

HPLC – CAD 法测定帕拉米韦注射液的有关物质及杂质谱解析

房思萌, 段玺玉, 隋玉荣, 鲁鑫, 韩晓捷*, 白海娇*

(天津市药品检验研究院, 天津 300070)

摘要 目的: 建立 HPLC – CAD 法测定帕拉米韦注射液的有关物质, 并对降解杂质进行杂质谱解析。**方法:** 采用 Welch Ultimate Polar RP 柱 (250 mm × 4.6 mm, 3.5 μm), 以 5 mmol · L⁻¹ 甲酸铵溶液 (用甲酸调 pH 至 4.6) – 乙腈 (B) (95:5) 为流动相 A, 流动相 A – 乙腈 (50:50) 为流动相 B, 梯度洗脱, 体积流量为 0.8 mL · min⁻¹, 柱温 30 °C, CAD 雾化器温度 50 °C, 采集频率 5 Hz, 滤光片 3.6 s。通过 LC – MS/MS, 推测帕拉米韦的降解途径及杂质结构。**结果:** 帕拉米韦与各杂质之间分离度良好, 帕拉米韦与 7 个杂质的质量浓度约在 0.2 ~ 12 μg · mL⁻¹ 与峰面积呈良好的线性关系, 定量限为 4.32 ~ 12.8 ng, 检测限为 2.16 ~ 6.44 ng; 杂质 III 的平均回收率 ($n=9$) 为 96.2%, RSD 为 1.8%; 对照溶液和供试品溶液在室温条件下放置 102 h 内稳定; 微调液相色谱参数后, 对有关物质的检测结果无影响。根据 LC – MS/MS, 推测了降解杂质的结构及可能的降解途径。**结论:** 该方法用于测定帕拉米韦注射液的有关物质准确、可靠, 专属性强, 为建立该品种质量标准提供研究基础。

关键词: 帕拉米韦注射液; 高效液相色谱; 电喷雾检测器; 杂质谱解析; 有关物质

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254 – 1793(2024)12 – 2105 – 09

doi: 10.16155/j.0254 – 1793.2024 – 0272

Determination of related substances and impurity profile in peramivir injection by HPLC – CAD

FANG Si – meng, DUAN Xi – yu, SUI Yu – rong, LU Xin,
HAN Xiao – jie*, BAI Hai – jiao*

(Tianjin Institute for Drug Control, Tianjin 300070, China)

Abstract Objective: To establish an HPLC – CAD method for the determination of related substances in peramivir injection and to analyze the impurity profile. **Methods:** Welch Ultimate Polar RP column (250 mm × 4.6 mm, 3.5 μm) was used with 5 mmol · L⁻¹ ammonium formate solution (pH adjusted to 4.6 with formic acid) – acetonitrile (95:5) as mobile phase A and mobile phase A – acetonitrile (50:50) as mobile phase B under gradient elution at the flow rate of 0.8 mL · min⁻¹. Column temperature was 30 °C. CAD atomizer temperature was 50 °C, acquisition frequency was 5 Hz and filter was 3.6 s. The degradation pathway and impurity structure of peramivir were estimated by LC – MS/MS. **Results:** The separation between peramivir and the impurities was good. The mass concentration of peramivir and 7 impurities showed good linear relationships with the peak area in the ranges of 0.2 – 12 μg · mL⁻¹. The limits of quantitation were 4.32 – 12.8 ng, and the limits of detection were 2.16 – 6.44 ng. The average recovery ($n=9$) of

* 通信作者 韩晓捷 Tel: (022)23374073; E – mail: hxjtide@163.com

白海娇 Tel: (022)23374073; E – mail: bhjdx@163.com

第一作者 Tel: (022)23374073; E – mail: fangsimeng521@163.com

impurity III was 96.2%, RSD was 1.8%. The control solution and the test product solution were stable for 102 hours at room temperature. After fine-tuning the parameters of liquid chromatography, there was no influence on the detection results of related substances. Based on LC-MS/MS, the structure and possible degradation pathway of the degraded related substances were deduced. **Conclusion:** This method is accurate, reliable and specific for the determination of related substances in peramivir injection, and provides a basis for the establishment of quality standards for this variety.

Keywords: peramivir injection; HPLC; electrospray detector; impurity profile analysis; related substances

帕拉米韦, 化学名称为(1*S*, 2*S*, 3*R*, 4*R*) - 3 - [(1*S*) - 1 - (乙酰氨基) - 2 - 乙基丁基] - 4 - 氨基 - 2 - 羟基环戊烷羧酸三水合物, 分子式为 $C_{15}H_{28}N_4O_4 \cdot 3H_2O$ ^[1]。帕拉米韦是 BioCryst 公司开发的以流感病毒表面糖蛋白神经氨酸酶为作用靶点的新型环戊烷类抗流感病毒制剂, 是世界首个静脉给药制剂^[2-3]。2013 年 12 月 FDA 接受了 BioCryst 公司的新药注册申请(NDA), 并于 2014 年 12 月批准上市。2013 年 4 月, 国家药品监督管理局批准了广州南新的抗流感新药帕拉米韦氯化钠注射液, 现有临床试验数据证明其对甲型和乙型流感有效。帕拉米韦是第一个批准的静脉应用的神经氨酸酶抑制剂, 可用于各年龄段人群。

帕拉米韦原料药及制剂的质量标准尚未被各国药典收载。经查阅文献, 帕拉米韦有多种合成路线, 目前各企业根据合成工艺及质量研究结果制定相应的质量标准^[4-6]。由于帕拉米韦的分子结构无生色基团, 从其紫外谱图可知, 其最大吸收波长在 208 nm 左右, 因此, 如采用紫外检测器需在低波长条件下进行检测, 导致流动相、缓冲盐、离子对试剂等均对有关物质检测, 但 HPLC-UV 方法中不同杂质的校正因子不同, 按不加校正因子的主成分对照法计算, 存在杂质质量计算不准确的情况, 对试验结果有较大影响^[7-10]。国家药品监督管理局批准的帕拉米韦氯化钠注射液标准(标准号 YBH00862017)中有关物质项下未规定已知杂质, 本研究建立了高效液相色谱法-电喷雾检测器法, 结合帕拉米韦的工艺过程和降解途径, 对表 1 中 7 个已知杂质进行定量测定。电子喷雾检测器(CAD)是通用型检测器, 检测器的响应值不依赖于被测物质的化学结构, 只与被测物质的进样质量有关, 具有较高的响应一致性^[11-12]。通过系统的方法学验证, 本法测定准确、可靠, 专属性强, 可为帕拉米韦注射液的有关物质测定提供一种新的检测方法。

1 仪器与试剂

Thermo Fisher Scientific Dionex Ultimate 3000 型高效液相色谱仪和 CoronaVevo RS 电喷雾检测器, Chromeleon 色谱工作站; Thermo Fisher Vanquish UP-LC-Orbitrap Exploris 480 高分辨质谱仪; Mettler Toledo XS205 十万分之一分析天平。

帕拉米韦对照品(中国食品药品检定研究院, 批号 101260-202203, 含量 85.0%), 帕拉米韦注射液(天津某企业提供, 规格 60 mL: 300 mg, 批号 2023112001、2023112002、2023112003), 对照品杂质 I(批号 20210901, 含量 96.13%)、杂质 II(批号 20210902, 含量 99.36%)、杂质 III(批号 20210801, 含量 98.25%)、杂质 IV(批号 20220401, 含量 99.93%)、杂质 V(批号 20210401, 含量 99.96%)、杂质 VI(批号 20220301, 含量 95.90%) 和杂质 VII(批号 20211101, 含量 98.11%) 均来源于深圳市恒丰万达医药科技有限公司, 乙腈(液质级, 天津康科德公司); 甲酸铵及甲酸(液质级, Fisher Scientific 公司), 水为 Millipore 超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

采用 Welch Ultimate Polar RP (250 mm × 4.6 mm, 3.5 μm) 色谱柱; 以 5 mmol · L⁻¹ 甲酸铵(用甲酸调 pH 至 4.6) - 乙腈(95:5) 为流动相 A, 以流动相 A - 乙腈(50:50) 为流动相 B, 梯度洗脱(见表 2), 进样体积 20 μL, 流速 0.8 mL · min⁻¹ 柱温 30 °C; Corona 电喷雾检测器: 采集频率 5 Hz, 过滤常数 3.6 s, 温度 50 °C, 氮气压力 0.41 MPa。

2.2 溶液配制

2.2.1 空白辅料溶液 称取氯化钠 540 mg, 加水 60 mL 溶解, 摇匀, 即得。

2.2.2 供试品溶液 精密量取帕拉米韦注射液 10 mL, 加水稀释至 25 mL, 制成 2 mg · mL⁻¹ 的供试品溶液。

表 1 帕拉米韦及其有关物质的结构式、分子式及相对分子质量

Tab. 1 The structural formula, molecular formula and relative molecular mass (M_r) of peramivir and related substances

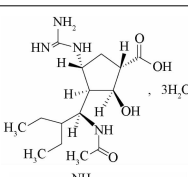
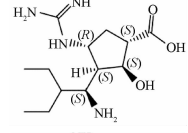
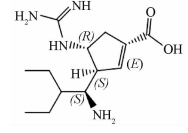
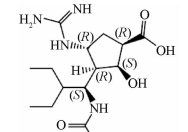
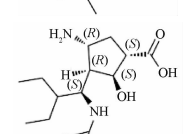
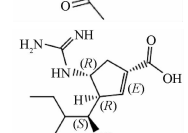
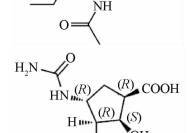
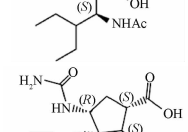
化合物 (compound)	结构式 (structure)	分子式 (molecular formula)	M_r
帕拉米韦 (peramivir)		$C_{15}H_{28}N_4O_4$	328.21
杂质 I (impurity I)		$C_{13}H_{26}N_4O_3$	286.20
杂质 II (impurity II)		$C_{13}H_{24}N_4O_2$	268.19
杂质 III (impurity III)		$C_{15}H_{28}N_4O_4$	328.21
杂质 IV (impurity IV)		$C_{14}H_{26}N_2O_4$	286.19
杂质 V (impurity V)		$C_{15}H_{26}N_4O_3$	310.20
杂质 VI (impurity VI)		$C_{15}H_{27}N_3O_5$	329.19
杂质 VII (impurity VII)		$C_{15}H_{27}N_3O_5$	329.19

表 2 洗脱程序表

Tab. 2 Gradient elution table

t/min	流动相比例 (ratio of mobile phase) / %	
	A	B
0	100	0
5	100	0
40	0	100
45	0	100
46	100	0
55	100	0

2.2.3 对照溶液 精密量取供试品溶液 3 mL, 置 20 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 精密量取 1 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 作为对照溶液。

2.2.4 帕拉米韦对照品溶液 精密称取帕拉米韦对照品 20 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为帕拉米韦对照品溶液。

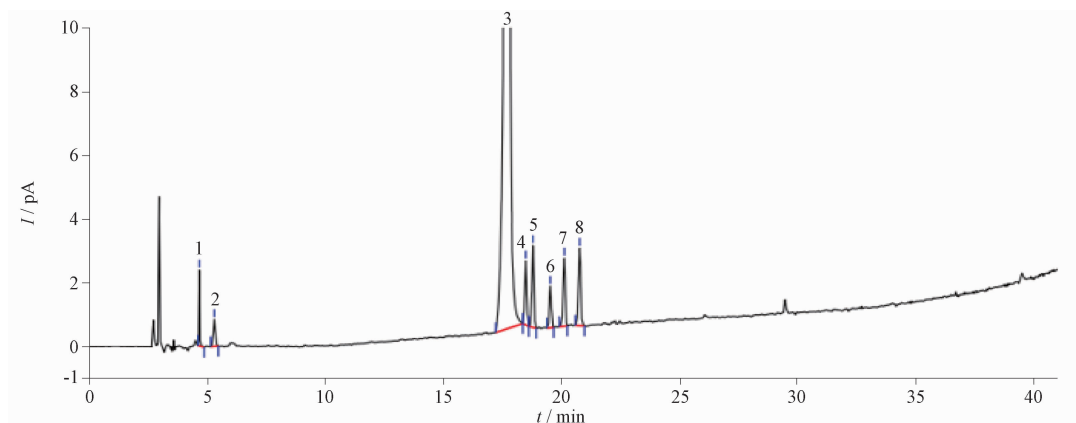
2.2.5 杂质对照品溶液 精密称取对照品杂质 I、杂质 II、杂质 III、杂质 IV、杂质 V、杂质 VI 和杂质 VII 适量, 分别加水制成 $0.6 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的杂质对照品溶液。

2.2.6 系统适用性溶液 精密称取帕拉米韦对照品 20 mg, 置 10 mL 量瓶中, 加水适量溶解, 分别精密量取各杂质对照品溶液 0.05 mL, 加水稀释至刻度, 摇匀, 即得。

2.3 专属性和系统适用性试验

分别取空白溶剂(水)、空白辅料溶液、帕拉米韦对照品溶液、杂质对照品溶液、系统适用性溶液、对

照溶液及供试品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样, 记录色谱图。空白溶剂、空白辅料不干扰帕拉米韦的有关物质测定, 系统适用性溶液中出峰顺序依次为杂质 I、杂质 II、帕拉米韦、杂质 III、杂质 IV、杂质 V、杂质 VI、杂质 VII, 各峰之间的最小分离度为 2.0, 帕拉米韦的拖尾因子为 1.3, 帕拉米韦峰理论塔板数为 91 119, 均符合要求。典型色谱图见图 1。



1. 杂质 I (impurity I) 2. 杂质 II (impurity II) 3. 帕拉米韦(peramivir) 4. 杂质 III (impurity III) 5. 杂质 IV (impurity IV) 6. 杂质 V (impurity V) 7. 杂质 VI (impurity VI) 8. 杂质 VII (impurity VII)

图 1 系统适用性色谱图

Fig. 1 System suitability chromatogram

2.4 强制降解试验

取帕拉米韦注射液 4 mL, 加水稀释至 10 mL, 摇匀, 作为未降解样品。强制降解样品溶液配制方法如下: (1) 加热降解: 取帕拉米韦注射液 4 mL, 70 °C 加热 8 h, 放冷, 加水稀释至 10 mL; (2) 酸降解: 取帕拉米韦注射液 4 mL, 加 5 mol · L⁻¹ 盐酸溶液 1 mL, 70 °C 加热 1 h 后, 加 5 mol · L⁻¹ 氢氧化钠溶液 1 mL, 放冷, 加水稀释至 10 mL; (3) 碱降解: 取帕拉米韦注射液 4 mL, 加 5 mol · L⁻¹ 氢氧化钠溶液 1 mL, 70 °C 加热 1 h 后, 加 5 mol · L⁻¹ 盐酸溶液 1 mL, 放冷, 加水稀释至 10 mL; (4) 氧化降解: 取帕拉米韦注射液 4 mL, 加 30% 过氧化氢溶液 1 mL, 70 °C 加热 0.5 h, 放冷, 加水稀释至 10 mL; (5) 光照降解: 取帕拉米韦注射液 4 mL, 于 (4 500 ± 500) lx 条件下放置 110 d, 加水稀释至 10 mL。降解试验色谱图见图 2。

结果表明, 帕拉米韦注射液在加热、光照条件下较为稳定, 在酸、碱、氧化条件下易降解。在酸性条件下, 主要降解产物为杂质 I; 在碱性条件下, 主要降解产物为杂质 III、杂质 IV 和杂质 VI。

2.5 线性范围及校正因子

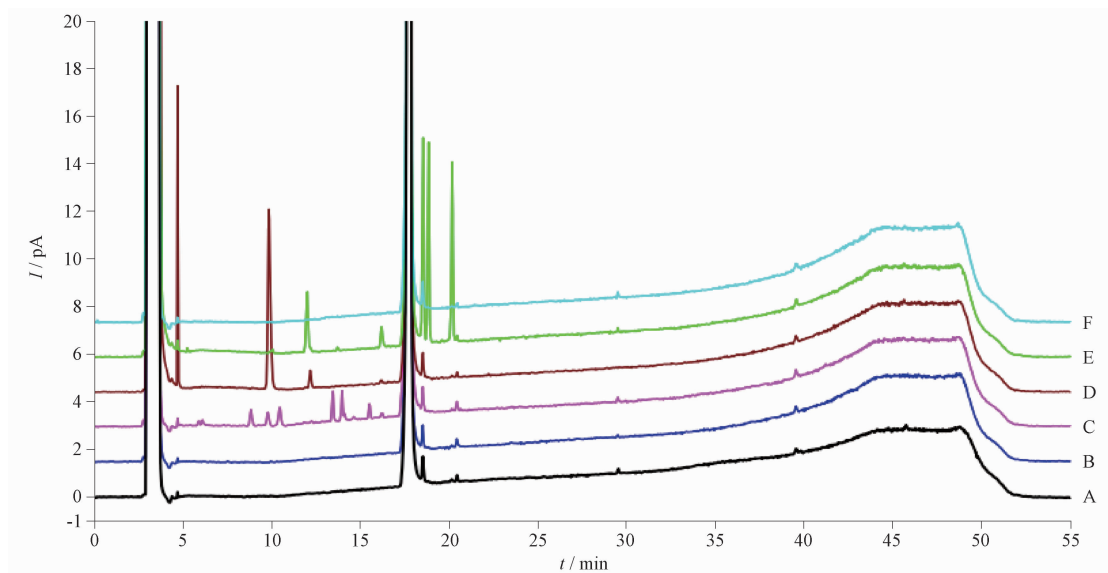
精密称取帕拉米韦、杂质 I、杂质 II、杂质 III、杂质 IV、杂质 V、杂质 VI 和杂质 VII 的对照品适量, 加水稀释制成质量浓度约为 12、6、2、1、0.6、0.2 μg · mL⁻¹ 的混合对照品溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样, 记录色谱图, 以峰面积对质量浓度进行线性回归, 计算回归方程, 校正因子采用斜率比值法计算, 结果见表 3。

2.6 定量限和检测限

取“2.5”项下混合对照品溶液, 用水稀释至信噪比(S/N)约为 10:1 相对应的浓度, 为定量限试验用溶液; 用溶剂稀释至信噪比约为 3:1 相对应的浓度, 为检测限试验用溶液, 测得的帕拉米韦及杂质的定量限和检测限结果见表 4。

2.7 重复性试验

取批号为 2023112001 的帕拉米韦注射液, 按“2.2.2”项下方法平行配制 6 份供试品溶液, 按“2.2.3”项下方法配制对照溶液, 按“2.1”项下色谱条件进样, 记录色谱图, 按加校正因子的自身稀释对照法进行计算, 样品中仅检出杂质 III, 其检出量均值为 0.06%, RSD 为 3.8%。



A. 未降解(undegraded sample) B. 光照降解(light degradation) C. 氧化降解(oxidation degradation) D. 酸降解(acid degradation) E. 碱降解(base degradation) F. 加热降解(heat degradation)

图2 帕拉米韦注射液强制降解试验色谱图

Fig. 2 Chromatogram of forced degradation test of peramivir injection

表3 帕拉米韦及杂质的线性结果

Tab.3 Linearity of peramivir and impurities

化合物 (compound)	线性方程 (linear equation)	<i>r</i>	线性范围 (linear range)/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	校正因子 (correction factor)
帕拉米韦(peramivir)	$Y=0.0792X+0.0127$	0.9992	0.216~10.804	1.0
杂质I(impurity I)	$Y=0.0387X-0.00340$	0.9994	0.252~12.593	2.0
杂质II(impurity II)	$Y=0.0235X+0.00440$	0.9999	0.639~15.971	3.4
杂质III(impurity III)	$Y=0.0562X+0.00850$	0.9995	0.252~12.608	1.4
杂质IV(impurity IV)	$Y=0.0680X+0.0154$	0.9990	0.247~12.361	1.2
杂质V(impurity V)	$Y=0.0330X+0.0069$	0.9995	0.385~19.272	2.4
杂质VI(impurity VI)	$Y=0.0696X+0.0026$	0.9998	0.243~12.151	1.1
杂质VII(impurity VII)	$Y=0.0769X+0.0078$	0.9994	0.256~12.822	1.0

表4 帕拉米韦及杂质的定量限和检测限结果

Tab.4 LOQ and LOD of Peramivir and impurities

化合物 (compound)	定量限(LOQ)		检测限(LOD)	
	浓度(concentration)/%	质量(mass)/ng	浓度(concentration)/%	质量(mass)/ng
帕拉米韦(peramivir)	0.011	4.32	0.005	2.16
杂质I(impurity I)	0.013	5.04	0.006	2.52
杂质II(impurity II)	0.032	12.8	0.016	6.44
杂质III(impurity III)	0.013	5.04	0.006	2.52
杂质IV(impurity IV)	0.012	4.94	0.006	2.47
杂质V(impurity V)	0.019	7.70	0.010	3.85
杂质VI(impurity VI)	0.012	4.86	0.006	2.43
杂质VII(impurity VII)	0.013	5.12	0.006	2.56

2.8 稳定性试验

分别取“2.7”项下新配制的对照溶液和供试品溶液(批号 2023112001),分别于室温条件下放置 0、6、12、24、48、72、102 h,进样测定,计算各成分峰面积 RSD,结果显示在对照溶液中主峰峰面积 RSD 为 1.2%;供试品溶液主峰及杂质Ⅲ的峰面积 RSD 分别为 1.3%、3.8%,结果显示对照溶液和供试品溶液稳定性良好。

2.9 加样回收率试验

精密量取批号为 2023112001 的帕拉米韦注射液适量,分别精密加入杂质Ⅲ对照品溶液,使得加入杂质Ⅲ的浓度分别为 0.012%、0.12%、0.18% 的溶液各 3 份,制成 9 份终浓度为 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的供试品溶液。在上述色谱条件下进样,记录色谱图。杂质Ⅲ的测得量要扣除按“2.7”项下测定的基础供试品中

杂质Ⅲ的含量,按加校正因子的自身稀释对照法计算,9 份样品的杂质Ⅲ的回收率在 94.0%~100.1%,均值为 96.2%,RSD 为 1.8%。

2.10 耐用性试验

分别考察了高效液相色谱系统参数变化和样品制备系统参数变化的耐用性。高效液相色谱系统参数考察包括流动相中乙腈的比例 $\pm 1\%$ 、流动相 pH ± 0.1 、流速 $\pm 0.1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 、柱温 $\pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ 。各条件下系统适用性试验符合要求,杂质测定结果 RSD $< 5\%$,色谱图杂质谱特征一致,高效液相色谱系统数耐用性良好。

2.11 样品测定

取 3 批帕拉米韦注射液供试品,按“2.2.2”项下方法分别制备供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件进行测定,记录峰面积,以加校正因子的主成分自身对照法计算样品中杂质含量,结果见表 5。

表 5 样品测定结果

Tab. 5 Sample determination results

化合物 (compound)	含量(content)/%			拟定限度 (limited)
	批号(lot No.)2023112001	批号(lot No.)2023112002	批号(lot No.)2023112003	
杂质 I (impurity I)	ND	ND	ND	$\leq 0.15\%$
杂质 II (impurity II)	ND	ND	ND	$\leq 0.15\%$
杂质 III (impurity III)	0.06	0.06	0.06	$\leq 0.15\%$
杂质 IV (impurity IV)	ND	ND	ND	$\leq 0.15\%$
杂质 V (impurity V)	ND	ND	ND	$\leq 0.15\%$
杂质 VI (impurity VI)	ND	ND	ND	$\leq 0.15\%$
杂质 VII (impurity VII)	ND	ND	ND	$\leq 0.15\%$
单个未知杂质(other individual impurity)	0.01	0.01	0.01	$\leq 0.15\%$
总杂质(total impurities)	0.07	0.07	0.07	$\leq 0.5\%$

注(note):ND. 未检出(no detected)

3 杂质谱分析

3.1 质谱条件

离子源为 ESI,正、负离子模式检测,喷雾电压 3 400 V(正离子模式)、2 000 V(负离子模式),鞘气 35 Arb,辅助气 10 Arb;吹扫气 0 Arb,离子管传输温度 $320 \text{ }^\circ\text{C}$,CID 碰撞能 40%,扫描范围(m/z) 50~1 500,RF Lens 50%。

3.2 降解杂质结构分析

酸降解产生了保留时间(RT)为 4.7 min 的杂质,在正离子扫描模式下检测到其准分子离子峰 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 为 m/z 287.21,通过 Compound Discoverer 软件预测其分子式为 $\text{C}_{13}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_3$ 。对其进行碰撞裂

解得到相关的二级碎片离子 m/z 270.18,推测为准分子离子 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 发生裂解,脱去 1 个羟基后得到 $[\text{M} + \text{H} - \text{OH}]^+$, m/z 270.18 的碎片离子。经对照品比对后,鉴定该化合物为杂质 I,质谱图见图 3(A)。

碱降解产生了 RT 为 18.5、18.9、20.7 min 的杂质,在正离子扫描模式下检测到 RT 18.5 min、RT 18.9 min 杂质的其准分子离子峰 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 分别为 m/z 329.22 和 287.20,通过 Compound Discoverer 软件预测其分子式为 $\text{C}_{15}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_4$ 和 $\text{C}_{14}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_4$ 。在正离子模式下对 RT 18.5 min 的杂质进行碰撞裂解,得到相关的二级碎片离子 m/z 270.17,推测其准分子离子 $[\text{M} + \text{H}]^+$ 脱去 1 个羟基后又脱去 1 个

乙酰基得到 $[M + H - CO - CH_3 - OH]^+$, 通过查阅相关文献, 该杂质为帕拉米韦的光学异构体杂质 III^[13-14], 质谱图见图 3(B); 在正离子模式下对 RT 18.9 min 的杂质进行碰撞裂解, 得到相关的二级碎片离子 m/z 270.17, 为 $[M + H - OH]^+$, 推测其碎裂途径同杂质 I, 为杂质 I 的同分异构体, 经对照品比对后, 鉴定该化合物为杂质 IV, 质谱图见图 3(C)。

在负离子扫描模式下检测到 RT 20.7 min 杂质的准分子离子峰分别 $[M - H]^-$ 为 m/z 327.20, 通过 Compound Discoverer 软件预测其分子式为 $C_{15}H_{27}N_3O_5$ 。对其进行碰撞裂解得到相关的二级碎片离子 m/z 285.18, 推测为其准分子离子 $[M - H]^-$ 发生裂解, 脱酰胺后得到 $[M - H - CO - NH_2]^-$, m/z 285.18 的碎片离子, 经对照品比对后, 鉴定该化合物为杂质 VI, 质谱图见图 3(D)。

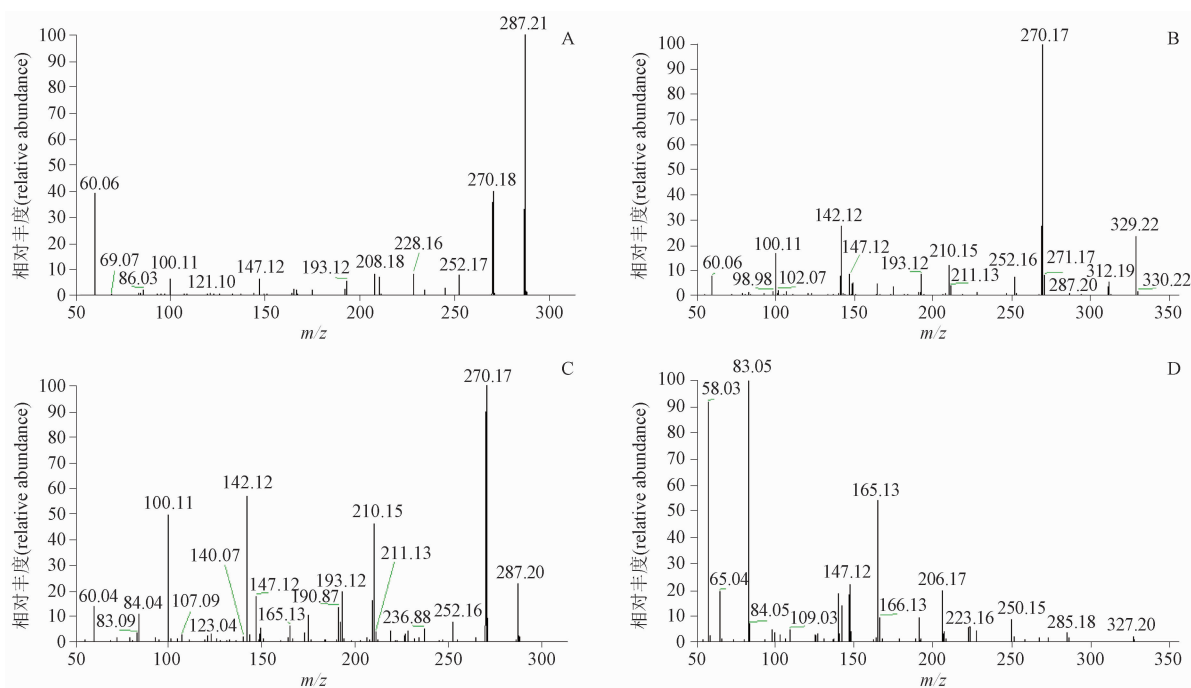


图3 杂质 I (A)、杂质 III (B)、杂质 IV (C)、杂质 VI (D) 的二级质谱图

Fig. 3 MS/MS spectra of impurity I (A), impurity III (B), impurity IV (C) and impurity VI (D)

3.3 杂质谱分析

杂质 VI 可能为帕拉米韦在碱性条件下, 发生酯基水解反应生成酰胺基; 杂质 IV 可能为杂质 VI 进一步降解, 酰胺键水解而生成, 杂质 IV 也是帕拉米韦合成过程的工艺杂质; 杂质 II 可能为帕拉米韦在酸性条件下脱水脱乙酰的产物; 杂质 I 为帕拉米韦在酸性条件下脱乙酰的产物; 杂质 III 为帕拉米韦在碱性条件下, 其母环 1 位的羧甲基发生部分消旋而产生的非对映异构体。此外, 推测杂质 V 可能为帕拉米韦脱水产物^[15], 杂质 VII 为杂质 VI 在碱性条件下的羧甲基发生部分消旋的产物, 推测的帕拉米韦的降解途径见图 4。

4 讨论

4.1 流动相考察

本试验考察了水-乙腈、乙酸铵-乙腈和甲酸

铵-乙腈等流动相体系, 无缓冲盐的体系, 帕拉米韦峰拖尾严重, 需在流动相中添加缓冲盐。考虑到 CAD 检测器的适用性, 优先考察具有挥发性的甲酸铵和乙酸铵, 甲酸铵体系的背景噪音约为同等浓度时乙酸铵体系的 10%, 且 2 个缓冲盐-乙腈体系中杂质保留时间和分离度结果基本一致, 故采用甲酸铵体系。甲酸铵的浓度考察了 5、10、20 $mmol \cdot L^{-1}$, 随着浓度的增大, 帕拉米韦峰的对称性变好, 但检测器的噪音增大, 最终流动相采用 5 $mmol \cdot L^{-1}$ 甲酸铵体系。考察了流动相中水相的 pH 3.0 ~ 6.0, 当 pH 在 4.0 以下时, 主峰后的杂质与主峰分不开, 当 pH 在 5.0 以上时, 杂质 III 与杂质 IV、杂质 V 和杂质 VI 不能达到基线分离, 经考察, 水相的 pH 为 4.6 ± 0.1 时, 各峰之间分离度符合规定。

- [2] PMDA. Peramivir Injection PMDA Drug Review Report. Edition 9 [DB/OL]. [2024 - 04 - 23]. <https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuSearch>
- [3] EMA. Peramivir Injection EMA Assessment Report [DB/OL]. (2018 - 02 - 22) [2024 - 04 - 23]. <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/alpivab>
- [4] 彭琳琳, 徐志. 帕拉米韦的合成及临床应用进展[J]. 国外医药(抗生素分册), 2020, 41(5): 354
PENG LL, XU Z. Progress in synthesis and clinical application of peramivir[J]. *World Notes Antibiot*, 2020, 41(5): 354
- [5] CHAND P, KOTIAN PL, DEHGhani A, *et al.* Systematic structure - based design and stereoselective synthesis of novel multisubstituted cyclopentane derivatives with potent Antiinfluenza activity [J]. *J Med Chem*, 2001, 44(25): 4379
- [6] 王伟强, 龚俊, 张艳秋, 等. 一种合成帕拉米韦的方法: 中国, CN116425659A[P]. 2023 - 07 - 14
WANG WQ, GONG J, ZHANG YQ, *et al.* A Method for Synthesizing Peramivir: China, CN116425659A[P]. 2023 - 07 - 14
- [7] 赵春建, 吕志东, 赵师靖, 等. 帕拉米韦中间体的检测方法: 中国, CN117250295A[P]. 2023 - 12 - 19
ZHAO CJ, LÜ ZD, ZHAO SJ, *et al.* Method for the Detection of Peramivir Intermediates: China, CN117250295A[P]. 2023 - 12 - 19
- [8] 段玺玉, 韩晓捷. 帕拉米韦原料含量测定方法比较研究[J]. 天津药学, 2023, 35(4): 7
DUAN XY, HAN XJ. Comparative study on the determination methods of peramivir raw materials[J]. *Tianjin Pharm*, 2023, 35(4): 7
- [9] 甘薇, 胡律江, 孙勇兵, 等. 帕拉米韦原料药的稳定性研究[J]. 现代药物与临床, 2018, 33(9): 2169
GAN W, HU LJ, SUN YB, *et al.* Stability of peramivir active pharmaceutical ingredient[J]. *Drugs Clin*, 2018, 33(9): 2169
- [10] 罗林, 邹晓东, 胡锦涛, 等. 帕拉米韦有关物质的制备方法和应用: 中国, CN112694421A[P]. 2020 - 12 - 28
LUO L, ZOU XD, HU JL, *et al.* Preparation Method and Application of Peramivir Related Substances: China, CN112694421A [P]. 2020 - 12 - 28
- [11] 刘菁, 吴燕. 新型通用型检测器 - 电喷雾检测器在药物分析中的应用进展[J]. 天津药学, 2022, 34(3): 61
LIU J, WU Y. The application progress of a new common detector - charged aerosol detector in pharmaceutical analysis [J]. *Tianjin Pharm*, 2022, 34(3): 61
- [12] 房思萌, 隋玉荣, 韩晓捷. 高效液相色谱 - 电喷雾检测器测定熊去氧胆酸的有关物质[J]. 药物分析杂志, 2023, 43(9): 1523
FANG SM, SUI YR, HAN XJ. Determination of ursodeoxycholic acid by HPLC - CAD [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2023, 43(9): 1523
- [13] 罗军奇, 万林, 朱海芳. 帕拉米韦杂质 A 与杂质 C 及其制备方法和应用: 中国, CN113880732A[P]. 2021 - 10 - 12
LUO JQ, WAN L, ZHU HF. Preparation Method and Application Thereof of Peramivir Impurity A and Impurity C: China, CN113880732A [P]. 2021 - 10 - 12
- [14] ALUMURI T, MERUGU KS, NAMBURII ALA, *et al.* An antiviral drug - peramivir; degradation and identification of impurities and the endorsement of an HPLC - MS method [J]. *J AOAC Int*, 2023, 106(5): 1138
- [15] 陈良柱, 方炳虎, 陈建新, 等. 电喷雾电离质谱监测合成帕拉米韦的反应副产物[J]. 药物分析杂志, 2009, 29(8): 1327
CHEN LZ, FANG BH, CHEN JX, *et al.* Identification of products formed in side reaction in peramivir synthesis with electrospray ionization - mass spectrometry [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2009, 29(8): 1327
- [16] 张村子, 吕丽娟, 王伟, 等. 帕拉米韦制备过程中手性杂质的控制[J]. 精细化工中间体, 2012, 42(4): 45
ZHANG CZ, LÜ LJ, WANG Y, *et al.* Chiral impurity control in synthesis of peramivir [J]. *Fine Chem Intermediat*, 2012, 42(4): 45

(本文于2024年4月23日收到)