

RP-HPLC 测定替诺福韦及其有关物质

刘超^{1,2,3}, 钟惺^{2,3}, 席艳琼^{2,3}, 汤银霞^{2,3}, 蒋礼^{2,3}, 王福军^{2,3}, 蒲通^{2,3*}, 曾苏¹

(¹浙江大学药学院, 杭州 310007; ²浙江车头制药股份有限公司, 台州 317321;

³浙江省抗病毒药物工程技术研究中心, 台州 317321)

摘要 为了研究替诺福韦的有关物质, 合成了3个有关化合物, 建立了替诺福韦RP-HPLC分离条件(以Agilent ZORBAX SB-C₁₈为色谱柱, 以甲醇-0.02 mol/L磷酸二氢钾为流动相梯度洗脱, 检测波长为260 nm)。结果显示替诺福韦有3种潜在的有关物质。所建立的分析方法准确度高, 重复性好, 适用于替诺福韦有关物质的含量检测。

关键词 替诺福韦; RP-HPLC; 有关物质; 杂质

中图分类号 R917 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2015)01-0078-03

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20150110

Determination of the related substances of tenofovir by RP-HPLC

LIU Chao^{1,2,3}, ZHONG Xing^{2,3}, XI Yanqiong^{2,3}, TANG Yinxia^{2,3}, JIANG Li^{2,3}, WANG Fujun^{2,3}, PU Tong^{2,3*}, ZENG Su¹

¹College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310007; ²Zhejiang Charioteer Pharmaceutical Co., Ltd, Taizhou 317321; ³Antiviral Drug Engineering Technology Research Center of Zhejiang Province, Taizhou 317321, China

Abstract To investigate the related substances of tenofovir, 3 related substances were synthesized. RP-HPLC analytical method was developed using Agilent ZORBAX SB-C₁₈ column. The mobile phase composed of methanol and 0.02 mol/L potassium dihydrogen phosphate. Linear gradient elution was used and the detection wavelength was 260 nm. 3 impurities were found in tenofovir. The established method was accurate and reproducible, and it can be applied for the related substances test in tenofovir.

Key words tenofovir; RP-HPLC; related substances; impurities

替诺福韦是一种新型开环磷酸核苷化合物, 可有效抑制逆转录病毒的复制。替诺福韦酯(tenofovir disoproxil fumarate, TDF)是替诺福韦的前药, 自2001年被美国FDA批准用于治疗HIV感染^[1-4]。中国从2012年起将TDF列为HIV感染的一线治疗药物。2011年国家CFDA批准替诺福韦酯治疗慢性乙型肝炎的新药临床试验申报, 标志着替诺福韦酯成为慢性乙肝抗病毒治疗新药。

关于替诺福韦有关物质的含量测定尚未见文献报导, 本文采用RP-HPLC对替诺福韦的有关物质含量测定进行了研究。

1 材料

1.1 试剂

替诺福韦及其杂质A~C对照品(结构式见图

1,浙江车头制药股份有限公司,杂质A~C经HPLC归一化纯度分别为99.2%, 94.9%, 97.4%);替诺福韦样品(浙江车头制药股份有限公司);磷酸二氢钾为分析纯, 甲醇、冰醋酸为色谱纯。

1.2 仪器

Prominence LC-20A型高效液相色谱仪、LC-solution色谱工作站(日本岛津公司)。

2 方法及结果

2.1 替诺福韦样品中的杂质分析

在研究替诺福韦中, 发现了3个限度超过0.1%的杂质, 根据对合成工艺的分析, 发现杂质A为反应体系中未水解的原料; 杂质B为水解反应原料中未发生缩合反应的杂质; 杂质C为杂质A部分水解形成的杂质, 该杂质尚未见文献报道。本

课题组对杂质 A ~ C 进行了结构解析和确证(图 1)。在此基础上,本研究建立了替诺福韦有关物质测定的 RP-HPLC 方法。

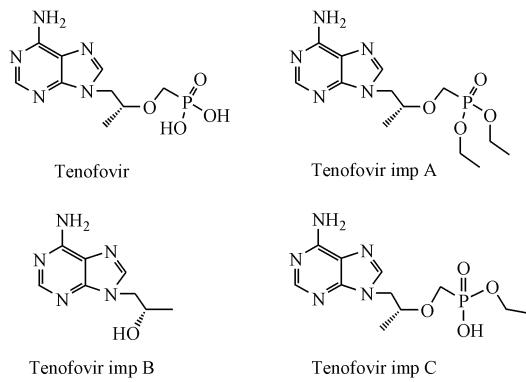


Figure 1 Chemical structures of tenofovir and 3 impurities

2.2 色谱条件

色谱柱:Agilent ZORBAX SB-C₁₈,250 mm × 4.6 mm,5 μm。检测波长:260 nm。流速:1.0 mL/min。柱温:25 °C。进样量:10 μL。流动相 A 为甲醇,流动相 B 为 0.02 mol/L 磷酸二氢钾,采用梯度洗脱的方式。梯度洗脱程序:5 min,92% B;25 min,77% B;40 min,50% B;45 min,92% B;60 min,92% B。稀释剂为流动相 B。

2.3 溶液的制备

称取替诺福韦样品 20 mg 于 20 mL 量瓶中,用稀释剂溶解并稀释定容至刻度,摇匀即得。

2.4 系统适用性

分别称取替诺福韦对照品 5 mg、杂质 A、B 对照品各 5 mg,杂质 C 对照品 7 mg 于同一个 100 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释定容至刻度;精密移取 1.0 mL 于 50 mL 量瓶中,用甲醇稀释定容至刻度。结果(图 2)表明替诺福韦和各杂质的分离良好。

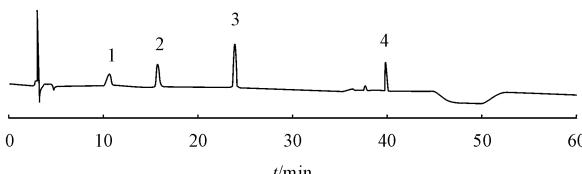


Figure 2 Chromatogram of system suitability test of mixture of tenofovir and its impurities A-C

1:Tenofovir;2:Imp B;3:Imp C;4:Imp A

2.5 方法专属性

2.5.1 酸破坏 取替诺福韦样品 20 mg 于 20 mL 量瓶之中,加入 1 mol/L 盐酸溶液 5.0 mL,置于

60 °C 水浴中 6 h,之后冷却至室温,加入 1 mol/L 氢氧化钠溶液 5.0 mL 中和后,加稀释剂定容至刻度。

2.5.2 碱破坏 取替诺福韦样品 20 mg 于 20 mL 量瓶之中,加入 1 mol/L 氢氧化钠溶液 5.0 mL,置于 60 °C 水浴中 6 h,之后冷却至室温,加入 1 mol/L 盐酸溶液 5.0 mL 中和后,加稀释剂定容至刻度。

2.5.3 氧化破坏 取替诺福韦样品 20 mg 于 20 mL 量瓶之中,加入 30% 双氧水溶液 5.0 mL,置于 60 °C 水浴中 4 h,之后冷却至室温,加稀释剂定容至刻度。

分别取上述溶液进样,记录色谱图,结果表明替诺福韦经过酸、碱和氧化破坏后,所产生的杂质均可以与主峰达到基线分离,经过 PDA 对主峰峰纯度检测,峰纯度均符合要求(图 3),表明方法的专属性良好。

2.6 线性范围

分取替诺福韦、替诺福韦杂质 A ~ C 对照品适量,配制成质量浓度分别为 10,10,10,20 μg/mL 的混合储备液,分别取该混合储备液 1.0 mL 至 100 mL 量瓶中,加稀释剂定容至刻度,标记为溶液 L1;储备液 1.0 mL 至 50 mL 量瓶中,加稀释剂定容至刻度,标记为溶液 L2;储备液 1.0 mL 至 25 mL 量瓶中,加稀释剂定容至刻度,标记为溶液 L3;储备液 4.0 mL 至 50 mL 量瓶中,加稀释剂定容至刻度,标记为溶液 L4;储备液 5.0 mL 至 50 mL 量瓶中,加稀释剂定容至刻度,标记为溶液 L5;储备液 6.0 mL 至 50 mL 量瓶中,加稀释剂定容至刻度,标记为溶液 L6。分别进 L1 ~ L6 溶液各 3 次,按照峰面积平均值 A 和质量浓度 c(μg/mL)进行线性回归,得标准曲线方程:替诺福韦: $A = 28133c + 602.9, r = 0.9995$ (0.1 ~ 1.2 μg/mL);替诺福韦杂质 A: $A = 23000c - 180.4, r = 0.9989$ (0.1 ~ 1.2 μg/mL);替诺福韦杂质 B: $A = 42965c - 389.1, r = 0.9999$ (0.1 ~ 1.2 μg/mL);替诺福韦杂质 C: $A = 19926c - 118.5, r = 0.9999$ (0.2 ~ 2.4 μg/mL)。

2.7 检出限

进样“2.6”项下 L1 溶液,计算替诺福韦杂质 A ~ C 和替诺福韦的信噪比,然后用稀释剂分别稀释合适的倍数,使各已知杂质和替诺福韦的信噪比约为 3,即为各自的检出限溶液;进样检测,重复 2 次。结果表明,替诺福韦及其杂质 A ~ C 的检出限分别为 6.1,6.0,6.1,13.6 pg。

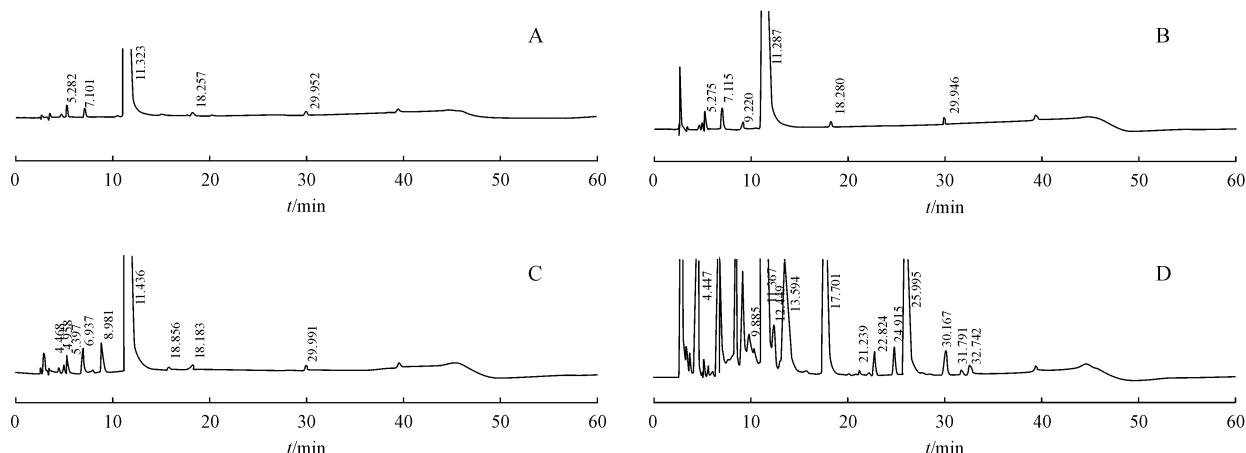


Figure 3 Chromatogram of undestroyed tenofovir (A), tenofovir destructed by acid (B), tenofovir destructed by base (C), and tenofovir destructed by oxidation (D)

2.8 精密度

分取替诺福韦杂质 A~C 适量配制质量浓度为 10, 10, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的混合储备液, 取替诺福韦样品 50 mg 至于 50 mL 量瓶之中, 加入杂质混合储备液 5.0 mL 于量瓶之中, 稀释剂溶解并定容至刻度, 平行配制 6 份, 进样。替诺福韦杂质 A~C 的含量 RSD(%) 分别为 0.79, 0.38 和 0.45。

2.9 回收率

取“2.7”项下杂质混合储备液, 将未加入杂质混合储备液标记为 A_0 : 取替诺福韦样品 50 mg 至于 50 mL 量瓶之中, 稀释剂溶解并定容。50% 添加杂质混合储备液标记为 A_1 : 取替诺福韦样品 50 mg 至于 50 mL 量瓶之中, 加入杂质混合储备液 2.5 mL 于量瓶之中, 稀释剂溶解并定容至刻度。100% 添加杂质混合储备液标记为 A_2 : 取“2.7”项下精密度重复溶液。120% 添加杂质混合储备液标记为 A_3 : 取替诺福韦样品 50 mg 至于 50 mL 量瓶之中, 加入杂质混合储备液 6 mL 于量瓶之中, 稀释剂溶解并定容至刻度。分别进样 A_0 ~ A_3 溶液, 重复 3 次。按照公式(1)计算每个浓度点的回收率(y)。

$$y = c_A / c_B \quad (1)$$

其中 c_A 为溶液 A_1 ~ A_3 中各杂质的计算含量; c_B 为溶液 A_1 ~ A_3 中各杂质实际配制的含量; $c_A = (a - a_0)$; a 为溶液 A_1 ~ A_3 中各杂质归一化法的含量; a_0 为溶液 A_0 中各杂质归一化法的含量。

根据计算得知, 替诺福韦杂质 A~C 的回收率(%) 分别为 95.62, 106.83 和 98.76。

2.10 有关物质检测

按照上述色谱条件, 取某制药公司连续生产 3 批样品测定, 结果见表 1。

Table 1 Determination of relative substances of tenofovir by the method established

Batch No.	Tenofovir/%	Imp A/%	Imp B/%	Imp C/%
201404001	99.61	0.116	0.164	0.086
201404002	99.72	0.105	0.142	0.077
201404003	99.65	0.121	0.153	0.081

3 讨论

本文使用 RP-HPLC 法对替诺福韦的有关物质进行了研究, 并应用于实际生产中样品的检测。在前期文献调研中, 未见关于替诺福韦的有关物质的文献报道。在所建立方法中, 所有杂质均达到基线分离, 主峰峰纯度符合要求。通过完整的方法学验证, 证明了方法的可靠性、实用性和耐用性。

参考文献

- [1] Van Griensven J, Phirum L, Thai S, et al. A clinical prediction score for targeted creatinine testing before initiating tenofovir-based antiretroviral treatment in Cambodia [J]. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2014, 65(4): 150-152.
- [2] Mansoor LE, Karim QA, Werner L, et al. Impact of an adherence intervention on the effectiveness of tenofovir gel in the CAPRISA 004 trial [J]. *AIDS Behav*, 2014, 18(5): 841-848.
- [3] Hu CY, Liu YM, Liu Y, et al. Pharmacokinetics and tolerability of Tenofovir disoproxil fumarate 300 mg once daily: an open-label, single- and multiple-dose study in healthy Chinese subjects [J]. *Clin Ther*, 2013, 35(12): 1884-1889.
- [4] Custodio JM, Yin X, Hepner M, et al. Effect of food on rilpivirine/emtricitabine/tenofovir disoproxil fumarate, an antiretroviral single-tablet regimen for the treatment of HIV infection [J]. *J Clin Pharmacol*, 2014, 54(4): 378-385.