

## RP-HPLC法测定拉米夫定的含量及有关物质

李萌, 刘有平, 鲁静, 邸欣\*

(沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016)

**摘要** 目的: 建立测定拉米夫定含量及有关物质的 RP-HPLC 方法。方法: 进行拉米夫定含量测定及有关物质检查时, 采用 Diamonsil C<sub>18</sub> 柱 (200 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.025 mol·L<sup>-1</sup> 醋酸铵溶液 (pH 3.9 ± 0.1) - 甲醇 (90:10), 流速为 1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长为 277 nm; 进行拉米夫定对映体纯度检查时, 采用 CYCLOBOND I 2000 RSP 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.05 mol·L<sup>-1</sup> 醋酸铵溶液 (pH 3.9 ± 0.1) - 甲醇 (95:5), 流速为 0.8 mL·min<sup>-1</sup>, 检测波长为 270 nm。结果: 拉米夫定与其他杂质能较好分离, 拉米夫定浓度在 5.0 ~ 50.0 μg·mL<sup>-1</sup> 范围内线性关系良好 ( $r = 0.9997$ ), 平均回收率为 100.1% (RSD = 0.69%,  $n = 9$ ), 检测限为 0.2 ng·mL<sup>-1</sup>; 拉米夫定与其右旋对映体可完全分离。结论: 本方法灵敏、准确、专属性好, 可用于拉米夫定的含量测定、有关物质检查及对映体纯度检查。

**关键词** 拉米夫定; 含量测定; 有关物质; 高效液相色谱法; 手性分离; 对映体

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)07-1216-04

## RP-HPLC determination of lamivudine and its related substances

LIM eng, LIU You-ping, LU Jing, DIX in\*

(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016, China)

**Abstract Objective** To establish RP-HPLC methods for the determination of lamivudine and its related substances. **Method** Separation of lamivudine and its related substances was performed on a Diamonsil C<sub>18</sub> column (200 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of 0.025 mol·L<sup>-1</sup> ammonium acetate (pH 3.9 ± 0.1) - methanol (90:10). The flow rate was 1.0 mL·min<sup>-1</sup> and the detection wavelength was 277 nm. Separation of lamivudine enantiomers was performed on a CYCLOBOND I 2000 RSP column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of 0.05 mol·L<sup>-1</sup> ammonium acetate (pH 3.9 ± 0.1) - methanol (95:5). The flow rate was 0.8 mL·min<sup>-1</sup> and the detection wavelength was 270 nm. **Results** Lamivudine was separated completely from impurities. The linear range of lamivudine was 5-50 μg·mL<sup>-1</sup> ( $r = 0.9997$ ). The average recovery of lamivudine was 100.1% with RSD of 0.69% ( $n = 9$ ). The lowest limit of detection was 0.2 ng·mL<sup>-1</sup>. (-) - Lamivudine was separated completely from (+) - lamivudine. **Conclusion** With good sensitivity and selectivity, the method can be applicable for the determination of lamivudine and its related substances.

**Key words** lamivudine; determination; related substances; HPLC; chiral separation; enantiomer

拉米夫定 (lamivudine) 是一种新型的核苷类抗病毒药, 其化学名为 (2*R*-顺式)-4-氨基-1-(2-羟甲基-1,3-氧硫杂环戊-5-基)-(1*H*)-嘧啶-2-酮, 结构式见图 1。拉米夫定在细胞内磷酸化为活性的三磷酸衍生物, 通过竞争性抑制乙型肝炎病毒 (HBV) 聚合酶而抑制 HBV-DNA 的合成, 同时又与新合成的 HBV 结合引起链的中断, 从而抑制 HBV 病毒的复制<sup>[1-3]</sup>。拉米夫定于 1998 年分别

通过美国 FDA 和我国 SDA 批准用于治疗慢性乙型肝炎, 现已成为 HBV 感染的一线治疗药物。目前, 拉米夫定原料药及其制剂在我国均为进口药品, 由于专利保护, 国内一直未有自主知识产权的产品。本文所研究的拉米夫定原料药由湖南千金湘江药业股份有限公司研制。为了有效控制产品质量, 本研究旨在建立拉米夫定原料药的含量测定及有关物质检查的反相高效液相色谱法。有关该方面的研究,

\* 通讯作者, Tel: (024) 23986342; E-mail: dixin63@hotmail.com

国内尚未见文献报道。

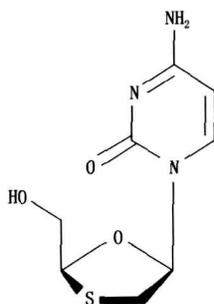


图 1 拉米夫定化学结构式

Fig 1 Chemical structure of lamivudine

### 1 仪器与试剂

LC-10AD 高效液相色谱仪 (日本岛津公司); N2000 色谱工作站 (浙江大学智能信息工程研究所); 拉米夫定原料药 (湖南千金湘江药业股份有限公司自制, 批号: 060101, 060102, 060103); 拉米夫定对照品 (USP, 纯度 > 99.9%); 拉米夫定左、右旋体混合对照品 (USP, 左旋体含量为 98.6%); 甲醇为色谱纯; 水为双蒸水; 其余试剂均为分析纯。

### 2 方法与结果

#### 2.1 含量测定及有关物质检查

##### 2.1.1 色谱条件与系统适用性

色谱柱: Diamonsil C<sub>18</sub> 柱 (200 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.025 mol·L<sup>-1</sup> 醋酸铵溶液 (pH 3.9 ± 0.1) - 甲醇 (90:10); 流速: 1.0 mL·min<sup>-1</sup>; 检测波长: 277 nm; 柱温: 25 °C; 进样量: 20 μL。

在上述色谱条件下, 拉米夫定峰与相邻杂质峰的分度大于 1.5 理论塔板数按拉米夫定计算在 4000 以上。

##### 2.1.2 专属性

取空白流动相 20 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图。结果表明, 流动相对测定无干扰 (见图 2)。

取本品数份, 1 份置于照度 (4500 ± 500) k 的光照箱内, 放置 10 d; 1 份在 120 °C 下加热 4 h 冷却至室温; 1 份加入 1 mol·L<sup>-1</sup> 的盐酸溶液 2.0 mL, 室温放置 4 h, 用氢氧化钠溶液中和; 1 份加入 1 mol·L<sup>-1</sup> 的氢氧化钠溶液 2.0 mL, 室温放置 4 h, 用盐酸溶液中和; 1 份加入 3% 过氧化氢溶液 2.0 mL, 室温放置 4 h, 调 pH 至中性。上述样品分别加流动相配制成浓度约为 250 μg·mL<sup>-1</sup> 的溶液, 分别进样 20 μL, 记录色谱图。结果表明, 本方法能有效检出各破坏性试验产生的降解产物和样品中的相关杂质, 且杂质峰与主成分峰能很好分离 (见图 2)。

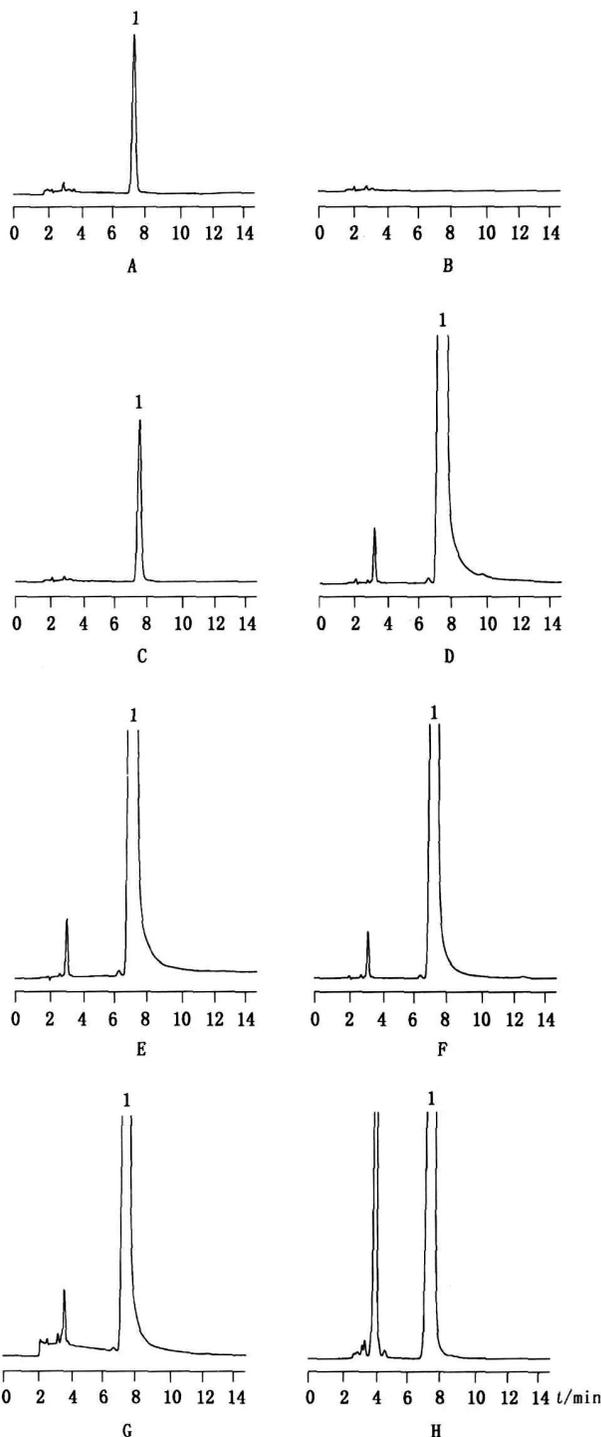


图 2 拉米夫定含量测定及有关物质检查色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms of lamivudine and its related substances

A 对照品 (standards) B 空白流动相 (blank) C 样品 (sample) D 光破坏 (degradation products by light) E 高温破坏 (degradation products by heat) F 酸破坏 (degradation products by acid) G 碱破坏 (degradation products by base) H 氧化破坏 (degradation products by oxidation)

1. 拉米夫定 (lamivudine)

2.1.3 检测限和定量限 在上述色谱条件下, 取基线噪声的 3 倍值作为检测限、基线噪声的 10 倍值作

为定量限,测得拉米夫定的检测浓度为  $0.2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ,定量浓度为  $0.5 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

**2.1.4 线性关系** 取拉米夫定对照品约  $12 \text{ mg}$  精密称定,置  $50 \text{ mL}$ 量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀。精密量取此溶液  $0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0 \text{ mL}$ 分别置  $10 \text{ mL}$ 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀。分别进样,记录色谱图,以峰面积为纵坐标 ( $A$ ),浓度为横坐标 ( $C$ )进行线性回归,回归方程为:

$$A = 6.835 \times 10^4 C + 7.118 \times 10^4 \quad r = 0.9997$$

拉米夫定浓度在  $5.0 \sim 50.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好。

### 2.1.5 精密性、重复性与溶液稳定性

取浓度为  $20.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的拉米夫定对照品溶液,重复进样 6次,测得峰面积的 RSD为  $0.77\%$ ,说明本法精密性良好。

取本品约  $25 \text{ mg}$  精密称定,共称取 6份,配制浓度为  $20.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的供试品溶液,分别进样,测得拉米夫定含量的 RSD为  $0.63\%$ ,说明本法重复性良好。

取浓度为  $20.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的同一份供试品溶液,室温下避光放置,分别于第  $0, 2, 4, 6, 8, 12 \text{ h}$ 进样,记录色谱图,测得峰面积的 RSD为  $0.42\%$ ,说明拉米夫定溶液在室温下避光放置  $12 \text{ h}$ 稳定。

**2.1.6 回收率** 分别取拉米夫定对照品约  $10, 12.5, 15 \text{ mg}$  精密称定,各称取 3份,分置  $50 \text{ mL}$ 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀。精密吸取此溶液  $1 \text{ mL}$ 置  $10 \text{ mL}$ 量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,配制成高、中、低 3个浓度的溶液,分别进样测定,高、中、低 3个浓度的回收率分别为  $100.4\%, 100.9\%, 100.2\%$ ,平均回收率为  $100.1\%$  ( $\text{RSD} = 0.69\%$ )。

**2.1.7 有关物质检查方法** 取本品约  $25 \text{ mg}$  精密称定,置  $100 \text{ mL}$ 量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,得到浓度为  $250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的拉米夫定溶液,作为供试品溶液;精密量取供试品溶液  $1.0 \text{ mL}$ ,置  $100 \text{ mL}$ 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,得到浓度为  $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的拉米夫定溶液,作为对照溶液。分别取供试品溶液和对照溶液各  $20 \mu\text{L}$ 注入液相色谱仪,记录色谱图至主成分保留时间的 2倍。以不加校正因子的自身对照法计算总杂质含量,结果见表 1。

**2.1.8 含量测定方法** 取本品约  $25 \text{ mg}$  精密称定,置  $100 \text{ mL}$ 量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,

摇匀。精密量取此溶液  $1.0 \text{ mL}$ ,置  $10 \text{ mL}$ 量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,取  $20 \mu\text{L}$ 注入液相色谱仪,记录色谱图;另取拉米夫定对照品适量,同法测定。按外标法以峰面积计算供试品中拉米夫定的含量,结果见表 1。

表 1 样品含量及有关物质测定结果 (%)

Tab 1 Results of the determination of lamivudine and its related substances

批号 (Lot No.)	拉米夫定 [(-)- lamivudine]	有关物质 (related substances)	右旋体 [(+)- lamivudine]
060101	98.9	0.33	0.18
060102	99.4	0.31	0.16
060103	98.9	0.31	0.12

## 2.2 对映体纯度检查

### 2.2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱: CYCLOBOND I 2000 RSP 柱 ( $200 \text{ mm} \times 4.6 \text{ mm}, 5 \mu\text{m}$ ), 流动相:  $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  醋酸铵溶液 ( $\text{pH} 3.9 \pm 0.1$ ) - 甲醇 ( $95:5$ ); 流速:  $0.8 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ; 检测波长:  $270 \text{ nm}$ ; 柱温:  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ; 进样量:  $20 \mu\text{L}$ 。

在上述色谱条件下,拉米夫定左、右旋体色谱峰之间的分离度大于  $1.5$ ,理论塔板数大于  $3000$ 。

### 2.2.2 专属性

取流动相  $20 \mu\text{L}$ 注入液相色谱仪,记录色谱图。结果表明,流动相对测定无干扰(见图 3)。

取光照、高温、酸、碱、氧化等破坏性试验的溶液(溶液制备方法同“2.1.2”项),浓度约为  $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,分别进样  $20 \mu\text{L}$ ,记录色谱图。结果表明,本方法能有效检出各破坏性试验产生的降解产物和样品中的相关杂质,且杂质峰与左、右旋体峰能很好分离(见图 3)。

**2.2.3 检测限** 在上述色谱条件下,取基线噪声的 3倍值作为检测限,测得拉米夫定左旋体的检测限为  $0.2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。因右旋体与左旋体的紫外吸收特性相同,故拉米夫定右旋体的检测限为  $0.2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

**2.2.4 右旋体检查** 取本品约  $25 \text{ mg}$  精密称定,置  $100 \text{ mL}$ 量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,得到浓度为  $250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的拉米夫定溶液。精密量取此溶液  $4 \text{ mL}$ ,置  $10 \text{ mL}$ 量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,量取此溶液  $20 \mu\text{L}$ ,注入液相色谱仪,记录色谱图。按峰面积归一化法计算拉米夫定右旋体含量,结果见表 1。

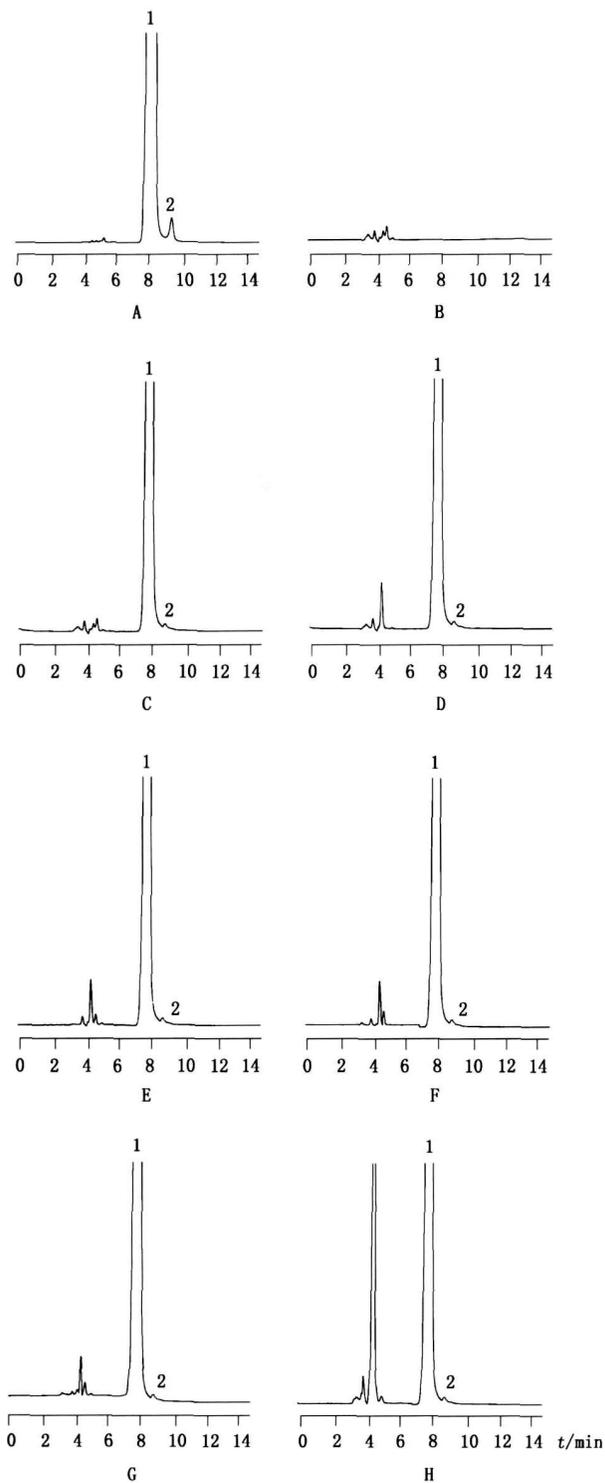


图 3 拉米夫定对映体纯度检查色谱图

Fig 3 HPLC chromatograms of lamivudine enantiomers

A. 对照品混合物 (standards) B. 空白流动相 (blank) C. 样品 (sample) D. 光破坏 (degradation products by light) E. 高温破坏 (degradation products by heat) F. 酸破坏 (degradation products by acid) G. 碱破坏 (degradation products by base) H. 氧化破坏 (degradation products by oxidation)

1 拉米夫定左旋体 [(-)- lamivudine] 2 拉米夫定右旋体 [(+)- lamivudine]

### 3 讨论

3.1 采用 CYCLOBOND I 2000 RSP 柱拆分拉米夫定对映体时, 考察了不同流动相配比对手性分离的影响, 发现随着水相 (醋酸铵缓冲液) 比例的增加, 拉米夫定左、右旋体的分离度增大。进一步考察了不同浓度 (0.025~0.05 mol·L<sup>-1</sup>)、不同 pH 值 (3.5~4.0) 的醋酸铵缓冲液对手性分离的影响, 发现当醋酸铵溶液的浓度小于 0.05 mol·L<sup>-1</sup> 时, 左、右旋体达不到基线分离, 而在 pH 3.9 下, 左、右旋体的分离效果最好。最后选择 0.05 mol·L<sup>-1</sup> 醋酸铵溶液 (pH 3.9 ± 0.1) - 甲醇 (95:5) 的流动相组成。

3.2 柱温的微小变化会引起拉米夫定保留时间的较大波动, 实验发现, 随着柱温的升高, 主药的保留时间显著缩短。因此, 为保证分析结果的重现性, 实验中需严格控制柱温。

3.3 拉米夫定有关物质的来源主要有: 拉米夫定右旋体、合成中间体胞嘧啶和尿嘧啶以及合成未步反应引入的乙酰水杨酸和水杨酸等杂质。本实验测定了胞嘧啶、尿嘧啶、乙酰水杨酸和水杨酸的检测限, 均小于 250 ng·mL<sup>-1</sup>。在本文研究的 3 批样品中, 除拉米夫定右旋体外, 其他 4 种杂质未被检出, 说明它们在样品中的含量均小于 0.1%, 故不单独制定上述 4 种杂质的检查, 而将之并入有关物质检查中。

### 参考文献

- Mario Rizzetto, Alfredo Marzano, Marco Lagget. Treatment of hepatitis B e antigen- negative chronic hepatitis B with lamivudine. *J Hepatol* 2003; 39 (Supplement 1): 168
- Teresa Santantonio, Michele Mazzola, Giuseppe Pastore. Lamivudine is safe and effective in fulminant hepatitis B. *J Hepatol*, 1999, 30(3): 551
- Stephen Kewn, Gareth J Veal, Patrick G Hoggard *et al*. Lamivudine (3TC) phosphorylation and drug interactions in vitro. *Biochem Pharmacol* 1997; 54(5): 589

(本文于 2009 年 5 月 15 日修改回)