

HPLC 法测定恩曲他滨中有关物质

房桂珍, 安庆军, 霍明山, 王丽丽

(河北医科大学生物医学工程中心, 石家庄 050011)

摘要 目的: 建立高效液相色谱测定恩曲他滨中有关物质的方法。方法: 采用 Inertsil C₈ 色谱柱(250 mm × 4.6 mm 5 μm), 以缓冲液(取 10% 四丁基氢氧化铵溶液 2.0 g, 用 0.013 mol · L⁻¹ 磷酸二氢钠溶液稀释至 1000 mL) - 乙腈(85:15) 为流动相(用磷酸调节 pH 至 5.0), 流速为 1.0 mL · min⁻¹, 检测波长为 220 nm。结果: 杂质峰与主峰均分离良好。结论: 该法专属性强、准确、灵敏, 可用于恩曲他滨原料中有关物质的检查。

关键词: 高效液相色谱; 核苷类新药; HIV 感染; 恩曲他滨; 杂质; 中间体; 有关物质

中图分类号: R917

文献标识码: A

文章编号: 0254 - 1793(2011)12 - 2325 - 05

HPLC determination of related substance in emtricitabine

FANG Gui - zhen, AN Qing - jun, HUO Ming - shan, WANG Li - li

(Department of Research and Development of Biomedical Engineering Center of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China)

Abstract Objective: To establish an HPLC method for determining the related substance of emtricitabine. **Methods:** Used Inertsil C₈ chromatographic column(250 mm × 4.6 mm 5 μm); flow liquid was buffer solution(10% tetrabutylammonium hydroxide solution 2.0 g, adding 0.013 mol · L⁻¹ sodium dihydrogen phosphate solution to 1000 mL) - acetonitrile(85:15) (pH value adjusted to 5.0 with phosphoric acid); flow rate: 1.0 mL · min⁻¹, determination wavelength was 220 nm. **Results:** Impurity peak and sample peak can be effectively separated. **Conclusions:** The method shows good separating degree and stable result which can be used determining the related substance of emtricitabine.

Key words: HPLC; nucleoside; new drugs; HIV infection; emtricitabine; impurity; intermediate; related substance

恩曲他滨(emtricitabine)属于三类化药新药,为核苷类逆转录酶抑制剂,与其他抗逆转录酶药物联合用于治疗 HIV 感染患者^[1]。有关物质的检测与控制是恩曲他滨质量控制的一项重要指标^[2],笔者采用高效液相色谱法^[3,4]探索其有关物质的检测方法,该方法操作简便、可靠、重复性好、灵敏度高、专属性强,可用于恩曲他滨原料中有关物质的检查。

1 仪器与试剂

高效液相色谱仪(日本岛津 LC-10A 系列,包括 LC-10ATvp 高压泵; SPD-10Avp 紫外检测器; SCL-10Avp 系统控制器; CLASS-VP 5.02 色谱工作站); UVKON 923 型紫外分光光度计; BP211D 型电子天平(德国赛多利斯股份有限公司); Orion 828 酸度计(美国奥立龙); KQ2200E 型超声波清洗机(80 W 40 kHz,昆山超声仪器有限公司)。

合成工艺中 4 个中间体,恩曲他滨原料(河北医科大学制药厂,批号: 20090901、20090902、20090903); 乙腈为色谱纯,水为超纯水,四丁基氢氧化铵、磷酸二氢钠、磷酸为分析纯。

2 方法与结果

2.1 试验色谱条件^[5] 色谱柱: Inertsil 色谱柱 - C₈(250 mm × 4.6 mm 5 μm); 流动相: 缓冲液(取 10% 四丁基氢氧化铵溶液 2.0 g,用 0.013 mol · L⁻¹ 磷酸二氢钠溶液稀释至 1000 mL) - 乙腈(85:15)(用磷酸调节 pH 至 5.0); 检测波长 220 nm; 流速: 1.0 mL · min⁻¹; 进样量: 20 μL; 柱温: 30 °C。

2.2 测定波长的选择

取恩曲他滨原料及合成工艺中的中间体 I、II、III、IV 适量,加乙腈溶解并稀释制成一定浓度的溶液,照分光光度法(中国药典 2010 年版二部附录 IV

A), 于 200 ~ 400 nm 波长范围内进行扫描, 结果见表 1。

表 1 恩曲他滨及其中间体的紫外特征吸收

Tab 1 UV-characteristic absorption of emtricitabine and its intermediates

样品 (names)	最大吸收 (maximum absorption) nm	220 nm 处的吸收度 (absorbance at 220 nm)
恩曲他滨(emtricitabine)	240, 287	0.8150
中间体 I (intermediate I)	251	0.380
中间体 II (intermediate II)	251	0.5416
中间体 III (intermediate III)	249	0.3592
中间体 IV (intermediate IV)	239, 287	0.6944

称取本品约 20 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀; 取 20 μ L 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 见图 1。由图可知, 本品在 220 nm 波长处检测的杂质为 0.31%, 在 250 nm 波长处检测的杂质为 0.27% (峰面积归一法计算)。

试验结果表明, 本品及其中间体的最大吸收的波长不一致, 样品与中间体在 250 nm 及 220 nm 处均有较大的吸收, 其中间体在 220 nm 处的响应值较大, 本品在 220 nm 处检测的杂质较 250 nm 处检测的杂质多, 为更灵敏地检查出样品在合成过程中可能残留的杂质, 有关物质的检测波长选为 220 nm。

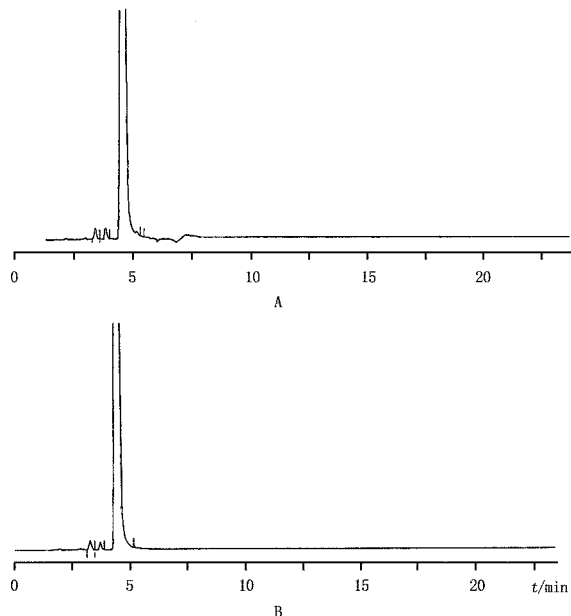


图 1 恩曲他滨有关物质色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of emtricitabine related substance

A. 220 nm B. 250 nm

2.3 采集时间的确定 取本品粗品约 20 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀,

取 20 μ L 注入液相色谱仪, 记录色谱图至主峰保留时间的 6 倍。试验结果表明, 本品的粗品在 5 倍保留时间以后无杂质峰, 在 4.3 倍保留时间处有杂质峰, 故将本品的保留时间确定为主峰保留时间的 5 倍。

2.4 溶液稳定性试验 取本品约 20 mg, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀; 分别于第 0, 4, 8 h 时, 量取 20 μ L 注入液相色谱仪, 记录色谱图至主峰保留时间的 5 倍。试验结果表明, 本品在流动相中放置 8 h 稳定, 有关物质不增加, 总杂质均为 0.25%。

2.5 专属性试验

称取本品约 20 mg, 置 100 mL 量瓶中, 加流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀; 取 20 μ L 注入液相色谱仪, 记录色谱图至主峰保留时间的 5 倍^[6]。由图 2 可知, 本品于 5.94 min 处出现主峰, 杂质峰与主成分峰间能够有效分离, 总杂质为 0.28%。

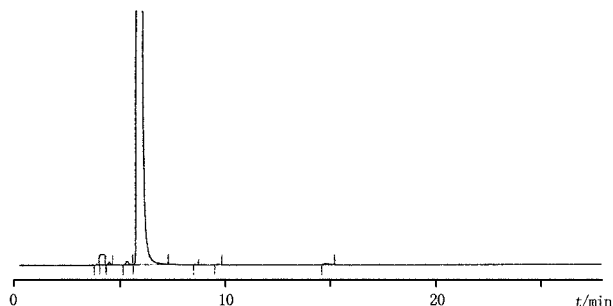


图 2 恩曲他滨专属性试验色谱图

Fig 2 HPLC chromatogram of emtricitabine specificity test

2.5.1 中间体试验

分别取中间体适量, 精密称定, 加乙腈使溶解, 制成一定浓度的溶液, 分别作为供试品溶液; 分别取供试品溶液 20 μ L 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 结果见图 3。

试验结果表明, 本品的中间体在系统条件下均有较大的响应值, 且与恩曲他滨峰能良好分离, 中间体中的杂质峰也不与恩曲他滨峰重合; 故本色谱条件与系统能较好地检测出合成过程中可能残留的杂质, 且主峰内不含中间体杂质峰。

2.5.2 酸、碱及氧化降解试验

取本品约 20 mg, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 分别加 1 mol $\cdot$ L⁻¹ 盐酸 1 mL 放置 2 h、加 1 mol $\cdot$ L⁻¹ 氢氧化钠溶液 1 mL 放置 3 h、加 30% 过氧化氢溶液 1 mL 放置 1 h 后, 加流动相溶解并稀释至刻度, 摇匀, 分别作为酸破坏溶液、碱破坏溶液、氧化破坏溶液, 量取以上破坏溶液各 20 μ L 注入液相色谱

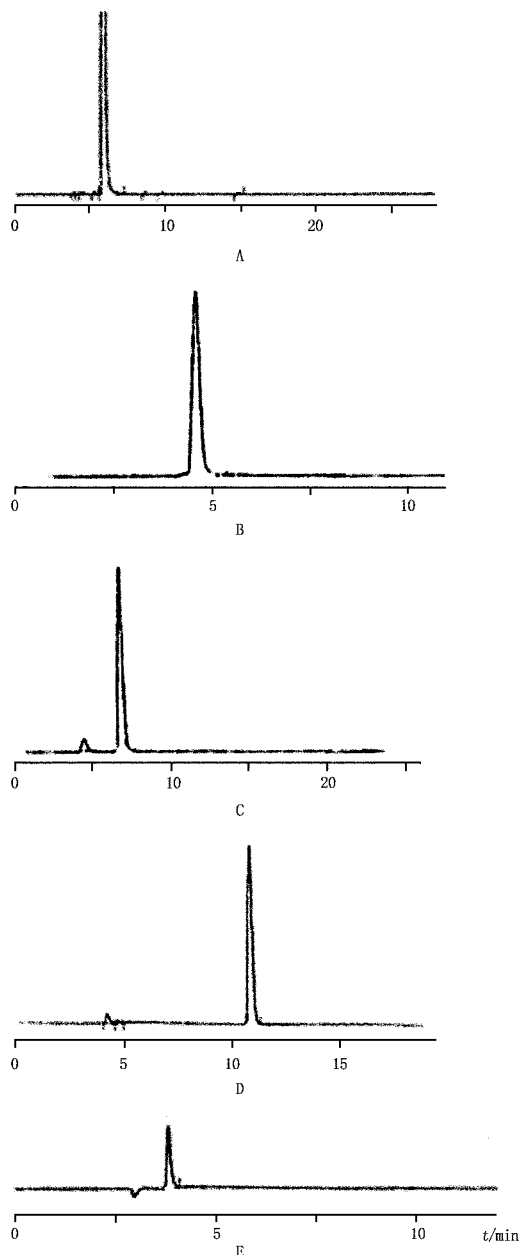


图3 恩曲他滨及其中间体高效液相色谱

Fig 3 HPLC chromatograms of emtricitabine and its intermediates

A. 样品 (the sample) B. 中间体 I (intermediate I) C. 中间体 II (intermediate II) D. 中间体 III (intermediate III) E. 中间体 IV (intermediate IV)

仪,记录色谱图至主成分峰保留时间的5倍。另取 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸1 mL、 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液1 mL、30%过氧化氢溶液1 mL,置100 mL量瓶中,加流动相稀释至刻度,分别作为酸、碱、氧化空白溶液,量取以上空白溶液各20 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图(图4-A~D)。

试验结果表明,本品在 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐酸中2 h稳定;在 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠溶液中放置3 h产生

降解杂质;在30%过氧化氢溶液中放置1 h破坏较明显。因此强碱、氧化对恩曲他滨的影响很大。

2.5.3 强光试验 取经 $4500\pm500\text{ lx}$ 照射5 d的本品约20 mg,精密称定,置100 mL量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,量取20 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图至主峰保留时间的5倍(图4-E)。试验结果表明,经 $4500\pm500\text{ lx}$ 照射5 d的本品未产生新杂质,原杂质未增加,故本品对光稳定。

2.5.4 高温试验 取经高温 $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ (加热1 d)、 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ (加热5 d)的本品约20 mg,精密称定,置100 mL量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,量取20 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图至主峰保留时间的5倍(图4-F、G)。试验结果表明,本品在 $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下于3.6 min处出现新杂质,此杂质含量为0.32%(峰面积归一化法计),在 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下不出现新杂质。因此本品在 $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下不稳定,干燥失重应于 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下减压至恒重。

2.5.5 高湿试验 取在相对湿度为 $\text{RH}90\pm5\%$ 条件下放置5 d的本品约20 mg,精密称定,置100 mL量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,量取20 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图至主峰保留时间的5倍(图4-H)。试验结果表明,未产生新杂质,原杂质未增加,故本品在高湿条件下稳定。

2.5.6 峰纯度试验 取本品约20 mg,精密称定,置100 mL量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,量取20 μL 注入液相色谱仪,记录色谱图至主峰保留时间的5倍。由快速多波长扫描结果可知,主峰中不含未分离的杂质峰,主峰峰纯度良好。

2.6 线性关系、相对保留时间和校正因子的考察

称取恩曲他滨、中间体 I - IV对照品各约20 mg,置100 mL量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,取5 mL置100 mL量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,作为储备液。取储备液0.1、0.5、1、2、4、6 mL,分别置10 mL量瓶中,加流动相稀释至刻度,摇匀,作为溶液(1) - (6);分别精密量取溶液(1) - (6)各20 μL ,注入液相色谱仪,测定保留时间和各色谱峰面积。以各浓度点色谱峰的平均保留时间(t_R)计算中间体相对于恩曲他滨的相对保留时间;以溶液浓度(X)为横坐标,峰面积(Y)为纵坐标,分别测定恩曲他滨与4个中间体的线性方程及回归系数 r ,以中间体与恩曲他滨线性方程的斜率计算中间体的校正因子,结果表明恩曲他滨与中间体的质量浓度在 $0.1\sim6.1\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 范围内线性关系良好, r 均达到0.999以上,中间体 I - IV相对

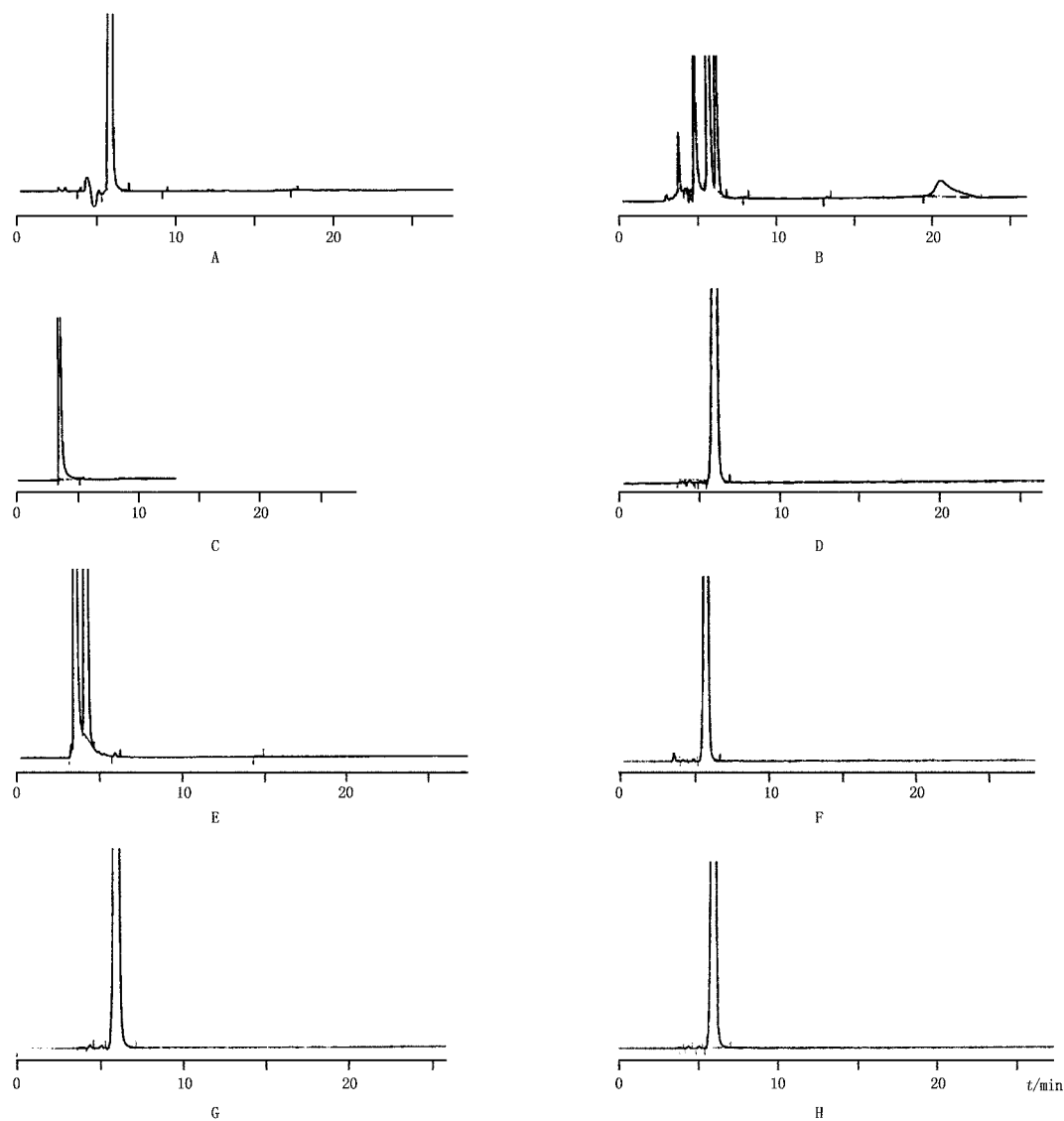


图4 恩曲他滨经酸(A)、碱(B)、氧化空白(C)、氧化(D)、强光(E)和105 °C加热(F)、60 °C加热(G)和高湿(H)破坏色谱图
Fig 4 HPLC chromatograms of emtricitabine destroyed by acid(A) alkali(B) oxidation blank(C) oxidation(D) light(E) 105 °C heat(F) 60 °C heat (G) and humid(H)

于主成分恩曲他滨的相对保留时间分别为 0.77 , 1.13 ,1.83 0.64 ,校正因子在 0.9 ~ 1.1 之间 ,具体结果见表 2。故可采用不加校正因子的主成分自身对照法计算有关物质含量。

表 2 恩曲他滨及其中间体的线性方程、相对保留时间和校正因子
Tab 2 Relative retention time regression equation and correction factor of emtricitabine and its intermediates

化合物 (component)	相对保留时间 (relative retention time)	线性方程 (linear equation)	回归系数 (regression coefficient)	校正因子 (calibration factor)
中间体 I (intermediate I)	0.77	$Y = 4.701 \times 10^4 X - 1.675 \times 10^3$	0.9996	0.9236
中间体 II (intermediate II)	1.13	$Y = 5.215 \times 10^4 X + 1.635 \times 10^3$	0.9997	1.0245
中间体 III (intermediate III)	1.83	$Y = 5.479 \times 10^4 X + 2.783 \times 10^3$	0.9996	1.0765
中间体 IV (intermediate IV)	0.64	$Y = 5.205 \times 10^4 X + 0.776 \times 10^3$	0.9995	1.0226
恩曲他滨(emtricitabine)	1	$Y = 5.090 \times 10^4 X + 22.8$	0.9999	

2.7 检测限和定量限 在选定的色谱条件下,按信噪比为 3 和 10 分别作为检测限和定量限。测定恩曲他滨和中间体 I - IV 的检测限分别为 0.14 ng、0.12 ng、0.15 ng、0.16 ng、0.15 ng; 定量限分别为: 0.42 ng、0.36 ng、0.45 ng、0.48 ng、0.45 ng。

2.8 精密性、重复性试验 取本品约 20 mg,置 100 mL 量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀;取 20 μ L 注入液相色谱仪,连续进样 6 次,结果中间体 I 和 IV 峰面积的 RSD 分别为 0.9% 和 0.6%;取同批样品,平行制备 6 份供试品溶液,分别取 20 μ L 注入液相色谱仪,结果以主成分自身对照法计算,中间体 I 和 IV 的含量平均值分别为 0.02%、0.10%;RSD 为 3.6%、2.5%。

2.9 回收率试验 取本品约 20 mg,置 100 mL 量瓶中 9 份,分别加中间体 I ~ IV 储备液(10 μ g $\cdot$ mL⁻¹) 1、2、5 mL 各 3 份,用流动相溶解并稀释至刻度,同时配制各自的对照溶液,摇匀;分别取 20 μ L 注入液相色谱仪,以主成分自身对照法计算,中间体 I ~ IV 的平均回收率分别为 92.3%、95.1%、96.3%、94.4%;RSD 分别为 1.5%、2.0%、0.8%、1.3%。

2.10 有关物质测定 取本品约 20 mg,精密称定,置 100 mL 量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液;精密量取供试品溶液 1.0 mL,置 100 mL 量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,作为对照溶液,量取对照溶液 20 μ L 注入液相色谱仪,调节检测灵敏度,使主成分峰峰高约为满量程的 10% ~ 20%,再取对照溶液和供试品溶液各 20 μ L 注入液相色谱仪,记录色谱图至主峰保留时间的 5 倍,按主成分峰自身对照法计算。按照本法色谱条件测定结果见表 3。

表 3 恩曲他滨 3 批样品有关物质检测结果

Tab 3 Results of related substance of emtricitabine

批号 (batch No.)	最大杂质 (maximum impurities) /%	总杂质 (total impurities) /%
20090901	0.18	0.40
20090902	0.16	0.35
20090903	0.16	0.46

3 讨论

3.1 本品及其合成中的中间体均在 250 nm 及 220 nm 波长处有较大的吸收度,在 220 nm 处检测的杂质较 250 nm 处检测的杂质多,且中间体 220 nm 处的响应值较大;为更灵敏地检查出样品在合成过程中可能残留的杂质,有关物质的检测波长选为 220 nm。

3.2 本文完成了对本品的中间体、高温、强光、高湿、酸、碱及氧化破坏试验,并进行了峰纯度检查试验,寻找到已知杂质和未知杂质的归属。

3.3 采用本文试验色谱条件所获得的色谱峰对称性好,供试品中杂质峰与主峰完全分离,并能使主成分峰与酸、碱、氧化破坏产生的成分分离,无干扰,该法专属性强、准确灵敏,可用于恩曲他滨原料中有关物质的检查。

参考文献

- HU Yu-qin(胡玉钦). The research status and application prospect of emtricitabine(恩曲他滨的研究现状与应用前景). *China Foreign Med Treatm*(中外医疗) 2008 20:135
- The Technical Golden Rule of the Research of Chemistry Medicine Impurity Topic study team(《化学药物杂质研究的技术指导原则》课题研究组). The Technical Golden Rule of the Research of Chemistry Medicine Impurity(化学药物杂质研究的技术指导原则). 2005. 3
- HU Yu-qin(胡玉钦), ZHANG Yun-hao(张运好), XUE Hong-yuan(薛洪源) et al. HPLC determination of emtricitabine in human plasma(高效液相色谱法测定人血浆中恩曲他滨). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志) 2008 28(11):1820
- OUYANG Qiang(欧阳强), SHEN Xiao-xia(沈晓霞). HPLC determination of emtricitabine enantiomer by chirality column(HPLC 手性柱检测恩曲他滨的对映体). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志). 2007 27(11):1698
- ChP(中国药典). 2010. Vol II(二部): Appendix(附录) 23
- The Technical Golden Rule of Analysis Method Validation of Chemistry Medicine Quality Control Topic study team(《化学药物质量控制分析方法验证技术指导原则》课题研究组). The Technical Golden Rule of Analysis Method Validation of Chemistry Medicine Quality Control(化学药物质量控制分析方法验证技术指导原则). 2005. 2

(本文于 2011 年 8 月 29 日修改回)