

反相高效液相色谱法测定富马酸替诺福韦二吡呋酯原料药7种有关物质含量

朱跃芳¹, 姚亮元^{2△}, 林芳¹, 陈珉珉¹, 朱婧²

(1. 湖南省株洲市食品药品检验所, 湖南 株洲 412008; 2. 湖南千金湘江药业股份有限公司, 湖南 株洲 412000)

摘要:目的 建立测定富马酸替诺福韦二吡呋酯原料药中有关物质含量的反相高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Polar-phenyl C₁₈ 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.05 mol/L 醋酸铵缓冲液 (用冰醋酸调 pH 至 4.6) - 乙腈 (97:3, V/V) (A) - 0.05 mol/L 醋酸铵缓冲液 (用冰醋酸调 pH 至 4.6) - 乙腈 (40:60, V/V) (B) (85:15, V/V), 梯度洗脱, 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 260 nm, 柱温为 35 ℃, 进样量为 20 μL。结果 各杂质质量浓度在 0.32~19.63 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好; 稳定性试验的 RSD 均小 2% (n=8); 平均加样回收率为 99.7%~101.1%, RSD 为 0.68%~0.94% (n=9)。结论 该方法操作简便、准确, 精密度、稳定性好, 可用于测定富马酸替诺福韦二吡呋酯原料药中 7 种有关物质含量。

关键词: 富马酸替诺福韦二吡呋酯; 有关物质; 反相高效液相色谱法; 含量测定

中图分类号: R917; R978.7

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2019)06-0026-03

Content Determination of Seven Related Substances in Active Pharmaceutical Ingredient of Tenofovir Disoproxil Fumarate by RP-HPLC

ZHU Yuefang¹, YAO Liangyuan², LIN Fang¹, CHEN Minmin¹, ZHU Jing²

(1. Institute for Food and Drug Control in Zhuzhou, Zhuzhou, Hunan, China 412008; 2. Hunan Qianjin Xiangjiang Pharmaceutical Co., Ltd., Zhuzhou, Hunan, China 412000)

Abstract: Objective To establish an RP-HPLC method for the content determination of related substances in the active pharmaceutical ingredient (API) of tenofovir disoproxil fumarate. **Methods** The chromatographic column was Polar-phenyl C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was 0.05 mol/L ammonium acetate buffer (adjusting pH to 4.6 with glacial acetic acid) - acetonitrile (97:3, V/V) (A) - 0.05 mol/L ammonium acetate buffer (adjusting pH to 4.6 with glacial acetic acid) - acetonitrile (40:60, V/V) (B) (85:15, V/V), gradient elution, the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 260 nm, the column temperature was 35 ℃, and the sample size was 20 μL. **Results** The impurities showed good relationship in the range of 0.32~19.63 μg/mL, the RSD of stability test was less than 2% (n=8), the average recovery rate was 99.7%~101.1%, and RSD was 0.68%~0.94% (n=9). **Conclusion** The method is simple and accurate, it has good precision and stability, which can be used for the content determination of seven related substances in the API of tenofovir disoproxil fumarate.

Key words: tenofovir disoproxil fumarate; related substances; RP-HPLC; content determination

富马酸替诺福韦二吡呋酯是一种核苷酸类抗病毒药^[1], 具有抗人类免疫缺陷病毒 (HIV) 和抗乙型肝炎 (简称“乙肝”) 病毒 (HBV) 活性^[2-3]。2001 年经美国食品药

物管理局 (FDA) 批准用于治疗 HIV-1 感染; 2008 年 4 月和 8 月, 欧盟和美国 FDA 又分别批准其用于治疗乙肝^[4-6]。由于其疗效确切, 适用性好, 也是多个治疗指南

第一作者: 朱跃芳, 女, 大学本科, 主任药师, 研究方向为药品检验, (电话) 0731-28687991。

△通信作者: 姚亮元, 女, 硕士研究生, 高级工程师, 研究方向为新药开发, (电子信箱) 1061582981@qq.com。

- 9(10):96.
- [8] 邓 雯, 杨泽锐, 程翔燕, 等. 不同粒径黄芪超微细粉理化性质的研究[J]. 中国现代中药, 2017, 19(8): 1187-1192.
- [9] 窦 霞, 靳子明, 甄小龙. 党参超微粉与细粉在大鼠体内的药动学比较研究[J]. 中国医院药学杂志, 2016, 36(20): 1749-1752.
- [10] 钟瑞坤. 中药配方颗粒优劣浅析[J]. 北方药学, 2011, 8(6): 73-74.
- [11] 李亚玲, 曾 超, 叶 云, 等. 中药传统饮片与中药配方颗粒治疗老年功能性便秘的临床疗效[J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37(23): 2378-2382.
- [12] 王晓琳, 张 平. 黄芪饮片与黄芪配方颗粒有效成分含量比较[J]. 西部中医药, 2017, 30(2): 25-27.
- [13] 俞路宁, 徐筱芳, 邵深深, 等. 传统煎法中药与配方颗粒比较[J]. 长春中医药大学学报, 2015, 26(5): 784-785.
- [14] 范羽丰, 谭 蓉, 胡晓波. 黄连饮片极细粉化形式的考察[J]. 抗感染药学, 2007, 4(3): 114-115.
- [15] 四川省食品药品监督管理局. 四川省中药饮片炮制规范[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 2015: 199-201.

(收稿日期: 2018-07-11)

推荐使用的一线抗 HIV 和抗 HBV 药物^[7-8]。目前,我国关于富马酸替诺福韦二吡呋酯原料药有关物质测定的文献报道尚少,有的检测已知结构杂质数量也偏少^[9-11]。本研究中采用反相高效液相色谱(RP-HPLC)法测定其原料药有关物质含量,为其质量控制提供参考。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

LC-20AT 型 HPLC 仪,包括二极管阵列检测器(日本 Shimadzu 公司);AB135-S 型电子分析天平、FE-20 型 pH 计(瑞士 Mettler Toledo 公司)。

1.2 试药

富马酸替诺福韦二吡呋酯原料药(上海阳帆医药科技有限公司,批号分别为 120919,120920,120925,湖南千金湘江药业股份有限公司,批号分别为 20130701,20130702,20130703,20170201);替诺福韦(杂质 B)对照品(批号为 100614JZ)、腺嘌呤(杂质 C)对照品(批号为 20120408)、替诺福韦单吡呋酯(杂质 D)对照品(批号为 121022),替诺福韦单吡呋单异丙酯(杂质 E)对照品(批号为 121128-1)、替诺福韦单吡呋单乙氧基羰氧基甲酯(杂质 F)对照品(批号为 130322),均购自上海阳帆医药科技有限公司;6-异丙氧甲酰胺替诺福韦二吡呋酯(杂质 G)对照品(批号为 03-MAR-16-16)、替诺福韦二吡呋酯二聚体(杂质 H)对照品(批号为 12-JUN-16-15)均为美国 QCC 标准品;乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Polar-phenyl C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:以 0.05 mol/L 醋酸铵缓冲液(用冰醋酸调 pH 至 4.6)-乙腈(97:3, V/V)为流动相 A,以 0.05 mol/L 醋酸铵缓冲液(用冰醋酸调 pH 至 4.6)-乙腈(40:60, V/V)为流动相 B,梯度洗脱(0~25 min 时 85% A→50% A,25~40 min 时 50% A→0 A,40~50 min 时 0 A);流速:1.0 mL/min;检测波长:260 nm;柱温:35℃;进样量:20 μL。

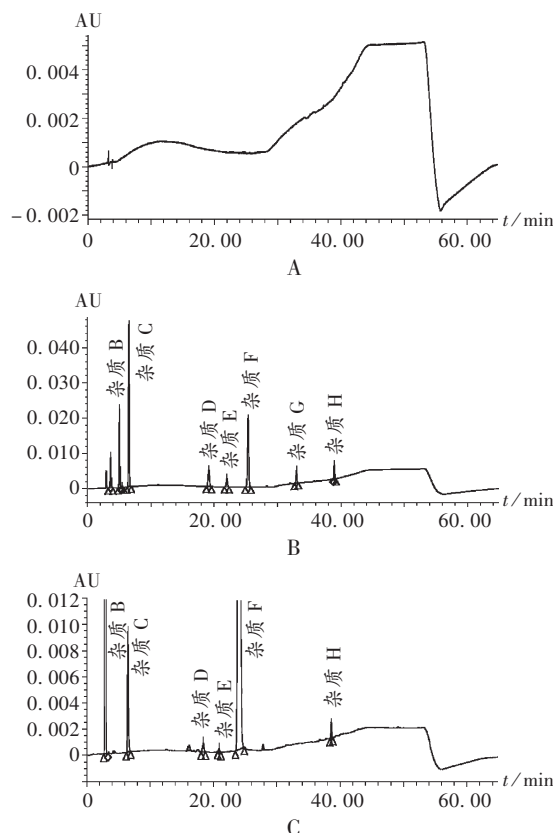
2.2 溶液制备

取杂质 B,C,D,E,F,G,H 对照品各适量,精密称定,分别置 7 个 100 mL 容量瓶中,加流动相溶解并稀释成每 1 mL 中分别含杂质 B 1.5 mg、杂质 C 1.5 mg、杂质 D 10 mg、杂质 E 3 mg、杂质 F 1.5 mg、杂质 G 1.5 mg、杂质 H 1.5 mg 的单杂质对照品贮备液,分别精密量取各 1 mL,置同一 100 mL 容量瓶中,加流动相定容,摇匀,即得混合对照品溶液。取样品适量,精密称定,加流动相溶解并稀释成质量浓度为 1.0 g/L 的供试品溶液。

以流动相作为空白对照溶液。

2.3 方法学考察

专属性试验:取 2.2 项下溶液各适量,按拟订色谱条件进样测定,记录色谱图,空白对照溶液色谱图中,在与各杂质对照品溶液色谱图相同保留时间处无干扰峰。详见图 1。



A. 空白对照溶液 B. 混合对照品溶液 C. 供试品溶液
图 1 高效液相色谱图

线性关系考察:分别精密量取混合对照品溶液 0.25,0.50,1.00,1.50,2.00 mL,置 5 个 10 mL 容量瓶中,加流动相定容,摇匀,制成系列混合对照品溶液。按拟订色谱条件进样测定,记录峰面积。以质量浓度(X)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归。结果见表 1。

定量限与检测限考察:精密量取混合对照品溶液适量,倍比稀释,按拟订色谱条件进样测定,以信噪比为 10:1 分别计算定量限、检测限。结果见表 1。

精密度试验:取混合对照品溶液适量,按拟订色谱条件连续进样测定 6 次,记录峰面积。结果见表 1。

稳定性考察:取供试品溶液(批号为 20130701)适量,分别置室温及 4℃下保存,于第 0,2,4,8,10,12,18,24 h 时按拟订色谱条件进样测定,记录峰面积。在室温下放置 24 h 时,除杂质 D 峰面积的 RSD 为 5.3% 外,其他杂质峰面积的 RSD 均小 2.0% (n=8),表明供

表1 回归方程与线性范围($n=5$)

杂质	回归方程	r	线性范围($\mu\text{g/mL}$)	定量限(ng)	检测限(ng)	精密度试验的 $RSD(\%)$
B	$Y = 48\,867X - 1\,277.6$	0.999 6	0.37 ~ 2.96	0.48	0.13	0.94
C	$Y = 97\,655X - 2\,242.5$	0.999 6	0.38 ~ 3.04	0.35	0.12	1.10
D	$Y = 32\,649X - 7\,732.5$	0.999 8	2.45 ~ 19.63	1.72	0.60	1.37
E	$Y = 26\,723X - 1\,458.2$	0.999 9	0.59 ~ 4.70	3.68	1.26	1.45
F	$Y = 28\,249X - 1\,295.8$	0.999 8	0.30 ~ 2.40	3.51	1.46	1.51
G	$Y = 21\,393X - 328.0$	0.999 9	0.34 ~ 2.75	2.39	1.03	1.14
H	$Y = 28\,615X - 762.2$	0.999 7	0.32 ~ 2.54	1.20	0.28	1.35

试品溶液在室温下放置 24 h 不稳定,在 4℃ 下放置 24 h 稳定。

加样回收试验:取已知含量的样品(批号为 120919)适量,每份约 10 mg,共 9 份,精密称定,溶解,分别加入 0.5, 1.0, 1.5 mL 混合对照品贮备液,按拟订色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率。结果见表 2。

表2 加样回收试验结果($n=9$)

项目	杂质 B	杂质 C	杂质 D	杂质 E	杂质 F	杂质 G	杂质 H
$\bar{X}(\%)$	99.80	100.00	101.10	100.00	100.10	99.70	100.30
$RSD(\%)$	0.75	0.71	0.86	0.94	0.68	0.73	0.82

2.4 样品中有关物质含量测定

取 7 批样品各适量,依法制备供试品溶液,按拟订色谱条件进样测定,平行测定 3 次,记录峰面积,并计算样品中有关物质含量。结果见表 3。

表3 样品中有关物质含量测定结果($\%, n=3$)

批号	杂质 B	杂质 C	杂质 D	杂质 E	杂质 F	杂质 G	杂质 H	其他	合计
120919	0.01	-	0.51	0.08	-	0.01	0.01	0.04	0.66
120920	0.01	-	0.40	0.07	-	-	-	0.03	0.51
120925	-	-	0.13	0.10	-	-	-	0.02	0.25
20130701	0.01	-	0.67	0.08	-	-	0.02	0.04	0.82
20130702	0.01	-	0.58	0.04	-	-	-	0.02	0.65
20130703	0.01	-	0.62	0.05	-	0.02	0.02	0.02	0.74
20170201	-	0.45	0.15	0.04	-	-	0.02	0.02	0.68

注:“-”表示未检出。

3 讨论

取杂质 B, C, D, E, F, G, H 对照品各适量,在 200 ~ 400 nm 波长范围内进行全波长扫描,结果显示,所有杂质对照品均在 260 nm 波长附近有最大吸收。杂质 E 与杂质 F 出峰时间很近,因此首先考察杂质 E 与杂质 F 间的分离情况,要求两者间分离度应大于 1.5。本试验中对两组色谱条件进行了考察,第 1 组为甲醇-叔丁醇-0.01 mol/L 磷酸氢二钠(用磷酸调 pH 至 5.5)(11:1:28, V/V/V)(A)-甲醇-叔丁醇-0.01 mol/L 磷酸氢二钠(用磷酸调 pH 至 5.5)(27:1:12, V/V/V)(B),梯度洗脱;第 2 组为 0.05 mol/L 醋酸铵缓冲液(用冰醋酸调 pH 至 4.6)-乙腈(97:3, V/V)(A)-0.05 mol/L 醋酸

铵缓冲液(用冰醋酸调 pH 至 4.6)-乙腈(40:60, V/V)(B),梯度洗脱。结果在第 2 组色谱条件下,各杂质与主峰间分离度均大于 1.5,更适合本样品分析有关物质。

稳定性试验结果显示,供试品溶液在室温下放置 24 h 时杂质 D 含量明显增加,说明供试品溶液在室温下放置 24 h 不稳定;供试品溶液在 4℃ 条件下放置 24 h 总杂质的绝对偏差小于 0.1%,说明供试品溶液在 4℃ 下放置 24 h 稳定。

综上所述,本研究中建立的方法操作简便,精密度、稳定性好,可用于富马酸替诺福韦二吡呋酯原料药中 7 种有关物质含量的测定。

参考文献:

- [1] 张石革. 核苷酸类逆转录酶抑制剂的进展与评价[J]. 中国医院用药评价与分析, 2005, 5(5): 270-273.
- [2] 徐玉文, 赵桂森. 抗艾滋病药物研究进展[J]. 中国药物化学杂志, 2002, 12(2): 119-124.
- [3] 中华医学会感染病学分会艾滋病学组. 艾滋病诊疗指南(2011 版)[J]. 中华临床感染病杂志, 2011, 4(6): 321-330.
- [4] 许国兵, 陆海湖, 李四海. 替诺福韦酯与恩替卡韦治疗 HBeAg 阳性慢性乙型肝炎对比研究[J]. 中南药学, 2015, 13(2): 206-208.
- [5] 蒋小仙, 金洁. 慢性乙型肝炎病毒感染妇女妊娠期抗病毒治疗进展[J]. 中国医学科学院学报, 2015, 37(1): 125-128.
- [6] 中华医学会肝病学会, 中华医学会感染病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南(2010 年版)[J]. 临床肝胆病杂志, 2011, 27(1): 1-16.
- [7] 冯靖劼, 张庆文, 徐云根. 抗 HIV-1 药物及其复方制剂研究新进展[J]. 药学进展, 2012, 36(12): 539-546.
- [8] 崔岚, 安富荣, 王晓珉. 核苷酸逆转录酶抑制剂替诺福韦 DF[J]. 中国新药杂志, 2004, 13(11): 1054-1058.
- [9] 万红艳, 张晴. HPLC 法测定富马酸替诺福韦二吡呋酯原料药和胶囊中的有关物质[J]. 中国药房, 2015, 26(6): 848-850.
- [10] 陶静, 李红艳. 反相高效液相色谱法测定富马酸替诺福韦二吡呋酯的有关物质[J]. 淮海工学院学报, 2012, 21(4): 60-62.
- [11] 李俊, 乔玉清, 杨志明. HPLC 法测定富马酸替诺福韦二吡呋酯原料药的有关物质[J]. 广州化工, 2016, 43(1): 129-130.

(收稿日期: 2018-07-02)