

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

万红艳*, 张 晴(福建省药品检验所, 福州 350001)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)06-0848-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.06.45

摘要 目的:建立测定富马酸替诺福韦二吡呋酯原料药和胶囊中有关物质的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Eclipse XDB-C₁₈,流动相为甲醇-0.05%磷酸溶液(40:60, V/V)和甲醇(梯度洗脱),检测波长为260 nm,流速为1.0 ml/min,柱温为40 ℃,进样量为20 μl。结果:已知杂质替诺福韦单吡呋酯浓度在2.515~20.120 μg/ml范围内与峰面积呈良好的线性关系($r=0.9999$);检测限为3.75 μg/ml,定量限为12.50 ng/ml;精密性、稳定性、重复性试验的RSD分别为0.42%、2.00%、2.67%。按自身对照法测得替诺福韦单吡呋酯含量的结果偏高。结论:该方法操作简便、专属性强、灵敏度高,可用于富马酸替诺福韦二吡呋酯原料药和胶囊中有关物质的测定。

关键词 高效液相色谱法;富马酸替诺福韦二吡呋酯;原料药;胶囊;有关物质

Determination of Related Substances in Tenofovir Disoproxil Fumarate Raw Material and Capsule by HPLC

WAN Hong-yan, ZHANG Qing (Fujian Provincial Institute for Drug Control, Fuzhou 350001, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determination of related substances in tenofovir disoproxil fumarate raw material and capsules. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Eclipse XDB-C₁₈ column with mobile phase consisted of methanol-0.05% phosphoric acid (40:60, V/V) and methanol (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 260 nm, and column temperature was 40 ℃. The volume of injection was 20 μl. RESULTS: The linear range of tenofovir monoproxil was 2.515-20.12 μg/ml ($r=0.9999$). RSDs of precision, stability and repeatability tests were 0.42%, 2.00%, 2.67%. The limits of detection and quantification were 3.75 μg/ml and 12.50 ng/ml. The content of disoproxil fumarate determined by self-control method. CONCLUSIONS: The method is convenient, specific, sensitive, and can be used for the determination of related substances in tenofovir disoproxil fumarate raw material and capsule.

KEYWORDS HPLC; Tenofovir disoproxil fumarate; Raw material; Capsule; Related substance

富马酸替诺福韦二吡呋酯(TDF)是美国 Gilead Sciences 公司研制的一种新型核苷类逆转录酶抑制剂^[1],可用于治疗人类获得性免疫缺陷病毒(HIV)感染,2008年美国食品与药品管理局(FDA)又批准其用于治疗成人慢性乙型肝炎病毒(HBV)感染^[2-3]。该药具有耐受性好、耐药率低、停药反弹率低、肾毒性小等特点,特别是对 HIV 合并 HBV 感染的患者具有较好的疗效。替诺福韦口服生物利用度差、组织分布系数低,而 TDF 为替诺福韦的口服前药,在肠道的吸收显著提高^[4]。目前,我国关于 TDF 有关物质的测定方法的文献报道尚少,有文献报道了以自身对照法对 TDF 的有关物质进行测定^[5],但色谱图没有记录到主峰保留时间的2倍,只记录到主峰出峰时。其他药物测定有关物质的文献也多采用主成分自身对照法^[6]。为此,笔者建立了采用高效液相色谱(HPLC)法测定 TDF 原料药和胶囊中有关物质的方法,以为其质量控制提供参考。

1 材料

1260 型 HPLC 仪,包括 G1329B 二级管阵列检测器、

* 主管药师,硕士。研究方向:药物分析。电话:0591-87505236。
E-mail: whympolaris@126.com

G1316A 自动进样器、Agilent1260 化学工作站(美国 Agilent 公司);XS205 电子天平(瑞士梅特勒-托利多公司);KQ5200 DE 超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

替诺福韦单吡呋酯对照品(福建广生堂药业股份有限公司,批号:130301,纯度:99.1%);富马酸对照品(德国 Dr. Ehrenstorfer GmbH 公司,批号:71109,纯度:99.5%);TDF 原料药(福建广生堂药业股份有限公司,批号:130201、130202、130203,纯度:99.5%、99.5%、99.3%);TDF 胶囊(福建广生堂药业股份有限公司,批号:130301、130302、130303,纯度:97.6%、99.0%、97.2%,规格:300 mg/粒);甲醇为色谱纯,其他试剂为分析纯,水为超纯水。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱: Eclipse XDB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相: 甲醇-0.05%磷酸溶液(40:60, V/V)为流动相 A, 甲醇为流动相 B, 采用梯度洗脱(梯度洗脱程序见表1);检测波长: 260 nm;流速: 1.0 ml/min;柱温: 40 ℃;进样量: 20 μl。

2.2 溶液的制备

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution procedure

时间, min	流动相A, %	流动相B, %
0	98	2
4	98	2
15	50	50
25	50	50
30	98	2

2.2.1 对照品溶液 精密称取替诺福韦单吡呋酯、富马酸对照品适量,加40%甲醇水溶液溶解并稀释制成每1 ml中约含替诺福韦单吡呋酯0.01 mg和富马酸0.2 mg的溶液,即得对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 取TDF胶囊内容物适量(约相当于TDF10 mg),精密称定,置于10 ml量瓶中,加40%甲醇水溶液超声(功率:200 W,频率:40 kHz)溶解并稀释至刻度,摇匀,滤过,即得供试品溶液a。取TDF原料药10 mg,精密称定,按上述制备方法制得供试品溶液b。

2.2.3 自身对照溶液 分别精密量取“2.2.2”项下供试品溶液a、b各1 ml,置于100 ml量瓶中,加40%甲醇水溶液稀释至刻度,即得相应的自身对照溶液。

2.2.4 空白对照溶液 取不含主成分的辅料14.79 mg,置于50 ml量瓶中,加40%甲醇水溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,滤过,即得空白对照溶液

2.3 系统适用性试验

取“2.2.1”项下对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,对照品溶液的色谱见图1。可见,替诺福韦单吡呋酯峰与富马酸峰的分离度为4,富马酸峰的理论板数为7 210,替诺福韦单吡呋酯峰的理论板数为6 433。

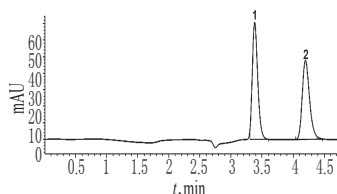


图1 系统适用性试验高效液相色谱图

1.富马酸;2.替诺福韦单吡呋酯

Fig 1 HPLC chromatograms of system suitability test

1.fumaric acid; 2. tenofovir monosoproxil

2.4 专属性试验

2.4.1 空白对照试验 取“2.2.4”项下空白对照溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,空白对照溶液色谱图见图2。结合图1可知,其他成分均不干扰有关物质的测定。

2.4.2 破坏试验 (1)酸破坏:精密称取TDF胶囊内容物13.08 mg,置于10 ml量瓶中,加40%甲醇水溶液3 ml,加1 mol/L盐酸溶液1 ml,于沸水浴中加热5 min,加1 mol/L氢氧化钠溶液1 ml调pH至中性,加40%甲醇水溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,备用。(2)碱破坏:精密称取TDF胶囊内容物12.96 mg,置于10 ml量瓶中,加40%甲醇水溶液3 ml,加1 mol/L氢氧化钠溶液1 ml,于沸水浴中加热5 min,加1

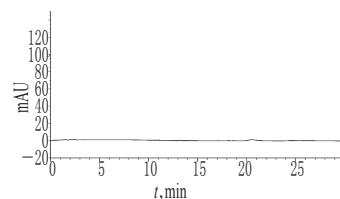


图2 空白对照试验高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms of blank control test

mol/L盐酸溶液调pH至中性,加40%甲醇水溶液溶解稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,备用。(3)高温破坏:精密称取于90 °C加热24 h后的TDF胶囊内容物13.16 mg,置于10 ml量瓶中,加40%甲醇水溶液超声(功率:200 W,频率:40 kHz)溶解并稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,备用。(4)光照破坏:精密称取于4 500 lx光照10 d后的TDF胶囊内容物13.02 mg,置于10 ml量瓶中,加40%甲醇水溶液超声(功率:200 W,频率:40 kHz)溶解并稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,备用。(5)高湿破坏:将TDF胶囊内容物适量置于下部装有硝酸钾的饱和溶液(25 °C,相对湿度92.5%)的密闭容器中,5 d后取出,精密称取12.99 mg,置于10 ml量瓶中,加40%甲醇水溶液超声(功率:200 W,频率:40 kHz)溶解并稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液,备用。取上述5种溶液,按“2.1”项下色谱条件进样,记录色谱,色谱见图3。由图3可见,本品经酸、高温、高湿和光照破坏条件处理的各杂质峰均能与主峰完全分离。碱破坏后主成分峰消失后,产生大量降解产物。

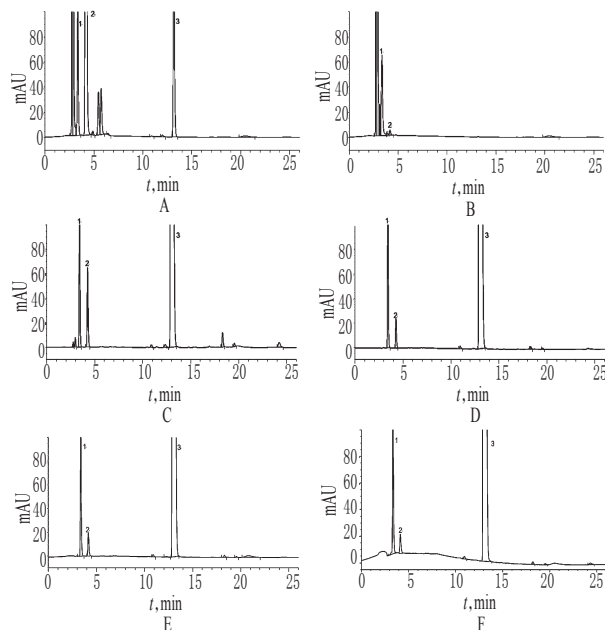


图3 专属性试验高效液相色谱图

A.酸破坏样品; B.碱破坏样品; C.高温破坏样品; D.光照破坏样品; E.高湿破坏样品; F.未破坏样品; 1.富马酸; 2.替诺福韦单吡呋酯; 3.替诺福韦二吡呋酯

Fig 3 HPLC chromatograms of specificity test

A.sample destroyed by acid; B.sample destroyed by base; C.sample destroyed by heat; D.sample destroyed by light; E.sample destroyed by moisture; F.undestroyed sample; 1.fumaric acid; 2.tenofovir monosoproxil; 3. tenofovir disoproxil fumarate

2.5 线性关系考察

精密称取替诺福韦单吡啶酯对照品 10.06 mg, 置于 100 ml 量瓶中, 加 40% 甲醇水溶液溶解并稀释至刻度, 作为贮备液; 精密量取上述贮备液 0.25、0.5、0.75、1.0、1.5、2.0 ml, 分别置于 10 ml 量瓶中, 加 40% 甲醇水溶液稀释至刻度, 各精密量取 20 μ l, 按“2.1”项下色谱条件进样。以质量浓度(x , μ g/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标, 进行线性回归, 得回归方程 $y=39.227x+3.2598$ ($r=0.9999$)。结果表明, 替诺福韦单吡啶酯质量浓度在 2.515~20.120 μ g/ml 范围内与其峰面积呈良好的线性关系。

2.6 检测限和定量限

精密量取“2.2.1”项下对照品溶液 1 ml, 置于 200 ml 量瓶中, 加 40% 甲醇水溶液稀释至刻度, 摇匀。按“2.1”项下色谱条件进样 1.5 μ l, 以信噪比 3:1 测得替诺福韦单吡啶酯检测限为 3.75 μ g/ml; 按“2.1”项下色谱条件进样 5 μ l, 以信噪比 10:1 测得替诺福韦单吡啶酯定量限为 12.50 ng/ml。

2.7 精密度试验

精密量取“2.5”项下对照品贮备液 1.0 ml, 置于 10 ml 量瓶中, 加 40% 甲醇水溶液稀释至刻度, 按“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次。结果, 替诺福韦单吡啶酯峰面积的 RSD 为 0.42%, 表明仪器精密度良好。

2.8 稳定性试验

取 TDF 胶囊(批号: 130301)内容物适量, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 分别于放置 0、2、4、6、8 h 时进样测定。结果, 替诺福韦单吡啶酯峰面积的 RSD 为 2.00%, 表明供试品溶液在 8 h 内稳定性良好。

2.9 重复性试验

取 TDF 胶囊(批号: 130301)内容物适量, 共 6 份, 按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液, 并按“2.1”项下色谱条件分别进样测定。结果, 替诺福韦单吡啶酯含量的 RSD 为 2.67%, 表明本方法重复性良好。

2.10 样品有关物质测定

取 TDF 原料药和胶囊各 3 批, 按“2.2.2”项下方法分别制备供试品溶液, 以外标法、自身对照法测定并计算有关物质的含量, 结果见表 3。由表 3 可见, 按自身对照法计算可能造成结果不准确。

3 讨论

笔者以甲醇-0.05% 磷酸溶液(40:60, V/V)为流动相 A, 甲醇为流动相 B, 以 1.0 ml/min 的流速进行线性梯度洗脱, 并与参

表 3 样品有关物质测定结果(%)

Tab 3 Results of related substances determination of samples(%)

批号	杂质个数	替诺福韦单吡啶酯(自身对照法)	替诺福韦单吡啶酯(外标法)	其他最大杂质(自身对照法)	其他杂质之和(自身对照法)
130201	4	0.37	0.26	0.11	0.26
130202	4	0.38	0.28	0.10	0.28
130203	4	0.37	0.27	0.10	0.23
130301	5	0.37	0.28	0.24	0.52
130302	5	0.37	0.28	0.25	0.54
130303	5	0.38	0.29	0.24	0.54

考文献[5]中的色谱条件进行了比较。结果发现, 采用文献的色谱系统与本试验建立的色谱系统检出的杂质峰个数相当, 但文献的色谱系统主峰出峰较晚(27.5 min), 记录色谱图至保留时间 2 倍需要 55 min; 本试验建立的色谱系统主峰在 13.0 min 出峰, 且本试验选用的流动相甲醇的毒性较文献中的流动相乙腈小。

TDF 胶囊(批号 130301)按自身对照法测得已知杂质替诺福韦单吡啶酯含量为 0.37%, 采用外标法测得替诺福韦单吡啶酯含量为 0.28%。可见, 按照自身对照法测定将高估该杂质, 造成结果不准确, 故该杂质采用外标法测定可更真实反映产品质量。

综上所述, 该方法操作简便、专属性强、灵敏度高、耐用性好, 可用于 TDF 原料药和胶囊中有关物质的测定。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 张久聪, 聂青和. 治疗慢性乙型肝炎新药: 替诺福韦酯[J]. 世界华人消化杂志, 2008, 16(24): 2679.
- [3] 何雅婧, 孙剑, 侯金林. 抗乙型肝炎病毒治疗新药替诺福韦[J]. 药学与临床研究, 2011, 19(5): 385.
- [4] 朱玉平, 王海勇, 刘运美. 替诺福韦前药研究概况[J]. 国际药学研究杂志, 2012, 39(5): 414.
- [5] 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啶酯的有关物质[J]. 淮海工学院学报: 自然科学版, 2012, 21(4): 60.
- [6] 刘宪勇, 刘世军, 孙克明, 等. HPLC 法测定奥拉西坦原料药中的有关物质[J]. 中国药房, 2014, 25(1): 66.

(收稿日期: 2014-05-15 修回日期: 2014-11-27)

(编辑: 陈宏)

《中国药房》杂志——《乌利希期刊指南》(UPD)收录期刊, 欢迎投稿、订阅