· 原 著 ·

利用高效液相色谱法同时检测恩替卡韦薄膜衣片中的有关物质

张 翼,袁 弘

浙江大学药学院,浙江 杭州 310058

[摘 要] 目的:建立能够同时测定恩替卡韦薄膜衣片8种有关物质的高效液相色谱法。方法:参考美国药典40和中美上海施贵宝制药有限公司的恩替卡韦薄膜衣片(博路定)标准(YBH33292005)等,采用WATERS C18色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相A为水-乙腈-三氟乙酸(990:10:1),流动相B为水-乙腈-三氟乙酸(700:300:1),梯度洗脱,采用紫外-可见光检测器,检测波长为254 nm,柱温30℃,建立同时测定恩替卡韦薄膜衣片8种有关物质的高效液相色谱法,并对该检测方法进行方法学验证。结果:恩替卡韦与各杂质峰之间的分离度均大于1.5,8种有关物质在线性范围内均与峰面积成良好的线性关系,检测限、定量限、精密度、稳定性、耐用性、专属性等均符合要求。结论:本研究建立的高效液相色谱法可同时检测恩替卡韦薄膜衣片常见的8种有关物质。

[关键词] 色谱法;液相;恩替卡韦;薄膜衣片;紫外-可见光检测器;有关物质

[中图分类号] R284.1; R917.101 [文献标志码] A

Simultaneous determination of related substances in entecavir film-coated tablet by high performance liquid chromatography

ZHANG Yi, YUAN Hong (College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Corresponding author: YUAN Hong, E-mail: yuanhong70@zju.edu.cn, <https://orcid.org/0000-0002-3491-5669>

[Abstract] Objective: To establish a high performance liquid chromatography method to simultaneously quantify eight related substances in entecavir film-coated tablets. Methods: According to USP40 and YBH33292005 standards, a high performance liquid chromatography (HPLC) method for simultaneous determination of 8 related substance in entecavir film-coated tablets was established and validated. The column was WATERS C18 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase A was water-acetonitrile-trifluoroacetic

收稿日期:2021-04-10 接受日期:2021-07-01

第一作者:张 翼,硕士研究生,主要从事药物分析研究;E-mail: zyi0571@sina.com; <https://orcid.org/0000-0002-7791-0622>

通信作者:袁 弘,教授,博士生导师,主要从事脂质纳米给药系统、靶向共聚物胶束给药系统等新型药物制剂的研究及新制剂的开发;E-mail: yuanhong70@zju.edu.cn; <https://orcid.org/0000-0002-3491-5669>

acid (990 : 10 : 1), the mobile phase B was water-acetonitrile-trifluoroacetic acid (700 : 300 : 1) with gradient elution and ultraviolet-visible light detector, detection wavelength at 254 nm and column temperature of 30 °C. **Results:** The resolution between entecavir and each impurity peak was more than 1.5, and each impurity had a good linear relationship with the peak area in the linear range. The limits of detection and quantification, precision, stability, durability, specificity, met the verification requirements. **Conclusion:** The HPLC method established in this study can be used for simultaneous determination of 8 related substance in entecavir film-coated tablets.

[**Key words**] Chromatography, liquid; Entecavir; Film-coated tablet; Ultraviolet-visible light detector; Related substance

[J Zhejiang Univ (Med Sci), 2021, 50(4): 529-536.]

[**缩略语**] 相对标准差(relative standard deviation, RSD); 美国药典(United States Pharmacopoeia, USP); 欧洲药典(European Pharmacopoeia, EP)

恩替卡韦作为鸟嘌呤核苷类似物,相比拉米夫定和阿德福韦能更有效地抑制乙型肝炎病毒复制^[1-3]。目前,国内已有恩替卡韦口服液、分散片、原料药有关物质测定的相关研究^[4-8],但对薄膜衣片的研究较少,且都未达到 USP40、EP9.0 等最新质量标准。根据 USP40 原料标准,恩替卡韦原料药中主要杂质已经增加到 7 种,即恩替卡韦呋喃杂质、非对映异构体 1、非对映异构体 3、8-羟基杂质、非对映异构体 2、8-甲氧基杂质、4-羟基二甲基甲硅烷基杂质^[9]。本研究参照 USP40、EP9.0 和国内恩替卡韦(原料和片剂)质量标准,考虑到恩替卡韦原料药合成过程中可能产生的新杂质,优化改进了原有恩替卡韦薄膜衣片有关物质的测定方法,并对所拟定的方法进行了实验验证。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

分析天平(AUW120D)为日本岛津公司产品;高效液相色谱仪(U3000)为美国 Thermo Fisher Scientific 公司产品;溶出度仪(RC12AD)为天津市天大天发科技有限公司产品;超声清洗器(KQ2200DE)为昆山超声仪器有限公司产品。乙腈为美国 TEDIA 试剂公司产品;盐酸、氢氧化钠、醋酸钠、磷酸二氢钾为国药集团化学试剂有限公司的分析纯产品;纯净水为杭州娃哈哈公司产品。供试品恩替卡韦薄膜衣片(商品名为博路定,

批号 AAW1539)为中美上海施贵宝制药有限公司产品;对照品鸟嘌呤(批号 140631-201606)为中国食品药品检定研究院产品;恩替卡韦呋喃杂质(批号 3-JMR-110-1)为加拿大 TRC 公司产品;恩替卡韦(批号 WSET-20170402-01)、非对映异构体 1(批号 ET-D5-17101701)、非对映异构体 2(批号 ET-D1-20151223-01)、非对映异构体 3(批号 ET-D3-17112401)均为博瑞生物医药(苏州)股份有限公司产品;8-羟基杂质(批号 18051720)为上海启太生物科技有限公司产品;8-甲氧基杂质(批号 2319-079A27)为加拿大 TLC 公司产品;4-羟基二甲基甲硅烷基杂质(批号 201809)为深圳健竹生物科技有限公司产品。

1.2 溶液配制

杂质储备溶液:称取各杂质 2.5 mg,加入适量 0.01 mol/L 盐酸溶液,超声 10 min,放冷至室温,置于 50 mL 容量瓶中,定容,摇匀作为各杂质储备液(浓度为 50 μg/mL)。

恩替卡韦对照品溶液:取恩替卡韦对照品细粉适量(相当于恩替卡韦约 0.5 mg),加入适量 0.01 mol/L 盐酸溶液,超声 10 min,放冷至室温,置于 10 mL 容量瓶中,定容,摇匀,过滤,取续滤液作为恩替卡韦对照品溶液。

系统适用性试验溶液:取恩替卡韦对照品溶液、各杂质储备液适量,用 0.01 mol/L 盐酸溶液溶解并稀释制成每毫升中分别含主成分 50 μg、各杂

质0.5 μg的溶液,作为系统适用性试验溶液。

供试品溶液:取恩替卡韦薄膜衣片10片,用研钵研成细粉,精密称取适量(相当于恩替卡韦0.5 mg),加入适量0.01 mol/L盐酸溶液,超声10 min,放冷至室温,置10 mL容量瓶中定容,摇匀,离心,取上清液作为供试品溶液。

1.3 色谱条件和运行参数

参照USP40原料标准、中美上海施贵宝制药有限公司的恩替卡韦薄膜衣片标准(YBH33292005)、正大天晴药业集团股份有限公司的恩替卡韦分散片标准中有关物质方法和原料使用的有关物质方法建立本研究检测方法。色谱柱选用WATERS C18色谱柱(250 mm×4.6 mm,5 μm)。流动相A:水-乙腈-三氟乙酸(990:10:1);流动相B:水-乙腈-三氟乙酸(700:300:1)。梯度洗脱条件:0~3.5 min,A为100%;3.5~21 min,A为100%~69%;21~24 min,A为69%~51%;24~27 min,A为51%~0%;27~35 min,A为0%;35~36 min,A为0%~100%;36~45 min,A为100%。流速为1.0 mL/min,检测波长254 nm,进样量为100 μL,进样浓度为50 μg/mL,运行45 min。

1.4 方法验证

1.4.1 系统适用性试验 取系统适用性溶液100 μL,注入液相色谱仪,记录色谱图。色谱图中按恩替卡韦峰计算,根据《中国药典(2015年版)》四部通则9101药品质量标准分析方法验证指导原则^[10],理论板数应不低于5000,且连续6针对照溶液峰面积的RSD不超过2%。

1.4.2 检测限和定量限试验 取恩替卡韦及各杂质对照品溶液,逐级稀释,精密量取100 μL,连续进样3针,记录色谱图。检测限:杂质峰与噪音峰信号强度比应不小于3;定量限:杂质峰与噪音峰信号强度比应不小于10^[10]。

1.4.3 恩替卡韦和已知杂质的线性关系 分别取恩替卡韦、鸟嘌呤、恩替卡韦呋喃杂质、8-甲氧基杂质、8-羟基杂质、4-羟基二甲基甲硅烷基杂质、非对映异构体1、非对映异构体2和非对映异构体3各对照品,制成各对照品储备液约10 μg/mL,再分别稀释制成各浓度的线性溶液。取100 μL注入高效液相色谱仪,记录色谱图,由峰面积对浓度进行线性回归,得回归方程、相关系数 r 、斜率和截距。

1.4.4 精密度试验 重复性:取供试品溶液,在

同一天由同一人配制并测定6份样品,分别进样测定并记录色谱图及峰面积,计算RSD。中间精密性:在不同时间由不同操作人取供试品溶液,按重复性方法配制并测定共12份样品,按照有关物质测定法测定杂质含量,并计算RSD,可接受的标准为各测定值间杂质含量RSD不超过15.0%^[10]。

1.4.5 稳定性试验 取系统适用性溶液和供试品溶液,分别于0、1、2、4、8、16、24 h测定,计算RSD,考察方法的稳定性。可接受的标准为在24 h内各成分峰面积的RSD均小于10%^[10]。

1.4.6 回收率试验 取按照线性溶液配制方法分别配制成50%、80%、100%、120%的已知杂质溶液各3份,分别加入供试品溶液中,再各取100 μL进样求各杂质回收率。有关物质回收率可接受的标准为各浓度下的平均回收率为92%~105%,RSD不大于10%^[10]。

1.4.7 耐用性试验 取恩替卡韦系统适用性溶液,分别采用25、30、35℃柱温,流速相对值为0.8、1.0、1.2 mL/min;流动相A(水-乙腈-三氟乙酸溶液分别采用985:15:1和995:5:1)和流动相B(水-乙腈-三氟乙酸溶液分别采用665:335:1和735:265:1)两种流动相配比,进行耐用性试验。可接受的标准为未知最大单杂质和总杂质含量检测误差均小于0.1%;恩替卡韦与8种相关物质的分离度均大于1.5^[10]。

1.4.8 专属性试验 ①各样品定位。取系统适用性溶液100 μL,注入液相色谱仪,记录色谱图,根据出峰保留时间确定每个峰对应的杂质。②强力降解试验。称取恩替卡韦片粉末约0.2 g(相当于恩替卡韦0.5 mg),加入适量0.01 mol/L盐酸溶液,超声溶解,再加入1.0 mol/L氢氧化钠溶液1.0 mL,放置室温1 h,置于10 mL容量瓶中定容。恩替卡韦溶液分别经酸破坏(2.0 mol/L盐酸溶液1.5 mL,80℃水浴1 h加氢氧化钠中和)、碱破坏(1.0 mol/L氢氧化钠溶液1.0 mL,放置1 h,用盐酸溶液中和)、氧化破坏(3%过氧化氢溶液1.0 mL,80℃水浴1 h)、光破坏(5000 Lx光照24 h)、热破坏(80℃水浴中放置2 h),另取未作处理的溶液,作为未破坏供试品溶液。参比制剂同上法操作,原料称取约0.5 mg,空白辅料称取约0.2 g,同上法操作,按有关物质检查法,精密量取100 μL进样,记录色谱图,测定有关物质。

2 结 果

2.1 方法建立

以稀释液、混合杂质溶液对USP40标准方法和本研究建立的方法进行对比研究发现,稀释液均不干扰检测,但USP40标准方法运行时间较长,需要100 min,且相邻杂质峰的分度最小仅1.61,而本研究建立的方法分度最小有2.47,且运行时间仅为45 min(表1)。因此,本研究建立的方法总体优于USP40标准方法。

2.2 方法验证结果

2.2.1 系统适用性 系统适用性检测色谱图见图1。主峰(恩替卡韦)与相邻杂质峰的分度为2.30。理论板数N以恩替卡韦峰计为60 567,其他各峰的峰面积RSD不超过2.0%,保留时间RSD不超过1.0%,拖尾因子均不超过2.0,各杂质峰的理论板数均至少5000,恩替卡韦与相邻杂质峰的分度均至少1.5,提示系统适用性符合要求,能满足测定有关物质要求。

2.2.2 检测限和定量限 恩替卡韦和8种有关物质的检测限和定量限均小于本规格制剂的报告浓度0.2%,见表2和表3。提示本系统可完全满足恩替卡韦中有关物质的有效检出。

2.2.3 恩替卡韦和8种有关物质浓度与响应值的线性关系 根据测定结果,各组分在范围内浓度与响应值呈良好的线性关系,相关系数 ≥ 0.990 ,Y轴截距在100%响应值的25%内,响应因子的RSD不大于5%(表4)。结果表明,恩替卡韦和各杂质在相应的范围内呈良好的线性关系。

2.2.4 精密度 最大单杂质和总杂质的平均含

量分别为0.12%(RSD=1.00%)、0.47%(RSD=0.21%)。两次测定恩替卡韦片各有关物质含量RSD均小于4.0%,表明使用本法测定恩替卡韦片有关物质精密度良好,耐用性良好,人为影响小。

2.2.5 稳定性 系统适用性溶液中恩替卡韦、鸟嘌呤、恩替卡韦呋喃杂质、非对映异构体1、非对映异构体3、8-羟基杂质、非异构体2、8-甲氧基杂质、4-羟基二甲基甲硅烷基杂质的峰面积RSD分别为1.69%、1.68%、1.72%、1.66%、1.68%、1.73%、1.70%、1.63%、1.06%;供试品溶液中最大单杂质峰面积RSD为2.67%,总杂质RSD为3.48%;低浓度对照溶液中恩替卡韦的峰面积RSD为1.35%。结果表明系统适用性、供试品溶液、低浓度对照溶液24 h内稳定。

2.2.6 回收率 恩替卡韦的8种有关物质回收率见表5,各浓度下的平均回收率及总平均回收率均为92%~105%,每个水平浓度的回收率RSD($n=3$)均不大于10.0%,总RSD($n=12$)均小于10%,表明该检测方法测定恩替卡韦和8种有关物质的回收率良好。

2.2.7 耐用性 在试验范围内,随着柱温升高,保留时间无明显变化,拖尾因子、分度及理论板数都符合规定,各有关物质含量偏差的绝对值均小于0.1。随着流速变大,保留时间提前,拖尾因子、分度及理论塔板数都符合规定,各有关物质含量偏差的绝对值均小于0.1。流动相A中水增大,保留时间略有提前,而三氟乙酸变化保留时间无明显变化;流动相B中水或三氟乙酸变化,保留时间均无明显变化,各条件变化拖尾因子、分度及理论板数均符合规定,各有关物质含量偏差的

表1 USP40标准方法与本研究建立的方法对混合溶液的检测结果对比
Table 1 Test results of USP40 standard method and the method established in this study for the mixed solution

峰归属	USP40标准方法				本研究建立的方法			
	保留时间(min)	分离度	拖尾因子	理论板数	保留时间(min)	分离度	拖尾因子	理论板数
鸟嘌呤	3.732	24.65	1.14	16 981	4.955	33.01	1.04	9436
恩替卡韦呋喃杂质	8.703	18.06	1.15	14 417	11.272	17.44	0.99	62 917
非对映异构体1	14.277	1.61	1.04	30 164	14.335	2.47	1.00	110 524
非对映异构体3	14.780	4.74	1.06	39 147	14.768	2.82	0.98	108 564
恩替卡韦	16.098	2.71	1.09	61 615	15.330	5.37	1.36	77 992
非对映异构体2	16.768	5.65	—	80 987	16.428	6.46	0.97	119 169
8-羟基杂质	18.082	18.31	1.11	98 635	17.618	20.41	0.99	154 875
8-甲氧基杂质	22.085	—	1.05	180 106	21.348	—	0.98	207 693

“—”:无相关数据。USP:美国药典。

图 1 系统适应性检测色谱图

Figure 1 Chromatograms of system applicability

表 2 恩替卡韦和8种有关物质的检测限

Table 2 Limits of detection of entecavir and related substances

成 分	最低检测浓度 (ng/mL)	信噪比	与供试品浓度比 (%)
鸟嘌呤	0.5	3.1~4.2	0.001
恩替卡韦呋喃杂质	1.3	4.4~4.7	0.003
非对映异构体1	2.4	4.1~4.8	0.005
非对映异构体3	2.5	6.2~6.6	0.005
恩替卡韦	1.2	4.5~4.9	0.002
8-羟基杂质	2.6	4.5~4.9	0.005
非对映异构体2	1.0	3.6~3.8	0.002
8-甲氧基杂质	1.0	3.8~4.4	0.002
4-羟基二甲基甲硅烷基杂质	1.2	3.3~3.7	0.002

绝对值小于0.1。

2.2.8 专属性 混合溶液中能检出一致的恩替卡韦和8种有关物质。各有关物质出峰顺序为鸟嘌呤、恩替卡韦呋喃杂质、非对映异构体1、非对映异构体3、恩替卡韦、非异构体2、8-羟基杂质、8-甲氧基杂质和4-羟基二甲基甲硅烷基,各峰之间分离度均大于1.5,分离度良好,空白辅料无干扰。强制降解实验结果见图2。在所有强制降解条件下,降解产物与恩替卡韦的峰可以分离,恩替卡韦和各有关物质的物质平衡绝对值均小于5%;峰纯度达到要求,在上述所获得的色谱图中,恩替卡韦的峰纯度均能达到970以上,证明本方法耐用性良好。

3 讨 论

恩替卡韦是治疗乙型肝炎的重要药物之一。中美上海施贵宝制药有限公司于2005年在国内上市了恩替卡韦薄膜衣片,但由于其售价偏高,给患者带来不小的经济压力。目前,国内仿制药中已有恩替卡韦分散片、硬胶囊和口服液上市,但与原研剂型一致的薄膜衣片仍处于研发申报阶段。因此需要一种准确、可靠、简便并满足最新质量标准要求的有关物质测定方法用于国内仿制薄膜衣片的质量控制以及再评价研究。查阅国内文献和国外标准,在现有国家标准和原料药、分散片的相关文献中只定义了总杂质和单杂质限度,没有确定杂质名称^[11];在恩替卡韦口服液的研究报道中也只计算了三种非对映异构体的含量^[12]。而目前无论是USP40的原料标准还是EP9.0的原料标准均增加了较多的已知结构有关物质。本研究结合了USP40和EP9.0的原料标准,在保留三种非对映异构体的基础上新增恩替卡韦呋喃杂质、8-羟基杂质、8-甲氧基杂质、4-羟基二甲基甲硅烷基杂质;此外,由于原料药生产过程中五元脂肪环上的碳氢键可能断裂,从而生成苄基鸟嘌呤,后续还可以进一步脱苄基生成鸟嘌呤,为加强其质量控制,在有关物质检查中再增加鸟嘌呤,合计纳入了8种已知结构的有关物质。

在检测方法上,本研究参考了USP40原料标准、中美上海施贵宝制药有限公司的恩替卡韦薄

表 3 恩替卡韦和8种有关物质的定量限

Table 3 Limits of quantitation of entecavir and related substances

成 分	定量限浓度(ng/mL)	信噪比	6针峰面积	与供试品浓度比(%)
鸟嘌呤	1.3	12.3~14.9	0.011~0.012	0.010
恩替卡韦呋喃杂质	5.1	11.9~15.1	0.016~0.018	0.010
非对映异构体1	5.4	12.5~15.6	0.019~0.020	0.011
非对映异构体3	5.5	10.0~14.6	0.022~0.025	0.011
恩替卡韦	2.5	11.5~19.9	0.009~0.010	0.005
8-羟基杂质	9.1	15.9~19.7	0.012~0.013	0.018
非对映异构体2	2.7	21.3~24.5	0.010~0.011	0.005
8-甲氧基杂质	6.4	13.0~14.5	0.023~0.023	0.013
4-羟基二甲基甲硅烷基杂质	3.5	10.1~15.8	0.005~0.006	0.005

表 4 恩替卡韦和8种有关物质的线性回归分析结果

Table 4 Linear regression analysis of entecavir with related substances

成 分	线性回归方程	相关系数	响应因子RSD(%)	浓度范围($\mu\text{g/mL}$)
鸟嘌呤	$y=8.3479x+0.0026$	0.9998	1.85	0.0013~0.3157
恩替卡韦呋喃杂质	$y=3.4239x+0.0006$	1.0000	1.42	0.0051~0.3066
非对映异构体1	$y=3.4324x-0.0006$	0.9998	2.39	0.0051~0.3078
非对映异构体3	$y=3.8999x+0.0035$	0.9999	1.29	0.0055~0.3279
恩替卡韦	$y=0.0414x-0.0016$	0.9900	1.75	0.0024~0.5735
8-羟基杂质	$y=4.2834x+0.0006$	0.9999	1.81	0.0027~0.3268
非对映异构体2	$y=3.6037x+0.0002$	0.9999	1.82	0.0027~0.3248
8-甲氧基杂质	$y=3.8217x-0.0010$	1.0000	0.77	0.0061~0.2942
4-羟基二甲基甲硅烷基杂质	$y=1.4790x-0.0025$	0.9999	4.39	0.0034~0.3069

RSD:相对标准差.

表 5 恩替卡韦的8种有关物质回收率

Table 5 Recovery rates of entecavir related substances

(n=12, %)

浓度 (%)	鸟嘌呤	恩替卡韦呋喃杂质	非对映异构体1	非对映异构体3	8-羟基杂质	非对映异构体2	8-甲氧基杂质	4-羟基二甲基甲硅烷基杂质
50	102.7	94.6	95.6	104.1	101.8	99.4	101.2	96.4
	103.4	94.8	96.3	103.9	102.3	100.2	101.6	96.4
	103.0	95.1	96.0	104.3	102.8	100.6	100.9	96.9
80	101.2	95.2	98.2	101.4	101.0	99.3	100.5	103.3
	101.1	95.1	99.2	101.4	100.4	99.2	100.5	102.6
	100.7	94.9	98.3	101.1	99.4	98.8	100.1	103.0
100	101.2	96.1	98.9	101.6	99.2	99.8	100.8	96.7
	101.9	96.8	98.9	102.1	100.7	100.5	101.4	96.9
	101.3	96.1	98.0	101.8	99.9	100.2	100.6	96.7
120	101.4	97.0	98.6	101.9	98.7	100.6	100.6	98.4
	101.3	96.8	98.1	101.7	97.9	100.8	100.6	98.4
	101.4	97.0	98.4	101.6	97.7	100.1	100.9	98.4
RSD	0.84	0.97	1.24	1.11	1.89	0.64	0.41	2.73

RSD:相对标准差.

在高温、光照、碱、酸和氧化处理条件下,降解产物与恩替卡韦的峰均可以分离。

图 2 强制降解实验结果色谱图
Figure 2 Chromatogram of forced degradation experiment

膜衣片标准(YBH33292005)和正大天晴药业集团股份有限公司的恩替卡韦分散片标准中有关物质方法和原料使用的有关物质方法。通过对比,改良并优化了色谱条件,即采用常用的WATERS C18色谱柱(250 mm×4.6 mm),以水-乙腈-三氟乙酸(990:10:1)为流动相A,水-乙腈-三氟乙酸(700:300:1)为流动相B,进行梯度洗脱,紫外-可见光检测器检测波长为254 nm,柱温30℃。为了检测可能存在的新杂质以及系统在27 min之后是否还有杂质出峰,将原标准中进样浓度提高到50 μg/mL,进样体积提高到进样环的最大体积100 μL,运行时间从YBH33292005标准中的27 min增加至35 min,总的梯度时间改为45 min。

方法学验证结果显示,在此条件下,空白辅料无干扰,定量限和检测限低于有关物质测定项下杂质限度要求,灵敏度能够满足杂质测定的需要。强制降解实验结果提示,恩替卡韦片在碱性及光照下不稳定,恩替卡韦原料在高温条件下杂质略有增多,提示在进行制剂生产时,应避免接触酸、碱和氧化剂,生成的有关物质主要是鸟嘌呤。本研究从恩替卡韦薄膜衣片质量控制的最新要求出发,建立能够有效地对恩替卡韦薄膜衣片中可能存在的8种有关物质进行检测的方法。经方法学验证,本研究建立的方法耐用性好,效费比高,操作简单,可作为最新标准下的恩替卡韦薄膜衣片中有关物质的检测方法,对进一步提高药品质量标

准具有积极意义,更保证了药品使用的安全性。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 聂忠江, 赵民学, 金善律. 乙型肝炎治疗的新进展[J]. 中国急救复苏与灾害医学杂志. 2010, 5(7): 657-658. NIE Zhongjiang, ZHAO Minxue, JIN Shanlyu. New progress in the treatment of hepatitis B[J]. **China Journal of Emergency Resuscitation and Disaster Medicine**, 2010, 5(7): 657-658. (in Chinese)
- [2] 刘林华, 陈新月. 抗乙型肝炎病毒新药-恩替卡韦[J]. 国际流行病传染病学杂志, 2006, 33(1): 58-61. LIU Linhua, CHEN Xinyue. A new antiviral drug against hepatitis B virus—Entecavir[J]. **International Journal of Epidemiology and Infectious Disease**, 2006, 33(1): 58-61. (in Chinese)
- [3] RIVKIN A. Entecavir: a new nucleoside analogue for the treatment of chronic hepatitis B[J]. **Drugs Today**, 2007, 43(4): 201.
- [4] 蒋银妹, 罗秀琴, 徐燕, 等. 梯度洗脱反相高效液相色谱法测定恩替卡韦的有关物质[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(4): 676-679. JIANG Yinmei, LUO Xiuqin, XU Yan, et al. HPLC determination of the related substances in entecavir[J]. **Chinese Journal of Pharmaceutical Analysis**, 2009, 29(4): 676-679. (in Chinese)
- [5] 霍晓方, 罗林, 谢永美, 等. HPLC法测定恩替卡韦原料药含量及其有关物质[J]. 中国药房, 2008, 19(6): 1254-1255. HUO Xiaofang, LUO Lin, XIE Yongmei, et al. Determination of the content of entecavir and its related substances by HPLC[J]. **China Pharmacy**, 2008, 19(6): 1254-1255. (in Chinese)
- [6] 冀满丰. 高效液相色谱——梯度洗脱法测定恩替卡韦分散片的含量和有关物质[J]. 中国药业, 2012, 21(9): 26-27. JI Manfeng. Content determination of entecavir dispersible tablets and its related substances by gradient elution[J]. **China Pharmaceuticals**, 2012, 21(9): 26-27. (in Chinese)
- [7] 陈华, 陈宇堃, 张雷, 等. 恩替卡韦有关物质测定方法的比较研究[J]. 药物生物技术, 2017, 24(6): 507-512. CHEN Hua, CHEN Yulong, ZHANG Lei, et al. Comparison of determination of the related substances in entecavir[J]. **Pharmaceutical Biotechnology**, 2017, 24(6): 507-512. (in Chinese)
- [8] 李晓峰. 恩替卡韦有机杂质的分析与控制[J]. 中国新药杂志, 2019, 28(21): 2640-2645. LI Xiaofeng. Analysis and control of organic impurities in entecavir[J]. **Chinese Journal of New Drugs**, 2019, 28(21): 2640-2645. (in Chinese)
- [9] United States Pharmacopeial Convention. USP 40[S]. Maryland: United States Pharmacopeial Convention, Inc, 2017: 3990-3992.
- [10] 中华人民共和国国家药典委员会. 中国药典(2015年版)[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 374-377. Chinese Pharmacopoeia Commission. **Chinese pharmacopoeia 2015 edition**[S]. Beijing: China Medical Science Press, 2015: 374-377. (in Chinese)
- [11] 崔婷, 王娜娜, 张道林, 等. HPLC测定恩替卡韦中的有关物质[J]. 华西药学杂志, 2017, 32(5): 540-542. CUI Ting, WANG Nana, ZHANG Daolin, et al. Determination of the related substances in entecavir by HPLC[J]. **West China Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2017, 32(5): 540-542. (in Chinese)
- [12] 严拯宇, 黄玉, 王瑞, 等. 高效液相色谱法测定恩替卡韦口服液中有关物质[J]. 分析测试学报, 2015, 31(4): 537-541. YAN Chengyu, HUANG Yu, WANG Rui, et al. Determination of the related substances of entecavir oral solution by high performance liquid chromatography[J]. **Journal of Analytical Science**, 2015, 31(4): 537-541. (in Chinese)

[本文编辑 余方 刘丽娜]