

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.01.016

高效液相色谱法测定依法韦仑异构体含量*

张稳稳¹, 谭黎君², 刘小东¹, 郑曦孜^{3△}

(1. 重庆医药高等专科学校药学院, 重庆 401331; 2. 重庆希韦医药科技有限公司, 重庆 400714; 3. 重庆市长寿区中医院, 重庆 401220)

摘要:目的 建立测定依法韦仑异构体含量的高效液相色谱法。方法 色谱柱为 Agilent Zorbax SB-Phenyl 苯基柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)和 Chiralpak OD-H 手性柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为正己烷-乙醇(97:3, V/V), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 250 nm, 柱温为 35 °C, 进样量为 20 μL。结果 依法韦仑异构体的质量浓度在 0.05 ~ 20.52 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($r = 0.9997, n = 6$); 检测限为 0.015 μg/mL, 定量限为 0.050 μg/mL; 中间精密度和重复性试验结果的 RSD 均为 5.22% ($n = 6$); 平均加样回收率为 96.73%, RSD 为 1.50% ($n = 9$)。3 批样品中依法韦仑异构体的含量分别为 0.11%, 0.12%, 0.11%。结论 该方法可用于依法韦仑异构体的含量测定。

关键词: 高效液相色谱法; 依法韦仑; 异构体; 含量测定

中图分类号: R927.2; R979.5 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)01-0069-03

Determination of Isomer of Efavirenz by HPLC

ZHANG Wenwen¹, TAN Lijun², LIU Xiaodong¹, ZHENG Xizi³

(1. College of Pharmacy, Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing, China 401331; 2. Chongqing Willway Pharmaceuticals Co., Ltd., Chongqing, China 400714; 3. Changshou District Hospital of Traditional Medicine, Chongqing, China 401220)

Abstract: Objective To establish the high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the determination of the isomer of efavirenz. **Methods** The chromatographic columns were Agilent Zorbax SB-Phenyl column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) and Chiralpak OD-H chiral column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was hexane-ethanol (97:3, V/V), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 250 nm, the column temperature was 35 °C, and the injection volume was 20 μL. **Results** The linear range of isomer of efavirenz was 0.05 - 20.52 μg/mL ($r = 0.9997, n = 6$). The limit of detection (LOD) was 0.015 μg/mL, and the limit of quantitation (LOQ) was 0.050 μg/mL. The RSD of intermediate precision test and repeatability test was 5.22% ($n = 6$). The average recovery of isomer of efavirenz was 96.73% with an RSD of 1.50% ($n = 9$). The contents of isomer of efavirenz in three batches of samples were 0.11%, 0.12% and 0.11% respectively.

Conclusion This method can be used for the determination of the isomer of efavirenz.

Key words: HPLC; efavirenz; isomer; content determination

依法韦仑化学名为(4S)-6-氯-4-(环丙乙炔)-4-三氟甲基-苯并-1,4-二氢噻唑-2-酮^[1], 是由美国 Merck 公司开发的非核苷类逆转录酶抑制剂, 主要用于首次治疗人体免疫缺陷病毒 1 亚型(HIV-1)患者^[2-5], 于 1999 年 2 月被美国食品药品监督管理局(FDA)批

准上市, 商品名为 Sustiva & reg 或 Stocrin & reg。现有技术通常以对氯苯胺为起始原料, 发生酰氯化反应, 后保护氨基, 得 N-2,2-二甲基丙酰基对氯苯胺, 所得产物与三氟乙酸乙酯反应后脱保护, 与环丙乙炔、格林尼亚试剂反应, 经手性诱导, 2,3-二氯-5,6-二氢基苯醌

*基金项目: 重庆市教育委员会科学技术研究项目[KJQN201902801]。

第一作者: 张稳稳, 女, 硕士研究生, 高级工程师, 研究方向为药物合成, (电子信箱)wenwen2528@163.com。

△通信作者: 郑曦孜, 男, 硕士研究生, 高级工程师, 研究方向为医院药学, (电子信箱)295907803@qq.com。

[15] 王莹, 张丽萍. 胃蛋白酶分离纯化技术研究进展[J]. 中国食品添加剂, 2008(1): 110-113.
[16] 田玉琼, 汤晓勤, 向仕学. 胃蛋白酶中丙酮残留量的扫描极谱法测定[J]. 预防医学情报杂志, 2006(6): 756-757.
[17] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(二部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 901-902.
[18] 周绪云, 马晓茜. 气相色谱法测定洛索洛芬钠中 7 种残留溶剂的含量[J]. 中南药学, 2021, 19(7): 1450-1453.
[19] 林瑛, 杨学灵, 杨雪珠. 气相色谱法测定胰酶中的丙酮溶剂残留量[J]. 广州化学, 2013, 38(2): 34-36.
[20] 田洁, 丁红雨, 赵丽元, 等. 顶空毛细管气相色谱法测定阿托伐他汀钙原料药中残留溶剂[J]. 中国药物评价, 2015, 32(3): 135-138.
(收稿日期: 2022-02-22; 修回日期: 2022-06-11)

(DDQ)环化、脱保护等步骤,最后环合得目标产物依法韦仑^[6-16]。虽然工艺较详细,但合成过程中产生的对映异构体[(4R)-6-氯-4-(环丙乙炔)-4-三氟甲基-苯并-1,4-二氢嘧啶-2-酮]不易分离,极大地影响了依法韦仑成品的质量。目前,尚未检索到依法韦仑异构体含量测定方法研究。本研究中建立了测定依法韦仑异构体含量的高效液相色谱法,方法学考察参考文献[17-18],为准确测定依法韦仑异构体的含量提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

BT125D型电子分析天平(北京赛多利斯公司,精度为十万分之一);LC-20A型高效液相色谱仪(美国安捷伦公司);UV-2600型紫外可见分光光度计(日本岛津公司)。

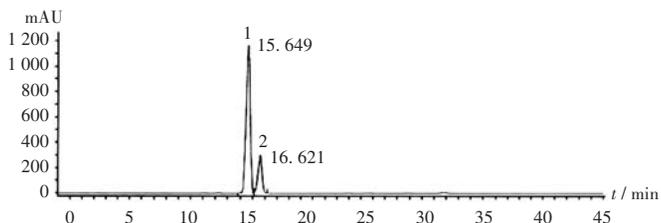
1.2 试剂

依法韦仑对照品(批号为R038UO,含量为99.7%),依法韦仑异构体对照品(批号为R061SO,含量为99.7%),均购于United States Pharmacopoeia;依法韦仑样品(重庆希韦医药科技有限公司,批号分别为Y01, Y02, Y03);正己烷、异丙醇、乙醇(色谱纯,德国默克公司)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱:Agilent Zorbax SB-Phenyl苯基柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), Chiralpak OD-H手性柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:正己烷-乙醇(97:3, V/V);流速:1.0 mL/min;检测波长:250 nm;柱温:35 °C;进样量:20 μL;运行时间:40 min。分别取依法韦仑对照品100 mg和依法韦仑异构体对照品25 mg,置同一100 mL容量瓶中,加流动相溶解并定容,作为混合对照品溶液,在此色谱条件下分别进样测定,记录色谱图。依法韦仑及其异构体在此色谱条件下的分离度为1.5,依法韦仑色谱峰理论板数为15 728,拖尾因子为1.01。色谱图见图1。



1. 依法韦仑异构体 2. 依法韦仑

图1 高效液相色谱图

1. Isomer of efavirenz 2. Efavirenz

Fig. 1 HPLC chromatograms

2.2 溶液制备

取依法韦仑异构体对照品25 mg,精密称定,置100 mL容量瓶中,加流动相溶解并定容,摇匀,即得质量浓度为0.25 mg/mL的对照品溶液。取依法韦仑样品100 mg,精密称定,置100 mL容量瓶中,加流动相溶解并定容,摇匀,即得质量浓度为1 mg/mL的供试品溶液。

2.3 方法学考察

线性关系考察:取依法韦仑异构体对照品10.29 mg,精密称定,加流动相溶解并稀释成质量浓度分别为0.05, 1.03, 8.21, 10.26, 15.39, 20.52 μg/mL的系列溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,以峰面积(Y)为纵坐标、质量浓度(X, μg/mL)为横坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 15\,064X + 4\,692.9$ ($r = 0.9997, n = 6$)。结果表明,依法韦仑异构体质量浓度在0.05~20.52 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好。

定量限与检测限确定:精密吸取线性关系考察项下溶液(质量浓度为0.05 μg/mL)作为定量限检测溶液,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图,计算其色谱峰峰高与噪声的比值信噪比(S/N),以S/N为10:1时的响应浓度为定量限,并将定量限检测溶液连续进样6次,结果定量限为0.050 μg/mL。另取线性关系考察项下溶液(质量浓度为0.05 μg/mL)3 mL,置10 mL容量瓶中,加流动相稀释并定容,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图,以S/N为3:1时的响应浓度为检测限,结果检测限为0.015 μg/mL。

中间精密度试验与重复性试验:取依法韦仑异构体对照品和样品(批号为Y01)各适量,精密称定,共6份,按2.1项下色谱条件分别进样测定;次日另换1人另取6份该批样品,同法配置并测定。结果中间精密度试验和重复性试验的RSD均为5.22% ($n = 6$),表明仪器精密度良好,方法重复性良好。

加样回收试验:取样品(批号为Y01)100 mg,精密称定,共9份,分别置100 mL容量瓶中,加入80%, 100%, 120%浓度的2.2项下对照品溶液(质量浓度为0.25 mg/mL),各3份,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果见表1。

耐用性试验:分别考察不同流速(0.8, 1.2 mL/min)和不同柱温(30, 40 °C)对检测结果的影响。结果分离度均大于1.5,依法韦仑异构体含量不低于0.11%,表明方法耐用性好。

2.4 依法韦仑异构体含量测定

取3批(批号分别为Y01, Y02, Y03)样品,各100 mg,精密称定,按2.2项下方法制备供试品溶液,按2.1项

表1 加样回收试验结果($n=9$)
Tab.1 Results of the recovery test ($n=9$)

样品含量(μg)	加入量(μg)	测得量(μg)	回收率(%)	\bar{X} (%)	RSD(%)
1.02	7.97	8.86	98.37		
1.04	7.97	8.92	98.87		
0.97	7.97	8.58	95.48		
1.02	9.96	10.54	95.58		
1.06	9.96	10.88	98.59	96.73	1.50
1.01	9.96	10.59	96.18		
1.03	11.95	12.42	95.31		
1.03	11.95	12.49	95.90		
1.06	11.95	12.56	96.23		

下色谱条件进样测定,记录色谱图,并计算依法韦仑异构体的含量。结果含量分别为0.11%,0.12%,0.11%,平均为0.11%。

3 讨论

3.1 色谱柱选择

考察了手性多聚物型、Daicel Chiralpak® IC 键合型、纤维素-三[3,5-二甲苯基氨基甲酸酯]衍生物的Chiralpak OD-H柱等手性色谱柱,结果前两类色谱柱的分离度、理论板数、分离因子等参数存在缺陷,分离效果差,后者能有效分离依法韦仑及其异构体,分离度大于1.5,依法韦仑色谱峰理论板数为15728,拖尾因子为1.01。故最终选择该型苯基柱联用手性色谱柱。

3.2 检测波长选择

分别取依法韦仑及其异构体对照品各适量,采用紫外可见-分光光度计分别于200~400 nm波长范围内扫描,结果显示依法韦仑及其异构体均在250 nm波长处有较大紫外吸收。故最终选择检测波长为250 nm。

3.3 流动相选择

考察了正己烷-异丙醇(90:10, V/V)和正己烷-乙醇(90:10, 97:3, V/V)流动相系统。流动相系统为正己烷-异丙醇时,依法韦仑异构体色谱峰峰形差,分离效果不佳;流动相系统为正己烷-乙醇(90:10, V/V)时,分离度小于1.5;为正己烷-乙醇(97:3, V/V)时,分离度为1.5,色谱峰峰形好。故最终选择流动相为正己烷-乙醇(97:3, V/V)。

3.4 方法评价

该方法专属性强、精密度高、准确度高,可有效控制依法韦仑异构体的含量,满足对其手性异构体的质量控制要求。

参考文献

[1] PIERCE ME, PARSONS RL, RACLESCA A, et al. Practical

asymmetric synthesis of efavirenz (DMP266), an HIV-1 reverse transcriptase inhibitor[J]. J Org Chem, 1998, 63(23): 8536-8543.

- [2] WANG P, LI JF, ZHANG SJ, et al. Effect of CYP2B*6 polymorphism on pharmacokinetics of efavirenz in Chinese[J]. Chin J New Drugs Clin Rem, 2016, 35(2): 131-137.
- [3] MALIKOVA J, ZINGG T, FINGERHUT R, et al. HIV Drug Efavirenz Inhibits CYP21A2 Activity With Possible Clinical Implications[J]. Horm Res Paediatr, 2019, 91(4): 262-270.
- [4] DU PLESSIS S, PEREZ A, FOUCHÉ JP, et al. Efavirenz Is Associated With Altered Fronto-Striatal Function in HIV+ Adolescents[J]. J Neurovirol, 2019, 25(6): 783-791.
- [5] JIN KJ, SANG YL, HAN S, et al. Synthesis and biological evaluation of dihydroquinazoline-2-amines as potent non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors of wild-type and mutant HIV-1 strains[J]. Eur J Med Chem, 2019, 176: 11-20.
- [6] 吴高鑫, 郑云峰, 罗海荣. 依法韦仑中间体的合成工艺优化[J]. 山东化工, 2018, 47(14): 18-19.
- [7] 杜世聪, 蒋成君. 依法韦仑合成路线图解[J]. 浙江化工, 2015, 46(6): 23-25.
- [8] DAI D, LONG X T, LUO B, et al. Process for preparation Efavirenz: WO, 2012079235[P]. 2012-06-21.
- [9] MEINRAD B, ERICK M C, NICKA C, et al. Process for the synthesis of cyclic carbamates: WO, 2012048884[P]. 2012-04-19.
- [10] 黄小庭, 潘江平, 洪道明. 一种依法韦仑中间体的制备方法: CN, 108997150A[P]. 2018-12-14.
- [11] 刘宁, 代斌, 王磊. 一种简单高效制备依法韦仑中间体的方法: CN, 104193657A[P]. 2014-12-10.
- [12] 姜斌, 李晓贤, 李金华, 等. 手性氨基酚配体在依法韦仑不对称合成中的应用: CN, 104016939A[P]. 2014-09-03.
- [13] LEINUNG MC, MILLER CH, TEHRANI B, et al. The effect of Efavirenz on estradiol metabolism in transgender women[J]. Transgend Health, 2019, 4(1): 197-199.
- [14] 弗朗切斯科·丰塔纳, 皮耶路易吉·帕多万, 马尔科·普雷比安卡. 使用酮溶剂制备依法韦仑的方法: CN, 106255682A[P]. 2016-12-21.
- [15] 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: 61-65.
- [16] 国家药品监督管理局药品审评中心. 化学药物质量控制分析方法验证技术指导原则[EB/OL]. (2005-03-18)[2022-01-20]. <https://www.cde.org.cn/zdzy/domesticinfopage?zdyzIdCODE=6fec13ef2fbb3a186e41a5fd7be41bfe>.
- [17] 中国药品生物制品检定所, 中国药品检验总所. 中国药品检验标准操作规范(2010年版)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 81-93.
- [18] The United States Pharmacopoeial Convention. USP40-NF35[M]. Rockville: The United States Pharmacopoeial Convention, 2016: 3942-3945.

(收稿日期: 2022-02-25; 修回日期: 2022-06-07)