

【医学实践】

2'-O, 3'-O, 5'-O-三乙酰基-N-(3-羟基苯基)腺苷含量测定方法的建立与验证

林玉彪

海南中济医药科技有限公司

摘要: 目的 建立新的 2'-O, 3'-O, 5'-O-三乙酰基-N-(3-羟基苯基)腺苷含量测定方法。方法 采用高效液相色谱法测定, 色谱柱为 COSMOSIL C18 (4.6mm×250mm, 5 μ m), 流动相为冰醋酸溶液(量取 1000mL 水, 加入 2mL 冰醋酸, 混匀)-乙腈(60:40)。检测波长为 300nm; 流速为每分钟 1.0mL; 柱温为 30℃; 进样体积 10 μ L。结果 专属性试验中溶剂对本品含量测定无干扰; 在强制降解试验中主峰与相邻杂质峰的分离度均大于 1.5, 主峰纯度匹配值均 \geq 990, 物质平衡均在 90%~110% 范围内; 线性与范围试验表明本品在 0.1mg·mL⁻¹~0.3mg·mL⁻¹ 浓度范围内主成分峰面积具有良好的线性关系($r=1.0000$); 在精密度试验中, 进样精密度 RSD 为 0.05%、重复性 RSD 为 0.4%、中间精密度 RSD 为 0.6%, 表明精密度良好; 溶液稳定性试验表明供试品溶液和对照品溶液于 25℃ 下放置 24 h 稳定性良好; 回收率在相当于供试品溶液浓度的百分比为 80%~120% 范围内, 回收率为 99.2% ($n=9$), RSD 为 0.3%, 回收率良好; 耐用性试验表明, 色谱条件的微小变动, 测定结果不受影响。结论 所建立的含量测定方法简单可靠, 专属性强, 线性与范围、精密度、准确度均良好, 耐用性范围广, 含量测定准确度高, 能更好地实现本品的含量控制。

关键词: 2'-O, 3'-O, 5'-O-三乙酰基-N-(3-羟基苯基)腺苷; 含量测定; 高效液相色谱法; 分析方法验证

2'-O, 3'-O, 5'-O-三乙酰基-N-(3-羟基苯基)腺苷[化学名称: (2R,3R,4R,5R)-2-(acetoxymethyl)-5-(6-((3-hydroxyphenyl)amino)-9H-purin-9-yl) tetrahydrofuran-3,4-diyl diacetate]是一种具有明确化学结构(见图1)的腺苷衍生物, 其分子式为 C₂₂H₂₃N₅O₈, 分子量为 485.45, 性状为白色至类白色结晶性粉末^[1]。该化合物是近年来新型开发的一种 AMP-激活蛋白激酶(AMPK)激活剂, 通过靶向 AMPK 信号通路发挥药理作用^[2]。有实验研究报道 2'-O, 3'-O, 5'-O-三乙酰基-N-(3-羟基苯基)腺苷具有显著的血脂调节活性。在动物模型中, 该化合物被证实能有效改善血脂紊乱状态, 具体表现为显著降低血液中的甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)水平, 同时减少腹部脂肪的蓄积。这些效应可能与 AMPK 介导的代谢调控机制相关, 例如通过抑制脂质合成和促进脂肪酸氧化^[3-4]。基于其积极的药理活性, 2'-O, 3'-O, 5'-O-三乙酰基-N-(3-羟基苯基)腺苷

展现出作为临床候选药物的潜力, 可用于预防和/或治疗高脂血症及其相关并发症, 如动脉粥样硬化等^[5]。未来研究还需进一步评估其药代动力学和安全性, 以推动其临床应用。

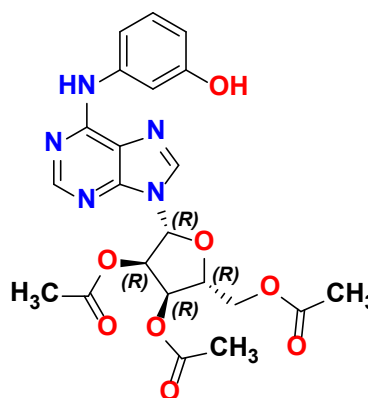


图1 2'-O, 3'-O, 5'-O-三乙酰基-N-(3-羟基苯基)腺苷的化学结构

然而, 目前国内外关于此化合物的公开研究文献报道非常有限, 特别是在其关键质量属性控制方面,

尚未见有关其含量测定方法的文献发表。这一研究空白的填补对于推进其后续开发至关重要。

因此,本研究聚焦于建立2'-O,3'-O,5'-O-三乙酰基-N-(3-羟基苯基)腺苷的专属、灵敏且准确的高效液相色谱(HPLC)含量测定方法,并对其进行系统全面的方法学验证(包括专属性、线性、精密度、准确度、稳定性等)。旨在为该化合物原料药及未来制剂的质量控制、工艺研究与稳定性考察提供科学、可靠的定量分析依据,从而支持其新药研发链条的推进。

1 仪器与试药

1.1 仪器

LC-2030C 高效液相色谱仪(日本岛津公司)、UltiMate 3000 高效液相色谱仪(赛默飞世尔科技公司)、AUW220D 十万分之一电子天平(日本岛津公司)。

1.2 试剂与试药

2'-O,3'-O,5'-O-三乙酰基-N-(3-羟基苯基)腺苷(批号分别为T250101、T250102、T250103)原料由国内1厂家提供。工作对照品(批号:RS250201,含量:98.5%)自制。乙腈(HPLC)、冰醋酸(AR)、盐酸(AR)均购自西陇科学股份有限公司;氢氧化钠(AR)购自广州化学试剂厂;过氧化氢(AR)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司、纯净水购自杭州娃哈哈集团有限公司。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱采用十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂(COSMOSIL C18 4.6mm×250mm, 5 μm 或能效相当的色谱柱);以冰醋酸溶液(量取1000mL水,加入2mL冰醋酸,混匀)-乙腈(60:40)为流动相;检测波长为300nm;流速为1.0 mL/min;柱温为30℃;进样体积10 μL。

2.2 溶液配制

2.2.1 供试品溶液

取2'-O,3'-O,5'-O-三乙酰基-N-(3-羟基苯基)腺苷适量,加流动相溶解并定量稀释制成每1mL中约含0.2mg的溶液。

2.2.2 对照品溶液

取工作对照品适量,精密称定,加流动相溶解并定量稀释制成每1mL中约含0.2mg的溶液。

2.2.3 强制降解试验用溶液

高温破坏溶液 称取本品约20mg,置100mL量瓶中,加流动相10mL使溶解,盖紧瓶塞,防止流动相蒸发,置100℃水浴1h,放冷至室温,加流动相稀

释至刻度,摇匀。

氧化破坏溶液 称取本品约20mg,置100mL量瓶中,加流动相10mL使溶解,加30%过氧化氢溶液1mL,室温放置6h,加流动相稀释至刻度,摇匀。

光照破坏溶液 称取本品约20mg,置100mL无色透明量瓶中,加流动相10mL使溶解,置光照试验箱中照射(照度:4500Lx±500Lx)24h,加流动相稀释至刻度,摇匀。

强酸破坏溶液 称取本品约20mg,置100mL量瓶中,加流动相10mL使溶解,加1mol·L⁻¹盐酸溶液1.0mL,室温放置1h,加1mol·L⁻¹氢氧化钠溶液1.0mL中和,加流动相稀释至刻度,摇匀。

强碱破坏溶液 称取本品约20mg,置100mL量瓶中,加流动相10mL使溶解,加1mol·L⁻¹氢氧化钠溶液1.0mL,室温放置6h,加1mol·L⁻¹盐酸溶液1.0mL中和,加流动相稀释至刻度,摇匀。

2.2.4 线性试验系列对照品溶液

取工作对照品20mg,精密称定,置20mL量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,作为线性试验对照品溶液用储备溶液。精密量取储备溶液,用流动相定量稀释制成每1mL中分别含0.10 μg、0.16 μg、0.20 μg、0.24 μg和0.30 μg的系列对照品溶液,即得。

2.2.5 准确度试验用测试溶液

取2'-O,3'-O,5'-O-三乙酰基-N-(3-羟基苯基)腺苷16mg、20mg和24mg分别于3个100mL量瓶中,加流动相溶解并稀释至刻度,摇匀,作为80%、100%和120%准确度测试溶液,每个浓度平行配制3份。

2.3 色谱条件中波长的选择

本实验采用二极管阵列检测器(DAD)进行光谱采集与波长选择,其检测范围覆盖200nm至400nm,能够全面捕捉各组分在此区间的紫外吸收特性。在专属性研究阶段,分别对主成分溶液、降解产物溶液及强制降解样品进行全波长扫描。结果显示,主成分及其主要降解杂质在270nm与300nm两处均表现出显著吸收,且两波长下均具备良好的检测灵敏度。

通过进一步对比分析不同波长下的光谱数据发现,尽管270nm处主成分与杂质均有较强吸收,但在300nm处二者的吸收响应值更高,提示该波长可能具备更优的检测灵敏度。此外,在300nm下,各降解杂质与主成分的色谱峰形更佳,分离效果良好,潜在干扰较小,有利于在实际样品分析中实现准确定量与杂质控制。

综上,基于吸收强度、峰形特征及分离效能

等多方面因素的综合评估,最终将检测波长确定为300nm,以确保分析方法在专属性、灵敏度及可靠性方面达到理想水平。

2.4 色谱条件中流动相的选择

在确定色谱条件的过程中,流动相的筛选基于前期LC-MS/MS方法开发阶段的系统比较研究。我们先后考察了乙腈/甲酸与乙腈/冰醋酸等不同流动相体系对目标成分色谱行为的影响。实验结果显示,采用乙腈/冰醋酸体系时,主成分的峰形对称性更好,峰宽更为合理,且无明显拖尾和前伸现象,整体分离效果优于乙腈/甲酸体系。结合保留行为和系统适用性要求,经进一步优化配比与流速等参数,最终确定采用第2.1项下所述的乙腈-冰醋酸水溶液作为流动相体系,以确保方法具有良好的灵敏度、稳定性和重现性。

2.5 方法学验证

2.5.1 专属性

取空白溶剂(流动相)、供试品溶液、强制降解试验溶液各10 μ L,分别注入液相色谱仪,照2.1项下色谱条件分析,记录色谱图(见图2),由记录的色谱图可知空白溶剂对本品含量测定无干扰;强制降解试验结果(见表1)表明,在高温、光照强制降解条件下,本品基本稳定;在强酸、强碱、氧化等强制降解条件下,均有不同程度的降解。各种破坏条件下主峰与相邻杂质峰的分离度均大于1.5,主峰纯度匹配值均 ≥ 990 ,物质平衡均在90%~110%范围内,符合验证要求,表明本方法专属性良好。

2.5.2 线性与范围

取配制对照品的系列浓度溶液(相当于供试品溶液浓度的50%~150%),分别精密量取10 μ L注入液相色谱仪检测,记录色谱图。以测得的峰面积对被测物的浓度作图,用最小二乘法进行线性回归。评估被测物峰面积与浓度直接呈比例关系的程度。试验结果(见表2)表明,溶液浓度在0.1 mg \cdot mL⁻¹~0.3 mg \cdot mL⁻¹内主峰面积与浓度直接呈比例关系的程度有着良好的线性关系。

2.5.3 精密度

(1) 进样精密度

取对照品溶液,精密量取10 μ L,连续重复进样6次,记录色谱图,主峰面积RSD为0.05%(可接受标准:RSD \leq 1.0%),表明方法仪器系统精密度良好。

(2) 重复性

按2.2.1供试品溶液配制方法,平行配制6份供试品溶液,分别精密量取10 μ L注入液相色谱仪检测,记录色谱图,计算含量的相对标准偏差(RSD)。试验结果(见表3)表明,重复测定6份供试品结果的RSD为0.4%,表明方法的重复性符合验证要求。

(3) 中间精密度

由另一个分析人员,在不同日期,使用不同仪器重复测定6份供试品,与重复性试验项下6份供试品的测定结果一起进行评价。重复测定两组共计12份供试品结果(见表4)的RSD为0.6%,表明方法的中间精密度符合验证要求。

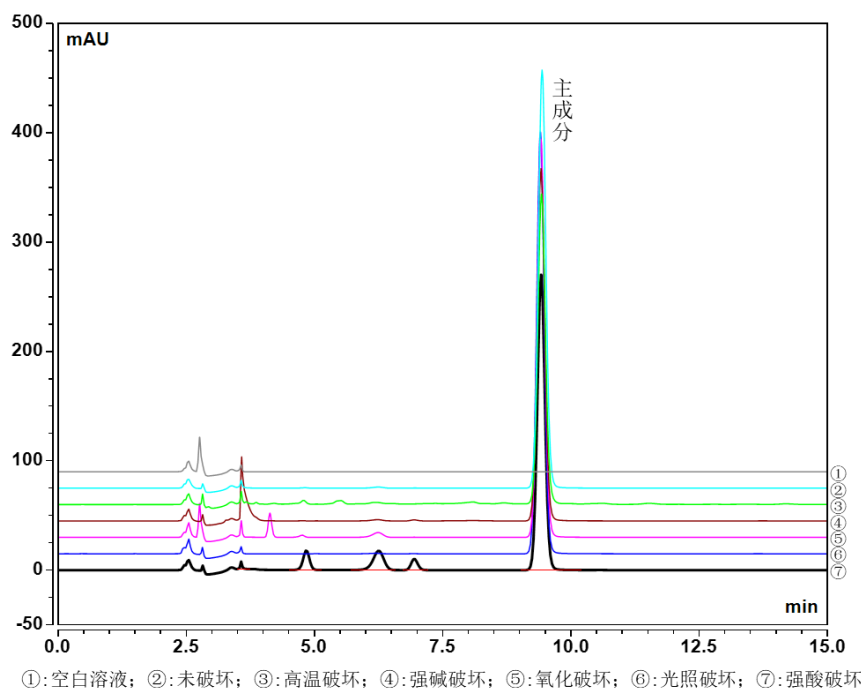


图2 专属性试验色谱图

（4）溶液稳定性

供试品溶液与对照品溶液在 25℃条件下放置 24 h 后，其相对含量的变化值分别为 0.16% 与 0.11%，均低于 2.0% 的预设可接受标准（≤ 2.0%）。如表 5 数据所示，在 24 h 的考察期间内，两种溶液各时间点的含量变化幅度均保持在较低水平，最大变化值远低于可接受限度。结果表明，供试品溶液与对照品溶液在 25℃条件下具有良好的稳定性，符合验证要求。

（5）准确度（回收率）试验

取 2.2.2 项下的对照品溶液及 2.2.5 项下的准确度试验用测试溶液，分别精密量取 10 μL 注入液相色谱仪检测，记录色谱图，结果见表 6。

结果表明，在相当于供试品溶液浓度的百分比为 80%~120% 范围内，回收率为 99.2%，RSD 为 0.3%，符合验证要求，表明此方法准确度较高。

2.5.6 耐用性试验

验证色谱条件的微小变动时，测定结果不受影响的承受程度。通过微调变动因素[包括流速

（0.8mL·min⁻¹~1.2 mL·min⁻¹）、柱温（25℃~35℃）、流动相中乙腈的比例（38%~42%）和不同色谱柱（① YMC-Pack ODS-A C18 和② Acclaim™ 120 C18）等]评价该方法的耐用性，测定结果见表 7。

由试验结果可知，在流速、柱温、流动相中乙腈的比例范围内和不同色谱柱等色谱条件发生较小的变动时，本品含量测定结果基本一致，符合验证要求，表明此方法的耐用性良好。

2.6 含量测定

取三批 2' -O, 3' -O, 5' -O- 三乙酰基 -N-(3-羟基苯基)腺苷，按 2.2.1 供试品溶液配制方法，照 2.1 项下色谱条件，测定本品的含量，按峰面积以外标法计算，测定结果见表 8。

结果表明，三批 2' -O, 3' -O, 5' -O- 三乙酰基 -N-(3-羟基苯基)腺苷含量均在 98.0%~102.0% 的标准范围内，表明此方法可用于检查本品的含量。

3 结论

2' -O, 3' -O, 5' -O- 三乙酰基 -N-(3-羟基苯基)腺苷含量测定方法的建立与验证,主要依据《中

表 1 强制降解试验结果

破坏条件	参数		
	主峰与前 / 后峰分离度	主峰纯度匹配值	物质平衡
未破坏	—/—	1000	100%
高温破坏	—/—	999	99%
氧化破坏	9.6/—	1000	100%
光照破坏	—/—	1000	100%
强酸破坏	5.4/—	999	98%
强碱破坏	9.6/—	1000	98%
可接受标准	> 1.5	≥ 990	90%~110%

表 2 线性试验结果

相当于供试品溶液 浓度的百分比	浓度 (mg·mL ⁻¹)	线性方程	相关系数 r ^y	可接受标准	
				轴截距与 100% 响应值的比值	相关系数 r ^y 轴截距与 100% 响应值的比值
50%~150%	0.1~0.3	y = 29 271 321 x - 2 515	1.000 0	0.04%	≥ 0.998 ≤ 2.0%

表 3 重复性试验结果

No	1	2	3	4	5	6	平均值	RSD	可接受标准
含量	99.67%	99.30%	99.10%	99.45%	99.51%	100.25%	100.3%	0.4%	RSD ≤ 1.0%

表 4 中间精密度试验结果

No	1	2	3	4	5	6	平均值	RSD	可接受标准
重复性	99.67%	99.30%	99.10%	99.45%	99.51%	100.25%	99.9%	0.6%	RSD ≤ 2.0%
中间精密度	100.57%	100.95%	100.75%	100.14%	99.23%	99.96%			

表 5 供试品溶液与对照品溶液在 25℃放置期间的含量变化

时间（h）	储存期间相对含量变化值						
	0	4	8	12	16	20	24
供试品溶液	N/A	0.02%	0.02%	0.05%	0.15%	0.14%	0.16%
对照品溶液	N/A	0.01%	0.02%	0.03%	0.05%	0.08%	0.11%

表 6 回收率试验结果

测试溶液浓度	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率	平均值	RSD	可接受标准
80%	16.24	16.04	98.77%	99.2%	0.3%	98%~102%；RSD ≤ 2.0%
	16.08	15.97	99.32%			
	16.21	16.08	99.20%			
100%	20.15	19.93	98.91%			
	20.04	19.95	99.55%			
	20.39	20.25	99.31%			
120%	24.37	24.18	99.22%			
	24.09	23.91	99.25%			
	24.18	23.87	98.72%			

表 7 耐用性试验结果

变动因素	变动范围	含量	平均值	RSD	可接受标准
无	标准条件	100.36%	99.7%	0.3%	RSD ≤ 2.0%
流速	0.8ml/min	99.45%			
	1.2ml/min	99.90%			
柱温	25℃	99.59%			
	35℃	99.57%			
乙腈比例	38%	99.37%			
	42%	99.76%			
色谱柱	色谱柱②	99.54%			
	色谱柱③	99.59%			

表 8 含量测定结果

批号	含量	平均值	RSD
T250101	100.31%、100.20%、100.49%	100.3%	0.1%
T250102	100.17%、99.53%、99.72%	99.8%	0.3%
T250103	99.46%、99.77%、99.27%	99.5%	0.3%

国药典》2020 年版四部通则 0512 “高效液相色谱法”^[6]、通则 9101 “分析方法验证指导原则”^[7]、通则 9102 “药品杂质分析指导原则”^[8]，并参考了《对药物研发中分析方法验证的几点考虑》^[9] 及《化学药物分析方法验证的内容和评价》^[10] 等相关技术文件^[11]。经验证，所建立方法的各项验证指标均符合可接受标准。

本研究建立的含量测定方法兼具操作简便性与方法可靠性，专属性强。方法在线性·范围、精密度、准确度及耐用性等关键质量属性上均表现良好，能够为本品含量提供准确、可靠的质量控制。

参考文献：

[1] 亓云鹏. 复杂体系化学计量学解析方法学研究及其在药物分析中的应用 [D]. 上海: 第二军医大学, 2003.

[2] Peng X, Li J, Wang M, et al. A novel AMPK activator improves hepatic lipid metabolism and leukocyte trafficking in experimental hepatic steatosis[J]. 2019 Jun;140(2):153–161.

[3] Jia Y, Wang B, Wu X, et al. Simultaneous quantification of 2',3',5'-tri-O-acetyl-N6-(3-hydroxylaniline) adenosine and its principal metabolites in hamster blood

- by LC-MS/MS and its application in pharmacokinetics study[J].2016(1):46-53.
- [4] 北京谷神生命健康科技有限公司. 三乙酰基-3-羟基苯基腺苷的晶型、制备方法及其用途:CN201911212746.8[P].2024-01-02.
- [5] 中国医学科学院药物研究所. 用于高脂血症治疗的联合用药物及其用途:CN202011130790.7[P].2024-11-05.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S].(ChP2020年版四部). 北京:中国医药科技出版社,2020:61-65.
- [7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S].(ChP2020年版四部). 北京:中国医药科技出版社,2020:480-483.
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S].(ChP2020年版四部). 北京:中国医药科技出版社,2020:483-485.
- [9] 李飞, 李云. 对药物研发中分析方法验证的几点考虑[J]. 中国新药杂志,2021,30(10):902-904.
- [10] 霍秀敏. 化学药物分析方法验证的内容和评价[J]. 中国新药杂志,2009,18(10):883-886.
- [11] 刘斌, 张印兵, 岑小波. 生物分析方法验证在药物非临床安全性评价中的应用[C]// 中国药理学会药物毒理专业委员会, 中国药学会药物安全评价研究专业委员会, 中国毒理学会药物毒理与安全性评价专业委员会, 中国毒理学会生殖毒理专业委员会, 中国毒理学会遗传毒理专业委员会. 2013年(第三届)中国药物毒理学年会暨药物非临床安全性评价研究论坛论文摘要. 成都华西海圻医药科技有限公司/国家成都中药安全性评价中心, 2013:176.