作者：李昆，男，硕士，研究方向为药事管理及医药政策，(电子信箱)likun@zdjt.com。

析及健康风险评估[J]. 特产研究，2023，45(5)：134－137.
[8] 王海娟，倪　琳，梁一博，等. 质谱法结合化学计量学分析甘肃产党参中的无机元素及其健康风险评估[J]. 华西药学杂志，2023，38(5)：556－563.
[9] 卜　桐，于　晓，张欣芮，等. 金银花中重金属污染分析及其健康风险评估[J]. 中国中药杂志，2022，47(3)：643－650.
[10] 韦　露，马秀梅，覃树先，等. 三种党参不同炮制品对脾虚模型大鼠肠道菌群的影响[J]. 湖北农业科学，2021，60(18)：125－128.
[11] 王清浩，王　云，张　雪，等. 党参产地加工及炮制研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志，2018，24(22)：206－214.
[12] 赵春雪，李　响，明　鑫，等. 药食两用资源川党参重金属含量的测定及其健康风险评估[J]. 成都大学学报(自然科学版)，2023，42(4)：348－353.
[13] 杨恩慈，王晓园，李志梅，等. 温州产山药中尿囊素及重金属含量的测定[J]. 中医药导报，2023，29(2)：54－58.
[14] 梅　婷，周海泳. 常见野生食用菌重金属含量分析及安全评价[J]. 中国果菜，2023，43(12)：34－38.
[15] 窦亚洁，刘　慧，李晓萌，等. 中药中外源性有害物的残留现状及风险评估的研究进展[J]. 中草药，2023，54(2)：396－407.
[16] 贾艾玲，王红梅，李玲玲. 电感耦合等离子体质谱法检测阿胶中 6 种有害元素的含量[J]. 药物分析杂志，2012，32(3)：434.
[17] 梁键谋，程　磊，王　芸，等. 电感耦合等离子体－质谱法测定硫酸氢氯吡格雷(Ⅰ型)中元素杂质的残留量[J]. 药物分析杂志，2021，41(10)：1734－1738.
[18] 郑　明，金情政，王　也，等. ICP－MS 测定衢枳壳中 26 种无机元素[J]. 中国现代应用药学，2020，37(12)：1493－1497.
[19] 王　玉，郑淑凤，贾艾玲，等. ICP－MS 法检测富马酸亚铁中 7 种元素杂质[J]. 药物分析杂志，2023，43(8)：1423－1428.

(收稿日期：2024－02－01；修回日期：2024－11－29)

*RSD*s of 1.68%, 3.64%, 2.65%, 1.57% (n = 9) respectively. **Conclusion** The established method is easy, accurate and reliable, which can be used to control the quality of four potential genotoxic impurities in cabozantinib malate.

Key words: cabozantinib malate; genotoxic impurities; content determination

卡博替尼(CBZ)为多靶点酪氨酸激酶抑制剂(TKI),主要通过抑制血管内皮生长因子受体(VEGFR)和肝细胞生长因子受体(MET)[1-2],抑制肿瘤增殖、转移和血管生成[3-4]。METEOR试验[5-6]和CABOSUN试验[7]均证实了卡博替尼治疗囊性肾癌(RCC)的疗效,但腹泻、疲劳、食欲下降、高血压等常见不良反应[8-11]可能限制了其临床应用。卡博替尼是由Exelixis制药公司开发的口服胶囊,具有生物利用度高、血脑屏障透过率高和清除半衰期长等优点[12],主要用于治疗进展性、转移性甲状腺髓样癌(MTC)[13-14]及晚期RCC患者的一线/二线治疗[15-17]。起始物料对氨基苯酚制备过程中产生的副产物在最终成品中仍有残留风险。为此,本研究中拟建立高效液相色谱(HPLC)法测定苹果酸卡博替尼中4种潜在基因毒杂质,即杂质A(含硝基苯警示结构)、杂质B(含苯胺警示结构)、杂质C(含硝基苯警示结构)、杂质D(潜在工艺已知基因毒性杂质),以为临床安全用药提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1260型高效液相色谱仪,配有二极管阵列检测器(美国Agilent公司);TB-215D型电子分析天平(精度为0.1 mg)、PB-10型pH计,均购自北京赛多利斯科学仪器有限公司;KQ-500DB型数控超声波清洗器(上海昆山市超声仪器有限公司);Milli-Q® IQ 7000型超纯和纯水净化系统(德国Merck公司)。

1.2 试药

苹果酸卡博替尼(批号分别为230701S、230801S、231201S、240201S、240202S),杂质A对照品(批号为WRS-2310-017,含量100.0%),杂质B对照品(批号为WRS-2310-016,含量100.0%),杂质C对照品(批号为WRS-2310-018,含量99.7%),杂质D对照品(批号为WRS-2310-015,含量99.9%),均购自山西振东制药股份有限公司;磷酸氢二钾、磷酸、甲醇、乙腈均为色谱纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent ZORBAX SB-C_{18}柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:10 mmol/L磷酸氢二钾(用磷酸调pH至5.5, A)-乙腈(B),梯度洗脱(程序见表1);流速:1.0 mL/min;检测波长:220 nm;柱温:30 ℃;进样量:20 μL。

表1 梯度洗脱程序

Tab. 1 Gradient elution program

t(min)	A(%)	B(%)	t(min)	A(%)	B(%)
0	95	5	55	40	60
5	95	5	56	95	5
35	50	50	60	95	5
42	40	60			

2.2 溶液制备

取各杂质对照品约10 mg,精密称定,置10 mL容量瓶中,加甲醇超声(功率500 W、频率40 kHz,下同)使溶解,并定容,摇匀,即得单一杂质对照品贮备液;各精密量取0.1 mL,置10 mL容量瓶中,加甲醇定容,摇匀,即得单一杂质对照品母液;各精密量取1.2 mL,置10 mL容量瓶中,加甲醇定容,摇匀,即得单一杂质对照品溶液。取样品、杂质A、杂质B、杂质C及杂质D对照品各适量,加甲醇超声使溶解,并稀释制成每1 mL含样品5 mg、杂质A 0.35 μg、杂质B 1.2 μg、杂质C 0.35 μg、杂质D 4.2 μg的系统适用性溶液。称取样品约50 mg,精密称定,置10 mL容量瓶中,加甲醇超声使溶解,并定容,摇匀,即得供试品溶液。

2.3 方法学考察

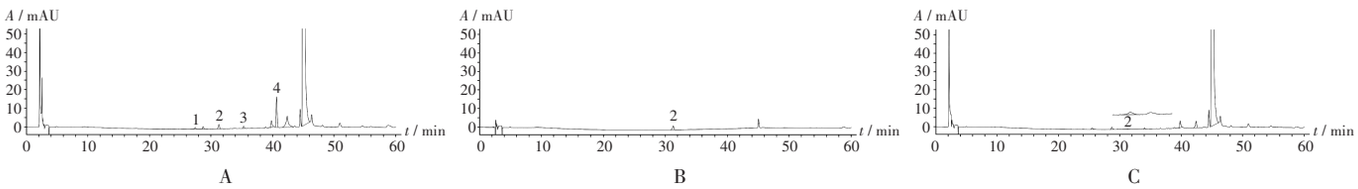
系统适用性试验:取上述系统适用性溶液、杂质B对照品溶液、供试品溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱。结果4种杂质与相邻杂质均能有效分离。详见图1。

线性关系考察:分别精密量取2.2项下单一杂质对照品溶液适量,加流动相定容,摇匀,制成系列混合对照品溶液。精密量取20 μL,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以待测成分质量浓度(X, μg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归。结果见表2。

定量限与检测限考察:分别精密量取2.2项下系统适用性溶液适量,倍比稀释,并按2.1项下色谱条件进样测定,以信噪比为10∶1、3∶1时的质量浓度分别记作定量限、检测限。结果见表2。

精密度试验:取2.2项下供试品(批号230701S)溶液适量,按2.1项下色谱条件,在不同日期下,采用不同仪器,又不同人员连续进样测定6次,记录峰面积。结果,杂质A、C、D均未检出,杂质B峰面积的*RSD*为3.72%(n=6),表明方法精密度良好。

稳定性试验:取2.2项下供试品(批号230701S)溶液适量,分别于室温下放置0,2,4,6,8,12,16,20,24,



1. 杂质A 2. 杂质B 3. 杂质C 4. 杂质D

A. 系统适用性溶液 B. 对照品溶液 C. 供试品溶液

图1 高效液相色谱图

1. Impurity A 2. Impurity B 3. Impurity C 4. Impurity D

A. System suitability solution B. Reference solution C. Test solution

Fig. 2 HPLC chromatograms

表2 线性关系及定量限、检测限考察结果

Tab. 2 Results of the linear relation test, LOQ and LOD investigation

待测成分	回归方程	线性范围(μg/mL)	r	定量限(μg/mL)	检测限(μg/mL)
杂质A	$Y_1 = 52.038\,71 X_1 - 0.514\,73$	0.103 0~10.300 0	1.000 0	0.103 0	0.030 9
杂质B	$Y_2 = 32.076\,47 X_2 + 0.126\,35$	0.100 5~10.050 0	1.000 0	0.100 5	0.030 2
杂质C	$Y_3 = 48.513\,65 X_3 + 0.370\,78$	0.104 0~10.400 0	1.000 0	0.104 0	0.031 2
杂质D	$Y_4 = 50.649\,14 X_4 - 0.468\,94$	0.100 4~10.040 0	1.000 0	0.100 4	0.030 1

28, 32, 36, 40, 44, 48 h时按2.1项下色谱条件进样测定，记录峰面积。结果杂质A、C、D均未检出，杂质B峰面积的*RSD*为3.70%（$n = 15$），表明供试品溶液在室温放置48 h内基本稳定。

重复性试验：称取样品（批号230701S）适量，精密称定，各6份，按2.2项下方法制备供试品溶液，再按2.1项下色谱条件进样测定，记录峰面积并计算含量。结果杂质A、C、D均未检出，杂质B峰面积平均值为0.001 4%，*RSD*为3.70%（$n = 6$），表明方法重复性良好。

加样回收试验：取已知含量样品（批号230701S）适量，共9份，分别加入低、中、高质量浓度的待测成分对照品溶液，按2.2项下方法制备供试品溶液，再按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3。

耐用性试验：取对照品及样品各适量，按2.2项下方法制备系统适用性溶液、供试品溶液，通过改变柱温（±2 ℃）、流速（±0.2 mL/min）、波长（±2 nm）、流动

表3 加样回收试验结果（$n = 9$）

Tab. 3 Results of the recovery test（$n = 9$）

待测成分	取样量(g)	样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	加样回收率(%)	$\bar{X}$(%)	*RSD*(%)	待测成分	取样量(g)	样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	加样回收率(%)	$\bar{X}$(%)	*RSD*(%)
杂质A	0.050 17	ND	1.05	1.02	97.14			杂质C	0.050 17	ND	1.10	1.12	101.82		
	0.050 16	ND	1.05	1.04	99.05				0.050 16	ND	1.10	1.14	103.64		
	0.050 38	ND	1.05	1.01	96.19				0.050 38	ND	1.10	1.13	102.73		
	0.050 31	ND	3.51	3.48	99.15				0.050 31	ND	3.66	3.67	100.27		
	0.050 28	ND	3.51	3.47	98.86	97.50	1.68		0.050 28	ND	3.66	3.68	100.55	100.05	2.65
	0.050 30	ND	3.51	3.47	98.86				0.050 30	ND	3.66	3.68	100.55		
	0.050 42	ND	5.27	4.97	94.31				0.050 42	ND	5.49	5.26	95.81		
	0.050 21	ND	5.27	5.11	96.96				0.050 21	ND	5.49	5.30	96.54		
	0.050 45	ND	5.27	5.11	96.96				0.050 45	ND	5.49	5.41	98.54		
杂质B	0.050 17	0.612 5	3.61	3.75	86.91			杂质D	0.050 17	ND	12.92	12.52	96.90		
	0.050 16	0.612 4	3.61	3.85	89.68				0.050 16	ND	12.92	12.65	97.91		
	0.050 38	0.615 1	3.61	3.88	90.44				0.050 38	ND	12.92	12.62	97.68		
	0.050 31	0.614 2	12.05	12.50	98.64				0.050 31	ND	43.05	42.88	99.61		
	0.050 28	0.613 8	12.05	12.54	98.97	94.32	3.64		0.050 28	ND	43.05	42.81	99.44	97.83	1.57
	0.050 30	0.614 1	12.05	12.51	98.72				0.050 30	ND	43.05	42.86	99.56		
	0.050 42	0.615 6	18.07	17.55	93.72				0.050 42	ND	64.58	61.47	95.18		
	0.050 21	0.613 0	18.07	17.81	95.17				0.050 21	ND	64.58	62.19	96.30		
	0.050 45	0.615 9	18.07	18.07	96.59				0.050 45	ND	64.58	63.23	97.91		

注：ND为未检出。

Note: ND indicates no detected.

相起始比例(±1%)、盐浓度(±2 mmol/L)、流动相A pH(±0.1)、不同品牌色谱柱(另选取同规格Agela Venusil MP C_{18}柱,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果柱温、流速、波长、流动相起始比例、盐浓度、流动相A pH、色谱柱发生一定程度变化时,本方法能满足试验要求,表明耐用性良好。

2.4 样品含量测定

取样品各适量,分别按2.2项下方法制备供试品溶液,再按2.1项下色谱条件进样测定,平行测定4次,记录峰面积并计算样品含量。结果杂质A、C、D均未检出,杂质B含量分别为0.001 3%,0.001 4%,0.001 3%,0.001 2%。

3 讨论

3.1 杂质限度制订依据

本研究中待测成分为起始物料及中间体中理论残留杂质,残留风险较小,但均为基因毒性杂质,考虑其限度较低,成品需进一步控制其残留量。

基因毒杂质A、C,均按毒理学关注阈值(TTC)法计算杂质限度:该制剂最大日剂量为140 mg,为非终身服药,按1~10年服用周期计,TTC为10 μg/d,最大日剂量140 mg计算,潜在毒性限度为(10 μg/d)÷(140 mg/d)=0.007%;基因毒杂质B[ICH M7中明确其允许日暴露量(PDE)为34 μg/d],按苹果酸卡博替尼最大日用剂量140 mg计算,可接受限度为(34 μg/d)÷(140 mg/d)=0.024%;杂质D,ICH M7中明确其PDE为117 μg/d,按CBZ-API最大日用剂量140 mg/d计算,可接受限度为(117 μg/d)÷(140 mg/d)=0.084%。

3.2 流动相A pH选择

调节流动相A的pH分别为5.3,5.4,5.5,5.6,5.7,结果显示:1)当pH为5.3时,溶剂峰干扰杂质A检测,杂质B与相邻未知杂质未达到基线分离,未达到基线分离;2)随着pH的升高溶剂峰与杂质A、杂质B与相邻未知杂质间的分离度逐渐增大(pH为5.4时达到基线分离,分离度>1.5),但当pH升高到一定值时分离度均逐渐降低(pH为5.7时分离度逐渐降低且低于1.5);3)考虑到耐用性试验,色谱条件参数微小变动的考察,最终选择流动相A的pH为5.5。

3.3 检测波长选择

采用DAD对各杂质进行全波长扫描,杂质A、B、C、D最大吸收波长均在200~394 nm范围内,因此每隔一段吸收波长统计目标杂质的信噪比,选择各杂质响应较强的波长作为检测波长,结果显示,4个杂质在不同波长下响应值存在差异,但在220 nm波长处,各杂质响应值最大,同时结合灵敏度试验综合考虑,最终采用220 nm作为检测波长。

3.4 方法评价

本研究中所建立的方法操作简便,结果准确可靠,专属性强、重现性好,可用于苹果酸卡博替尼4种基因毒性杂质的质量控制。

参考文献

[1] MANNSAKER, TROND A, HOANG H, et al. Cabozantinib Is Effective in Melanoma Brain Metastasis Cell Lines and Affects Key Signaling Pathways[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2021, 22(22): 12296.

[2] STORANDT MH, GILE JJ, PALMER ME, et al. Cabozantinib Following Immunotherapy in Patients with Advanced Hepatocellular Carcinoma[J]. Cancers, 2022, 14(21): 5173.

[3] 陈 娜,詹世鹏,刘 芳. 卡博替尼治疗肾细胞癌的疗效与安全性评价及其管理措施[J]. 中国新药杂志,2020,29(11):1265-1269.

[4] SCHFFSKI P, BLAY JY, RAY-COQUARD I. Cabozantinib as an emerging treatment for sarcoma[J]. Current Opinion in Oncology, 2020, 32(4): 321-331.

[5] CHOUEIRI TK, ESCUDIER B, POWLES T, et al. Cabozantinib versus everolimus in advanced renal-cell carcinoma[J]. The New England Journal of Medicine, 2015, 373(19): 1814-1823.

[6] CHOUEIRI TK, ESCUDIER B, POWLES T, et al. Cabozantinib versus everolimus in advanced renal cell carcinoma (METEOR): final results from a randomised, open-label, phase 3 trial[J]. Lancet Oncology, 2016, 17(7): 917-927.

[7] CHOUEIRI TK, HALABI S, SANFORD BL, et al. Cabozantinib Versus Sunitinib As Initial Targeted Therapy for Patients With Metastatic Renal Cell Carcinoma of Poor or Intermediate Risk: The Alliance A031203 CABOSUN Trial[J]. Journal of Clinical Oncology, 2017, 35(6): 591-597.

[8] 李朗明. 卡博替尼联合免疫治疗不良反应分析(FAERS数据库)[D]. 广州:南方医科大学,2023.

[9] 石珂函. 基于FAERS数据库的卡博替尼不良事件信号挖掘和分析[J]. 智慧健康,2023,9(25):31-37.

[10] 胡帮芹,余 娴. 卡博替尼治疗相关不良事件研究进展[J]. 心血管外科杂质,2019,3(8):195-196.

[11] 陈 娜,詹示鹏,刘 芳. 卡博替尼治疗肾细胞癌的疗效与安全性评价及其管理措施[J]. 中国新药杂志,2020,29(11):1265-1269.

[12] NAVIS AC, BOURGONJE A, WESSELING P, et al. Effects of dual targeting of tumor cells and stroma in human glioblastoma xenografts with a tyrosine kinase inhibitor against c-MET and VEGFR2[J]. PLoS One, 2013, 8(3): e58262.

[13] KOEHLER VF, ADAM P, RAUE F, et al. Real-World Efficacy and Safety of Cabozantinib and Vandetanib in Advanced Medullary Thyroid Cancer[J]. Thyroid, 2021, 31(3): 459-469.

[14] 竺 晶,谢 骥,赵紫婷,等. 卡博替尼治疗晚期甲状腺癌有效性和安全性的Meta分析[J]. 中国药房,2023,34(22):