

盐酸地巴唑原料药和片剂中有关物质的测定及最大未知杂质结构的推测^Δ

陈宇堃*, 梁蔚阳[#](广东省药品检验所/国家药品监督管理局血液制品质量控制重点实验室/广东省药品监督管理局血液制品质量控制研究重点实验室, 广州 510663)

中图分类号 R927.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2020)06-0696-07

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2020.06.12

摘要 目的:建立测定盐酸地巴唑原料药及片剂中有关物质的方法,并对其最大未知杂质的结构进行推测。方法:采用高效液相色谱法测定盐酸地巴唑原料药及片剂中的有关物质(邻苯二胺、苯乙酸),色谱柱为KromasilC₁₈,流动相为水-甲醇-冰醋酸-三乙胺(45:55:0.5:0.5, V/V/V/V),流速为1.0 mL/min,检测波长为220 nm,柱温为30 ℃,进样量为10 μL。采用超高效液相色谱-飞行时间质谱法、氢谱、碳谱推测最大未知杂质的结构,色谱柱为Waters Acquity UPLC BEH C₁₈,流动相为水-甲醇(45:55, V/V),流速为0.2 mL/min,柱温为30 ℃,进样量为1 μL,离子源为电喷雾离子源(ESI),扫描模式为负离子扫描模式,一级质谱扫描范围为 m/z 100~800,毛细管电压为3 000 V,离子源温度为100 ℃,去溶剂气体为氮气,去溶剂气体流速为600 L/h,锥孔流速为50 L/h。结果:邻苯二胺、苯乙酸、盐酸地巴唑检测质量浓度的线性范围为0.427~4.27 μg/mL($r=0.998\ 9$)、0.403~4.03 μg/mL($r=0.998\ 9$)、0.82~8.20 μg/mL($r=0.999\ 9$);定量限分别为0.042 7、0.134 3、0.088 7 μg/mL,检测限分别为0.021 4、0.067 1、0.044 3 μg/mL;精密性、稳定性、重复性、耐用性试验的RSD均小于2%;邻苯二胺的加样回收率为98.31%~102.81%(RSD=1.60%, $n=9$)、苯乙酸为99.78%~102.23%(RSD=0.70%, $n=9$)。6批盐酸地巴唑原料药中均未检出邻苯二胺,苯乙酸含量为0~0.04%,最大未知杂质含量为0.05%~0.25%,未知杂质总量为0.05%~0.31%;77批盐酸地巴唑片剂中,邻苯二胺含量为0~0.11%,苯乙酸含量为0~0.03%,最大未知杂质含量为0.06%~0.51%,未知杂质总量为0.10%~0.62%。推测最大未知杂质为2-(羟苯基甲基)苯并咪唑(羟苕唑)。结论:所建方法快速、准确、专属性好,可用于测定盐酸地巴唑原料药及片剂中的有关物质。最大未知杂质可能为苕唑类化合物。

关键词 盐酸地巴唑原料药;盐酸地巴唑片剂;高效液相色谱法;有关物质;超高效液相色谱-飞行时间质谱法;杂质;结构鉴定

Determination of Related Substances in Dibazol Hydrochloride Raw Materials and Tablets and Structure Prediction of Maximum Unknown Impurity

CHEN Yukun, LIANG Weiyang (Guangdong Institute for Drug Control/NMPA Key Laboratory for Quality Control of Blood Products/Guangdong Drug Administration Key Laboratory of Quality Control and Research of Blood Products, Guangzhou 510663, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determination of related substances in dibazol hydrochloride raw materials and tablets, and to predict the maximum unknown impurity's structure. METHODS: The related substances (*o*-phenylenediamine, phenylacetic acid) in dibazol hydrochloride raw materials and tablets were determined by HPLC. The determination was performed on Kromasil C₁₈ column with mobile phase consisted of mobile phase-methanol-glacial acetic acid-triethylamine (45:55:0.5:0.5, V/V/V/V) at the flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 220 nm, and column temperature was 30 ℃. Sample size was 10 μL. UPLC-TOF-MS, ¹H-NMR and ¹³C-NMR were used for structure prediction. The determination was performed on Waters Acquity UPLC BEH C₁₈ column with mobile phase consisted of water-methanol (45:55, V/V) at the flow rate of 0.2 mL/min. The column temperature was 30 ℃, and sample size was 1 μL. The ion source was electrospray ion source. The scanning mode was negative ion scanning mode. The first-order mass spectrum scanning range was m/z 100-800, the capillary voltage was 3 000 V, the source temperature was 100 ℃, the desolvent gas was nitrogen, and the solvent free gas flow rate was 600 L/h. The flow rate of the conical orifice was 50 L/h. RESULTS: The linear range of *o*-phenylenediamine, phenylacetic acid and dibazol hydrochloride were 0.427-4.27 μg/mL ($r=0.998\ 9$), 0.403-4.03 μg/mL ($r=0.998\ 9$) and 0.82-8.20 μg/mL ($r=0.999\ 9$), respectively. The limits of quantitation were 0.042 7, 0.134 3, 0.088 7 μg/mL. The limits of detection were 0.021 4, 0.067 1, 0.044 3 μg/mL. RSDs of precision, stability, reproducibility and durability tests were all less than 2%. The average recoveries were 98.31% - 102.81% for *o*-phenylenediamine (RSD=1.60%, $n=9$), and 99.78% - 102.23% for phenylacetic acid (RSD=0.70%, $n=9$). No *o*-phenylenediamine was detected in 6 batches of dibazol hydrochloride raw materials; the contents of phenylacetic acid

^Δ 基金项目:广东省科技计划项目(No.2015A030402004);广东省医学科学技术研究基金项目(No.B2018130, No.B2018220);广东省食品药品监督管理局科技创新项目(No.2019ZDZ23, No.2018YDB02)

* 副主任药师。研究方向:生化药品和生物制品质量控制。电话:020-81848209。E-mail:bettycyk@163.com

[#] 通信作者:主任药师,硕士。研究方向:生化药品和生物制品评价与质量控制。电话:020-81848209。E-mail:wl-1023@163.com

were 0-0.04% ; the contents of maximum unknown impurity were 0.05% -0.25% ; total contents of unknown impurity were 0.05% -0.31% . In 77 batches of Dibasol hydrochloride tablets, the contents of *o*-phenylenediamine were 0-0.11% , the contents of phenylacetic acid were 0-0.03% ; the contents of maximum unknown impurity were 0.06% -0.51% ; total contents of unknown impurity were 0.10% -0.62% . It was speculated that maximum unknown impurity was 2-(hydroxyphenylmethyl) benzimidazole (hydrobenzde). CONCLUSIONS: Established method is rapid, accurate and specific, and can be used for the determination of related substances in dibasol hydrochloride raw materials and tablets. The maximum unknown impurity may be benzimidazoles.

KEYWORDS Dibasol hydrochloride raw materials; Dibasol hydrochloride tablets; HPLC; Related substance; UPLC-TOF-MS; Impurity; Structure identification

地巴唑为血管扩张降压药,具有直接松弛血管平滑肌的作用,可通过降低外周阻力而降低血压,缓解胃肠平滑肌痉挛,对中枢神经系统有轻度兴奋作用^[1]。该药主要用于治疗轻度高血压、脑血管痉挛、胃肠平滑肌痉挛、脊髓灰质炎后遗症、外周颜面神经麻痹和妊娠后高血压综合征^[2]。有研究发现,地巴唑的血管舒张作用可能与其可通过非活化钙通道而阻断钙离子进入平滑肌细胞有关^[3]。近年来,临床发现其在预防脑缺血疾病方面具有积极作用^[4]。也有研究发现,地巴唑联合养血清脑颗粒可用于治疗血管性头痛^[5]。

邻苯二胺与苯乙酸是盐酸地巴唑的合成原料,两者在氮气保护下于160~240℃加热数小时后可得到地巴唑,再加入适量稀盐酸,经重结晶后即可得盐酸地巴唑,也是其有关物质的来源^[6]。虽然,盐酸地巴唑原料药收载于《国家药品标准修订件》^[7]中,但仅涉及干燥失重、炽灼残渣、重金属与砷盐检查项;盐酸地巴唑片收载于《卫生部药品标准—化学药品及标准》^[8]中,但仅有重量差异与崩解时限检查项;此外,上述两个标准制定时间久远,一直未有更新,且均缺乏有关物质、杂质检查项。基于此,本研究采用高效液相色谱法(HPLC)测定了盐酸地巴唑原料药及片剂中的有关物质,并以超高效液相色谱-飞行时间质谱法(UPLC-TOF-MS)、氢谱(¹H-NMR)和碳谱(¹³C-NMR)对其中峰面积最大的未知杂质(以下简称“最大未知杂质”)的结构进行推测,旨为其质量控制的完善提供参考。

1 材料

1.1 仪器

2695型HPLC仪(包括2478型紫外检测器、Empower 2色谱工作站)、E2695型HPLC仪(包括2998型二极管阵列检测器、Empower 2色谱工作站)均购自美国Waters公司;Acquity H Class UPLC/G2 QToF型UPLC-TOF-MS仪(美国Waters公司);AVANCE III HD 600型超导脉冲傅里叶变换核磁共振谱仪(瑞士Bruker公司);CAP225D型十万分之一电子天平(德国Sartorius公司);ED53型干燥箱(德国Binder公司)。

1.2 药品与试剂

盐酸地巴唑对照品(中国食品药品检定研究院,批号:100420-201002,纯度:98.9%);邻苯二胺对照品(江

阴市华亚化工有限公司,批号:10511140401,纯度:99.3%);苯乙酸对照品(河北诚信有限责任公司,批号:12011140501,纯度:99.5%);盐酸地巴唑原料药6批(企业A,批号:A1~A3;企业B,批号:B01~B03)、盐酸地巴唑片77批(企业B,批号:B1~B7;企业C,批号:C1~C7;企业D,批号:D1~D8;企业E,批号:E1;企业F,批号:F1;企业G,批号:G1~G6;企业H,批号:H1~H12;企业I,批号:I1;企业J,批号:J1~J8;企业K,批号:K1~K10;企业L,批号:L1~L16),规格均为每片含盐酸地巴唑10 mg;最大未知杂质(企业A,批号:A01);亮氨酸脑啡肽溶液(美国Waters公司,批号:W27011702);甲醇、冰醋酸、三乙胺均为色谱纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 有关物质测定的HPLC色谱条件

色谱柱:Kromasil C₁₈(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:水-甲醇-冰醋酸-三乙胺(45:55:0.5:0.5, V/V/V/V);流速:1.0 mL/min;柱温:30℃;检测波长:220 nm;进样量:10 μL。

2.2 溶液的制备

2.2.1 系统适用性混合对照品溶液 取邻苯二胺、苯乙酸、盐酸地巴唑对照品适量,加流动相溶解,制成邻苯二胺、苯乙酸、盐酸地巴唑质量浓度分别为1.5、1.5、1 000 μg/mL的系统适用性混合对照品溶液。

2.2.2 混合对照品贮备液 分别精密称取邻苯二胺、苯乙酸对照品适量,加流动相溶解,制成邻苯二胺、苯乙酸质量浓度均为0.15 mg/mL的混合对照品贮备液。

2.2.3 混合对照品溶液 精密量取“2.2.2”项下混合对照品贮备液适量,另取盐酸地巴唑对照品适量,置于100 mL量瓶中,加流动相溶解,制成邻苯二胺、苯乙酸、盐酸地巴唑质量浓度分别为1.5、1.5、5 μg/mL的混合对照品溶液。

2.2.4 原料药供试品溶液 精密称取盐酸地巴唑原料药适量,加流动相溶解,制成质量浓度为1 mg/mL的原料药供试品溶液。

2.2.5 片剂供试品溶液 取盐酸地巴唑片50片,精密称定,置于研钵中研磨,取适量,加流动相溶解,制成质量浓度为1 mg/mL的片剂供试品溶液。

2.2.6 阴性对照溶液 按企业J的处方工艺,制备缺盐

酸地巴唑的阴性样品,按“2.2.5”项下方法制备阴性对照溶液。

2.3 检测波长的选择

取“2.2.1”项下系统适用性混合对照品溶液,按“2.1”项下色谱条件,于200~300 nm波长范围内进行全波长扫描。结果,邻苯二胺于212.6 nm波长处有最大吸收,苯乙酸与单个最大未知杂质均于219.6 nm波长处有最大吸收,盐酸地巴唑于222.8 nm波长处有最大吸收,故选择检测波长为220 nm,详见图1。

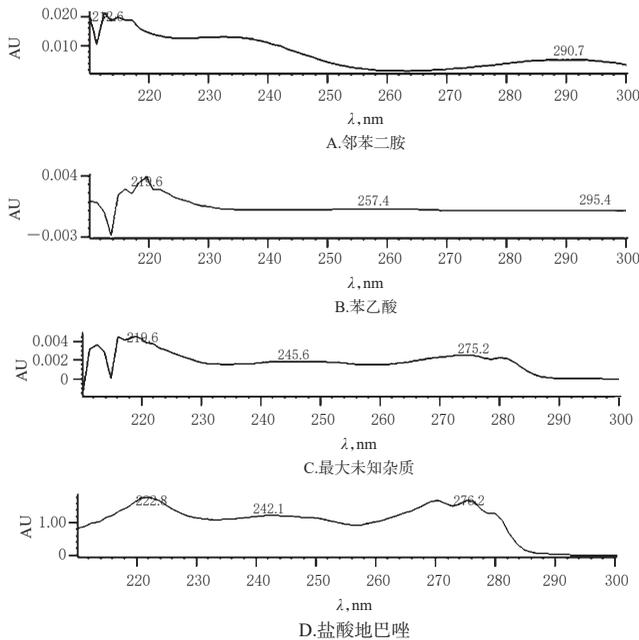


图1 最大吸收波长的扫描结果

Fig 1 Scanning results of maximum absorption wavelength

2.4 系统适用性试验

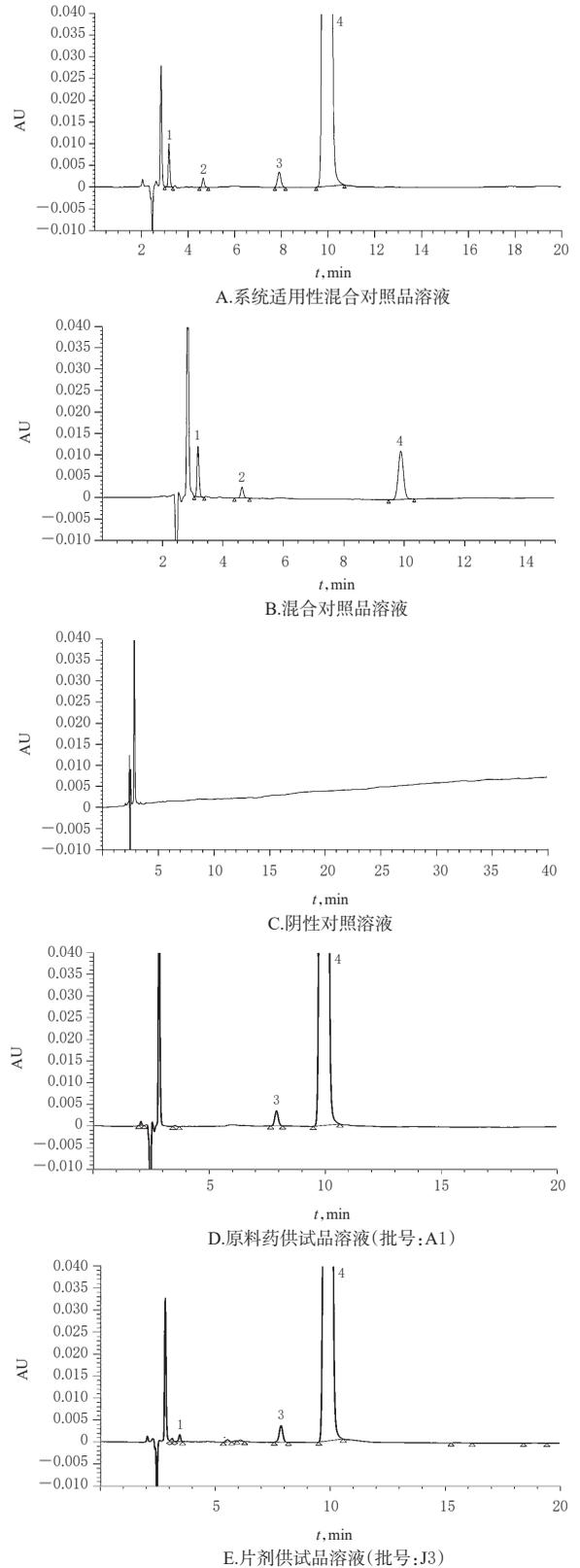
分别取“2.2”项下系统适用性混合对照品溶液、混合对照品溶液、原料药供试品溶液、片剂供试品溶液、阴性对照溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,详见图2。由图2可知,邻苯二胺峰、苯乙酸峰、最大未知杂质峰与盐酸地巴唑峰的分离度均大于5.52,理论板数均大于6 800,阴性对照对测定无干扰。

2.5 破坏性试验

2.5.1 酸破坏样品溶液的制备 取盐酸地巴唑原料药(批号:A1)适量,加入1 mol/L盐酸溶液1 mL,放置1 h后,加入1 mol/L氢氧化钠溶液中和,加流动相稀释,制成盐酸地巴唑质量浓度为1 mg/mL的酸破坏样品溶液。

2.5.2 碱破坏样品溶液的制备 取盐酸地巴唑原料药(批号:A1)适量,加入1 mol/L氢氧化钠溶液1 mL,放置1 h后,加入1 mol/L盐酸溶液中和,加流动相稀释,制成盐酸地巴唑质量浓度为1 mg/mL的碱破坏样品溶液。

2.5.3 氧化破坏样品溶液的制备 取盐酸地巴唑原料药(批号:A1)适量,加入30%过氧化氢溶液1 mL,放置



注:1.邻苯二胺;2.苯乙酸;3.最大未知杂质;4.盐酸地巴唑

Note: 1. *o*-phenylenediamine; 2. phenylacetic acid; 3. maximum unknown impurity; 4. dibazol hydrochloride

图2 系统适用性试验的高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms of system suitability tests

1 h后,加流动相稀释,制成盐酸地巴唑质量浓度为1 mg/mL的氧化破坏样品溶液。

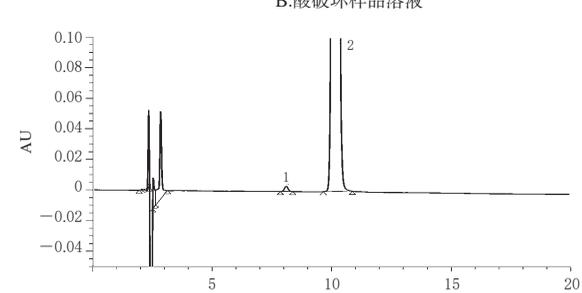
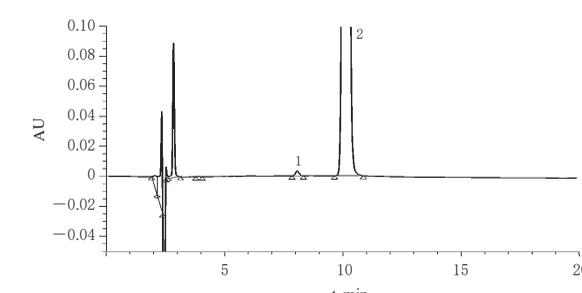
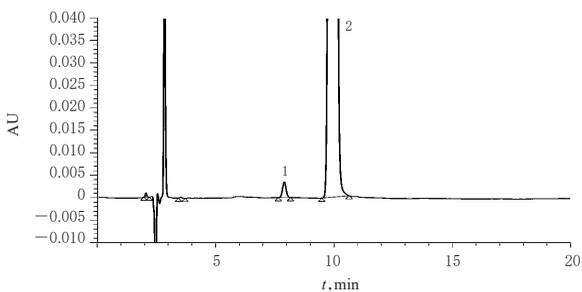
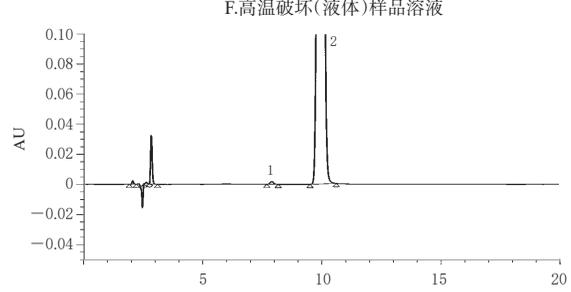
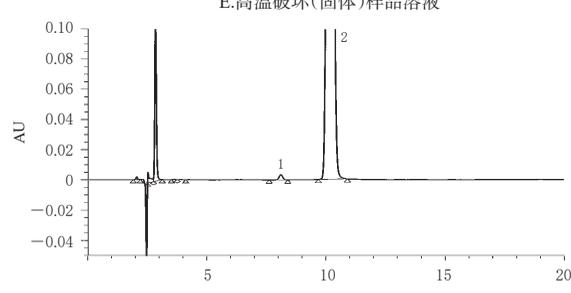
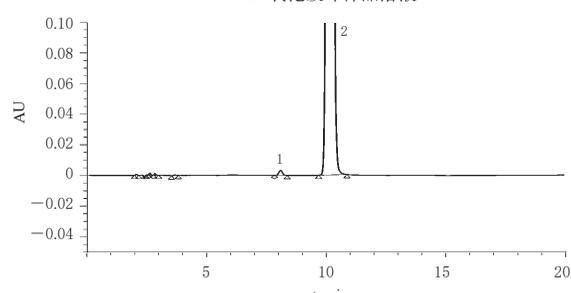
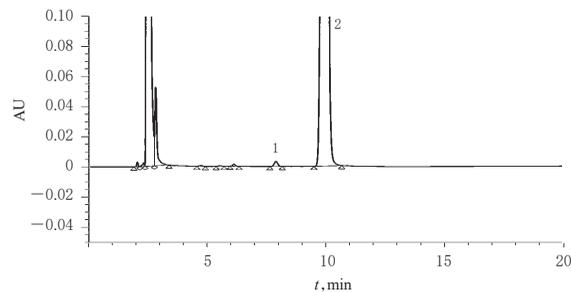
2.5.4 高温破坏(固体)样品溶液的制备 取盐酸地巴唑原料药(批号:A1)适量,于105℃干燥箱中放置24 h后,加流动相稀释,制成盐酸地巴唑质量浓度为1 mg/mL的高温破坏(固体)样品溶液。

2.5.5 高温破坏(液体)样品溶液的制备 取盐酸地巴唑原料药(批号:A1)适量,加入流动相5 mL,置于100℃水浴中加热1 h,加流动相稀释,制成盐酸地巴唑质量浓度为1 mg/mL的高温破坏(液体)样品溶液。

2.5.6 光照破坏样品溶液的制备 取盐酸地巴唑原料药(批号:A1)适量,于4 000 lx光照下放置1 d,加流动相稀释,制成盐酸地巴唑质量浓度为1 mg/mL的光照破坏样品溶液。

2.5.7 未破坏样品溶液的制备 取盐酸地巴唑原料(批号:A1)适量,加流动相稀释,制成盐酸地巴唑质量浓度为1 mg/mL的未破坏样品溶液。

2.5.8 破坏性试验 取上述各样品溶液10 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,详见图3。由图3可知,盐酸地巴唑原料药在氧化破坏条件下未知杂质数目及总量增加,其他破坏条件下均无明显变化;保留时间8.1 min处对应的色谱峰为盐酸地巴唑原料药中的最大未知杂质峰,经酸、碱、氧化、高温、光照破坏后该峰的峰面积无明显变化,推测该峰可能为盐酸地巴唑在工艺过程中产生的杂质。



D.氧化破坏样品溶液

E.高温破坏(固体)样品溶液

F.高温破坏(液体)样品溶液

G.光照破坏样品溶液

注:1.最大未知杂质;2.盐酸地巴唑

Note: 1. maximum unknown impurity; 2. dibazol hydrochloride

图3 破坏性试验的高效液相色谱图

Fig 3 HPLC chromatograms of destructive tests

2.6 线性关系考察

精密称取邻苯二胺、苯乙酸、盐酸地巴唑对照品适量,加流动相溶解,制成邻苯二胺、苯乙酸、盐酸地巴唑质量浓度分别为0.427~4.27、0.403~4.03、0.82~8.20 μg/mL的线性关系混合工作溶液,按“2.1”项下色谱条件进样测定。以各待测成分质量浓度(C , μg/mL)为横坐标、峰面积(A)为纵坐标进行线性回归。结果,邻苯二胺的回归方程为 $A=41\ 382C-1\ 176$ ($r=0.998\ 9$)、苯乙酸的回归方程为 $A=10\ 527C+24$ ($r=0.998\ 9$)、盐酸地巴唑的回归方程为 $A=27\ 422C+2\ 696$ ($r=0.999\ 9$),表明邻苯二胺、苯乙酸、盐酸地巴唑在质量浓度分别为

0.427~4.27、0.403~4.03、0.82~8.20 μg/mL 范围内与峰面积的线性关系良好。

2.7 定量限与检测限考察

取“2.2.3”项下混合对照品溶液适量,用流动相逐级稀释,按“2.1”项下色谱条件进样测定,以信噪比10:1、3:1分别计算定量限、检测限。结果,邻苯二胺、苯乙酸、盐酸地巴唑的定量限分别为0.042 7、0.134 3、0.088 7 μg/mL,检测限分别为0.021 4、0.067 1、0.044 3 μg/mL。

2.8 精密度试验

取“2.2.3”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。结果,邻苯二胺、苯乙酸、盐酸地巴唑峰面积的RSD分别为0.4%、0.8%、0.2%(n=6),表明仪器精密度良好。

2.9 稳定性试验

取“2.2.4”项下原料药供试品溶液(批号:A1)适量,分别于室温下放置0、1、2、3、4 h时,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,邻苯二胺、苯乙酸均未检出,盐酸地巴唑峰面积的RSD为1.4%(n=5),表明原料药供试品溶液在室温下放置4 h内基本稳定。

2.10 重复性试验

取盐酸地巴唑原料药(批号:A1)约10 mg,共6份,按“2.2.4”项下方法制备原料药供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并按外标法计算样品含量。结果,邻苯二胺、苯乙酸均未检出,盐酸地巴唑含量的RSD为1.1%(n=6);最大未知杂质含量的RSD为1.3%(n=6),未知杂质总量的RSD为1.3%(n=6),表明方法重复性良好。

2.11 加样回收率试验

取已知含量的盐酸地巴唑原料药(批号:A1)约10 mg,精密称定,共9份,分别置于10 mL量瓶中,加入一定量的“2.2.2”项下混合对照品贮备液,加流动相稀释,按“2.2.4”项下方法制备原料药供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算加样回收率,结果见表1。

2.12 耐用性试验

取盐酸地巴唑原料药(批号:A1)约10 mg,按“2.2.4”项下方法制备原料药供试品溶液,按“2.1”项下色谱条件[以不同流速(0.9、1.0、1.1 mL/min)、不同流动相中甲醇的比例(50%、55%、60%)、不同柱温(20、30、40 ℃)、不同色谱柱(Ultimate C₁₈、Waters Acquity UPLC BEH C₁₈、Thermo C₁₈)]进样测定。结果,最大未知杂质含量的RSD均小于2%,各峰的分度良好,表明方法耐用性较好。

2.13 样品有关物质测定

取83批样品,分别按“2.2.4”“2.2.5”项下方法制备

表1 加样回收率试验结果(n=9)

Tab 1 Results of recovery tests(n=9)

待测成分	样品含量, μg	加入量, μg	测得量, μg	加样回收率, %	平均加样回收率, %	RSD, %			
邻苯二胺	0	1.281	1.291	100.78	100.23	1.60			
	0	1.281	1.313	102.50					
	0	1.281	1.317	102.81					
	0	1.601	1.597	99.75					
	0	1.601	1.574	98.31					
	0	1.601	1.581	98.75					
	0	1.922	1.925	100.16					
	0	1.922	1.929	100.36					
	0	1.922	1.896	98.65					
	苯乙酸	0	1.210	1.220			100.83	101.20	0.70
		0	1.210	1.237			102.23		
		0	1.210	1.225			101.24		
		0	1.513	1.523			100.66		
		0	1.513	1.537			101.59		
		0	1.513	1.542			101.92		
0		1.816	1.812	99.78					
0		1.816	1.841	101.38					
0		1.816	1.838	101.21					

原料药及片剂的供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,平行操作9次,记录峰面积,邻苯二胺和苯乙酸按外标法计算含量,最大未知杂质和未知杂质总量按外标法以盐酸地巴唑峰面积为对照计算含量,结果见表2(表中,-表示未检出)。

表2 样品有关物质测定结果(n=9, %)

Tab 2 Results of related substances in samples(n=9, %)

样品	生产企业	批号	邻苯二胺	苯乙酸	最大未知杂质	未知杂质总量	
盐酸地巴唑原料	A	A1	-	-	0.13	0.14	
		A2	-	-	0.10	0.10	
		A3	-	-	0.05	0.05	
	B	B01	-	0.01	0.09	0.12	
		B02	-	0.03	0.25	0.31	
		B03	-	0.04	0.20	0.27	
	盐酸地巴唑片剂	B	B1	-	-	0.31	0.36
			B2	-	0.02	0.18	0.25
			B3	-	0.02	0.18	0.26
B4			-	0.01	0.19	0.27	
B5			-	-	0.16	0.23	
B6			-	-	0.13	0.21	
B7			-	0.02	0.22	0.30	
C		C1	0.02	-	0.14	0.22	
		C2	0.01	-	0.11	0.16	
		C3	0.02	-	0.11	0.14	
		C4	-	-	0.14	0.16	
		C5	0.01	-	0.14	0.21	
		C6	0.01	-	0.20	0.21	
		C7	0.02	-	0.11	0.13	
D	D1	0.01	-	0.10	0.17		
	D2	0.01	-	0.07	0.10		
	D3	0.01	-	0.13	0.18		
	D4	0.01	-	0.16	0.18		
	D5	0.01	-	0.07	0.12		
	D6	0.01	-	0.08	0.16		
	D7	-	-	0.15	0.19		

续表 2

Continued tab 2

样品	生产企业	批号	邻苯二胺	苯乙酸	最大未知杂质	未知杂质总量
		D8	-	-	0.11	0.14
E		E1	-	0.03	0.19	0.32
F		F1	-	-	0.12	0.17
G		G1	0.01	-	0.10	0.11
		G2	0.01	-	0.11	0.12
		G3	0.01	-	0.11	0.13
		G4	-	-	0.09	0.12
		G5	-	-	0.10	0.13
		G6	-	-	0.10	0.12
H		H1	-	-	0.24	0.25
		H2	-	-	0.18	0.20
		H3	-	-	0.20	0.24
		H4	-	-	0.22	0.25
		H5	-	-	0.20	0.23
		H6	-	-	0.21	0.23
		H7	-	-	0.20	0.23
		H8	-	-	0.20	0.23
		H9	-	-	0.17	0.18
		H10	-	-	0.20	0.23
		H11	-	-	0.18	0.19
		H12	-	-	0.19	0.21
I		I1	-	-	0.06	0.10
J		J1	0.01	-	0.15	0.32
		J2	-	-	0.34	0.50
		J3	-	-	0.22	0.34
		J4	0.01	-	0.51	0.62
		J5	-	-	0.31	0.41
		J6	0.02	-	0.15	0.23
		J7	-	-	0.13	0.25
		J8	-	-	0.10	0.24
K		K1	0.01	-	0.16	0.21
		K2	0.01	-	0.29	0.39
		K3	0.01	-	0.29	0.39
		K4	0.01	-	0.28	0.38
		K5	0.01	0.03	0.27	0.38
		K6	-	-	0.17	0.26
		K7	-	-	0.15	0.22
		K8	-	-	0.16	0.23
		K9	0.01	-	0.23	0.31
		K10	0.01	-	0.31	0.42
L		L1	0.01	-	0.14	0.21
		L2	-	-	0.18	0.26
		L3	0.01	-	0.26	0.32
		L4	0.01	0.02	0.19	0.25
		L5	0.01	-	0.24	0.29
		L6	0.01	-	0.16	0.24
		L7	0.01	-	0.23	0.28
		L8	0.01	-	0.14	0.33
		L9	-	-	0.17	0.25
		L10	0.01	-	0.19	0.29
		L11	0.01	-	0.14	0.23
		L12	0.02	-	0.13	0.23
		L13	-	-	0.14	0.19
		L14	-	-	0.09	0.23
		L15	0.11	0.03	0.13	0.31
		L16	0.01	0.01	0.14	0.20

由表2可见,盐酸地巴唑原料及片剂中邻苯二胺、苯乙酸的含量较低,提示盐酸地巴唑的起始合成底物在合成工艺中残留较小。盐酸地巴唑原料药中,最大未知杂质含量为0.05%~0.25%,未知杂质总量为0.05%~0.31%;片剂中,最大未知杂质含量为0.06%~0.51%,未知杂质总量为0.10%~0.62%。采用箱式图对片剂中最大未知杂质含量和未知杂质总量进行分析,详见图4、图5。由图4、图5可知,企业J样品中的最大未知杂质含量和未知杂质总量的四分位间距最大;其次为企业K。这提示上述两家企业样品中杂质含量差异较大。企业C和企业D样品中最大未知杂质含量和未知杂质总量的四分位间距较小,提示这两家企业样品生产控制较好,杂质含量差异较小。

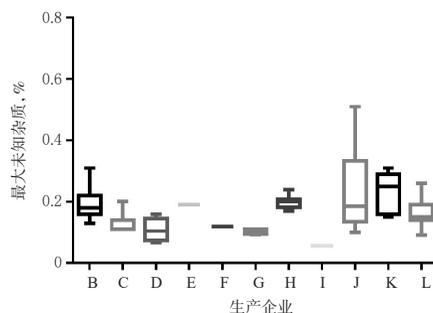


图4 最大未知杂质含量的箱式图

Fig 4 Box plot of the contents of largest unknown impurity

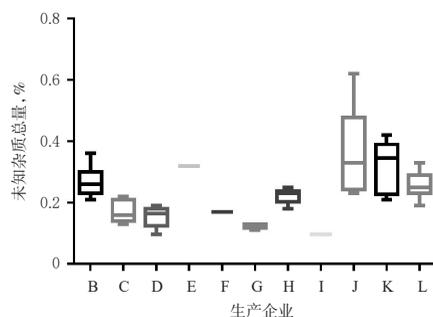


图5 未知杂质总量的箱式图

Fig 5 Box plot of total contents of unknown impurities

2.14 最大未知杂质的结构推测

2.14.1 色谱条件 色谱柱: Waters Acquity UPLC BEH C₁₈(100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相: 水-甲醇(45:55, V/V); 流速: 0.2 mL/min; 柱温: 30 °C; 进样量: 1 μL。

2.14.2 质谱条件 离子源: 电喷雾离子源(ESI); 扫描模式: 负离子扫描模式; 一级质谱扫描范围: m/z 100~800; 毛细管电压: 3 000 V; 离子源温度: 100 °C; 去溶剂气体: 氮气; 去溶剂气体流速: 600 L/h; 锥孔流速: 50 L/h; 利用质谱校正通道每 20 s 注射亮氨酸脑啡肽溶液, 流速 10 μL/min, 获得 Lock mass 参比质量信号, 对测得的质量数据进行实时校准。

2.14.3 结构推测 取最大未知杂质(批号: A01)约 10

mg,加甲醇溶解,制成质量浓度为100 μg/mL的供试品溶液,按“2.2”项下试验条件进样分析,得到质谱信息,采用¹H-NMR和¹³C-NMR对最大未知杂质的结构进行推测。结果,ESI-MS:*m/z* 223.2055[M-H]⁻。¹H-NMR(600 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 7.77(2H, m, H-1/4)、7.53(2H, m, H-2/3)、6.38(1H, s, H-8)、7.66(2H, d, *J*=7.4 Hz, H-10/14)、7.38(1H, t, *J*=7.4 Hz, H-12)、7.44(2H, t, *J*=7.6 Hz, H-11/13)。¹³C-NMR(151 MHz, DMSO-*d*₆) δ: 114.1(C-1/4)、125.8(C-2/3)、130.9(C-5/7)、155.6(C-6)、67.4(C-8)、139.2(C-9)、126.8(C-10/14)、128.8(C-11/13)、128.8(C-12)。推测其化学名为2-(羟基苯基)苯并咪唑(羟苄唑),物质数字识别码[CAS]为50-97-5,其结构式见图6。

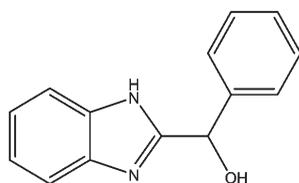


图6 最大未知杂质结构

Fig 6 Maximum unknown impurity's structure

3 讨论

盐酸地巴唑的原料为邻苯二胺和苯乙酸,分别属于碱性化合物和酸性化合物,而盐酸地巴唑属于有机铵盐酸盐,三者化学结构相差较大。通过查询相关文献^[9-10],笔者考察了0.01 mol/L醋酸铵缓冲液-乙腈(70:30, *V/V*)、甲醇-水(55:45, *V/V*)、甲醇-水-三乙胺(80:19.5:0.5, *V/V/V*)、水-甲醇-冰醋酸-三乙胺(45:55:0.5:0.5, *V/V/V/V*)等不同流动相系统的分离效果。结果,以水-甲醇-冰醋酸-三乙胺(45:55:0.5:0.5, *V/V/V/V*)为流动相时的分离效果较好,且主峰与相邻杂质峰的分离度良好。

Bao K等^[11]研究发现,重复使用的活性炭在水中可催化合成2-苯甲酰基苯并咪唑和2-苯甲酰基苯并恶唑衍生物。由此本研究推测,盐酸地巴唑中最大未知杂质产生的原因可能为盐酸地巴唑在脱色过程中接触到活性炭时,与残留的氧气发生反应,生成2-(羟基苯基)苯并咪唑(羟苄唑)。

根据盐酸地巴唑片说明书,该药用量为10~20 mg/次,每日3次,以最大服用量计算,每日最大剂量为60 mg。根据《化学药物杂质研究的技术指导原则》^[12]和《人用药品注册技术要求国际协调会(ICH)三方协调指导原则 ICH-Q3A(R2)》^[13]建议,当每日最大剂量<2 g时,杂质限度为0.15%;当每日最大剂量为10~100 mg时,杂质限度为0.5%。参考上述原则规定,盐酸地巴唑原料药中邻苯二胺、苯乙酸、最大未知杂质和未知杂质总量的限度分别为0.15%、0.15%、0.15%、0.5%;盐酸地巴唑片剂中的限度分别0.5%、0.5%、0.5%、1.0%。按上述限度规定,本研究的83批样品基本符合要求。

不同厂家盐酸地巴唑原料药和片剂中邻苯二胺和

苯乙酸含量较低,最大未知杂质为主要杂质;本研究中的盐酸地巴唑原料药均来源于企业A和企业B,由于无法获得更多的生产信息,因此未对最大未知杂质含量和未知杂质总量存在较大差异的样品进行研究,仅推测可能与不同盐酸地巴唑原料药生产企业间工艺差异较大有关。

综上所述,本研究所建方法快速、准确、专属性好,可用于测定盐酸地巴唑原料药及片剂中的有关物质。盐酸地巴唑原料药及片剂中的最大未知杂质可能为2-(羟基苯基)苯并咪唑(羟苄唑)。

参考文献

- [1] 顾玉潜.对我院58例内科患者采用地巴唑片治疗的多种临床疗效观察[J].中国医药指南,2010,8(15):211-212.
- [2] 王秀连.多发性神经病的西药治疗[J].世界最新医学信息文摘,2016,16(13):112-114.
- [3] GURKOVSKAIA AN, GOKINA NI, SHUBA MF, et al. Mechanism of the effect of dibazol on the contractile and electric activities of the smooth muscle of the portal vein[J]. *Fiziol Zh*, 1989, 35(6):50-53.
- [4] 王五早,周根宝,潘晓娜.地巴唑在预防脑缺血中的应用[J].实用医技杂志,2010,17(9):860.
- [5] 陈湘勇.养血清脑颗粒联合地巴唑治疗血管性头痛随机平行对照研究[J].实用中医内科杂志,2016,30(4):68-70.
- [6] 杨和军,李洪武,郭拥政,等.一种地巴唑及其盐的合成方法:中国,CN103113305A.[P]2013-05-22.
- [7] 国家食品药品监督管理局.国家药品标准:修订件[S]. 2010-12-10.
- [8] 卫生部药典委员会.卫生部药品标准-化学药品及标准[S].北京:卫生部药典委员会,1989:32-33.
- [9] 胡德福,谭会洁,蒋慧. HPLC法测定地巴唑片含量及其有关物质[J].药物分析杂志,2004,24(4):430-431.
- [10] 陆广马.高氯酸滴定法与高效液相色谱法测定地巴唑片中地巴唑含量比较[J].中国药业,2019,28(8):19-21.
- [11] BAO K, LI F, LIU H, et al. Activated carbon for aerobic oxidation: Benign approach toward 2-benzoylbenzimidazoles and 2-benzoylbenzoxaoles synthesis[J]. *Sci Rep*, 2015. DOI:10.1038/srep10360.
- [12] 国家药品审评中心.化学药物杂质研究的技术指导原则[EB/OL]. [2019-08]. <http://www.ced.org.cn/zdyz.do?method=largePage&id=2060>.
- [13] International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use; 2006. *ICH Harmonised Tripartite Guideline: Impurities in New Drug Substances. ICH: Q3A(R2)* [EB/OL]. [2019-08]. https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3A_R2/Step4/Q3A_R2_Guideline.pdf.

(收稿日期:2019-08-27 修回日期:2020-02-10)

(编辑:陈宏)