

阿昔洛韦片中杂质的色谱-质谱结构分析

王丽, 陈国清 (无锡市药品安全检验检测中心, 江苏 无锡 214028)

摘要: 目的 建立高效液相色谱-四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱 (HPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS) 联用法对阿昔洛韦片及其强制降解试验样品中的杂质进行结构分析。方法 采用 Waters Xbridge BEH Shield RP₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) 色谱柱, 以 10 mmol·L⁻¹ 甲酸铵溶液 (含 0.15% 甲酸) 为流动相 A, 以 10 mmol·L⁻¹ 甲酸铵溶液 (含 0.15% 甲酸)-乙腈 (50 : 50) 为流动相 B, 进行梯度洗脱, 检测波长为 254 nm, 对阿昔洛韦片及其强制降解试验样品中的杂质进行分离, 再采用 Q-Exactive Orbitrap-MS 测定各杂质一级精确分子量及二级碎片离子, 并进行结构鉴定。结果 阿昔洛韦及其杂质均分离良好, 检测并鉴定出阿昔洛韦片及其强制降解试验样品中 8 个含量>0.1% 的主要杂质, 其中 4 个为欧洲药典 10.0 规定的已知杂质, 而其他杂质均未见报道。结论 建立的液质联用技术能有效鉴定阿昔洛韦片的杂质, 能够为其生产工艺的优化和质量控制提供参考。

关键词: 阿昔洛韦; 四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱; 杂质; 降解产物; 结构鉴定

中图分类号: R917.101 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2024)01-0062-09

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.20221878

引用本文: 王丽, 陈国清. 阿昔洛韦片中杂质的色谱-质谱结构分析[J]. 中国现代应用药学, 2024, 41(1): 62-70.

Structural Analysis of Impurities in Aciclovir Tablets by HPLC-MS/MS

WANG Li, CHEN Guoqing (Wuxi Institute for Drug Control, Wuxi 214028, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To analysis the structures of the impurities in aciclovir tablets and the compulsory degradation samples by high performance liquid chromatography coupled with hybrid quadrupole orbitrap mass spectrometry technology (HPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS). **METHODS** The HPLC separation was carried out on a Waters Xbridge BEH Shield RP₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm) by the gradient elution with a mobile phase consisting of 10 mmol·L⁻¹ ammonium formate solution (0.15% formic acid)(A) and 10 mmol·L⁻¹ ammonium formate solution(0.15% formic acid)-acetonitrile(50 : 50)(B), and the detection wavelength was 254 nm. The Q-Exactive Orbitrap-MS was used to determine the precise first-order molecular weight and second-order fragment ions of these impurities, and the structures were identified. **RESULTS** Aciclovir and its impurities were well separated, and 8 major impurities with content>0.1% were detected and identified in aciclovir tablets and the compulsory degradation samples. Among them, 4 were the impurities listed in the European Pharmacopeia 10.0, and the others were unknown impurities identified for the first time. **CONCLUSION** The LC-MS/MS method can effectively identify the impurities in aciclovir tablets, which is significant for the production process optimization and quality control.

KEYWORDS: aciclovir; Q-Exactive Orbitrap-MS; impurities; degradation products; structural identification

阿昔洛韦化学名称为 9-(2-羟乙氧甲基) 鸟嘌呤, 结构式见图 1, 是首个研制成功并上市的开环类的核苷类广谱抗病毒药物, 临床上主要用于乙型肝炎及水痘、带状疱疹、单纯性疱疹病毒引起的皮肤和黏膜感染^[1]。

目前, 阿昔洛韦片仅收载于中国药典 2020 年版^[2] 及美国药典^[3], 两国药典标准收载的阿昔洛韦片有关物质项下采用 HPLC, 仅对鸟嘌呤特定杂质的含量进行控制。欧洲药典 10.0 版^[4] 收载了阿昔洛韦原料的质量控制方法, 其中有关物质亦采用 HPLC 对多个已知杂质进行分析, 但流动相中使用了非挥发性的磷酸盐体系, 无法与质谱联用进行杂质结构的分析。少数文献报道了阿昔洛韦片的

药理学^[5-6] 和含量研究^[1,7-8], 但前期的研究均基于 HPLC 开展。虽有文献采用液质联用技术对阿昔洛韦的三环类似物的稳定性进行了研究, 并表明阿昔洛韦为其主要的降解产物, 但并未对除阿昔洛韦外的其他降解产物进行结构鉴定和降解途径的分析^[9]。近年来, 四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱 (Q-Exactive Orbitrap-MS) 技术逐渐被应用于药物杂质的结构鉴定以及定量分析^[10-12], 由于其具有高质量精度、质量范围宽等优点, 具有很大的发展前景。

本研究建立了与质谱兼容的 HPLC 方法, 分析阿昔洛韦片及其强制降解试验样品中的杂质, 并通过 Q-Exactive Orbitrap-MS 对其主要杂质进行

基金项目: 国家药品监督管理局化学药品杂质谱研究重点实验室开放课题项目 (NMPA-KLIPCD-2020-02)

作者简介: 王丽, 女, 硕士, 副主任药师 E-mail: 95214524@qq.com

结构鉴定, 为该药品的质量标准提高提供参考。

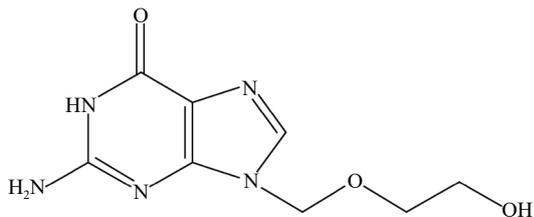


图1 阿昔洛韦化学结构

Fig. 1 Chemical structure of aciclovir

1 仪器与试剂

1.1 仪器

e2695 高效液相色谱仪 [包括四元泵、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器 (photo-diode array, PDA), 美国 Waters 公司]; Thermo Q Vanquish 超高效液相色谱仪/Q-Exactive 联用质谱仪 (包括二元泵、自动进样器、柱温箱、PDA、高分辨质谱仪)、质谱采集为 Xcalibur 4.1 软件均购自美国 Thermo 公司; XS-205 型电子天平 (瑞士梅特勒-托利多公司); Climacell 404 恒温恒湿箱 (德国 MMM 公司); Millipore 纯水系统 (美国 Millipore 公司)。

1.2 样品与试剂

阿昔洛韦对照品 (批号: 100380-201904; 含量: 99.8%)、鸟嘌呤对照品 (阿昔洛韦杂质 B, 批号: 140631-201807; 含量: 98.5%) 均购自中国食品药品检定研究院; 阿昔洛韦杂质 J 对照品 (深圳振强生物技术有限公司, 批号: RM-A031210-14003; 含量: 99.96%); 阿昔洛韦杂质 K 对照品 (美国 Lovan 公司, 批号: LA-1010011; 含量: 95.2%); 阿昔洛韦杂质 O 对照品 (批号: ACV 01520210819; 含量: 96.14%)、阿昔洛韦杂质 I 对照品 (批号: ACV00920210728; 含量: 98.23%) 均购自深圳市健兴医药科技有限公司; 阿昔洛韦杂质 P 对照品 (加拿大 RXA 公司, 批号: 17-A005216-02; 含量: 97.3%)。

阿昔洛韦片 (厂家 A, 批号: 2103091; 规格: 每片 0.1 g。厂家 B, 批号: 210901; 规格: 每片 0.2 g。厂家 C, 批号: 17018301; 规格: 每片 0.1 g) 均为市售。

二甲基亚砜、乙腈、甲酸铵和甲酸均为色谱纯, 水为超纯水, 其余试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 色谱条件

色谱柱: Waters Xbridge BEH Shield RP₁₈ (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 柱温: 30 ℃; 以

10 mmol·L⁻¹ 甲酸铵溶液 (含 0.15% 甲酸) 为流动相 A, 10 mmol·L⁻¹ 甲酸铵溶液 (含 0.15% 甲酸)-乙腈 (50:50) 为流动相 B, 梯度洗脱 (0~10 min, 100%A; 10~30 min, 100%→90%A; 30~50 min, 90%→80%A; 50~50.1 min, 80%→100%A; 50.1~58 min, 100%A); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 254 nm; PDA 扫描范围: 190~400 nm; 进样体积: 10 μL。

2.2 质谱条件

电喷雾离子源 (HESI), 正离子检测; 喷雾电压: 3.9 kV; 毛细管温度: 400 ℃; 鞘气流速: 75 arb; 辅助气流速: 20 arb; 扫描模式: Full MS-PRM; Full MS 一级扫描分辨率: 70 000 FWHM; 扫描范围 *m/z*: 100~1 500; PRM 二级扫描分辨率: 17 500 FWHM; 扫描范围 *m/z*: 50~500; 碰撞能量: 10~60 eV。

2.3 溶液配制

2.3.1 供试品溶液 取阿昔洛韦片的细粉适量 (约相当于阿昔洛韦 25 mg), 精密称定, 加二甲基亚砜 5 mL, 超声使阿昔洛韦溶解, 用水稀释定容至 25 mL 量瓶中, 摇匀, 滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

2.3.2 对照溶液 精密量取供试品溶液适量, 用二甲基亚砜-水 (1:4) 稀释制成含阿昔洛韦 1 μg·mL⁻¹ 的溶液, 摇匀, 作为对照溶液。

2.3.3 对照品溶液 精密称取阿昔洛韦杂质 B 对照品约 5 mg, 加 0.4% 氢氧化钠溶液适量使溶解, 用二甲基亚砜-水 (1:4) 稀释定容至 20 mL 量瓶中, 摇匀, 作为杂质 B 对照品储备液。精密称取阿昔洛韦杂质 P、O、I、J 和 K 对照品各约 5 mg, 加二甲基亚砜适量使溶解, 分别用水稀释定容至 20 mL 量瓶中, 摇匀, 分别得到杂质 P、O、I、J 和 K 的对照品储备液。精密量取各对照品储备液 1 mL, 置同一 25 mL 量瓶中, 加二甲基亚砜-水 (1:4) 稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液。

2.3.4 系统适用性溶液 取阿昔洛韦片的细粉适量 (约相当于阿昔洛韦 25 mg, 厂家 A), 精密称定, 加二甲基亚砜 5 mL, 超声使阿昔洛韦溶解, 精密加入对照品溶液 5 mL, 用水稀释定容至 25 mL 量瓶, 摇匀, 滤过, 取续滤液作为系统适用性溶液。

2.3.5 空白溶液及空白辅料溶液 取二甲基亚砜-水 (1:4) 作为空白溶液。模拟厂家 A 处方, 称取空白辅料适量 (约 1 片量), 于 100 mL 量瓶中, 加二甲基亚砜 20 mL, 超声, 用水稀释至刻度, 摇

匀, 滤过, 取续滤液作为空白辅料溶液。

2.3.6 强制降解溶液 取阿昔洛韦片(厂家 A) 的细粉适量(约相当于阿昔洛韦 25 mg), 精密称定, 分别通过 2 mL 1 mol·L⁻¹ 盐酸溶液室温放置 2, 3 d; 2 mL 1 mol·L⁻¹ 氢氧化钠溶液室温放置 10 d; 2 mL 30% 过氧化氢溶液室温放置 10 d; 100 °C 烘箱加热 6 d; 照度为 (4 500±500)lx 的灯检箱下照射 10 d 以及恒温恒湿箱 (25 °C、95%) 放置 10 d 进行强制降解。经相应处理后(酸碱降解溶液先中和, 加热样品先放冷至室温), 加二甲基亚砜 5 mL, 超声使阿昔洛韦溶解, 加水转移至 25 mL 量瓶中, 制成含阿昔洛韦约为 1 mg·mL⁻¹ 的强制降解溶液, 滤过, 取续滤液, 即得。同时采用空白辅料进行平行对照试验。

3 结果

3.1 系统适用性试验

取系统适用性溶液、空白溶液及空白辅料溶液, 按“2.1”项下色谱条件记录色谱图见图 2, 系统适用性溶液中各已知杂质的 PDA 光谱图见图 3。结果系统适用性溶液色谱图中, 各杂质峰之间、杂质峰和阿昔洛韦主峰间的分离度良好, 分离度均>1.5, 空白溶剂和空白辅料溶液不干扰杂质的测定。

3.2 强制降解试验溶液

取强制降解溶液, 按“2.1”项下色谱条件记录色谱图, 见图 4, 阿昔洛韦片主要降解杂质的 PDA 光谱图见图 5。试验结果表明, 阿昔洛韦片经高温、光照、高湿以及长时间碱降解后, 均未产生明显的杂质, 含量基本未变, 但对酸、氧化不稳定, 均有不同程度的降解。采用 0.1% 自身对照法计算各杂质含量, 共检出 8 个杂质峰>0.1%, 按照色谱相对保留时间顺序对其进行编号(1~8),

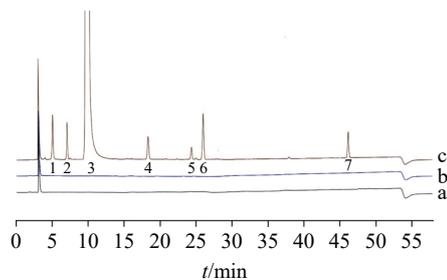


图 2 系统适用性试验 HPLC 色谱图

a-空白溶液; b-空白辅料溶液; c-系统适用性溶液; 1-杂质 B; 2-杂质 P; 3-阿昔洛韦; 4-杂质 O; 5-杂质 I; 6-杂质 J; 7-杂质 K。

Fig. 2 HPLC chromatogram of system suitability test

a-blank solution; b-adjuvant solution; c-system suitability solution; 1-impurity B; 2-impurity P; 3-acyclovir; 4-impurity O; 5-impurity I; 6-impurity J; 7-impurity K.

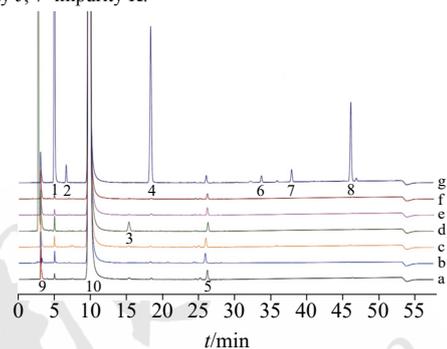


图 4 阿昔洛韦片强制降解溶液 HPLC 色谱图

a-未降解; b-碱降解; c-高温降解; d-氧化降解; e-光照降解; f-高湿降解; g-酸降解; 峰 1-8 代表杂质 1-8; 9-溶剂及过氧化氢峰; 10-阿昔洛韦。

Fig. 4 HPLC chromatograms of compulsory degradation solutions of aciclovir tablets

a-test solution; b-alkaline destruction; c-high temperature destruction; d-oxidative destruction; e-light destruction; f-humidity destruction; g-acid destruction; peaks 1-8 represented impurities 1-8; 9-solvent peak and hydrogen peroxide peak; 10-aciclovir.

其中 5 个为阿昔洛韦片本身含有的杂质(1, 3, 4, 5 和 8), 3 个为新产生的降解杂质(2, 6 和

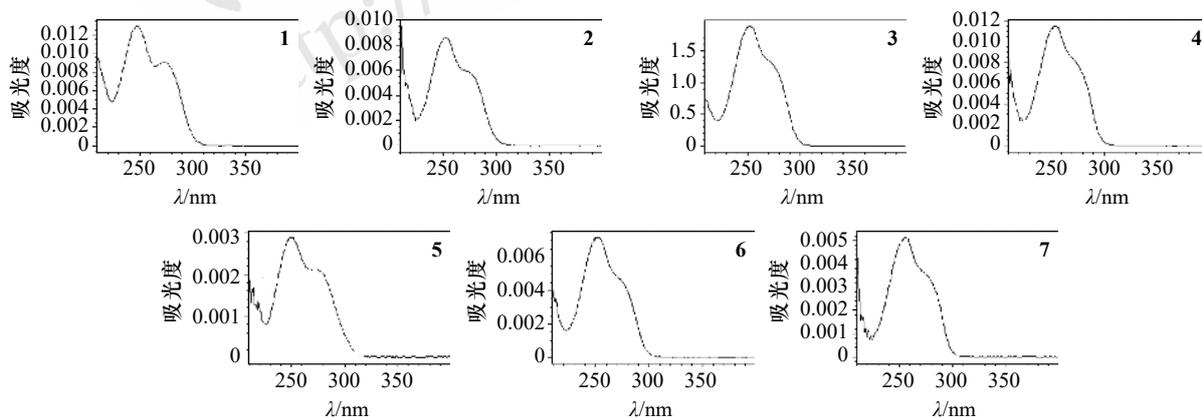


图 3 系统适用性溶液中阿昔洛韦和已知杂质的 PDA 图

1-杂质 B; 2-杂质 P; 3-阿昔洛韦; 4-杂质 O; 5-杂质 I; 6-杂质 J; 7-杂质 K。

Fig. 3 PDA spectra of acyclovir and known impurities in system suitability solution

1-impurity B; 2-impurity P; 3-acyclovir; 4-impurity O; 5-impurity I; 6-impurity J; 7-impurity K.

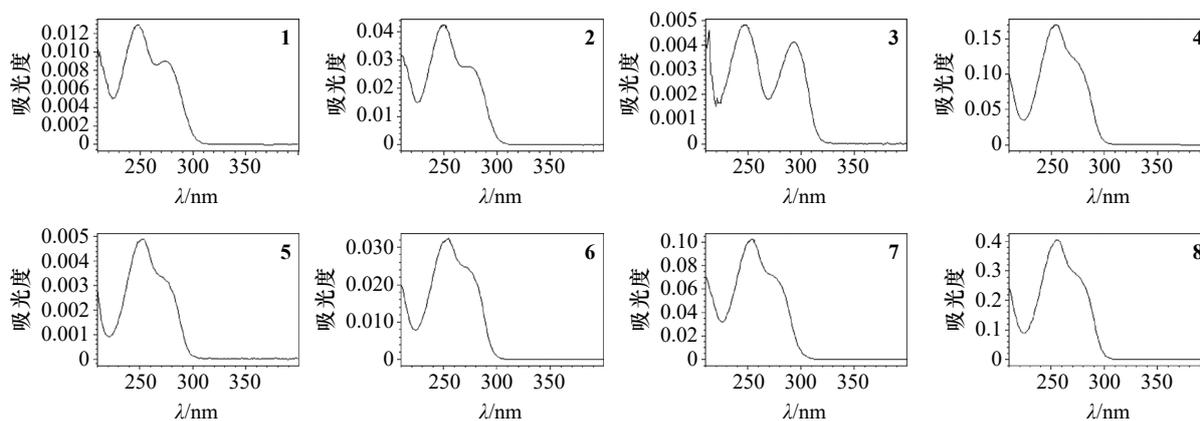


图5 阿昔洛韦片主要降解杂质的 PDA 图
1~8 代表杂质 1~8。

Fig. 5 PDA spectra of major degradation impurities in aciclovir tablets
1-8 represented 8 impurities.

7)。酸降解 2 d 后，产生 6 个主要降解杂质 (1, 2, 4, 6, 7 和 8)，其中杂质 1 最大，约为 6%，当酸降解时间延长至 3 d 时，各降解产物也显著增加，杂质 1 增大至约 10%。氧化降解后，阿昔洛韦片本身含有的 2 个杂质 (1 和 3) 也略有增加。各杂质峰之间、杂质峰与阿昔洛韦主峰间分离良好，且空白辅料溶液未发生降解。

3.3 杂质测定结果

取各厂家的阿昔洛韦片供试品溶液，按“2.1”项下色谱条件进行分析，各供试品溶液的 HPLC 色谱图见图 6。采用 0.1% 自身对照法计算各杂质含量，厂家 A 的样品中检出杂质 5 > 0.1%，与杂质 J 对照品色谱峰保留时间一致；厂家 B 的样品中杂质均 < 0.1%；厂家 C 的样品中检出杂质 1 > 0.1%，与杂质 B 对照品色谱峰保留时间一致。

3.4 阿昔洛韦及其杂质的结构分析确证

取系统适用性溶液、供试品溶液及强制降解溶液，按“2.1”项下色谱条件和“2.2”项下质谱条件进样分析，通过 HPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 检测到的阿昔洛韦片及其强制降解溶液中的

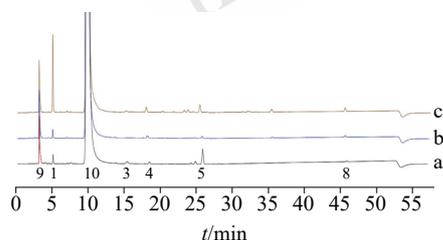


图6 阿昔洛韦片供试品溶液 HPLC 色谱图
a-厂家 A; b-厂家 B; c-厂家 C; 1-杂质 1; 3-杂质 3; 4-杂质 4; 5-杂质 5; 8-杂质 8; 9-溶剂峰; 10-阿昔洛韦。

Fig. 6 HPLC chromatogram of aciclovir tablet solutions
a-manufacture A; b-manufacture B; c-manufacture C; 1-impurity 1; 3-impurity 3; 4-impurity 4; 5-impurity 5; 8-impurity 8; 9-solvent peak; 10-aciclovir.

8 个主要杂质的 PDA 图谱、一级精确分子量及二级碎片离子，对比阿昔洛韦和各杂质对照品的 PDA 图谱和质谱特征，并结合有机化学反应机制及阿昔洛韦原料的合成工艺^[13]，合理分析元素组成和裂解途径，初步鉴定了各主要杂质的结构，见表 1。

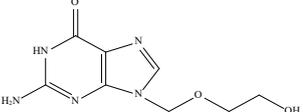
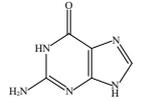
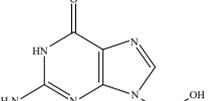
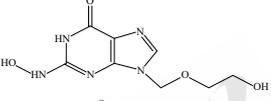
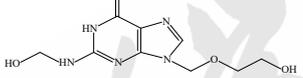
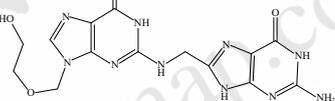
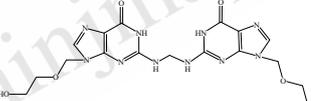
阿昔洛韦：测得阿昔洛韦的 $[M+H]^+$ 一级母离子精确质量为 226.093 8，与离子式 $C_8H_{12}N_5O_3^+$ 相应，其主要子离子为 m/z 152.056 8 和 135.030 2，其中 m/z 152.056 8 为母离子脱去咪唑环上的 2-羟乙氧甲基产生， m/z 135.030 2 为 m/z 152.056 8 的子离子进一步脱去氨基产生。阿昔洛韦二级质谱图及可能裂解途径见图 7，对杂质的鉴定具有非常重要的借鉴意义。

杂质 1：测得杂质 1 的 $[M+H]^+$ 一级母离子精确质量为 152.056 7，与离子式 $C_5H_6N_5O^+$ 相应，其主要子离子为 m/z 135.030 1 和 110.035 0。在相同的色谱及质谱条件下，杂质 1 与杂质 B 对照品 (鸟嘌呤) 色谱保留时间、PDA 光谱图、精确分子量及二级质谱得到的主要碎片均相同，由此推测杂质 1 为鸟嘌呤。阿昔洛韦的合成一般以鸟嘌呤出发的路线为优先选择^[13]。鸟嘌呤为阿昔洛韦合成中残留的起始原料，同时在氧化、酸化条件下也易脱去咪唑环上的羟乙氧甲基产生，其二级质谱图及可能裂解途径见图 8。

杂质 2：杂质 2 主要是在酸化降解下产生。测得杂质 2 的 $[M+H]^+$ 一级母离子精确质量为 182.067 0，与离子式 $C_6H_8N_5O_2^+$ 相应，与阿昔洛韦的相对分子量相差 44，与分子结构中羟乙基片段相对应，推测为阿昔洛韦脱除羟乙基的降解产物。主要子离子为 m/z 164.056 5，152.056 5 和 135.030 0，其中 m/z 164.056 5 为母离子脱掉中性

表 1 阿昔洛韦及其各杂质的质谱数据和推测可能的化学结构

Tab. 1 Mass spectrum data and probable chemical structures of aciclovir and the impurities

| 化合物 | 相对保留时间 | 母离子 [M+H] ⁺ /m/z | 推测离子式 | 质量误差 /×10 ⁻⁶ | 主要子离子/m/z | 最大吸收波长/nm | 可能化学结构 | 可能来源 |
|------|--------|-----------------------------|---|-------------------------|--|-----------|--|-----------------|
| 阿昔洛韦 | 1.00 | 226.093 8 | C ₈ H ₁₂ N ₅ O ₃ ⁺ | 1.326 9 | 152.056 8, 135.030 2 | 253 |  | / |
| 1 | 0.51 | 152.056 7 | C ₅ H ₆ N ₅ O ⁺ | 3.288 2 | 135.030 1, 110.035 0 | 248 |  | 原料合成起始物料；氧化、酸降解 |
| 2 | 0.68 | 182.067 0 | C ₆ H ₈ N ₅ O ₂ ⁺ | 4.394 0 | 164.056 5, 152.056 5, 135.030 0 | 249 |  | 酸降解 |
| 3 | 1.56 | 242.088 1 | C ₈ H ₁₂ N ₅ O ₄ ⁺ | 3.304 6 | 180.051 8, 168.051 8, 152.056 8 | 248, 293 |  | 原料合成副产物；氧化降解 |
| 4 | 1.87 | 256.103 6 | C ₉ H ₁₄ N ₅ O ₄ ⁺ | 3.904 7 | 182.067 4, 164.056 7, 152.056 7 | 254 |  | 原料合成副产物；酸降解 |
| 5 | 2.66 | 389.142 5 | C ₁₄ H ₁₇ N ₁₀ O ₄ ⁺ | 1.027 9 | 238.093 5, 164.056 7, 152.056 7 | 252 |  | 原料合成副产物 |
| 6 | 3.43 | 389.142 3 | C ₁₄ H ₁₇ N ₁₀ O ₄ ⁺ | 1.541 8 | 238.093 4, 164.056 7, 152.056 7 | 254 |  | 酸降解 |
| 7 | 3.86 | 389.142 6 | C ₁₄ H ₁₇ N ₁₀ O ₄ ⁺ | 0.770 9 | 238.093 3, 226.093 4, 164.056 8, 152.056 7 | 253 |  | 酸降解 |
| 8 | 4.69 | 463.180 0 | C ₁₇ H ₂₃ N ₁₀ O ₆ ⁺ | 0.431 8 | 238.093 2, 226.093 4, 164.057 0, 152.056 7 | 255 |  | 原料合成副产物；酸降解 |

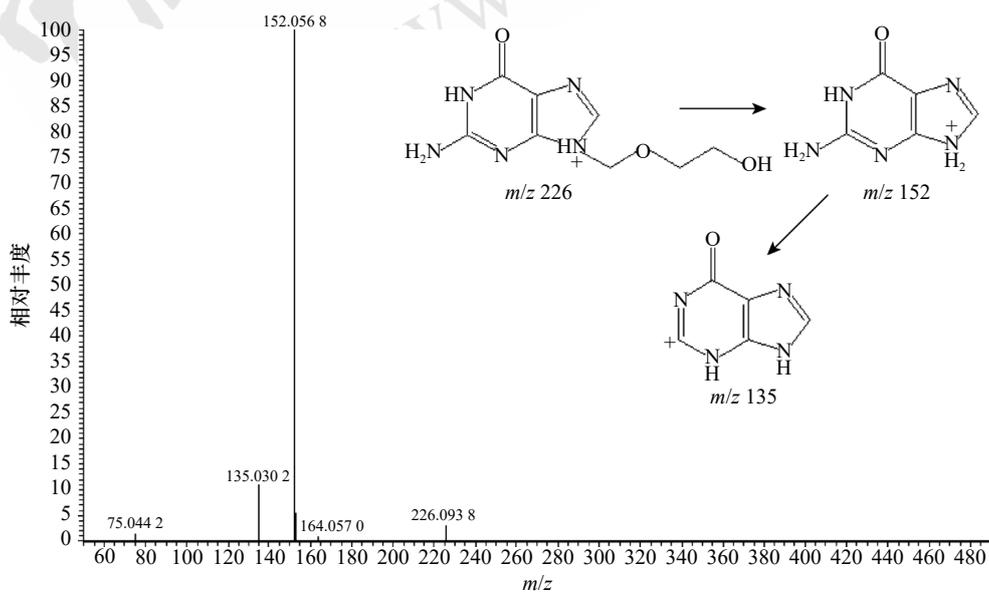


图 7 阿昔洛韦二级质谱图及可能裂解途径

Fig. 7 MS/MS spectrum and proposed fragmentation pathway of aciclovir

分子 H_2O 产生, m/z 152.056 5 的碎片与鸟嘌呤的母离子相同, 表明结构中含有鸟嘌呤的母体结构, m/z 135.030 0 为 m/z 152.056 5 的子离子进一步脱去氨基产生。由此推测杂质 2 为 9-羟甲基鸟嘌呤, 其二级质谱主要碎片均可经此结构合理裂解产生, 见图 9。

杂质 3: 杂质 3 主要是在氧化降解下产生。测得杂质 3 的 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 一级母离子精确质量为 242.088 1, 与离子式 $\text{C}_8\text{H}_{12}\text{N}_5\text{O}_4^+$ 相应, 与阿昔洛韦相比, 多 1 个 O 原子。结合杂质 3 主要子离子 m/z 180.051 8, 168.051 8 和 152.056 8, 可推测发生氧化加 O 的位置为嘌呤环上 2-氨基, 其二级质

谱图及可能裂解途径见图 10。

杂质 4: 测得杂质 4 的 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 一级母离子精确质量为 256.103 6, 与离子式 $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{N}_5\text{O}_4^+$ 相应, 其主要子离子为 m/z 182.067 4, 164.056 7 和 152.056 7。在相同的色谱及质谱条件下, 杂质 4 与杂质 O 对照品色谱保留时间、PDA 光谱图、精确分子量及二级质谱得到的主要碎片均相同, 由此推测杂质 4 为杂质 O, 杂质 O 为阿昔洛韦合成过程中产生的副产物, 且在酸化条件下阿昔洛韦嘧啶环上的氨基也易降解产生, 其二级质谱图及可能裂解途径见图 11。

杂质 5: 测得杂质 5 的 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 一级母离子精

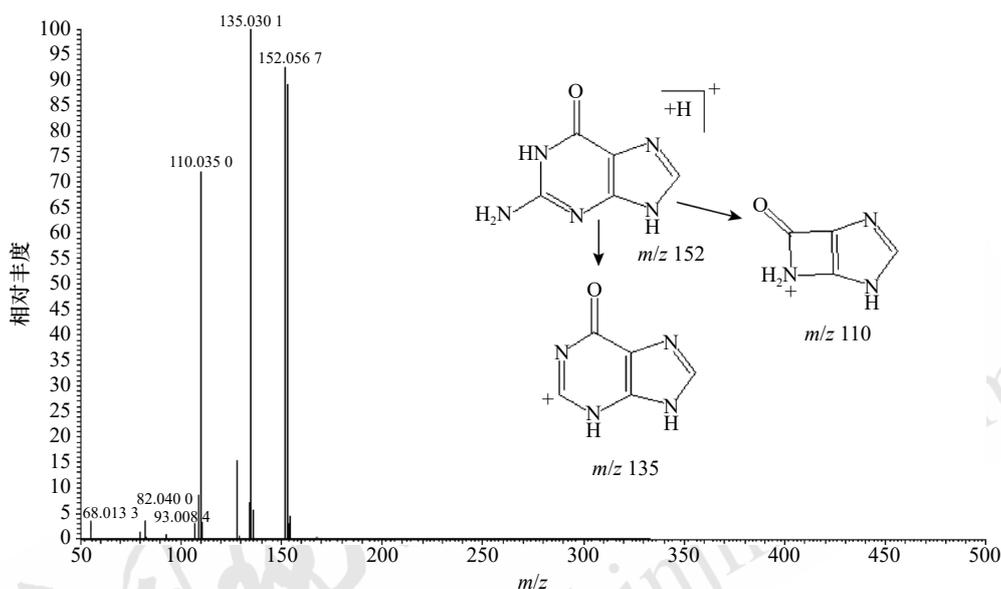


图 8 杂质 1 二级质谱图及可能裂解途径

Fig. 8 MS/MS spectrum and proposed fragmentation pathway of impurity 1

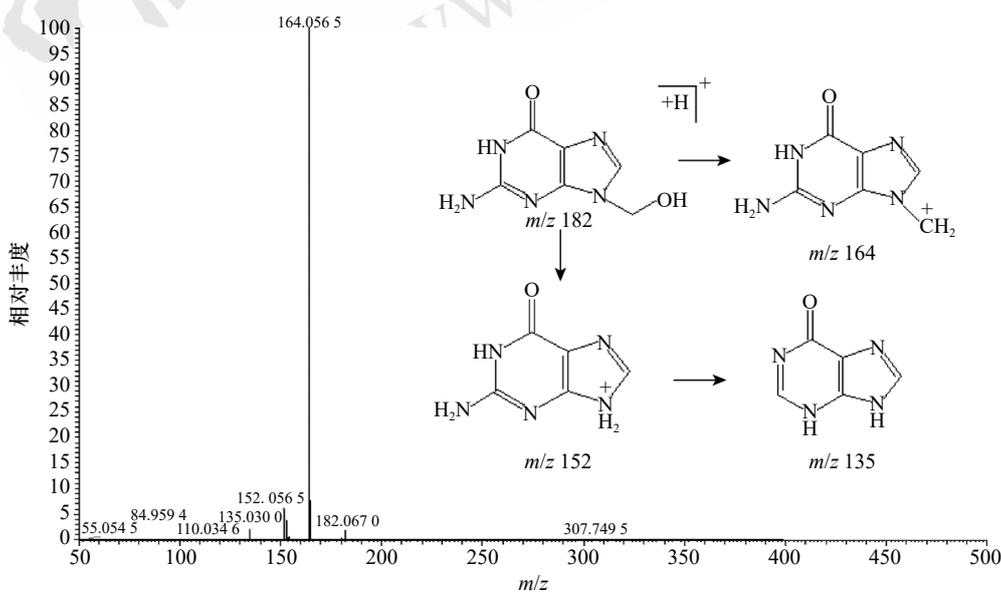


图 9 杂质 2 二级质谱图及可能裂解途径

Fig. 9 MS/MS spectrum and proposed fragmentation pathway of impurity 2

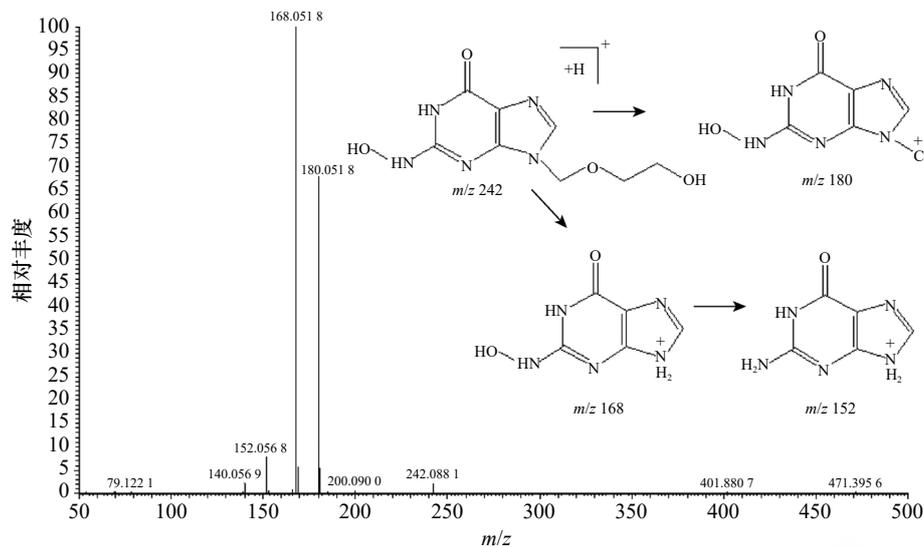


图 10 杂质 3 二级质谱图及可能裂解途径

Fig. 10 MS/MS spectrum and proposed fragmentation pathway of impurity 3

确质量为 389.142 5, 与离子式 $C_{14}H_{17}N_{10}O_4^+$ 相应, 其主要子离子为 m/z 238.093 5, 164.056 7 和 152.056 7。在相同的色谱及质谱条件下, 杂质 5 与杂质 J 对照品色谱保留时间、PDA 光谱图、精确分子量及二级质谱得到的主要碎片均相同, 由此推测杂质 5 为杂质 J, 杂质 J 为阿昔洛韦原料合成中产生的聚合物杂质, 其二级质谱图及可能裂解途径见图 12。

杂质 6 和 7: 测得杂质 6 和 7 的 $[M+H]^+$ 离子的精确质量分别为 389.142 3 和 389.142 6, 均与离子式 $C_{14}H_{17}N_{10}O_4^+$ 相应, 推测均为杂质 J 的同分异构体杂质。杂质 6 的主要子离子为 m/z 238.093 4, 164.056 7 和 152.056 7, 与杂质 J 相似。与杂质 J 相比, 杂质 7 可见明显碎片 m/z 226.093 4, 表明

其分子结构中仍含阿昔洛韦的母体结构。由此推测杂质 6 和 7 可能的化学结构见表 1, 均为酸化条件下产生的阿昔洛韦聚合物杂质, 其二级质谱图及可能裂解途径分别见图 13~14。

杂质 8: 测得杂质 8 的 $[M+H]^+$ 一级母离子精确质量为 463.180 0, 与离子式 $C_{17}H_{23}N_{10}O_6^+$ 相应, 其主要子离子为 m/z 238.093 2, 226.093 4, 164.057 0 和 152.056 7。在相同的色谱及质谱条件下, 杂质 8 与杂质 K 对照品色谱保留时间、PDA 光谱图、精确分子量及二级质谱得到的主要碎片均相同, 由此推测杂质 8 为杂质 K, 杂质 K 为阿昔洛韦合成过程中产生的副产物, 且在酸化条件下阿昔洛韦也易降解产生, 其二级质谱图及可能裂解途径见图 15。

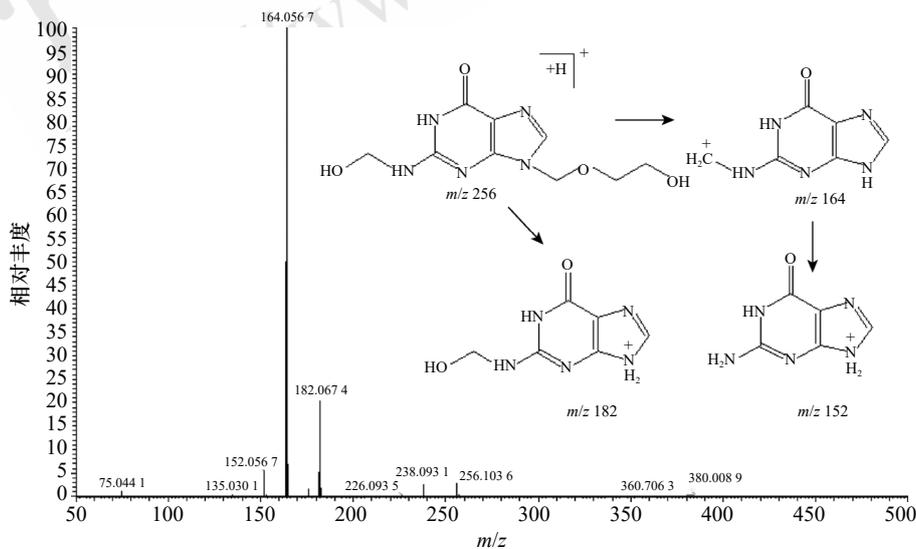


图 11 杂质 4 二级质谱图及可能裂解途径

Fig. 11 MS/MS spectrum and proposed fragmentation pathway of impurity 4

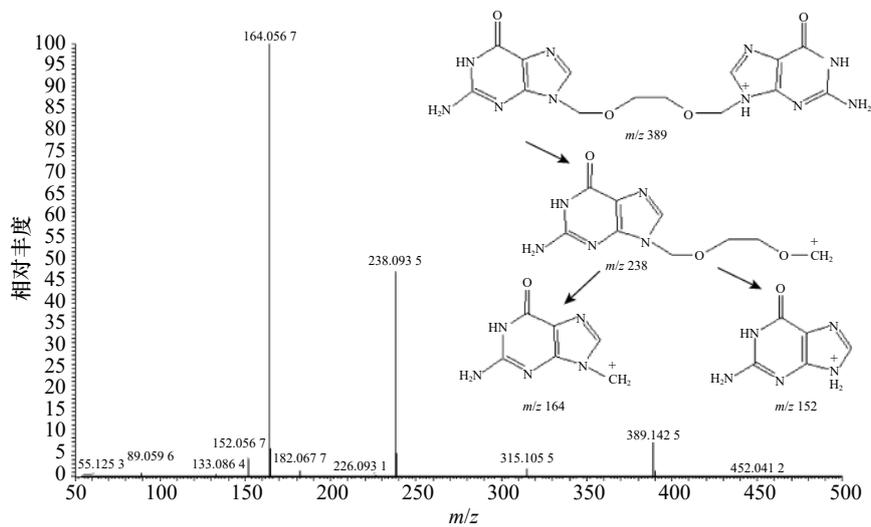


图 12 杂质 5 二级质谱图及可能裂解途径

Fig. 12 MS/MS spectrum and proposed fragmentation pathway of impurity 5

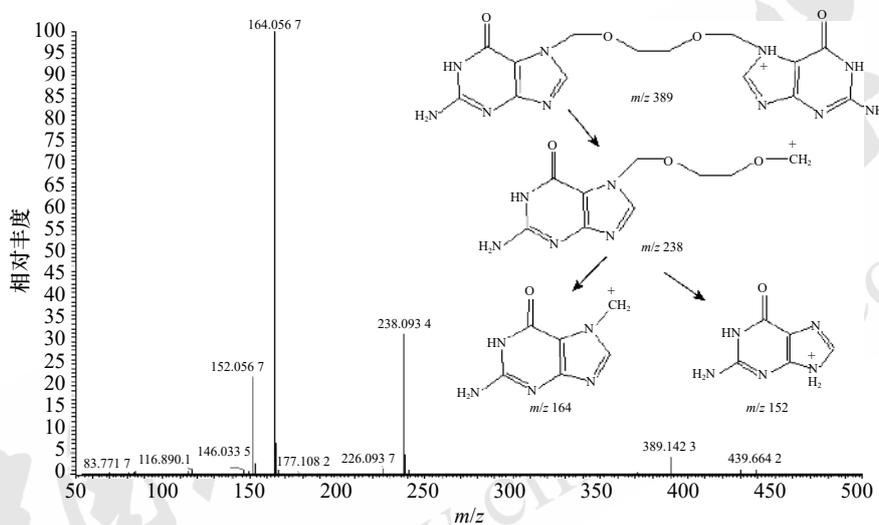


图 13 杂质 6 二级质谱图及可能裂解途径

Fig. 13 MS/MS spectrum and proposed fragmentation pathway of impurity 6

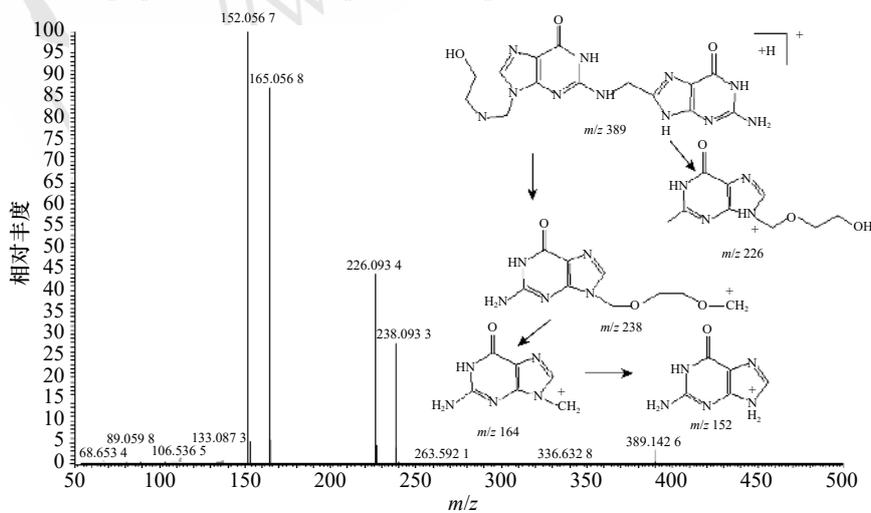


图 14 杂质 7 二级质谱图及可能裂解途径

Fig. 14 MS/MS spectrum and proposed fragmentation pathway of impurity 7

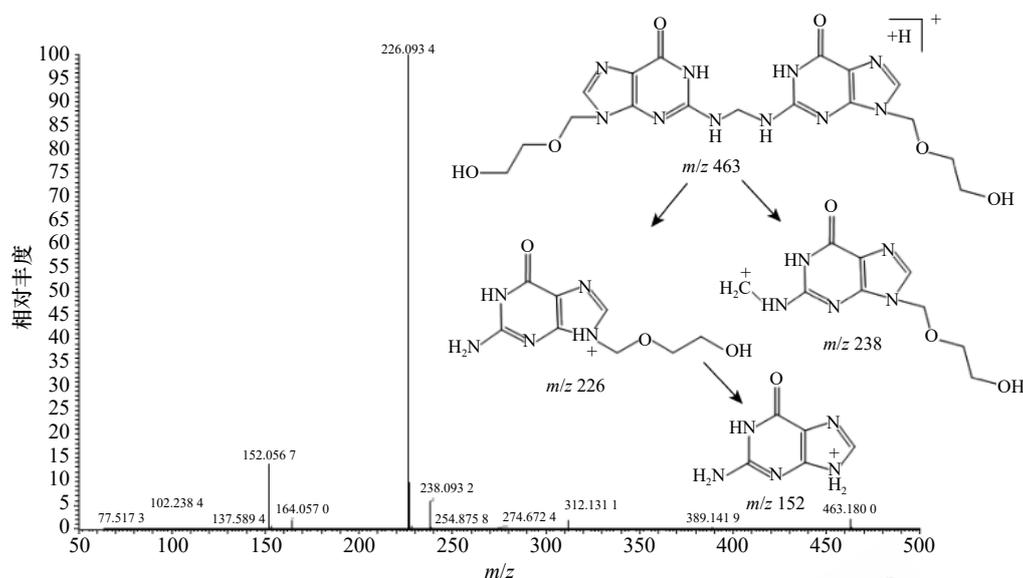


图 15 杂质 8 二级质谱图及可能裂解途径

Fig. 15 MS/MS spectrum and proposed fragmentation pathway of impurity 8

4 讨论

本研究基于 HPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 技术，建立了与质谱兼容的 HPLC 分析阿昔洛韦片及其强制降解溶液中的主要杂质。在所建立条件下，阿昔洛韦片及其强制降解溶液中的杂质均得到有效的分离，根据化合物的质谱裂解规律、化学合成路线和分子结构特点等，初步鉴定出 8 个含量 >0.1% 的杂质可能的化学结构，其中杂质 1, 4, 5, 8 分别与欧洲药典 10.0 版的阿昔洛韦杂质 B, O, J, K 相对应，而杂质 2, 3, 6 和 7 尚未见报道，其准确结构有待于通过制备进行 H-NMR 确证。结合阿昔洛韦的化学结构及合成工艺^[13]，对其杂质的来源进行了归属，大致可分为 3 类：合成过程的中间体、合成过程的副产物和酸、氧化降解产物。

强制降解试验结果表明，阿昔洛韦对碱、高温、光照和高湿相对比较稳定，未产生明显的杂质，长时间氧化条件能产生杂质 1 和 3，但量较少。但阿昔洛韦对酸性条件较为敏感，能够产生明显的杂质，且随着酸化程度的增加，降解产物也显著增加，表明阿昔洛韦片对酸性条件极为不稳定，在质量控制和工艺优化时应给予重视，在阿昔洛韦原料及制剂的管理全过程中要注意避免与酸性的成分接触。

REFERENCES

[1] ZHANG X Z, YANG M, LU D, et al. Instrument comparison for determination of acyclovir tablets by HPLC[J]. Anal

Instrum(分析仪器), 2018(6): 145-147.

[2] 中国药典. 二部[S]. 2020: 679.

[3] USP[S]. 2021.

[4] EP 10.0[S]. 2020: 1758-1760.

[5] LI K, DONG L F, WANG Y Q, et al. Pharmacokinetics and bioequivalence of acyclovir tablets in healthy Chinese subjects [J]. Chin J Clin Pharmacol(中国临床药理学杂志), 2021, 37(8): 939-943.

[6] ZHAO L P, SONG J W. Pharmacokinetics and bioavailability of acyclovir in healthy volunteers [J]. J Henan Med Coll Staff Work(河南职工医学院学报), 2007, 19(5): 408-411.

[7] WANG Y X, MENG M Y. Content determination of acyclovir tablets [J]. J North Pharm(北方药学), 2016, 13(12): 7.

[8] FAN Y F, LI H, HU S L. Content determination of acyclovir in acyclovir tablets by HPLC[J]. China Med Her(中国医药导报), 2008, 5(28): 23, 25.

[9] LESNIEWSKA M A, DEREZIŃSKI P, KLUPCZYŃSKA A, et al. HPLC and HPLC/MS/MS studies on stress, accelerated and intermediate degradation tests of antivirally active tricyclic analog of acyclovir [J]. J AOAC Int, 2015, 98(5): 1240-1247.

[10] LUO Y T, ZENG Y J, PENG J Y, et al. Chemical composition analysis of Tibetan medicine Ji-ni-de-xie based on UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS technology[J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2022, 31(17): 1727-1735.

[11] LIU M S, YANG D P, YANG W L, et al. Analysis of compounds in Citri Reticulatae Pericarpium viride by UHPLC-Q-exactive orbitrap-MS [J]. Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志), 2021, 41(23): 2395-2400,2427.

[12] MEI Q, LI Y T, YANG B H, et al. Determination of genotoxic impurity in metformin hydrochloride and its tablets by UHPLC-Q-Orbitrap HRMS[J]. Chin J Drug Eval(中国药物评价), 2020, 37(5): 353-357.

[13] SUN W J. Study on preparation technology and quality standard of acyclovir tablets[D]. Harbin: Harbin University of Commerce, 2019.

收稿日期: 2022-05-23

(本文责编: 曹粤锋)