

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¹¹ 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 Su¹¹ College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310007; ² Zhejiang Charioteer Pharmaceutical Co., Ltd, Taizhou 317321; ³ Antiviral 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。

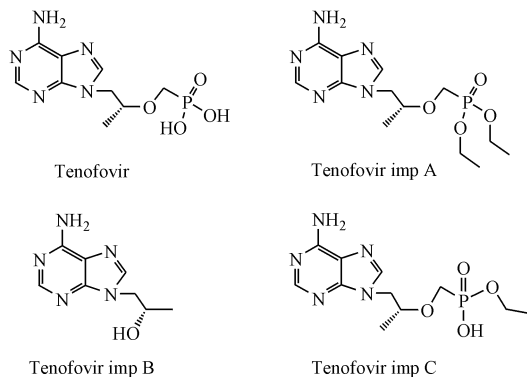


Figure 1 Chemical structures of tenofovir and 3 impurities

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 ℃。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。

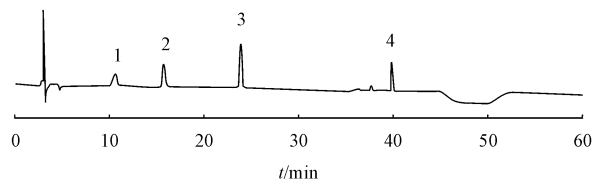


Figure 2 Chromatogram of system suitability test of mixture of tenofovir and its impurities A-C

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 ℃ 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 ℃ 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 ℃ 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: $A = 28\,133c + 602.9$, $r = 0.999\,5$ (0.1 ~ 1.2 μg/mL);替诺福韦杂质 A: $A = 23\,000c - 180.4$, $r = 0.998\,9$ (0.1 ~ 1.2 μg/mL);替诺福韦杂质 B: $A = 429\,65c - 389.1$, $r = 0.999\,9$ (0.1 ~ 1.2 μg/mL);替诺福韦杂质 C: $A = 19\,926c - 118.5$, $r = 0.999\,9$ (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。

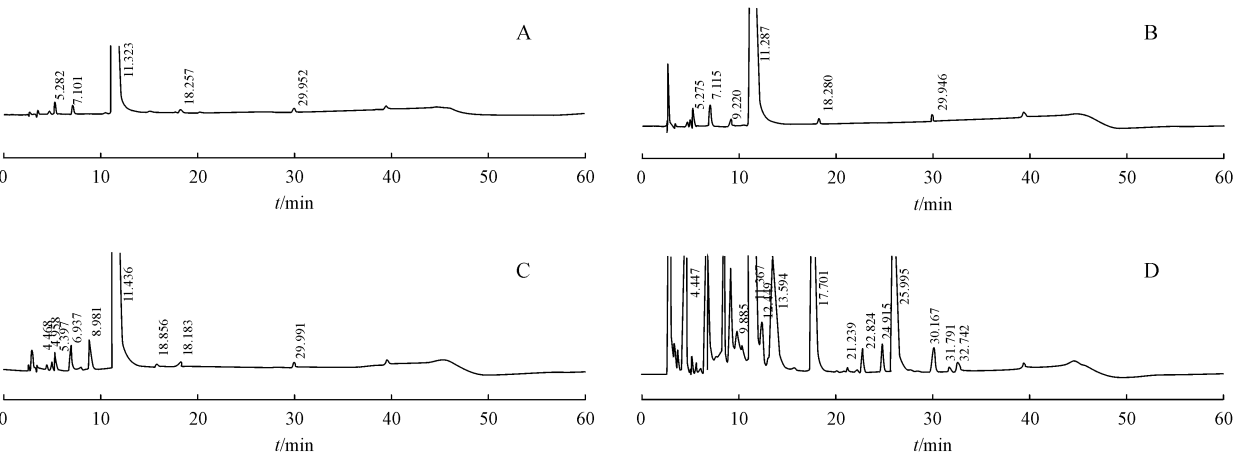


Figure 3 Chromatogram of undestroyed tenofovir (A), tenofovir destroyed by acid (B), tenofovir destroyed by base (C), and tenofovir destroyed by oxidation (D)

2.8 精密度

分取替诺福韦杂质 A ~ C 适量配制成质量浓度为 10,10,20 μg/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 A₀;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 A₁;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 A₂;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 A₃;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 A₀ ~ A₃ 溶液,重复 3 次。按照公式 (1) 计算每个浓度点的回收率(*g*)。

$$g = c_A / c_B \tag{1}$$

其中 *c_A* 为溶液 A₁ ~ A₃ 中各杂质的计算含量;*c_B* 为溶液 A₁ ~ A₃ 中各杂质实际配制的含量;*c_A* = (*a* - *a*₀);*a* 为溶液 A₁ ~ A₃ 中各杂质归一化法的含量;*a*₀ 为溶液 A₀ 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/%	Im 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.