

超高效液相色谱 - 三重四极杆质谱联用技术测定富马酸替诺福韦二吡啶酯中 (E)-9-丙基-1-烯基腺嘌呤的含量

LCMSMS-304

摘要： 本文建立了使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用测定富马酸替诺福韦二吡啶酯中 (E)-9-丙基-1-烯基腺嘌呤的含量的方法。方法采用梯度洗脱，外标法定量，线性范围为 0.5~20 ng/mL，相关系数 0.9999，定量限 0.5 ng/mL，重复性 RSD 为 4.62%。该方法分析速度快、灵敏度高、重复性好，能够满足富马酸替诺福韦二吡啶酯中 (E)-9-丙基-1-烯基腺嘌呤准确定量的要求，可用于严格监控药物中基因毒性杂质含量。

关键词： 超高效液相色谱 三重四极杆质谱 富马酸替诺福韦二吡啶酯 (E)-9-丙基-1-烯基腺嘌呤

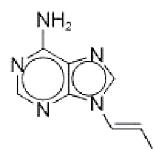
富马酸替诺福韦二吡啶酯 (Tenofovir Disoproxil Fumarate, TDF) 是一种新型核苷酸类逆转录酶抑制剂，是替诺福韦的前体药物，具有潜在的抗 HIV-1 的活性，可有效对抗多种病毒，临床上常用来治疗人类免疫缺陷病毒 (HIV) 和乙型肝炎病毒 (HBV) 感染。TDF 在药物合成与贮存过程中会引入多种杂质，(E)-9-丙基-1-烯基腺嘌呤则是其中一种具有致突变作用的基因毒性杂

质，世界卫生组织 (WHO) 对其含量具有严格规定，要求其不能超过 5 mg/L，因此，建立 (E)-9-丙基-1-烯基腺嘌呤灵敏、高效的检测方法对其含量控制较为重要。本实验采用 LCMS-8045 建立高灵敏度的富马酸替诺福韦二吡啶酯中 (E)-9-丙基-1-烯基腺嘌呤含量检测方法，可为富马酸替诺福韦二吡啶酯的质量控制提供检测依据，供有关人员参考。

实验部分

1.1 化合物信息

表1 化合物信息

化合物名称	英文名	CAS No.	分子式	结构式
(E)-9-丙基-1-烯基腺嘌呤	(E)-9-(Prop-1-enyl)-amidopurine	4121-40-8	C ₈ H ₉ N ₅	

1.2 仪器

岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A_{SR} 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-20AC 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8045 三重四极杆质谱仪，LabSolutions Ver. 5.89 色谱工作站。

1.3 分析条件

液相条件

色谱柱：Shim-pack GIST C18 Column
 (2.1 mm I.D.×100 mm L., 2.0 μm)
 流动相：A 相 -10 mM 乙酸铵水溶液, B 相 - 乙腈
 流速：0.4 mL/min

柱温：30°C
 进样量：5 μL
 洗脱方式：梯度洗脱，B 相初始浓度为 20%，洗脱程序见表 2。

表2 梯度洗脱程序

Time(min)	Module	Command	Value
4.00	泵	B.Conc	70
4.10	泵	B.Conc	20
6.00	控制器	Stop	

质谱条件

分析仪器: LCMS-8045

离子化模式: ESI(+)

离子源接口电压: 4.0 kV

雾化气: 氮气 3.0 L/min

加热气: 空气 15.0 L/min

干燥气: 氮气 5.0 L/min

碰撞气: 氩气

接口温度: 300°C

DL 温度: 250°C

加热模块温度: 400°C

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

驻留时间: 97ms

延迟时间: 3 ms

MRM 参数: 见表 3

表3 MRM优化参数

化合物	前体离子	产物离子	Q1 Pre Bias (V)	CE (V)	Q3 Pre Bias (V)
(E)-9-丙基-1-烯基腺嘌呤		136.10*	-19.0	-21.0	-23.0
基腺嘌呤	176.15	119.10	-10.0	-31.0	-10.0

注: *表示定量离子

1.4 标准品与样品的配制

标准样品的配制: 精密称取 (E)-9-丙基-1-烯基腺嘌呤标准品适量, 加入甲醇溶解后, 用流动相稀释配制标准曲线, 浓度分别为 0.5 ng/mL、1 ng/mL、2 ng/mL、4 ng/mL、6 ng/mL、8 ng/mL、10 ng/mL、12 ng/mL、14 ng/mL、20 ng/mL。

样品配制方法: 精密称取富马酸替诺福韦二吡啶酯适量, 加入甲醇溶解, 配制成浓度为 2 mg/mL 的待测样品。

结果与讨论

2.1 标准样品一级质谱图与产物离子扫描质谱图

(E)-9-丙基-1-烯基腺嘌呤在一级质谱扫描下主要生成 $[M+H]^+$ 准分子离子峰 m/z 176.15, 对准分子离子峰进行产物离子扫描, 生成主要碎片离子为 m/z 136.10、 m/z 119.10, 其一级质谱图与产物离子扫描图分别见图 1、2。

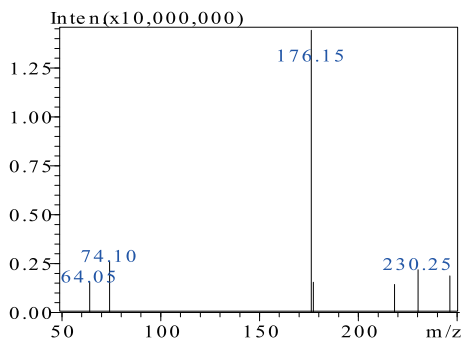


图1 (E)-9-丙基-1-烯基腺嘌呤的一级质谱图

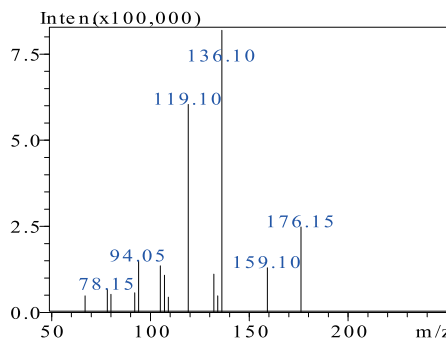


图2 (E)-9-丙基-1-烯基腺嘌呤的产物离子扫描图(CE值-28 V)

2.2 液相条件优化

国家食品药品监督管理总局发布的富马酸替诺福韦二吡啶酯检测标准(YBH01472017)中,(E)-9-丙基-1-烯基腺嘌呤采用乙腈-10 mM 乙酸铵水溶液(40/60, v/v) 等度方式进行洗脱,通过对标准品检测发现,在等度洗脱方式下目标物出峰前段会有干扰峰存在,色谱图见图3。为使(E)-9-丙基-1-烯基腺嘌呤定量更为准确,实验考察了梯度洗脱的液相条件,结果发现采用梯度洗脱后干扰峰与目标物明显分开,本实验采用梯度洗脱进行检测,色谱图见图4。

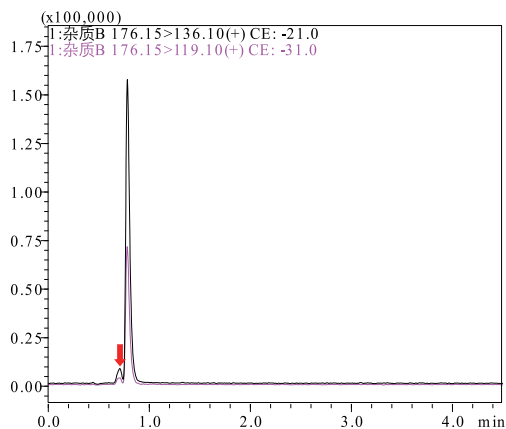


图3 10 ng/mL标准品等度洗脱色谱图

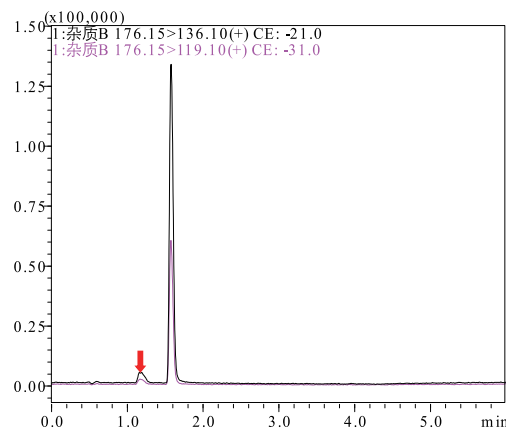


图4 10 ng/mL标准品梯度洗脱色谱图

2.3 线性范围和最低定量限

将按照1.4项下标准品配制方法制备好的标准曲线,按仪器条件进样分析,外标法定量。以(E)-9-丙基-1-烯基腺嘌呤浓度 X 为横坐标,以(E)-9-丙基-1-烯基腺嘌呤峰面积 Y 为纵坐标,权重系数为 1/C,进行线性回归分析,所得标准曲线见图5,线性回归方程及相关系数见表4。结果表明(E)-9-丙基-1-烯基腺嘌呤峰在0.5~20 ng/mL的浓度范围内线性关系良好。

在本实验所建立的方法中,(E)-9-丙基-1-烯基腺嘌呤最低定量限为0.5 ng/mL,平行制备6份最低定量限浓度的标准样品进行测定,其RSD为4.62%(n=6),准确度为97.1~111.4%,S/N平均值为16.5。结果表明,此浓度水平精密度与准确度均在标准规定范围内,并且满足检测浓度要求。

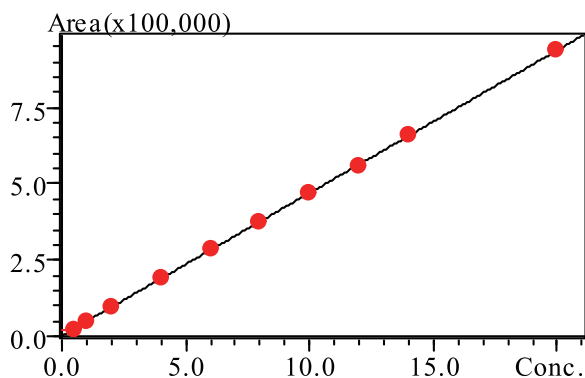


图5 (E)-9-丙基-1-烯基腺嘌呤标准曲线

表4 校准曲线参数(线性回归,权重为1/C)

化合物	校准曲线	线性范围 (ng/mL)	准确度(%)	相关系数 r
(E)-9-丙基-1-烯基腺嘌呤	$Y = (46814.1)X + (1997.28)$	0.5~20	93.1~104.6	0.9999

表5 标准曲线各浓度点准确度

级别	标准浓度 (ng/mL)	实测浓度 (ng/mL)	准确度(%)
1	0.5	0.466	93.1
2	1	1.046	104.6
3	2	2.032	101.6
4	4	4.036	100.9
5	6	6.083	101.4
6	8	7.958	99.5
7	10	9.962	99.6
8	12	11.868	98.9
9	14	14.084	100.6
10	20	19.965	99.8

2.4 样品含量检测

富马酸替诺福韦二吡啶酯样品按照上述样品配制方法与仪器分析条件, 平行进样分析 6 次, 采用外标法进行含量测定, 所得结果为富马酸替诺福韦二吡啶酯样品中 (E)-9- 丙基 -1- 烯基腺嘌呤含量为 0.216 $\mu\text{g/g}$ (n=6)。

■ 结论

本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 和三重四极杆质谱仪 LCMS-8045 联用测定富马酸替诺福韦二吡啶酯样品中 (E)-9- 丙基 -1- 烯基腺嘌呤的方法。该方法在 6 min 内完成检测, 采用外标法定量, 方法定量限 0.5 ng/mL, 线性范围为 0.5~20 ng/mL, 相关系数在 0.9999。该方法具有分析方法简单、分析速度快、灵敏度高、重现性好的特点, 满足 (E)-9- 丙基 -1- 烯基腺嘌呤定量分析要求, 适合富马酸替诺福韦二吡啶酯中 (E)-9- 丙基 -1- 烯基腺嘌呤的准确定量检测要求。