

梯度洗脱反相高效液相色谱法测定恩替卡韦的有关物质

蒋银妹¹, 罗秀琴², 徐燕², 毕开顺^{1*}

(1. 沈阳药科大学药学院, 沈阳 110016 2 长沙市华美医药研究所, 长沙 410007)

摘要 目的: 建立测定恩替卡韦有关物质的梯度洗脱反相高效液相色谱法。方法: 采用 Waters C₁₈ 色谱柱 (5 μm, 4.6 mm × 250 mm), 以乙腈-水 (3:97) 为流动相 A, 乙腈为流动相 B, 梯度洗脱条件: 0~10 min A 从 100% → 90%; 10~15 min A 为 90%; 15~25 min A 从 90% → 60%; 25~28 min A 从 60% → 100%; 以 1.0 mL·min⁻¹ 的流速进行梯度洗脱, 检测波长为 254 nm。结果: 在上述色谱条件下, 恩替卡韦与各中间体杂质及降解杂质均能有效分离, 分离度大于 2.0, 检测限为 0.4 ng, 精密度良好 (RSD 为 0.8%)。结论: 本方法操作简便, 专属性强, 灵敏度高, 可用于恩替卡韦有关物质的测定。

关键词: 恩替卡韦; 有关物质; 反相高效液相色谱法; 梯度洗脱

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)04-0676-04

HPLC determination of related substances in entecavir

JIANG Yin-mei¹, LUO Xiu-qin², XU Yan², BIKai-shun^{1*}

(1. Shenyang Pharmaceutical University Shenyang 110016, China 2. Institute of Hamei Medicine of Changsha City, Changsha 410007, China)

Abstract Objective To establish an RP-HPLC method for related substances determination of entecavir. **Method** The Waters C₁₈ column (5 μm, 4.6 mm × 250 mm) was used. Mobile phase A: acetonitrile-water (3:97); Mobile phase B: acetonitrile. Condition of the gradient elution: 0-10 min A: 100% → 90%; 10-15 min A: 90%; 15-25 min A: 90% → 60%; 25-28 min A: 60% → 100%; The gradient elution was performed with a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, the detection wavelength was 254 nm. **Results** Good chromatographic separation of entecavir and its intermediate products and by-products were obtained. The detection limit is 0.4 ng and the precision was good with RSD of 0.8%. **Conclusion** The method is convenient, highly specific, sensitive and suitable for determination of the related substances of entecavir.

Key words entecavir; related substance; RP-HPLC; gradient elution

恩替卡韦化学名为 2-氨基-9-[(1S,3R,4S)-4-羟基-3-羟甲基-2-亚甲基环戊基]-1,9-二氢-6H-嘌呤-6-酮-1-水合物, 是由百时美施贵宝公司自主研发的一种核苷类似物, 已于 2005 年 3 月 30 日在美国获得美国食品药品监督管理局 (FDA) 的上市批准, 剂型有片剂 (规格: 0.5, 1.0 mg·片⁻¹) 和口服液 (规格: 0.05 mg·mL⁻¹), 适用于病毒复制活跃、血清转氨酶 (ALT) 持续升高或有肝脏组织学显示活动性病变的成人慢性乙型肝炎患者。国家食品药品监督管理局于 2005 年 11 月 15 日正式批准了中美上海施贵宝制药有限公司申报的恩替卡韦片, 商品名: 博路定, 规格: 0.5 mg, 批准文号: 国药准字 H20052237^[1]。

恩替卡韦片国家药品标准^[2] 选用梯度洗脱反相高效液相色谱法对本品有关物质检查进行了控制。本文采用 HPLC 法对恩替卡韦原料的有关物质检查进行了详细的方法学研究, 考察了恩替卡韦合成工艺中可能存在的中间体杂质、酸、碱、氧化、高温破坏的降解产物与主药的分离, 并建立了准确、灵敏、可靠的有关物质检查方法, 为保证本品的产品质量提供重要依据。

1 仪器及试剂

Waters 515 泵, Waters 2487 检测器, 7725i 手动进样器, 大连依利特 EC2000 色谱数据工作站及泵控系统, 依利特 ZW 柱温箱, TU1810 紫外-可见分光光度计 (北京通用公司); Mettler AE100 电子分析

* 通讯作者 Tel: (024) 23986016 E-mail: Bikaishun@yahoo.com

天平(梅特勒公司)。乙腈(色谱纯, Caledon Laboratories LTD.); 甲醇(色谱纯, 国药集团化学试剂有限公司); 水(乐百氏纯水); 其他试剂均为分析纯。试验用的恩替卡韦对照品(HPLC纯度: 99.7%)、供试品(批号: 080801, 080802, 080803)、起始原料(HM-1)、中间体(HM-2, HM-3, HM-4)均由长沙市华美医药研究所提供。恩替卡韦结构式见图1。

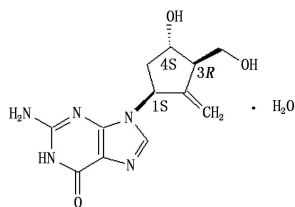


图1 恩替卡韦结构式

Fig 1 Structure of Entecavir

2 方法及结果

2.1 色谱条件 色谱柱: Waters C₁₈ (5 μm, 4.6 mm × 250 mm); 流动相: 以乙腈-水(3:97)为流动相A, 乙腈为流动相B; 梯度洗脱条件: 0~10 min A从100% → 90%; 10~15 min A为90%; 15~25 min A从90% → 70%; 25~28 min A从60% → 100%; 检测波长: 254 nm; 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 进样浓度: 200 μg · mL⁻¹; 进样量: 20 μL。

2.2 溶液的配制

供试品溶液: 取本品约25 mg精密称定, 置25 mL量瓶中, 加甲醇适量, 超声使溶解, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 精密量取10 mL, 置100 mL量瓶中, 加流动相A稀释至刻度, 摇匀, 即得。

对照品溶液: 取恩替卡韦对照品约25 mg精密称定, 置25 mL量瓶中, 加甲醇适量, 超声使溶解, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 精密量取5 mL, 置25 mL量瓶中, 加流动相A稀释至刻度, 摇匀, 即得。

混合溶液: 取恩替卡韦对照品、起始原料HM-1及中间体HM-2, HM-3, HM-4各适量, 分别加甲醇溶解并稀释制成200 μg · mL⁻¹的溶液; 精密量取上述溶液各适量, 混匀, 作为混合溶液。

2.3 检测波长的确定 紫外扫描图谱显示恩替卡韦在255 nm的波长处有最大吸收, 而起始原料HM-1及中间体HM-2, HM-3, HM-4分别在258 nm, 257 nm, 258 nm, 254 nm的波长处有最大吸收, 故参照恩替卡韦片国家药品标准^[2]有关物质检查项下的色谱条件, 选择254 nm为本品有关物质检查的检测波长。

2.4 分离度试验

精密量取混合溶液20 μL注入液相色谱仪, 记录色谱图, 由图可见: 恩替卡韦的保留时间为11.2 min, 起始原料HM-1的保留为25.2 min, 中间体HM-2的保留时间为25.8 min, HM-3的保留时间为27.4 min, HM-4的保留时间为16.8 min。恩替卡韦与起始原料及各中间体的分离度均大于2.0, 可满足有关物质的测定要求。混合溶液的色谱图见图2。

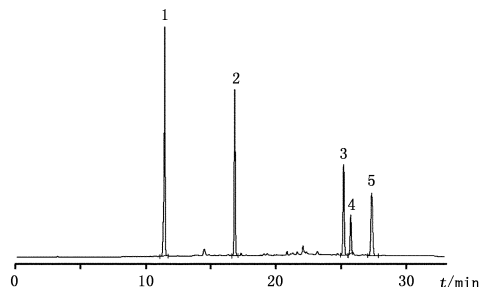


图2 混合溶液的 HPLC 色谱图

Fig 2 HPLC chromatograph of mixed solution

1. 恩替卡韦 (entecavir) 2. HM-4 3. HM-1 4. HM-2 5. HM-3

2.5 系统适用性评价 精密量取供试品溶液20 μL注入液相色谱仪测定, 记录色谱图, 主峰与相邻杂质峰完全分离, 分离度为2.76, 理论板数以恩替卡韦峰计为 3.48×10^5 , 拖尾因子为0.98, 分离效果与峰对称性均较理想, 能满足有关物质测定的要求。

2.6 专属性考察试验

2.6.1 酸中破坏试验 精密量取供试品溶液20 mL, 置具塞比色管中, 加0.1 mol · L⁻¹盐酸溶液2 mL, 摇匀, 置80~85 °C水浴中加热4 h, 取溶液适量, 放冷至室温, 用0.1 mol · L⁻¹氢氧化钠溶液中和, 滤过, 取续滤液作为酸破坏溶液。

2.6.2 碱中破坏试验 精密量取供试品溶液20 mL, 置塑料瓶中, 加0.1 mol · L⁻¹氢氧化钠溶液2 mL, 摇匀, 置80~85 °C水浴中加热4 h, 取溶液适量, 放冷至室温, 用0.1 mol · L⁻¹盐酸溶液中和, 滤过, 取续滤液作为碱破坏溶液。

2.6.3 氧化破坏试验 精密量取供试品溶液20 mL, 置塑料瓶中, 加30%双氧水溶液2 mL, 摇匀, 置80~85 °C水浴中加热2 h, 取溶液适量, 冷却, 滤过, 取续滤液作为氧化破坏溶液。

2.6.4 光照破坏试验 精密量取供试品溶液20 mL, 置具塞比色管中, 于4500 k强光照射条件下放置48 h, 滤过, 取续滤液作为光照破坏溶液。

2.6.5 测定 精密量取上述破坏溶液各20 μL, 分别注入液相色谱仪测定, 记录色谱图, 考察主药与各

降解杂质的分离情况。试验结果可见,在该色谱条件下,各试验条件下破坏的降解产物均能与本品主峰获得基线分离,表明该色谱系统的专属性较好,能

有效检测本品的有关物质。破坏试验色谱图见图3。

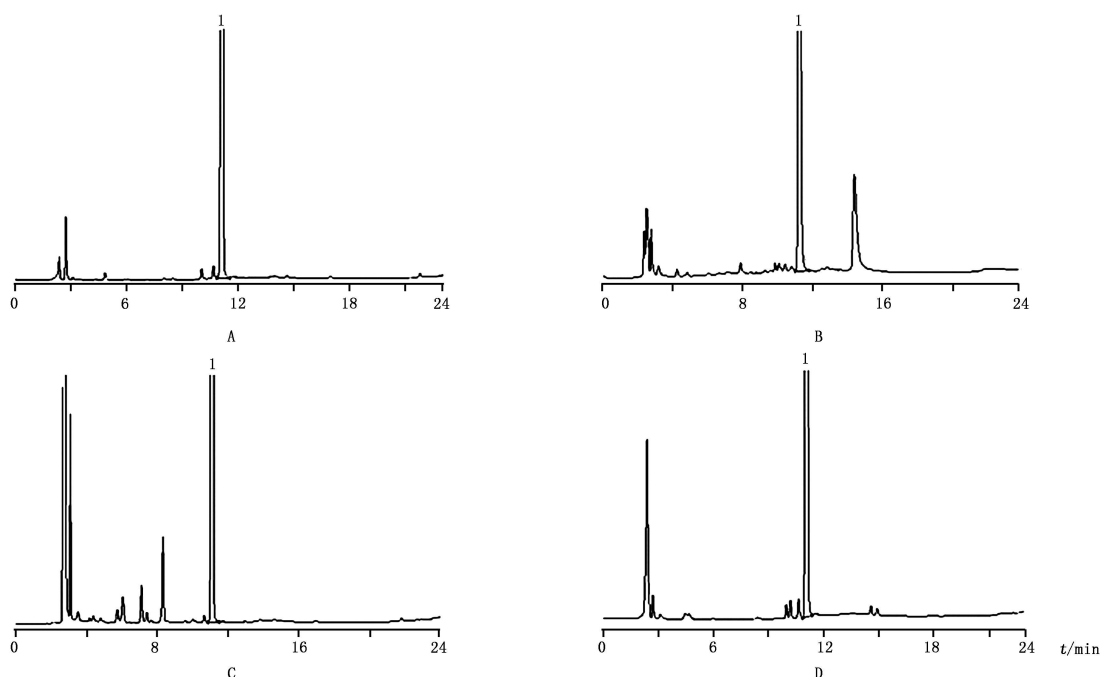


图3 恩替卡韦在不同破坏条件下的色谱图

Fig 3 HPLC chromatograms of Entecavir under different destroy conditions

A. 酸中破坏产物 degradation in acid solution B. 碱中破坏产物 degradation in basic solution C. 过氧化氢中破坏产物 degradation in H_2O_2 solution
D. 光照降解产物 degradation after strong lighted

1. 恩替卡韦 (entecavir)

2.7 检测限 精密量取对照品溶液适量,用流动相A逐级稀释成一系列浓度的稀溶液,分别精密量取各溶液20 μL 进样测定,记录色谱图。当进样浓度为 $0.02 \mu g \cdot mL^{-1}$ 时,主峰的 $SN \approx 3$,即最低检测限为 $0.4 ng$ 。

2.8 精密度试验 精密量取对照品溶液20 μL 注入液相色谱仪进样测定,并连续平行分析6次,记录色谱图,计算峰面积的RSD为0.8%。

2.9 溶液的稳定性试验 取恩替卡韦供试品溶液,室温下放置48 h,分别于0, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48 h取20 μL 注入液相色谱仪测定,记录色谱图,计算峰面积的RSD为1.3%。

2.10 样品中的有关物质考察 各批样品均按照“2.2”项下的方法制备成供试品溶液;精密量取各供试品溶液1 mL,分别用流动相A稀释1000倍,摇匀,作为对照溶液。精密量取各对照溶液20 μL 注入液相色谱仪,调节检测灵敏度,使主成分色谱峰的峰高约为满量程的20%,再精密量取各供试品溶液各20 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图。供试品溶

液的色谱图中如显杂质峰,量取各杂质峰面积的总和,不得大于对照溶液主峰面积的3倍(0.3%),量取单个杂质峰面积,不得大于对照溶液主峰面积(0.1%)。3批样品的总杂质检查结果分别为:0.25%, 0.28%, 0.21%; 单个杂质检查结果分别为:0.05%, 0.08%, 0.09%。

3 讨论

3.1 恩替卡韦合成工艺复杂,合成中间体多,起始原料HM-1及中间体HM-2, HM-3, HM-4与主药极性差异较大,实验证明,采用一般的等强度洗脱难以同时分离主药与各中间体及降解杂质,因此参照恩替卡韦片国家药品标准^[2]选用梯度洗脱方式对本品有关物质检查进行方法学研究。

3.2 参照恩替卡韦片国家药品标准^[2]项下的有关物质检查方法,采用水-乙腈-三氟乙酸(990:10:1)为流动相A,以水-乙腈-三氟乙酸(700:300:1)为流动相B,记录的色谱图显示,基线有一定漂移,且产生较强的溶剂峰,噪音较大,部分杂质峰不能有效检出。以乙腈-水(3:97)为流动相A,乙腈

为流动相 B, 在 30 min 内, 流动相 B 由 0% 增加到 100%, 在此条件下取样品溶液 20 μ L 进样测定, 记录色谱图, 主峰在 8 min 左右出峰, 且与相邻杂质峰有效分离, 表明乙腈-水系统能有效洗脱本品并分离有关物质, 故选择乙腈-水 (3: 97) 为流动相 A, 乙腈为流动相 B。梯度程序为 0~ 10 min A 从 100% $\rightarrow$ 90%; 10~ 15 min A 为 90%; 15~ 25 min A 从 90% $\rightarrow$ 60%; 25~ 28 min A 从 60% $\rightarrow$ 100%。在此试验条件下, 各相关杂质峰与主峰均获得了良好的分离。

3.3 参照恩替卡韦片国家药品标准^[2]中的有关物质检查色谱条件, 实验中选用十八烷基硅烷键合硅胶作为固定相, 曾用 Waters Apollo 和 Diamond 不同

牌号的 C_{18} 柱对恩替卡韦及其有关物质进行分离测定, 所得色谱图各峰保留时间基本一致, 表明本方法有较好的重复性。采用 Waters C_{18} 柱分离的色谱峰理论塔板数高、对称性较好, 而采用 Apollo 及 Diamond C_{18} 柱获得的色谱峰理论塔板数相对较低, 并略有拖尾, 故本实验中均采用 Waters C_{18} 柱。

参考文献

- 1 LI Lin(李霖), LI Yu-zhen(李玉珍). New drug for anti-hepatitis B virus- Entecavir (抗乙肝病毒新药-恩替卡韦). *Clin Med J* (临床药物杂志), 2006(4) 4-56
- 2 Entecavir Tablets Drug Standard of China(恩替卡韦片国家药品标准)

(本文于 2008 年 11 月 6 日修改回)

2009 中国科协学术建设发布会在京举行

4 月 10 日 上午, 2009 中国科协学术建设发布会在京举行。中国科协副主席、中国科学院常务副院长白春礼, 科技部副部长刘燕华, 中国工程院副院长杜祥琬, 国家自然科学基金委员会副主任何鸣鸿, 国家新闻出版总署副署长李东东, 中国科协副主席、工程院院士陈赛娟, 中国科协书记处书记冯长根出席发布会。白春礼介绍了 2008-2009 年度学科进展情况, 冯长根介绍了 2007-2008 年度中国科协全国学会发展状况和 2008 年中国科协科技期刊发展状况。有关部委领导、中国科协学术与学会工作专门委员会委员, 参加本次学科发展专题研究的全国学会的首席专家、学科发展报告主编、全国学会负责人, 中国科学院有关院所、部分在京重点院校、主要图书馆、出版社、全国学会期刊代表、50 余家媒体记者共 400 余人出席此次发布会。发布会由中国科协副主席陈赛娟主持。

详情请访问 <http://www.ztcast.org.cn>