

高效液相色谱法测定阿德福韦酯有关物质

王惠玉, 张佳佳

(海能未来技术集团股份有限公司, 山东 250104)

摘要: 本文使用悟空 K2025 高效液相色谱仪测定阿德福韦酯有关物质。色谱条件: C_{18} (4.6×250mm, 5 μ m), 流速为 1.0mL/min, 柱温为 25°C, 进样量为 10 μ L, 检测波长为 260nm。实验结果: 阿德福韦峰与阿德福韦单酯峰间的分离度为 18.81, 阿德福韦单酯峰与阿德福韦酯峰间的分离度为 59.37; 将对照溶液进行重复性测试, 连续进样 7 针, 阿德福韦酯保留时间的 RSD 为 0.048%, 峰面积的 RSD 为 0.684%, 均满足《中国药典(2020 年版)》的要求。
关键词: 阿德福韦酯;测定

阿德福韦酯为 [[2-(6-氨基-9H-嘌呤-9-基) 乙氧基] 甲基] 膦酸二(特戊酰氧基甲基) 酯, 为白色或类白色结晶性粉末, 在乙醇中易溶, 在水中几乎不溶。

阿德福韦酯是一种新的抗乙型肝炎病毒 (HBV) 药物, 也是继拉米夫定后的另一种口服抗 HBV 药。

1 范围

适用于阿德福韦酯有关物质的测定。

2 原理

阿德福韦酯在 260nm 处有紫外吸收, 使用高效液相色谱法进行测定。

3 试剂与材料

水: 符合 GB/T6682 的一级水;

乙腈: 色谱纯;

磷酸二氢钾: 优级纯;

阿德福韦;

阿德福韦单酯;

阿德福韦酯原料药。

4 仪器与设备

高效液相色谱仪: K2025 P2 二元高压输液泵、K2025 AS 自动进样器、K2025 CO 柱温箱、K2025 UVD 紫外-可见光检测器、Wookinglab 色谱工作站;

分析天平：精确到 0.0001g；

涡旋振荡器；

5 测定步骤

5.1 溶液配制（临用新制）

溶剂：0.025mol/L磷酸二氢钾溶液-乙腈（82：18）；

系统适用性溶液 取阿德福韦、阿德福韦单酯与阿德福韦酯对照品，加溶剂溶解并稀释制成每1 mL中分别约含阿德福韦、阿德福韦单酯与阿德福韦酯0.5 μg、0.5 μg、0.2 mg的溶液，必要时在冰浴中超声使溶解；

供试品溶液 取本品，精密称定，加溶剂（0.025mol/L磷酸二氢钾溶液-乙腈（82：18））溶解并定量稀释制成每1 mL中约含1 mg的溶液；

对照溶液 精密量取供试品溶液 1mL，置 100mL 量瓶中，用溶剂稀释至刻度，摇匀；

灵敏度溶液 供试品溶液稀释 2000 倍。

5.2 色谱条件

a) 色谱柱：C₁₈ 4.6×250mm，5μm 或者相当的色谱柱；

b) 流动相：以 0.025 mol/L 磷酸二氢钾溶液为流动相 A，以乙腈为流动相 B，按下表进行梯度洗脱：

时间 (min)	流动相 A (%)	流动相 B (%)
0	82	18
1	82	18
9	42	58
11	35	65
18	21	79
20	21	79
20.5	82	18

c) 柱温：25°C；

d) 进样量：10 μL；

e) 流速：1.0mL/min；

f) 波长：260 nm。

系统适用性溶液色谱图中，阿德福韦峰与阿德福韦单酯峰间的分离度应符合要求，阿德

福韦单酯峰与阿德福韦酯峰间的分离度应大于 9。

6 结果

按照上述色谱条件（5.2）进行采集，系统适用性溶液的色谱图如图 1 所示，积分结果如表 1 所示。

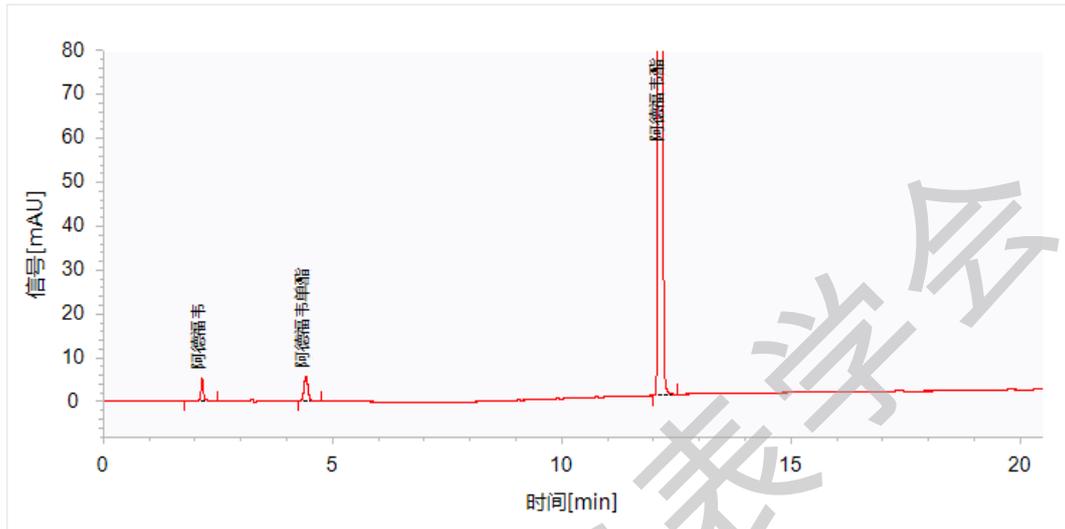


图 1 系统适用性溶液的色谱图

表 1 系统适用性溶液色谱图积分结果

目标物	保留时间 (min)	峰面积 (mAU.s)	峰高 (mAU)	理论塔板数	分离度	对称/拖尾因子
阿德福韦	2.170	18.003	5.052	10150	-	1.21
阿德福韦单酯	4.437	32.377	5.554	13132	18.81	1.06
阿德福韦酯	12.170	3081.975	768.458	211997	59.37	0.99

由表 1 可知，阿德福韦峰与阿德福韦单酯峰间的分离度为 18.81，阿德福韦单酯峰与阿德福韦酯峰间的分离度为 59.37，满足《中国药典（2020 年版）》中阿德福韦峰与阿德福韦单酯峰间的分离度应大于 1.5，阿德福韦单酯峰与阿德福韦酯峰间的分离度应大于 9 要求。

供试品溶液的色谱图如图 2 所示。

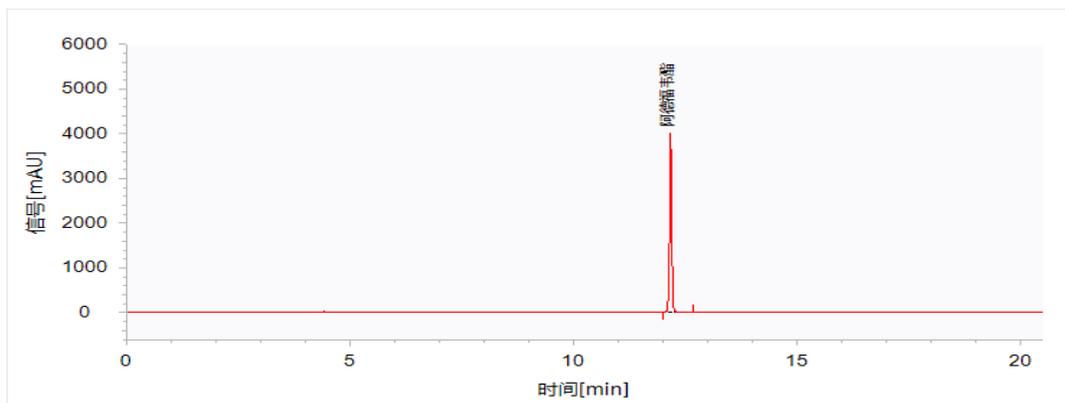


图 2 供试品溶液的色谱图

将对照溶液连续进样 7 针，结果见表 2，叠加的色谱图如图 3 所示。

表 2 对照溶液连续进样 7 针重复性数据统计

目标物	1	2	3	4	5	6	7	平均值	RSD %
阿德福韦酯	保留时间	12.182	12.170	12.188	12.187	12.180	12.182	12.182	0.048
	峰面积	152.855	150.923	150.761	150.308	150.329	150.319	152.260	0.684

由表 2 可知，对照溶液连续进样 7 针重复性测试，阿德福韦酯保留时间的 RSD 为 0.048%，峰面积的 RSD 为 0.684%。

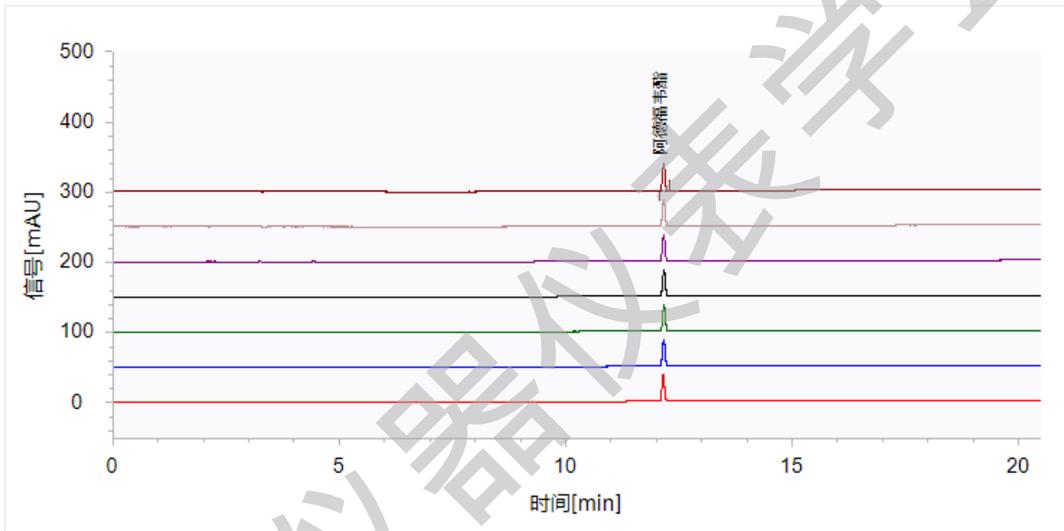


图 3 对照溶液连续进样 7 针叠加的色谱图

将供试品溶液稀释 2000 倍进行灵敏度测试，如图 4 所示，灵敏度计算结果见表 3。

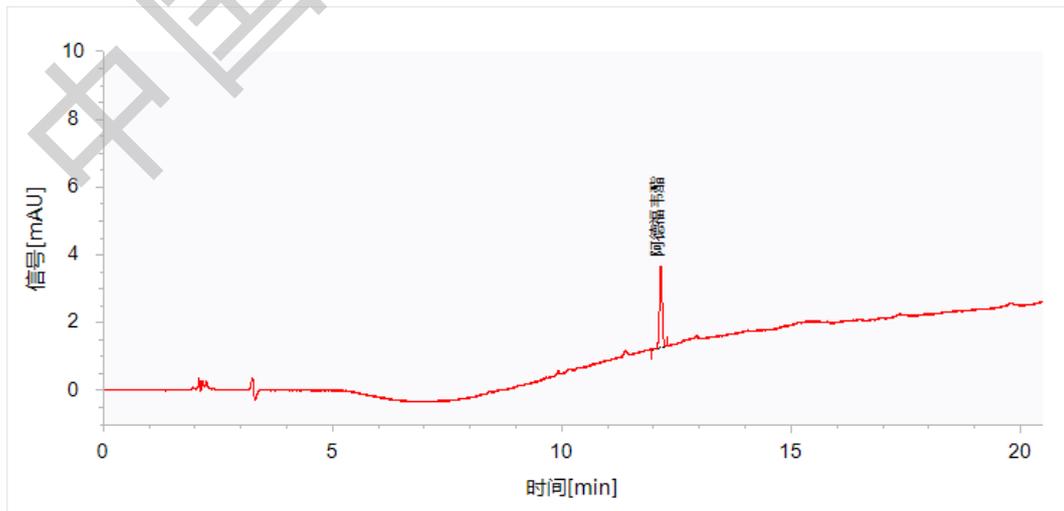


图 4 灵敏度溶液的色谱图

表 3 阿德福韦酯灵敏度计算结果

目标物	峰高 (mAU)	噪声 (mAU)	S/N
阿德福韦酯	2.372	0.055	43.1

通过计算，灵敏度溶液中阿德福韦酯的信噪比 S/N 为 43.1，满足《中国药典（2020 年版）》中定量测定时，信噪比应不小于 10 的要求。

7 结论

本实验结果：阿德福韦峰与阿德福韦单酯峰间的分离度为 18.81，阿德福韦单酯峰与阿德福韦酯峰间的分离度为 59.37；将对照溶液进行重复性测试，连续进样 7 针，阿德福韦酯保留时间的 RSD 为 0.048%，峰面积的 RSD 为 0.684%，灵敏度溶液中阿德福韦酯的信噪比 S/N 为 43.1。因此，Wooking K2025 高效液相色谱仪对阿德福韦酯有关物质的测定，在分离度、重复性以及灵敏度等方面均满足《中国药典（2020 年版）》的要求。