

LC-MS 法鉴定艾滋病治疗药物去羟肌苷的有关物质^{*}

杜明苹, 连莹, 张军霞, 陈炜, 仲平^{**}

(河南省食品药品检验所, 郑州 450003)

摘要 目的: 采用高效液相色谱-质谱联用技术鉴定艾滋病治疗药物去羟肌苷的有关物质结构。**方法:** InertSurstain C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以 0.386% 醋酸铵溶液加氨水调节 pH 至 8.0 为流动相 A, 以甲醇-乙腈 (50:50) 为流动相 B, 进行梯度洗脱, 电喷雾正离子化高分辨 TOF/MS 和 MS/MS 检测并解析有关物质结构。TOF/MS 雾化气压力 345 kPa, 温度 350 °C, 干燥气流量 10 L · min⁻¹, 毛细管电压 4 kV, 碎片电压 100 V, MS/MS 测定氩气 CID 压力 0.2 Pa, 碰撞能量 25 eV。**结果:** 检测到去羟肌苷原料中共有 8 个有关物质, 通过有机反应机制分析和质谱解析鉴定了他们的结构, 他们分别是 9-(2-氧基-丁酸)-1, 4, 5, 7, 8, 9-六氢-嘌呤-6-酮、次黄嘌呤、肌苷、2'-去氧肌苷、9-(2-羟基-乙酰基)-1, 9-双氢-嘌呤-6-酮、3'-去氧肌苷、2', 3'-脱水肌苷、9-(2-羟乙基-4-丙酸甲酯-四氢咪唑)-1, 9-双氢-6H-嘌呤-6-酮。**结论:** 采用色谱-质谱联用技术能有效地鉴定去羟肌苷的有关物质, 可为其质量控制研究提供参考。

关键词: 艾滋病治疗药物; 嘌呤核苷类药物; 去羟肌苷; 杂质鉴定; 9-(2-氧基-丁酸)-1, 4, 5, 7, 8, 9-六氢-嘌呤-6-酮; 次黄嘌呤; 肌苷; 2'-去氧肌苷; 9-(2-羟基-乙酰基)-1, 9-双氢-嘌呤-6-酮; 3'-去氧肌苷; 2', 3'-脱水肌苷; 9-(2-羟乙基-4-丙酸甲酯-四氢咪唑)-1, 9-双氢-6H-嘌呤-6-酮; 液相色谱-质谱

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2017)11-1986-08

doi: 10.16155/j.0254-1793.2017.11.10

LC-MS identification of the degradation products of didanosine^{*}

DU Ming-luo, LIAN Ying, ZHANG Jun-xia, CHEN Wei, ZHONG Ping^{**}

(Henan Institute for Food and Drug Control, Zhengzhou 450003, China)

Abstract Objective: To identify the related substances of didanosine by hyphenated LC-MS methods. **Methods:** The separation was carried out on InertSurstain C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisting of 0.386% ammonium acetate solution (adjust pH=8.0 by ammonia water solution) and methanol-acetonitrile (50:50) by gradient elution. The related substances were detected by positive ESI high resolution TOF/MS and their MS/MS spectra were determined as well. The conditions of TOF/MS were as follows: nebulizer pressure 345 kPa, gas temperature 350 °C, drying gas flow 10 L · min⁻¹, capillary voltage 4 kV and fragmentor 100 V. The argon collision

* 全球基金资助项目 (No.GF2012-14)

** 通信作者 Tel:(0371)65566054; E-mail: zhongp3@126.com

第一作者 Tel:(0371)65566054; E-mail: philipdu@163.com

gas pressure of MS/MS was set at 0.2 Pa, and the collision energy at 25 eV. **Results:** There were 8 related substances in didanosine and their chemical structures were determined through the elucidation of their accurate TOF/MS data, the corresponding product MS spectra and further validated with the organic reaction mechanisms. The impurities were identified as 9-(2-oxo-4-butiric acid)-1,4,5,7,8,9-hexahydro-purin-6-amine, hypoxanthine, inosine, 2'-deoxyinosine, 9-(2-hydroxy-acetyl)-1,9-dihydrogen-purin-6-amine, 3'-deoxyinosine, 2',3'-anhydroinosine, 9-(2-ethoxy-4-methyl propionate-tetrahydrofuran)-1,9-dihydrogen-6H-purin-6-amine. **Conclusion:** The LC-MS method is useful for the identification of related substances in pharmaceuticals. The related substances found in didanosine are valuable for its quality control.

Keywords: anti-HIV therapeutic preparation; purine nucleoside drug; didanosine; identification of impurities; 9-(2-oxo-4-butiric acid)-1,4,5,7,8,9-hexahydro-purin-6-amine; hypoxanthine; inosine; 2'-deoxyinosine; 9-(2-hydroxy-acetyl)-1,9-dihydrogen-purin-6-amine; 3'-deoxyinosine; 2',3'-anhydroinosine; 9-(2-ethoxy-4-methyl propionate-tetrahydrofuran)-1,9-dihydrogen-6H-purin-6-amine; LC-MS

去羟肌苷(didanosine, 2',3'-双脱氧肌苷, 见图1)是一种嘌呤核苷类逆转录酶抑制剂,竞争性地抑制逆转录病毒对自然底物三磷酸双脱氧腺苷作用,中止DNA链的延长,从而阻碍HIV病毒的复制增殖。临床上主要用于治疗齐多夫定(AZT)不耐受、无效或无症状HIV感染的艾滋病患者^[1-7]。合成工艺以肌苷为起始原料,经过溴化反应、消除反应、氢化反应得到去羟肌苷,其有关物质的分析鉴定研究尚未见报道。

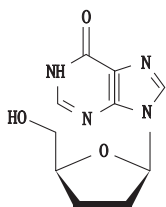


图1 去羟肌苷结构

Fig. 1 Chemical structure of didanosine

本文采用液相-质谱联用技术对其有关物质进行进行鉴定研究,并进行强制破坏试验。去羟肌苷在酸破坏条件下不稳定,主要破坏产物为次黄嘌呤,在碱、光照及高温条件下较为稳定^[8-9],对原料中8个主要有关物质进行了结构鉴定^[10-14],其中3个有关物质并未见报道,可为其质量控制提供参考依据。

1 仪器与试剂

Shimadzu LC2010液相色谱仪,LC Solution工作站;Agilent 1260 Infinity液相色谱-6224飞行时间质谱仪,MassHunter工作站;ThermoFinnigan TSQ Quantum Ultra AM型LC-MS/MS联用仪;Xcalibur工

作站。Sartorius BS21S电子天平。去羟肌苷对照品(批号:14703-200401,含量99.7%),次黄嘌呤(杂质A,批号:140661-200903,含量99.5%),肌苷(杂质B,批号:140669-201104,含量100%)均购自中国食品药品检定研究院;2'-去氧肌苷(杂质C,批号:D239755,含量98%),3'-去氧肌苷(杂质D,批号:D239760,含量98%),2',3'-脱水肌苷(杂质E,批号:A648370,含量97%)均购自Toronto Research Chemicals公司;2',3'-二去氧-2',3'二去氢肌苷(杂质F,批号:RGT8936,含量99%)购自深圳市瑞吉特生物科技有限公司;系统适用性试验对照品(批号:69655-05-6,含去羟肌苷98.4%,杂质A 0.5%,杂质B 0.2%,杂质C 0.3%,杂质D 0.2%,杂质E 0.2%,杂质F 0.2%,USP对照品);去羟肌苷原料(批号:20121001、20121002、20121003)由河南天方药业股份有限公司提供;甲醇和乙腈为色谱纯,实验用水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

参照ChP2015选择如下色谱条件^[12]。InertSustain C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm;填料:十八烷基硅烷键合硅胶)色谱柱,以0.386%醋酸铵溶液加氨水调节pH至8.0为流动相A,以乙腈-甲醇(50:50)为流动相B,进行线性梯度洗脱(A-B) 0 min(92:8) → 15 min(92:8) → 30 min(70:30) → 45 min(70:30) → 50 min(92:8) → 60 min(92:8),检测波长254 nm,进样体积20 μL,柱温25℃。

2.2 质谱条件

TOF/MS 质谱条件: Dual ESI 正离子扫描, 雾化气压力 350 kPa, 温度 350 °C, 干燥气流量 10 L · min⁻¹, 毛细管电压 4 kV, 碎片电压 100 V, 参比离子 *m/z* 121.050 8 和 922.009 7, 质量数扫描范围 *m/z* 100~1200。

MS/MS 质谱条件: 喷雾电压 5 kV, 雾化气压 310 kPa, 辅助气压力 35 kPa, 毛细管温度 350 °C, 二级质谱扫描碰撞氦气压力 0.20 Pa, 碰撞能量 25 eV。

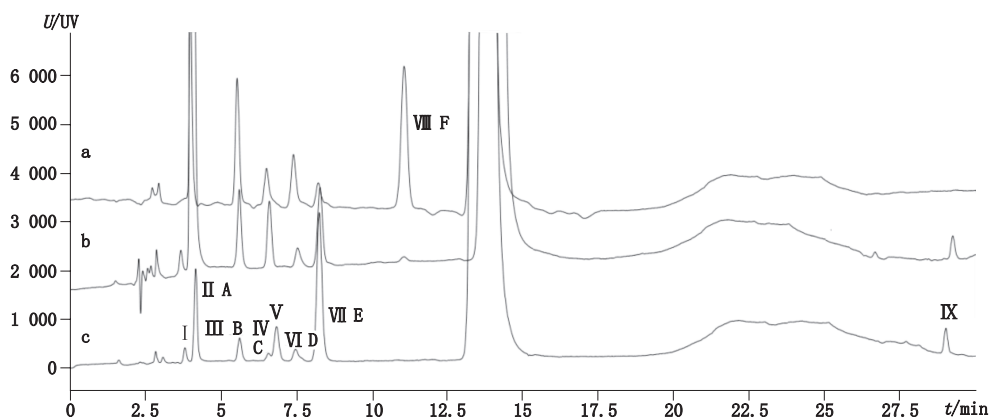
2.3 系统适用性试验

精密称取系统适用性试验对照品适量, 加稀释液 (流动相 A-B=90:10) 溶解并定量稀释制成含去羟肌苷 0.5 mg · mL⁻¹ 的溶液, 按 ‘2.1’ 色谱条件, 精密量取 20 μL 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 见图 2-a。

测得理论板数按去羟肌苷峰计算为 6 589, 杂质 C 峰与杂质 D 峰间的分离度为 3.8。

2.4 有关物质检查

精密称取去羟肌苷原料 25 mg, 置 50 mL 量瓶中, 用稀释液溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。按照 “2.1” 项色谱条件进行试验 HPLC-UV 色谱图中共显示有 8 个主要有关物质峰 (杂质编号为 I ~ VIII), 见图 2-c。由于去羟肌苷在强碱、高温、和光照条件下较稳定, 在酸性条件下降解产物较多^[5], 酸破坏溶液色谱图, 见图 2-b。结果显示去羟肌苷有关物质 II、III、IV、VIII 可能为降解杂质, 有关物质 I、V、VII、IX 可能由生产过程中代入。有关物质 II、III、IV、VI、VII 的液相色谱相对保留时间与 USP 系统适用性溶液中杂质 A~E 的相对保留时间一致, 杂质 F 未检出, 结果见表 1~2。



I ~ VII . 杂质峰编号 (No.of impurity peaks) A~F. 杂质 A~F (impurities A~F)

图 2 系统适用性 (a)、酸破坏溶液 (b) 和原料 (c) 有关物质检查色谱图

Fig.2. Chromatograms for related substances of system suitability solution (a), acid stress solution (b) and didanosine (c)

表 1 去羟肌苷有关物质的 ESI-TOF/MS 高分辨测定结果

Tab.1 Accurate mass results of the related substances of didanosine by ESI high resolution TOF/MS

No.	RRT	检测值 (experimental mass)	理论值 (theoretical mass)	生成分子式 (proposed molecular formula)	No.	RRT	检测值 (experimental mass)	理论值 (theoretical mass)	生成分子式 (proposed molecular formula)
I	0.28	240.088 1	240.085 9	C ₉ H ₁₂ N ₄ O ₄	VI (D)	0.55	252.085 7	252.085 9	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₄
II (A)	0.31	136.039 6	136.038 5	C ₅ H ₄ N ₄ O	VII (E)	0.61	250.072 7	250.070 2	C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O ₄
III (B)	0.41	268.080 8	268.081 5	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₅	VIII (F)	0.81	234.078 1	234.075 3	C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O ₃
IV (C)	0.48	252.084 1	252.085 9	C ₁₀ H ₁₂ N ₄ O ₄	IX	2.13	336.144 2	336.143 4	C ₁₅ H ₂₀ N ₄ O ₅
V	0.50	194.043 5	194.044 0	C ₇ H ₆ N ₄ O ₃					

表 2 去羟肌苷有关物质 MS/MS 二级碎片

Tab. 2 The MS/MS fragments of the related substances of didanosine

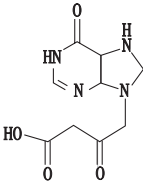
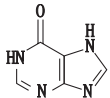
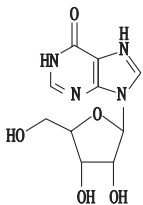
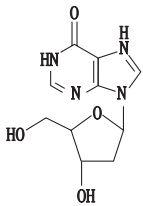
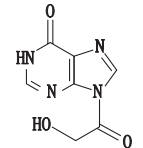
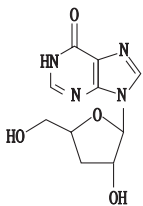
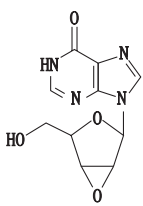
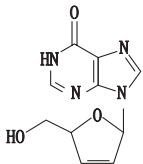
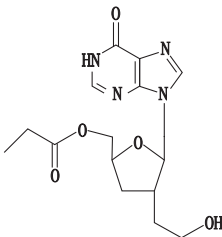
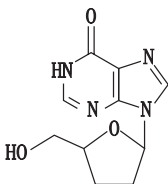
编号 (No.)	[M+H] ⁺ (m/z)	碎片离子 (product ions)(m/z)	化学结构 (chemical structure)	命名 (name)
I	241	177, 159, 140, 99		9-(2-氧基-丁酸)-1,4,5,7,8,9-六氢-嘌呤-6-酮 [9-(2-oxo-4-butiric acid)-1,4,5,7,8,9-hexahydro-purin-6-amine]
II (A)	137	119, 95		次黄嘌呤 (hypoxanthine)
III (B)	269	165, 137		肌苷 (inosine)
IV (C)	253	217, 137		2'-去氧肌苷 (2'-deoxyinosine)
V	195	177, 163, 149, 137		9-(2-羟基-乙酰基)-1,9-双氢-嘌呤-6-酮 [9-(2-hydroxy-acetyl)-1,9-dihydrogen-purin-6-amine]
VI (D)	253	217, 183		3'-去氧肌苷 (3'-deoxyinosine)
VII (E)	251	233, 219, 137		2',3'-脱水肌苷 (2',3'-anhydroinosine)
VIII (F)	235	217, 143		2',3'-二去氧-2',3'-二去氧肌苷 [2',3'-dideoxy-2',3'-dideoxyinosine]

表 2(续)

编号 (No.)	$[M+H]^+/(m/z)$	碎片离子 (product ions)/(m/z)	化学结构 (chemical structure)	命名 (name)
IX	337	263, 203, 183, 137		9-(2-羟基-4-丙酸甲酯-四氢呋喃)-1,9-双氢-6H-嘌呤-6-酮 [9-(2-ethoxy-4-methyl propionate-tetrahydrofuran)-1,9-dihydrogen-6H-purin-6-amine]
去羟肌苷 (didanosine)	237	219, 137		去羟肌苷 (didanosine)

2.5 有关物质结构鉴定

2.5.1 LC-TOF/MS 测定 按“2.1”、“2.2”项所述条件,对去羟肌苷有关物质进行 ESI 高分辨 TOF/MS 检测,测定各有关物质的精确离子质量,设置杂质组成为 C、H、O、N 并通过 Mass Hunter 软件匹配计算其离子式,质量偏差均小于 3×10^{-6} 。

结果显示去羟肌苷有关物质 II、III、IV、VI、VII 的精密质量及相对保留时间与已知杂质 A~E 一致,结果见表 1。

2.5.2 有关物质 MS/MS 结构鉴定 按“2.2”所述质谱条件,测得去羟肌苷有关物质 II、III、IV、VI、VII 二级质谱碎片与杂质 A~E 的二级质谱碎片一致,结合相对保留时间和 TOF/MS 测定的结果,推测去羟肌苷原料中含有 5 个已知杂质和 3 个未知杂质,MS/MS 主要碎片离子见表 2。3 个未知杂质二级质谱图见图 3。去羟肌苷裂解途径见图 5-a,已知杂质 A~F 裂解途径见图 5-b~g。

有关物质 I 为未知杂质,其准确分子量为 240.088 1,通过 TOF/MS 得到的分子式为 $C_9H_{12}N_4O_4$,主要特征碎片离子为 m/z 177、 m/z 159、 m/z 140 与 m/z 99,见图 3-a。杂质可能是生产过程中带入, m/z 177 为母离子脱去一分子 H_2O (18 amu) 和一分子 $HCOOH$ (46 amu), m/z 159 为 m/z 177 脱去一分子 H_2O (18 amu), m/z 140 为母离子开环后脱去一分子 $HCOOH$ (46 amu)、一分子 CO (28

amu) 和一分子 HCN (17 amu) 得到, m/z 99 为母离子开环后得到。有关物质 II 可能为 9-(2-氧基-丁酸)-1,4,5,7,8,9-六氢-嘌呤-6-酮,裂解途径见图 4-h。

有关物质 V 为未知杂质,其准确分子量为 194.043 5,通过 TOF/MS 的到的分子式为 $C_7H_6N_4O_3$,主要特征碎片离子为 m/z 177、 m/z 163、 m/z 149 与 m/z 137,见图 4-b。 m/z 177 为母离子脱去一分子 H_2O (18 amu), m/z 149 为 m/z 177 脱去一分子 CO (28 amu), m/z 163 为母离子脱去一分子 CH_3OH (32 amu), m/z 137 说明母离子与次黄嘌呤有相同的结构。有关物质 V 可能为 9-(2-羟基-乙酰基)-1,9-双氢-嘌呤-6-酮,裂解途径见图 4。

有关物质 IX 为未知杂质,其准确分子量为 336.144 2,通过 TOF/MS 的到的分子式为 $C_{15}H_{20}N_4O_5$,主要特征碎片离子为 m/z 263、 m/z 203、 m/z 183、 m/z 137 与 m/z 101,见图 3-c。 m/z 263 为母离子脱去一分子 CH_3CH_2COOH (74 amu), m/z 203 为母离子脱去 CH_3CH_2OH (46 amu) 和一分子 $CH_3CH_2COOCH_3$ (88 amu), m/z 183 为母离子脱去一分子 H_2O (18) 及次黄嘌呤 (136 amu), m/z 137 说明母离子与次黄嘌呤有相同的结构,通过去羟肌苷原料的合成路线,与碎片离子的质荷比,有关物质 IX 的可能为 9-(3-乙氧基-4-丙酸甲酯-四氢呋喃)-1,9-双氢-6H-嘌呤-6-酮,裂解途径见图 5。

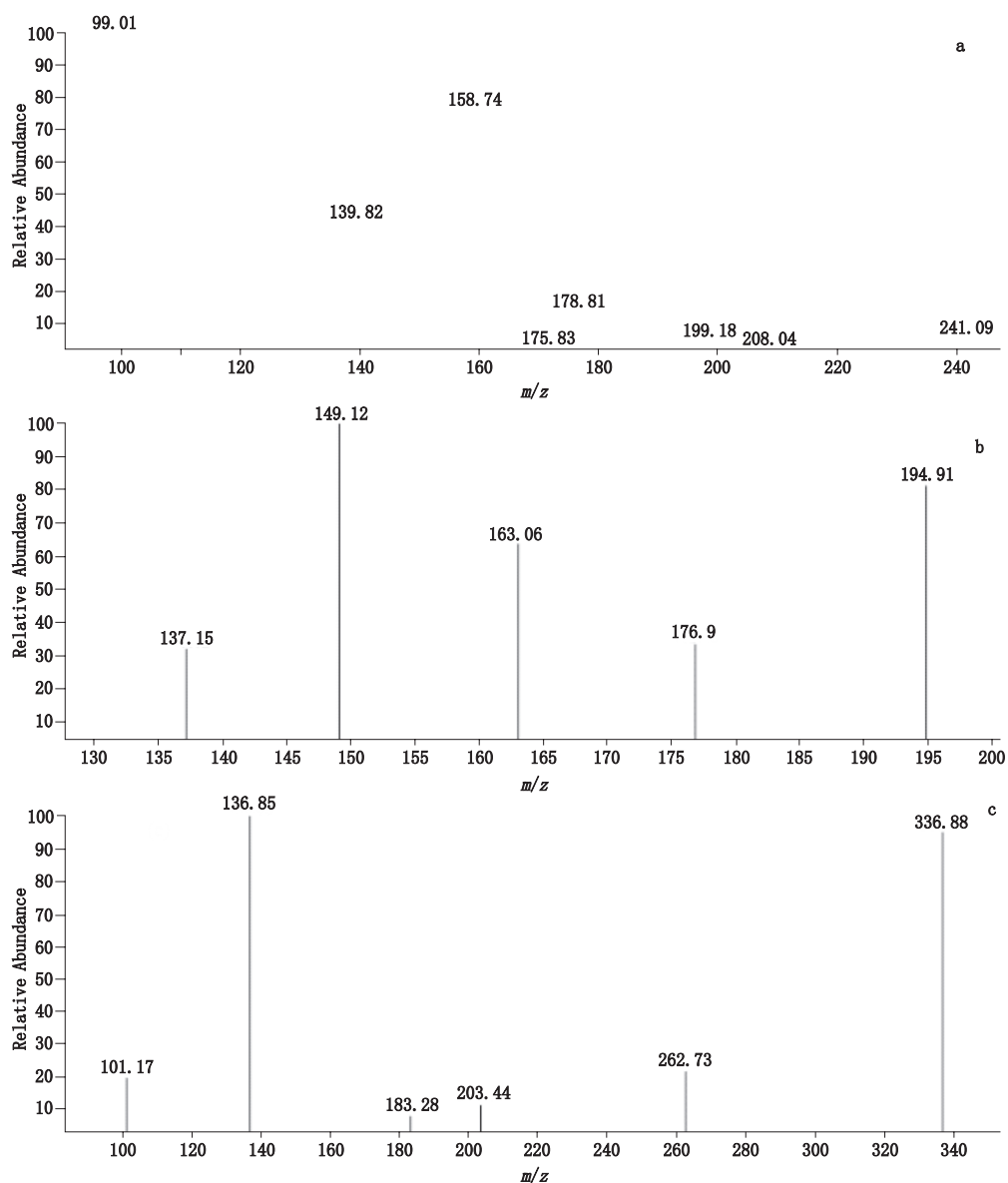
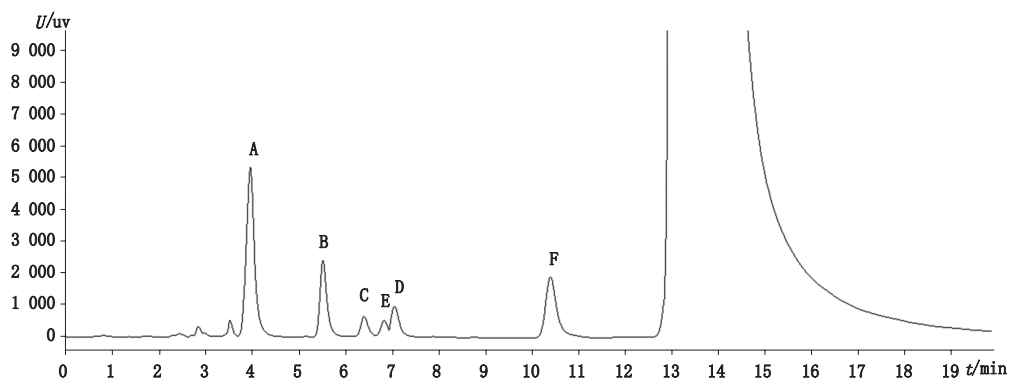


图 3 杂质 I (a)、V (b)、IX (c) [M+H]⁺ 离子的二级质谱图

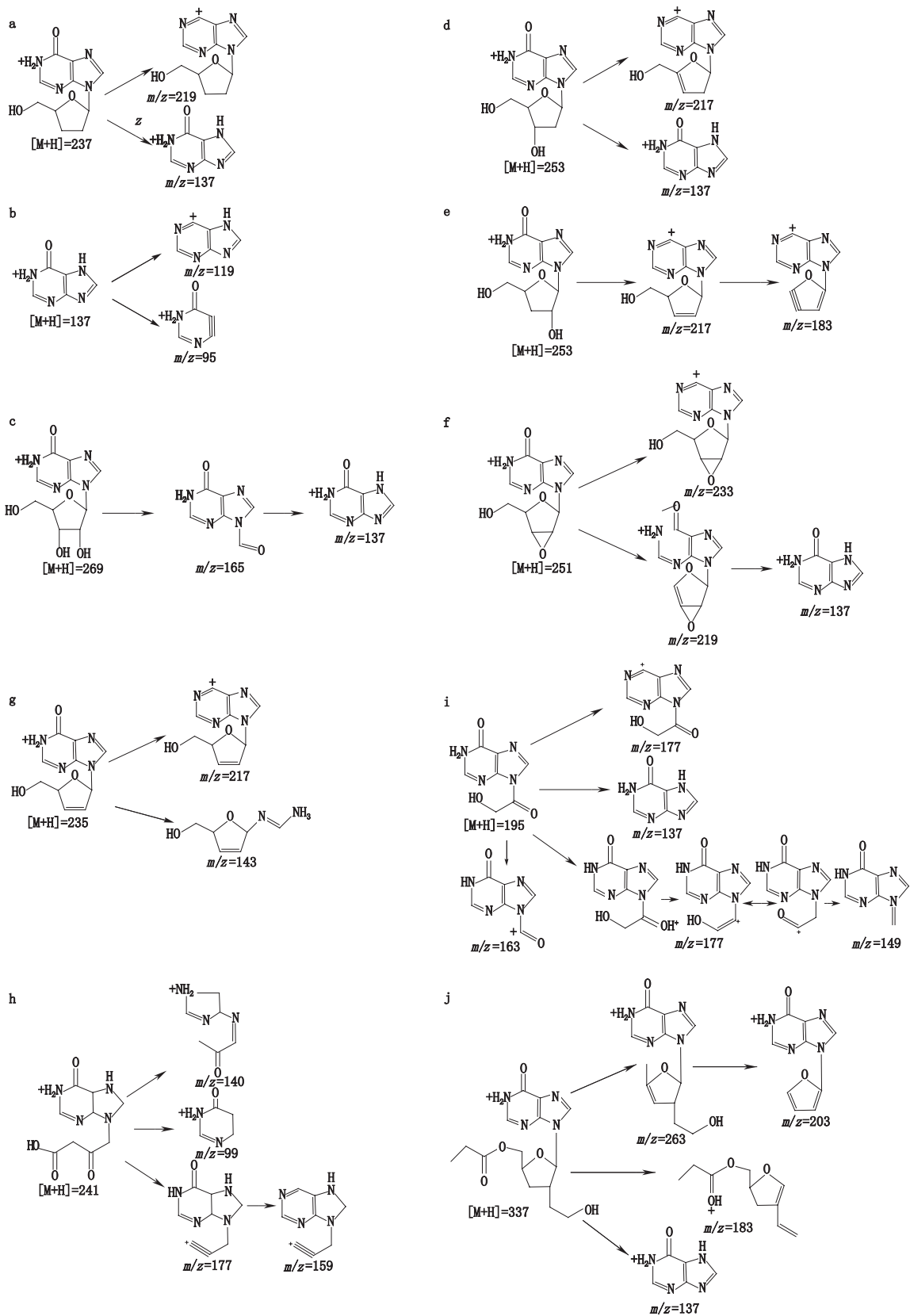
Fig 3 MS/MS spectra of [M+H]⁺ ions of impurity I (a), impurity V (b) and impurity IX (c)



A~F. 杂质 A~F (impurity A~F)

图 4 系统适用性溶液色谱图 (EP9.0)

Fig. 4 HPLC chromatogram of system suitability solution



a. 去羟肌苷(didanosine) b. II(A) c. III(B) d. IV(C) e. VI(D) f. VII(E) g. III(F) h. I i. V j. IX [A~F, 同图4(same as Fig.4)]

图5 去羟肌苷有关物质裂解途径

Fig 5 Proposed fragmentation schemes for didanosine and the related substances of it

3 讨论

按照 EP 9.0 中去羟肌苷原料有关物质检查色谱条件^[15],采用不同厂家的 3 根色谱柱进行测定,杂质 C、D、E 之间的分离较差,杂质 D 与 E 的相对保留时间分别为 0.52 和 0.50 (EP9.0 正文中规定杂质 D 与 E 的相对保留时间为 0.48、0.5),出峰顺序与正文描述的相反,见图 4,并通过 LC-TOF/MS 对结果进行了确认。采用液相色谱-质谱联用技术对去羟肌苷原料中 3 个未知杂质的结构鉴定,可以为质量控制提供参考依据。

参考文献

- [1] 赵红卫,秦玉花,张伟,等. 进口去羟肌苷肠溶胶囊在中国健康男青年体内药物动力学研究[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2010, 24(1): 16
ZHAO HW, QIN YH, ZHANG W, *et al.* Pharmacokinetics of imported didanosine enteric capsules in healthy Chinese young men [J]. *J Chin Pract Diagn Ther*, 2010, 24(1): 16
- [2] 徐先彬,李杨,刘蕾,等. RP-HPLC 法测定人血浆中去羟肌苷的浓度[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(4): 491
XU XB, LI Y, LIU L, *et al.* RP-HPLC determination of didanosine concentration in human plasma [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2006, 26(4): 491
- [3] 卢云雯,陈芬儿. 去羟肌苷的化学合成路线图解[J]. 中国医药工业杂志, 2002, 33(6): 310
LU YW, CHEN FE. Graphical synthetic routes of dideoxyinosine [J]. *Chin J Pharm*, 2002, 33(6): 310
- [4] 杨蓓,郁颖佳,陶芸莺,等. 国产去羟肌苷散剂与进口去羟肌苷片剂的人体生物等效性[J]. 中国新药与临床杂志, 2005, 24(9): 701
YANG B, YU YJ, TAO YY, *et al.* Bioequivalence of domestic didanosine powders and imported didanosine tablets in human [J]. *Chin J New Drugs Clin Rem*, 2005, 24(9): 701
- [5] 靳凤丹,陈笑艳,于河舟,等. 血浆中去羟肌苷测定与制剂生物等效性评价[J]. 中国药学杂志, 2006, 41(13): 1016
JIN FD, CHEN XY, YU HZ, *et al.* Determination of didanosine in human plasma and its application to a bioequivalence study [J]. *China Pharm J*, 2006, 41(13): 1016
- [6] 官常荣,何平,徐戎,等. 国产与进口去羟肌苷分散片在健康人体的生物等效性[J]. 中国临床药理学杂志, 2007, 23(5): 336
GUAN CR, HE P, XU R, *et al.* Bioequivalence of domestic and imported didanosine dispersing tablets in healthy volunteer [J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 2007, 23(5): 336
- [7] PERRY CM, NOBLE S. Didanosine: An updated review of its use in HIV [J]. *Drugs*, 1999, 58(6): 1099
- [8] 连莹,仲平. 容量滴定法测定去羟肌苷含量的分析方法与认可[J]. 药物分析杂志, 2015, 35(6): 1110
LIAN Y, ZHONG P. Methodological verification and approval of the volumetric titration determination of didanosine [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2015, 35(6): 1110
- [9] 杜明萃,张军霞,秦志国,等. RP-HPLC 法测定去羟肌苷肠溶胶囊有关物质及含量[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(2): 346
DU ML, ZHANG JX, QIN ZG, *et al.* RP-HPLC Determination of related substances and assay in didanosine enteric-coated capsules [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2016, 36(2): 182
- [10] DE OLIVEIRA AM, LÖWEN TC, CABRAL LM, *et al.* Development and validation of a HPLC-UV method for the determination in didanosine tablets [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, 38: 751
- [11] 刘蕾,徐先彬,李杨,等. HPLC-MS/MS 同时测定人血浆中 4 种抗 HIV 感染药物的浓度[J]. 药物分析杂志, 2007, 27(5): 681
LIU L, XU XB, LY, *et al.* HPLC-MS/MS simultaneous determination of four anti-HIV drugs in human plasma [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2007, 27(5): 681
- [12] 中国药典 2015 年版. 二部[S]. 2015: 114
ChP2015. Volume II [S]. 2015: 114
- [13] MALLAMPATI S, LEONARD S, DE VULDER S, *et al.* Method development and validation for the analysis of didanosine using micellar electrokinetic capillary chromatography [J]. *Electrophoresis*, 2005, 26(21): 4097
- [14] SANGSHETTIJAIPRAKASH N., KULKARNI PARAG A., SHINDEDEVANAND B. Spectrophotometric determination of didanosine in bulk and tablet formulation [J]. *Trends Applied Sci Res*, 2007, 2(1): 71
- [15] EP9.0[S]. 2016: 2250

(本文于 2016 年 12 月 21 日收到)