

中图分类号: R917; R978.7 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)07-0053-06
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.07.012



富马酸丙酚替诺福韦片中有关物质测定及杂质鉴定*

章海云¹, 金秉德^{1△}, 王玲兰¹, 宿亮¹, 徐彬滨¹, 朱跃芳²

(1. 株洲千金药业股份有限公司, 湖南 株洲 412000; 2. 湖南省株洲市食品药品检验所, 湖南 株洲 412000)

摘要:目的 建立检测富马酸丙酚替诺福韦片中有关物质含量的高效液相色谱法, 以及鉴定制剂中未知湿热降解杂质化学结构的二维液相色谱-三重四极杆串联质谱法。方法 有关物质测定中, 色谱柱为 Waters XTerra MS C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为 0.02 mol/L 磷酸盐(1 mol/L 氢氧化钾溶液调 pH 至 6.0) - 甲醇(95:5, V/V) - 甲醇(梯度洗脱), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 260 nm, 柱温为 35 °C, 进样量为 20 μL。化学结构鉴定中, 色谱柱为 Agilent Zorbax Eclipse Plus C₁₈ 柱(50 mm × 3.0 mm, 1.8 μm), 流动相为 0.1% 甲酸水溶液 - 甲醇(55:45, V/V), 流速为 0.4 mL/min, 柱温为 35 °C, 采用电喷雾离子源(ESI), 正离子模式, 质荷比(*m/z*)扫描范围为 100~1 000, 雾化气体(氮气, N₂)压力为 45 psi, 干燥气(N₂)流速为 6 L/min, 温度为 350 °C, 碎裂电压为 150 V, 二级质谱碰撞裂解能量为 30 eV。根据保留时间、分子量及二级碎片识别湿热降解杂质。结果 丙酚替诺福韦与 5 个降解杂质 A-E 的定量限分别为 0.4, 0.4, 2.0, 2.0, 0.8, 0.8 ng。5 个降解杂质 A-E 的杂质校正因子分别为 0.61, 0.70, 3.16, 0.75, 0.85; 平均加样回收率分别为 100.20%, 95.23%, 102.36%, 94.48%, 97.26%, RSD 分别为 0.50%, 0.23%, 0.89%, 1.02%, 1.67% (*n* = 9)。未知湿热降解杂质分别为杂质 D 乳糖加合物及丙酚替诺福韦乳糖加合物。结论 该方法专属性强、灵敏度好、准确度高, 可用于富马酸丙酚替诺福韦片中有关物质的含量测定, 通过特征碎片离子可快速识别丙酚替诺福韦乳糖加合物类杂质。

关键词:富马酸丙酚替诺福韦片; 高效液相色谱法; 二维液相色谱-三重四极杆串联质谱法; 有关物质; 乳糖加合物; 化学结构鉴定

Determination of Related Substances and Identification of Impurities in Tenofovir Alafenamide Fumarate Tablets

ZHANG Haiyun¹, JIN Bingde¹, WANG Linglan¹, SU Liang¹, XU Binbin¹, ZHU Yuefang²

(1. Zhuzhou Qianjin Pharmaceutical Co., Ltd., Zhuzhou, Hunan, China 412000; 2. Zhuzhou Institute for Food and Drug Control, Zhuzhou, Hunan, China 412000)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography method for the content determination of related substances in Tenofovir Alafenamide Fumarate Tablets, and to establish a two-dimensional high-liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry (2D-HPLC-MS/MS) method for the identification of the chemical structure of unknown hydrothermal degradation impurities. **Methods** For the content determination of related substances, the chromatography column was Waters XTerra MS C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was 0.02 mol/L phosphate (adjusted to pH 6.0 with 1 mol/L potassium hydroxide solution) - methanol (95:5, V/V) - methanol (gradient elution), the flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 260 nm, the column temperature was 35 °C, and the injection volume was 20 μL. For the chemical structure identification, the chromatographic column was Agilent Zorbax Eclipse Plus C₁₈ column (50 mm × 3.0 mm, 1.8 μm), the mobile phase was 0.1% formic acid aqueous solution - methanol (55:45, V/V), the flow rate was 0.4 mL/min, the column temperature was 35 °C, the positive ion mode was adopted with the electric spray ion source (ESI), the mass charge ratio (*m/z*) scanning range was 100-1 000, the pressure of atomized gas (nitrogen, N₂) was 45 psi, the flow rate of dry gas (N₂) was 6 L/min, the temperature was 350 °C, the fragmentation voltage was 150 V, and the secondary mass spectrometry collision pyrolysis energy was

*基金项目: 2020年度湖南省自然科学基金[2022JJ80122]。

第一作者: 章海云, 女, 硕士研究生, 工程师, 研究方向为药品质量标准与药物分析, (电子信箱)316022993@qq.com。

△通信作者: 金秉德, 男, 硕士研究生, 高级工程师, 研究方向为药品合成工艺, (电子信箱)276306735@qq.com。

on Pazopanib Pharmacokinetics in Cancer Patients [J]. Clin Pharmacokinet, 2019, 58(5): 651-658.

[18] ABDEL-KAHAAR E, WINTER S, TREMMEL R, et al. The Impact of CYP3A4*22 on Tacrolimus Pharmacokinetics and Outcome in Clinical Practice at a Single Kidney Transplant Center [J]. Front Genet, 2019, 10: 871.

[19] RAGIA G, KOLOVOU V, TAVRIDOU A, et al. No effect of CYP3A4 intron 6 C > T polymorphism (CYP3A4*22) on lipid-lowering response to statins in Greek patients with primary hypercholesterolemia [J]. Drug Metab Pers Ther, 2015, 30(1): 43-48.

[20] 侯艳华, 张加强, 武江霞. CYP3A4*1G 不同基因型对颞关节置换术后地佐辛复合舒芬太尼自控镇痛效应的影响[J]. 临床麻醉学杂志, 2020, 36(3): 239-243.

[21] YE ZZ, HU JY, WANG J, et al. The effect of Resveratrol on the pharmacokinetic profile of tofacitinib and the underlying mechanism [J]. Chem Biol Interact, 2023, 374: 110398.

(收稿日期: 2023-06-03; 修回日期: 2023-12-23)

30 eV. The hygrothermal degradation impurities were identified based on retention time, molecular weight, and secondary fragments.

Results The limits of quantification (LOQ) of tenofovir alafenamide and five degradation impurities A – E were 0.4, 0.4, 2.0, 2.0, 0.8, and 0.8 ng, respectively. The relative correction factors of impurities A – E were 0.61, 0.70, 3.16, 0.75, and 0.85, respectively. The average recoveries of impurities A – E were 100.20%, 95.23%, 102.36%, 94.48%, 97.26% with RSDs of 0.50%, 0.23%, 0.89%, 1.02%, and 1.67% ($n = 9$), respectively. The unknown hygrothermal degradation impurities were identified as impurity D lactose adducts and tenofovir alafenamide lactose adducts. **Conclusion** The method is specific, sensitive, accuracy, which is suitable for the content determination of related substances in Tenofovir Alafenamide Fumarate Tablets. Impurities such as lactose adducts in the tenofovir alafenamide can be quickly identified through characteristic fragment ions.

Key words: Tenofovir Alafenamide Fumarate Tablets; HPLC; 2D – HPLC – MS / MS; related substances; lactose adducts; chemical structure identification

富马酸丙酚替诺福韦片(TAF, 商品名 VemLidy)是一种新型核苷类逆转录酶抑制剂^[1],于2016年11月经美国食品和药物管理局(FDA)批准上市,用于成人代偿性肝病患者的慢性乙型肝炎的治疗,2018年11月在我国获批上市^[2-3]。TAF与抗病毒治疗一线药物富马酸替诺福韦二吡呋酯片(规格为每片300 mg)的有效成分相同,但TAF在细胞内能更快水解,有更好的血浆稳定性和更强的肝脏靶向性,且其临床使用剂量约为TDF的1/10,极大地减少了肾功能损伤、骨密度降低等不良反应,安全性更高^[4]。为确保TAF的安全性,需建立有关物质控制方法。目前,各国药典均未收录该药物,其有关物质检测方法的报道较少,仅通过流动相中加入较高比例四氢呋喃以改善杂质分离^[5]。由于四氢呋喃具有刺激性和麻醉作用,吸入后易引起上呼吸道刺激、恶心、头晕、头痛、中枢神经系统抑制及肝、肾功能损害;具有化学不稳定性,易氧化成过氧化物;对液相色谱系统中的peek管及泵密封垫具有溶胀和腐蚀作用,在有关物质检验中具有使用局限性。本研究中建立了测定TAF中有关物质含量的高效液相色谱(HPLC)法,采用磷酸盐 – 甲醇梯度洗脱程序,以加校正因子的主成分对照品法定量^[6-8];采用二维液相色谱 – 三重四极杆串联质谱(2D – LC – MS / MS)法对湿热降解杂质进行化学结构鉴定^[9-10],并推测其形成机理;通过比较不同包装形式样品在使用期间的稳定性^[11-12],为选择合适的包装材料提供依据,确保药品全生命周期的质量安全、可控。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters e2695型高效液相色谱仪(美国Waters公司),配有二极管阵列检测器(PDA);Agilent 1260型高效液相色谱仪,Agilent 1260 – Agilent 1290 Infinity II型二维液相色谱 – G6470A型三重四极杆串联质谱仪,均购于美国Agilent公司;MS105DU型电子分析天平(精度为0.01 mg),ME204/02型电子分析天平(精度为0.1 mg),均购于Mettler – Toledo国际贸易有限公司;KQ –

500DE型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率为500 W,频率为40 kHz)。

1.2 试药

富马酸丙酚替诺福韦对照品(中国食品药品检定研究院,批号为430025 – 202101,纯度为99.40%);杂质A对照品(上海启太生物科技有限公司,批号为17092071,纯度为99.07%;Pharmace chemi Lab,批号为18 – TEN – 79 – 12,纯度为99.59%);杂质B对照品(深圳菲斯生物科技有限公司,批号为19011537,纯度为98.09%;Pharmace Chemi Lab,批号为TAF – 2018 – 09,纯度为97.21%);杂质C对照品(CATO Research Chemicals Inc.,批号为CCEM500690 – 1605,纯度为99.90%;Quality Control Chemicals Inc.,批号为08 – MAY – 18 – 03,纯度为100.00%);杂质D对照品(上海启太生物科技有限公司,批号为1154 – A31,纯度为97.62%;Quality Control Chemicals Inc.,批号为21 – OCT – 17 – 53,纯度为96.42%);杂质E对照品(上海启太生物科技有限公司,批号为18110562,纯度为94.14%;Quality Control Chemicals Inc.,批号为23 – JUL – 18 – 01,纯度为98.71%);富马酸丙酚替诺福韦片(自制,批号为20200501);甲醇为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱与质谱条件

2.1.1 有关物质测定色谱条件

色谱柱:Waters XBridge C₁₈柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:A为0.02 mol / L磷酸盐缓冲液(用1 mol / L氢氧化钾调pH至6.0) – 甲醇(95:5, V / V),B为甲醇,梯度洗脱(0 ~ 5 min时100%A, 20 ~ 25 min时60%A, 25 ~ 50 min时60%A → 25%A, 50 ~ 60 min时100%A);流速:1.0 mL / min;检测波长:260 nm;柱温:35 °C;进样量:20 μL。

2.1.2 杂质鉴定色谱与质谱条件

一维液相色谱条件:同2.1.1项下。

二维液相色谱条件:色谱柱为Agilent Zorbax Eclipse Plus C₁₈柱(50 mm × 3.0 mm, 1.8 μm);流动相

为0.1%甲酸水溶液-甲醇(55:45, V/V);流速为0.4 mL/min;柱温为35℃。

质谱条件:离子源为电喷雾离子源(ESI);正离子模式;质荷比(m/z)扫描范围为100~1000;雾化气和干燥气为氮气(N_2); N_2 压力为45 psi; N_2 流速为6 L/min;温度为350℃;碎裂电压为150 V;二级质谱碰撞裂解能量为30 eV。

2.2 溶液制备

供试品溶液:取样品细粉0.4 g(约相当于丙酚替诺福韦50 mg),精密称定,置50 mL容量瓶中,加流动相A适量,超声10 min使溶解,加流动相A定容,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

丙酚替诺福韦对照品溶液:取富马酸丙酚替诺福韦对照品28 mg(约相当于丙酚替诺福韦25 mg),精密称定,置100 mL容量瓶中,加甲醇适量,超声使溶解,加流动相A定容,摇匀,再精密量取1 mL,置50 mL容量瓶中,加流动相A定容,摇匀,即得。

灵敏度溶液:精密量取丙酚替诺福韦对照品溶液1 mL,置25 mL容量瓶中,加流动相A定容,摇匀,即得。

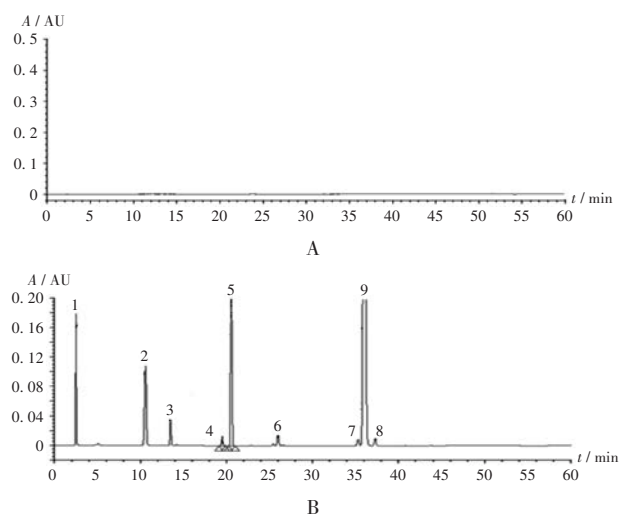
混合杂质对照品贮备液:分别取杂质A-E对照品各适量,精密称定,加少量甲醇适量,超声使溶解,加流动相A稀释制备成每1 mL中杂质A-E分别含300, 250, 200, 75, 75 μg 的溶液,即得。

系统适用性溶液:取富马酸丙酚替诺福韦56 mg,精密称定,置50 mL容量瓶中,加甲醇适量,超声使溶解,分别取杂质C及杂质D对照品各10 mg,精密称定,置20 mL容量瓶中,加甲醇适量,超声使溶解,用流动相A定容,摇匀,置同一50 mL容量瓶中,加流动相A稀释成每1 mL含1 mg丙酚替诺福韦、5 μg 杂质C和5 μg 杂质D的溶液,即得。

2.3 方法学考察

专属性试验:分别精密量取空白溶剂、2.2项下系统适用性溶液各适量,按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果空白溶剂无干扰,系统适用性溶液色谱图中出峰顺序依次为富马酸、杂质A、杂质B、杂质C、杂质D、杂质E、丙酚替诺福韦,其中杂质C与杂质D色谱峰间的分离度为3.43(>1.5)。色谱图见图1。

破坏性试验:取细粉0.4 g,精密称定,置50 mL容量瓶中,加流动相A 20 mL,超声10 min使溶解,平行6份。分别不处理;90℃水浴4 h,放至室温;加0.1 mol/L盐酸溶液2 mL,90℃水浴0.5 h,放至室温,再加0.1 mol/L氢氧化钠溶液2 mL中和;加0.1 mol/L氢氧化钠溶液2 mL,90℃水浴0.5 h,放至室温,再加0.1 mol/L盐酸溶液2 mL中和;加30%过氧化氢溶液1 mL,90℃水浴0.5 h,放冷至室温;强光照射试验箱(照度为5000 lx,



1. 富马酸 2. 杂质A 3. 杂质B 4. 杂质C 5. 杂质D
6. 杂质E 7-8. 工艺杂质 9. 丙酚替诺福韦
A. 空白溶剂 B. 系统适用性溶液

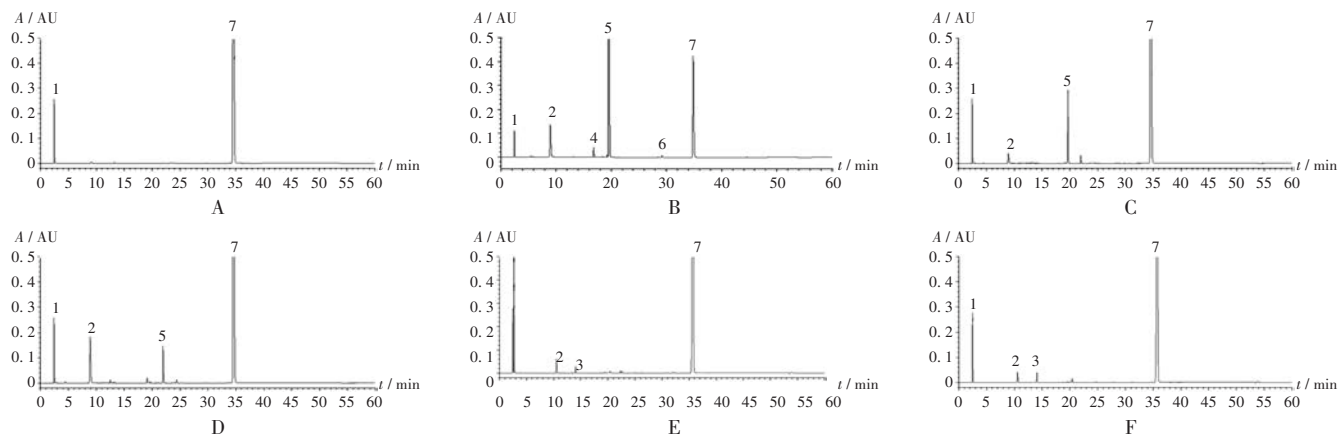
图1 系统适用性溶液高效液相色谱图

1. Fumarate 2. Impurity A 3. Impurity B 4. Impurity C
5. Impurity D 6. Impurity E 7-8. Process impurities
9. Tenofovir Alafenamide
A. Blank solution B. System suitability solution

Fig. 1 HPLC chromatograms of the system suitability solution

紫外90 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$)中放置24 h。加流动相A定容至50 mL,摇匀,滤过,分别作为未破坏、湿热破坏、酸破坏、碱破坏、氧化破坏及光照破坏溶液,按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果显示,湿热破坏、碱破坏条件下,主要产生杂质A和杂质D;酸破坏条件下,主要产生杂质D;氧化破坏条件下,主要产生杂质A;光照破坏条件下,主要产生杂质A和杂质B;各破坏条件下降解杂质与已知杂质及主峰间的分离度均符合要求,各破坏条件下主峰纯度均符合要求,表明主峰无杂质包裹;各破坏试验物料守恒值为0.97~1.03,物料守恒,表明无杂质漏检,方法专属性较好。色谱图见图2。

线性关系考察:分别取富马酸丙酚替诺福韦对照品28 mg、杂质A-E对照品10 mg,精密称定,分别置100 mL、10 mL容量瓶中,加少量甲醇,超声使溶解,用流动相A溶解并定容,摇匀,作为贮备液。分别精密量取各贮备液适量,加流动相A逐级稀释为丙酚替诺福韦(质量浓度分别0.20, 0.51, 5.09, 10.18, 49.55, 198.18, 990.92 $\mu\text{g}/\text{mL}$)及杂质(杂质A质量浓度分别0.04, 0.80, 4.00, 8.00, 16.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$;杂质B质量浓度分别0.13, 2.55, 12.75, 25.50, 50.99 $\mu\text{g}/\text{mL}$;杂质C质量浓度分别0.11, 2.25, 11.25, 22.50, 45.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$;杂质D质量浓度分别0.04, 0.80, 4.00, 8.00, 16.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$;杂质E质量浓度分别0.04, 0.72, 3.59, 7.17, 14.34 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的系列标准溶液,按2.1.1项下色谱条件进样测定,以



1. 富马酸 2. 杂质A 3. 杂质B 4. 未知杂质1 5. 杂质D 6. 未知杂质2 7. 丙酚替诺福韦
A. 未破坏 B. 湿热破坏 C. 酸破坏 D. 碱破坏 E. 氧化破坏 F. 光照破坏

图2 破坏性试验高效液相色谱图

1. Fumarate 2. Impurity A 3. Impurity B 4. Unknown impurity 1 5. Impurity D 6. Unknown impurity 2 7. Tenofvir Alafenamide
A. Not damaged B. Hygrothermal damage C. Acid damage D. Alkali damage E. Oxidative damage F. Light damage

Fig. 2 HPLC chromatograms of the destructive test

待测成分的质量浓度($X, \mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,结果见表1,表明丙酚替诺福韦及杂质A-E在各自线性范围内与峰面积线性关系良好。

表1 线性关系考察结果

Tab. 1 Results of the linear relation test

成分	线性范围($\mu\text{g}/\text{mL}$)	回归方程	r
丙酚替诺福韦	0.20~990.92	$Y = 32\,591X + 66\,004.00$	0.9999
杂质A	0.04~16.00	$Y = 56\,344X + 1\,915.20$	1.0000
杂质B	0.13~50.99	$Y = 47\,188X + 593.41$	1.0000
杂质C	0.11~45.00	$Y = 10\,650X + 191.39$	1.0000
杂质D	0.04~16.00	$Y = 42\,123X + 123.04$	1.0000
杂质E	0.04~14.34	$Y = 37\,418X + 745.42$	1.0000

杂质校正因子考察:以回归方程中丙酚替诺福韦的斜率除以杂质的斜率作为杂质的相对校正因子(f),杂质A-E的 f 分别为0.58,0.69,3.06,0.77,0.87。分别采用不同型号(Waters e2695型及Agilent1260型)液相色谱仪、不同型号(Waters XBridge C_{18} 柱、Waters Xterra C_{18} 柱)色谱柱、柱温($\pm 5^\circ\text{C}$),以及不同来源对照品,进行线性回归,并计算杂质校正因子。结果杂质A-E的校正因子平均值分别为0.61,0.70,3.16,0.75,0.85, RSD 分别为2.87%,2.50%,1.71%,2.50%,2.67%。

检测限与定量限确定:取线性关系考察项下标准溶液逐步稀释,按2.1.1项下色谱条件进样测定,分别以信噪比(S/N)为3和10时待测成分的含量为检测限和定量限。结果丙酚替诺福韦及杂质A-E的检测限分别为0.2,0.2,1.0,1.0,0.4,0.4 ng,定量限分别为0.4,0.4,2.0,2.0,0.8,0.8 ng。取定量限溶液连续进样测定6次,结果峰面积的 RSD 分别为0.81%,1.64%,0.22%,2.55%,0.49%,1.69%($n=6$)。

精密度试验:取丙酚替诺福韦对照品溶液适量,按2.1.1项下色谱条件连续进样测定6次,记录色谱图。结果丙酚替诺福韦峰面积的 RSD 为0.14%($n=6$),表明仪器精密度良好。

重复性试验:按2.2项下方法平行制备供试品溶液6份,取适量,按2.1.1项下色谱条件进样测定,按加校正因子的主成分对照品法以峰面积计算含量。结果杂质A-E和总杂质含量的 RSD 分别为1.68%,4.64%,0.57%,0.85%,0.49%,3.16%($n=6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取2.2项下丙酚替诺福韦对照品溶液及供试品溶液各适量,分别于室温放置0,2,4,8,12,24 h按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果的 RSD 为0.90%($n=6$),表明丙酚替诺福韦对照品溶液在室温下放置24 h内稳定性良好,供试品溶液室温放置4 h内基本稳定(8 h时杂质D及总杂质略有增长,杂质含量最大变化率分别为0.03%和0.13%)。另取2.2项下供试品溶液适量,分别于2~8 $^\circ\text{C}$ 放置0,2,4,8,12 h按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果各单个杂质及总杂质含量最大变化率分别为0.04%和0.08%,表明供试品溶液在2~8 $^\circ\text{C}$ 控温条件放置12 h内稳定性良好。

加样回收试验:取本品细粉约0.4 g,精密称定,按2.2项下方法制备供试品溶液,分别精密量取混合杂质对照品贮备液各1,2,3 mL,加流动相A稀释并定容,摇匀,滤过,分别作为相对各杂质限度浓度50%,100%,150%的加样回收试验溶液,每个浓度各平行制备3份。按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图,按加校正因子的主成分对照品法以峰面积计算各杂质含量,将理论值与测得值比较,并计算加样回收率。结果杂质

A-E的平均回收率分别为100.20%, 95.23%, 102.36%, 94.48%, 97.26%, RSD分别为0.50%, 0.23%, 0.89%, 1.02%, 1.67% ($n=9$), 表明方法准确度较好。

耐用性试验:取2.2项下系统适用性溶液、灵敏度溶液、丙酚替诺福韦对照品溶液及供试品溶液各适量,按2.1.1项下条件分别进样测定,以系统适用性溶液中杂质C与杂质D的分离度、灵敏度溶液S/N及杂质含量为指标,考察柱温($\pm 5^\circ\text{C}$)、流速($\pm 0.2\text{ mL/min}$)、流动相pH(± 0.2)、不同型号色谱柱对试验结果的影响。结果各项指标的测定结果均无显著差异,表明方法耐用性良好。详见表2。

表2 耐用性试验结果

Tab. 2 Results of the durability test

影响因素	分离度 (R)	S/N	含量(%)					总杂质
			杂质A	杂质B	杂质C	杂质D	杂质E	
标准条件	1.96	55.7	0.09	0.05	-	-	-	0.17
流速	0.8 mL/min	2.01	40.9	0.09	0.05	-	-	0.18
	1.2 mL/min	1.86	39.1	0.09	0.05	-	-	0.19
柱温	30 °C	1.85	78.2	0.09	0.05	-	-	0.21
	40 °C	1.92	61.4	0.09	0.05	-	-	0.19
pH	5.8	1.95	55.2	0.09	0.05	-	-	0.21
	6.2	1.84	38.8	0.09	0.05	-	-	0.21
不同型号色谱柱	1.75	27.2	0.09	0.05	-	-	0.19	
\bar{X}	*	49.6	0.09	0.05	-	-	0.20	
与标准条件相比含量绝对变化(%)	*	*	0	0	0	0	0	0.04

注:*为不涉及;-为未检测到。

Note:* refers to not involved;- refers to not detected.

2.4 湿热降解杂质鉴定

由图2 B可知,湿热破坏条件下产生了未知杂质1和2。取2.2项下湿热破坏溶液,按2.1.2项下色谱与质谱条件进样分析,依据在一级质谱图中准分子离子峰[M+H]⁺确定成分的分子式,并进一步依据二级质谱中相关信息,鉴定出杂质的结构,结果未知杂质1和2在正离子模式下的准分子离子峰[M+H]⁺为m/z 688.3, 801.4, 确定其分子式分别为C₂₇H₃₈N₅O₁₄P, C₃₃H₄₉N₆O₁₅P,这2种成分分别较杂质D、丙酚替诺福韦多了相同的m/z 325,在二级质谱中分别可见碎片离子m/z 364.6(杂质D准分子离子峰)和m/z 477.5(丙酚替诺福韦准分子离子峰),推测未知杂质1和2的准分子离子峰分别为[杂质D+342-18+H]⁺和[丙酚替诺福韦+342-18+H]⁺,而分子量342的化合物为乳糖,故分析未知杂质1和2分别为杂质D乳糖加合物及丙酚替诺福韦乳糖加合物(见表3)。以未知杂质2为例,其裂解途径见图3。

2.5 多剂量包装制剂使用期间稳定性有关物质测定

为研究包装对产品质量的影响,按拟订有关物质

表3 湿热降解杂质结构及特征质谱数据

Tab. 3 Chemical structures and MS / MS data of the hydrothermal degradation impurities

未知杂质	保留时间(min)	分子式	[M+H] ⁺	特征碎片离子	成分鉴定
1	16.853	C ₂₇ H ₃₈ N ₅ O ₁₄ P	688.3	364.6, 406.5, 508.6	杂质D乳糖加合物
2	30.347	C ₃₃ H ₄₉ N ₆ O ₁₅ P	801.4	477.5, 519.4, 621.7	丙酚替诺福韦乳糖加合物

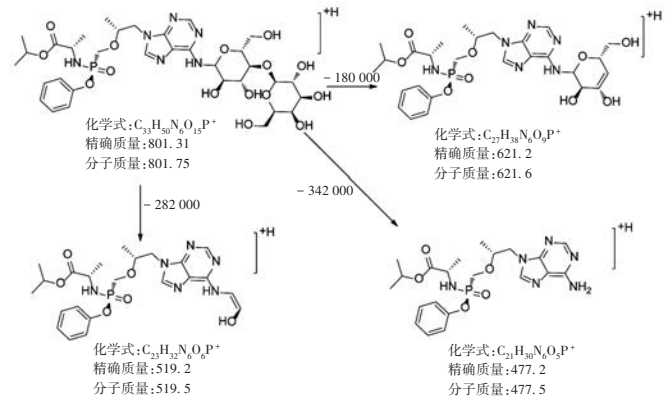


图3 未知杂质2的结构及质谱裂解途径

Fig. 3 Structures and mass spectrometry deavage pathway of unknown impurity 2

检查方法考察了不同包装(不含干燥剂,每袋含0.5 g药用固体纸袋装硅胶干燥剂,每袋含1.0 g药用固体纸袋装硅胶干燥剂)口服固体药用高密度聚乙烯瓶装样品在拟订储存条件下使用期间的稳定性,在温度30 °C、相对湿度65%长期存放环境下模拟药品实际服用的操作,分别于0, 10, 30, 40 d时测定有关物质的变化情况。结果显示,不加干燥剂的包装形式受空气中水分的影响,导致降解杂质A, B, C的含量增加;每袋含1.0 g干燥剂的包装形式最优,可确保使用过程中产品的质量稳定。详见表4。

表4 不同包装制剂使用期间的稳定性试验结果

Tab. 4 Results of in-use stability test of preparations with different packaging

包装形式	放置时间 (d)	含量(%)					
		杂质A	杂质B	杂质C	杂质D	杂质E	总杂质
不含干燥剂	0	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	0.09
	15	0.26	0.12	0.08	<0.05	<0.05	0.52
	30	0.59	0.42	0.33	<0.05	<0.05	0.52
	40	0.68	0.56	0.24	<0.05	<0.05	1.54
每袋含0.5 g干燥剂	0	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	0.09
	15	0.13	0.06	0.05	<0.05	<0.05	0.27
	30	0.23	0.10	0.10	<0.05	<0.05	0.49
	40	0.37	0.23	0.15	<0.05	<0.05	0.89
每袋含1.0 g干燥剂	0	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	<0.05	0.09
	15	0.08	<0.05	0.06	<0.05	<0.05	0.19
	30	0.15	0.08	0.09	<0.05	<0.05	0.35
	40	0.19	0.10	0.12	<0.05	<0.05	0.46

3 讨论

3.1 色谱条件、系统适用性要求及定量方法选择

富马酸丙酚替诺福韦的酸解常数(pKa)值为3.9,考虑其在酸碱体系下稳定性较差,故采用pH 6.0的磷酸缓冲盐-甲醇作为流动相体系,梯度洗脱。在此条件下,丙酚替诺福韦与杂质A-E均能良好分离,且不受该品种工艺杂质的干扰。其中,杂质C与杂质D为最难分离杂质对,为主要降解杂质,且2种杂质的 f 分别为3.16和0.75,差异较大,若两者分离不佳,易影响杂质含量结果的准确性。故将杂质C与杂质D色谱峰的分离度作为系统适用性评价指标,确保杂质定量结果的准确性。通过采用不同型号液相色谱仪、不同型号色谱柱、色谱条件微调(柱温 $\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$),以及不同来源对照品对各杂质校正因子进行研究,结果杂质A-E校正因子平均值分别为0.61, 0.70, 3.16, 0.75, 0.85,均超出0.9~1.1范围。故最终拟订采用加校正因子的主成分对照品法进行定量研究。与杂质外标法相比,检测结果无明显差异,但可有效节省杂质对照品。

3.2 破坏条件选择

各破坏试验条件通过多次探索试验获得,一般降解5%~20%较合适,需避免二次降解^[13-14],同时结合降解杂质个数综合确定合适的降解条件。以酸破坏为例,分别采用0.01 mol/L盐酸溶液2 mL室温放置10, 30 min,结果降解总杂质分别为0.31%和0.43%,降解较少,故增加盐酸溶液浓度及延长放置时间;采用0.1 mol/L盐酸溶液2 mL室温放置1.5 h,结果降解总杂质为1.02%,降解强度不符合预期;为获得合适的降解条件,采用0.1 mol/L盐酸溶液2 mL于90 $^{\circ}\text{C}$ 水浴0.5 h,降解总杂质为6.91%,符合预期,故最终拟订酸破坏试验条件。同法最终确定碱破坏、氧化破坏、湿热破坏及光照破坏试验条件。

3.3 多剂量药品包装形式的影响

由湿热降解杂质成分结构鉴定结果可知,原料药富马酸丙酚替诺福韦中磷酸酯键极易水解,从而产生杂质D。在湿热条件下,杂质D及丙酚替诺福韦结构中的伯胺基团与辅料中的还原性乳糖发生美拉德反应,从而产生乳糖加合物杂质,这与文献^[15-16]的研究结果相似,提示在富马酸丙酚替诺福韦片的制剂工艺及储存过程中需控制好温度和相对湿度,从而可减少相应杂质的产生。采用不加干燥剂的多剂量包装形式模拟药品使用期间的稳定性时,因受空气中水分影响,杂质A,B,C降解明显,不利于安全用药,提示该产品包装材料及包装形式的选择应重点关注防潮及除湿功能,可采用含硅胶干燥剂的口服固体药用高密度聚乙烯瓶作为包装材料。

3.4 方法评价

本研究中建立的方法专属性强、灵敏度好、准确度

高,可快速鉴别丙酚替诺福韦乳糖加合物类杂质,可用于富马酸丙酚替诺福韦片的质量控制。

参考文献

- [1] 张文娟,张静洁,郑志兵. 乙肝治疗新药——替诺福韦艾拉酚胺半富马酸[J]. 临床药物治疗杂志,2017,15(3):10-13.
- [2] 顾琳,陶春蕾,杨亚楠. LC-MS/MS法测定人血浆中丙酚替诺福韦和替诺福韦的质量浓度[J]. 沈阳药科大学学报,2021,38(2):133-140.
- [3] 黄大卫,贾洪达. 富马酸丙酚替诺福韦关键中间体的合成研究[J]. 山东化工,2020,49(5):56-61.
- [4] 王素娜,连建奇,贾战生,等. 富马酸丙酚替诺福韦治疗慢性乙型肝炎的研究现状[J]. 临床肝胆病杂志,2019,35(8):1828-1833.
- [5] 韩抒真,胡菲菲,林丽娅,等. HPLC法检测富马酸丙酚替诺福韦中的有关物质[J]. 中国医药工业杂志,2021,52(6):836-841.
- [6] 王柳,田晓彤,路愫楠,等. 替代对照品法测定奥硝唑注射液中的3种已知杂质[J]. 华西药学杂志,2022,37(4):435-439.
- [7] 胡泽锴,罗媛. HPLC加校正因子的主成分自身对照法测定咪塞米片中有关物质的含量[J]. 药物分析杂志,2022,42(8):1433-1439.
- [8] 王玲兰,龚翠云,朱跃芳,等. 高效液相色谱法同时测定富马酸伏诺拉生中活性成分含量及成盐率研究[J]. 中国药业,2023,32(11):63-66.
- [9] 黄朝瑜,陈民辉. 二维液相-离子阱-飞行时间质谱法对咪达唑仑注射液中有关注物质的初探与结构解析[J]. 药物分析杂志,2017,37(4):688-694.
- [10] 舒展,王铮帅,应斌斌,等. 高效液相色谱-高分辨四极杆-飞行时间质谱法测定中成药中非法添加物二乙氨基前他达拉非[J]. 中国药业,2023,32(15):67-70.
- [11] 陈海峰. 药物使用期间稳定性试验的技术要求探讨[J]. 新药申报与审评技术,2010,19(3):184-189.
- [12] EMA. Note for Guidance on In-use Stability Testing of Human Medicinal Products[EB/OL]. (2001-03-01)[2023-10-10]. https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/note-guidance-use-stability-testing-human-medicinal-products_en.pdf.
- [13] 马俊威,刘娟,刘永辉,等. 强制降解试验在药物研发中的应用[J]. 中国现代应用药学,2020,37(14):1778-1782.
- [14] 郭涤亮. 浅谈化学药物强制降解试验的设计与开展[J]. 新药注册与审评技术,2010,28(20):2468-2472.
- [15] LAI XH, CHEN X, LI M, et al. Purification and mass spectrometry study of Maillard reaction impurities in five acyclic nucleoside antiviral drugs[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2022(212):114637.
- [16] ASMAA A, EL-ZAHER. Synthesis and Characterization of Maillard Reaction Products of Salbutamol and Terbutaline with Lactose and Development and Validation of an LC Method for the Determination of Salbutamol and Terbutaline in the Presence of These Impurities[J]. Analytical Chemistry Insights, 2014,9:1-7.

(收稿日期:2023-04-19;修回日期:2023-10-28)