

色谱-质谱联用技术鉴定盐酸咪达唑仑的有关物质

金 瑞, 闫若凝, 陆宇婷, 宋 敏, 杭太俊*

(中国药科大学药物分析系, 南京 210009)

摘要 色谱-质谱联用(LC-MS)技术鉴定盐酸咪达唑仑中的有关物质。采用 Thermo BDS Hypersil C₁₈ (100 mm×4.6 mm, 2.4 μm)色谱柱, 以乙腈-25 mmol/L 醋酸铵水溶液(冰醋酸调节 pH 为 5.5)为流动相梯度洗脱, 对盐酸咪达唑仑有关物质进行分离, 电喷雾正离子化-四极杆-飞行时间串联质谱(ESI-Q-TOF/MS)高分辨测定各有关物质母离子及其子离子的准确质量和元素组成, 通过光谱解析并结合合成工艺分析鉴定了它们的结构, 并对部分杂质进一步采用对照品对照确证。在所建立的分析条件下, 盐酸咪达唑仑及其有关物质分离良好, 检测并鉴定出盐酸咪达唑仑及其强制降解试验样品中 22 个主要有关物质, 其中 8 个为美国药典规定的已知杂质。LC-MS 技术能有效地分离鉴定盐酸咪达唑仑中的有关物质, 可为其贮存条件制定、生产工艺优化和质量控制提供参考依据。

关键词 盐酸咪达唑仑; 有关物质; 结构鉴定; 色谱-质谱联用

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2020)03-0313-14

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20200309

引用本文 金瑞, 闫若凝, 陆宇婷, 等. 色谱-质谱联用技术鉴定盐酸咪达唑仑的有关物质[J]. 中国药科大学学报, 2020, 51(3):313–326.

Cite this article as: JIN Rui, YAN Ruoning, LU Yuting, et al. Identification of related substances of midazolam hydrochloride by LC-MS[J]. *China Pharm Univ*, 2020, 51(3):313–326.

Identification of related substances of midazolam hydrochloride by LC-MS

JIN Rui, YAN Ruoning, LU Yuting, SONG Min, HANG Taijun*

Department of Pharmaceutical Analysis, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract This study aimed to identify the related substances of midazolam hydrochloride by liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS). To separate the related substances of midazolam hydrochloride, gradient elution was performed using acetonitrile and 25 mmol/L of ammonium acetate (pH was adjusted to 5.5 with acetic acid) as mobile phase on Thermo BDS Hypersil C₁₈ column (100 mm × 4.6 mm, 2.4 μm). The accurate mass and elemental composition of the parent ions and their product ions of related substances were determined by electrospray-ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry (ESI-Q-TOF/MS). The structures of the related substances were identified by spectral analysis and process synthesis, and some of them were further confirmed by reference substances. Under the established HPLC condition, midazolam hydrochloride and its related substances were adequately separated, and 22 major related substances were detected and identified by hyphenated techniques in midazolam hydrochloride and its stressed samples, of which 8 were recorded as impurities in the *United States Pharmacopeia*. The LC-MS techniques can effectively separate and identify the related substances of midazolam hydrochloride and provide reference for the establishment of storage condition, optimization of synthetic processes and quality control.

Key words midazolam hydrochloride; related substances; structural identification; LC-MS

This study was supported by the National Key R&D Program of China (No. 2017YFC0803606, No. 2018YFC0807400)

收稿日期 2020-03-25 *通信作者 Tel:025-83271090 E-mail:hangtj@cpu.edu.cn

基金项目 国家重点研发计划资助项目(No. 2017YFC0803606, No. 2018YFC0807400)

盐酸咪达唑仑(1-甲基-8-氯-6-(2-氟苯基)-4H-咪唑并[1,5-a][1,4]苯并二氮杂草盐酸盐, midazolam hydrochloride, 图1)是一种短效苯二氮草类药物(GABA-a激动剂), 对中枢神经系统有抑制作用, 起效快, 不良反应少^[1-5], 可用于镇静催眠、抗惊厥及麻醉诱导^[6-7]。目前, 文献报道主要集中在临床应用和药理学研究^[6-9]。咪达唑仑有关物质研究虽已有报道^[10-13], 主要阐述了咪达唑仑有关物质分析方法的建立及验证^[10], 针对工艺杂质、降解杂质

的鉴定和裂解机制的研究^[11-13]尚不完善。

本研究建立了适用于盐酸咪达唑仑全部有关物质(工艺杂质及降解产物)检查的LC-MS方法, 通过光谱检测和分析、对照品比对、并结合合成工艺(图1), 共分析鉴定了成品中潜在的22个有关物质, 其中包括中间体、副产物及分降解产物(图2), 可为盐酸咪达唑仑的贮存条件制定, 生产工艺和质量控制提供参考依据。

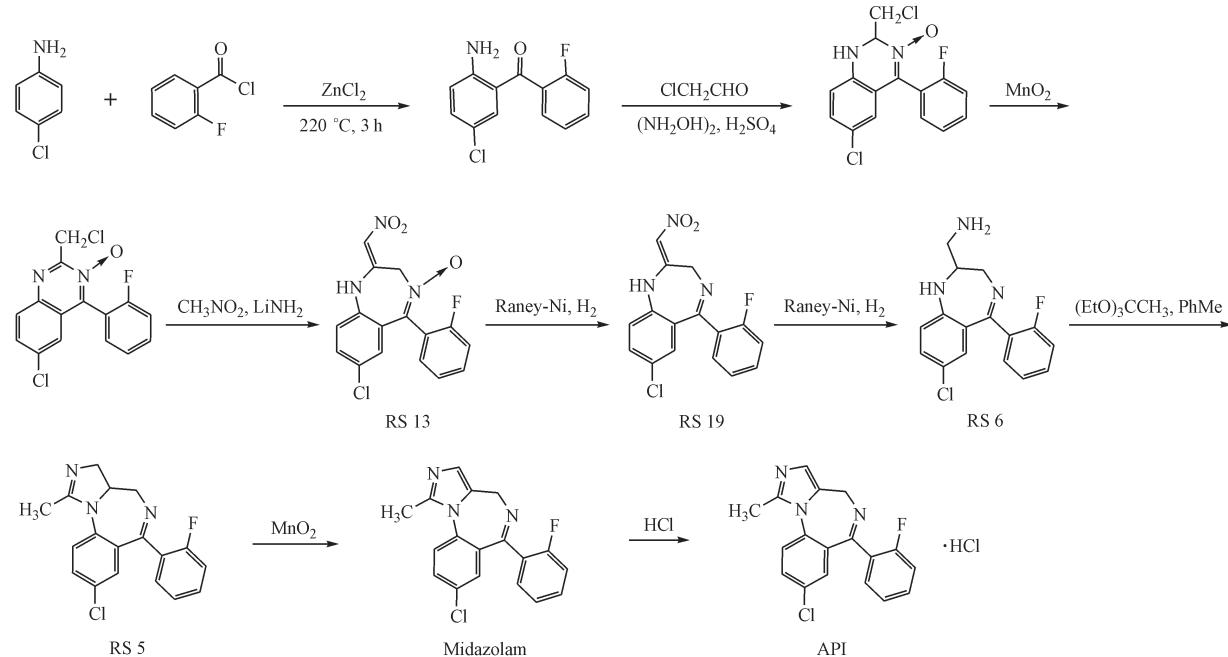


Figure 1 Typical synthetic routes of midazolam hydrochloride

1 材料

1.1 试剂

盐酸咪达唑仑及其有关物质对照品(中国食品药品检定研究院及USP对照品);乙酸铵、冰醋酸(AR级, 南京化学试剂有限公司);乙腈(CR级, 美国Tedia公司), 市售超纯水(杭州娃哈哈集团有限公司)。

1.2 仪器

岛津LCMS-9030四极杆飞行时间质谱仪、Lab-Solutions数据处理系统(日本岛津公司); BS21S分析天平(德国Sartorius公司)。

2 方法

色谱条件: Thermo BDS HYPERSIL C₁₈ (100

mm × 4.6 mm, 2.4 μm)色谱柱;流动相A相为25 mmol/L乙酸铵缓冲溶液(用冰醋酸调节pH至5.5), B相为乙腈, 线性梯度洗脱(A:B):0 min (75:25)→20 min (50:50)→25 min (50:50)→26 min (75:25)→32 min (75:25), 流速0.65 mL/min, 柱温40 °C, 检测波长254 nm, 进样量10 μL。

质谱条件:电喷雾正离子化, 高分辨Q-TOF/MS测定, NaI溶液(400 μg/mL)准确质量校正。喷雾电压4.0 kV, 雾化气压力230 kPa, 流量3 L/min, 接口温度300 °C, 加热气流量10 L/min, 干燥气流量10 L/min, 氩气CID碰撞能量30~40 eV, 扫描范围m/z 50~1 000。

供试品溶液:取盐酸咪达唑仑约5 mg, 精密称定, 置于5 mL量瓶中, 加25%乙腈溶解并稀释至刻

度,摇匀,配制成质量浓度为 1 mg/mL 的供试品溶液。精密量取上述溶液适量,加 25% 乙腈定量稀释,配制 0.1% 的自身对照溶液。

混合对照品溶液:取各有关物质对照品(有关物质 5、6、8、10、13、16、17、18、19、21 和 22)适量,精密称定,加乙腈溶解并定量稀释成质量浓度均约为 1 μg/mL 的溶液,作为混合杂质对照溶液。

强制降解试验溶液:取盐酸咪达唑仑约 5 mg,加 0.01 mol/L 盐酸溶液 0.2 mL,60 ℃水浴放置 10 min,或加 0.01 mol/L 氢氧化钠溶液 0.2 mL,60 ℃水浴放置 10 min,或加 30% 过氧化氢 1 mL,60 ℃水浴放置 10 h,或加 25% 乙腈 1 mL,90 ℃水浴放置 6 d,或加 25% 乙腈 1 mL 光照(4 500 lx)放置 2 d,或 110 ℃烘箱中放置 10 d,或光照(4 500 lx)放置 10 d,分别处理后,各加 25% 乙腈溶解(酸碱处理样品先中和)并稀释至 5 mL,配制成质量浓度均约为 1 mg/mL 的强制降解试验溶液。同时进行空白溶剂试验。

3 结 果

3.1 有关物质检查

美国药典(USP 43)中采用乙腈-100 mmol/L 醋酸盐缓冲溶液等度洗脱^[14]的反相 HPLC 方法检查咪达唑仑的有关物质。该条件下潜在有关物质之间的分离差异较大,耗时较长。

本研究优化了缓冲溶液浓度,并使用梯度洗

脱方法进行盐酸咪达唑仑中有关物质的分离与检查。结果:显著改善了盐酸咪达唑仑各有关物质的分离度,提高了分析效率,并适用于有关物质的 LC-MS 鉴定。

根据工艺过程、潜在副产物分析^[13,15],结合强制降解试验,分离检测到盐酸咪达唑仑中潜在的 22 个主要有关物质(图 2),对各杂质依保留时间从小到大顺序编号。其中 8 个为工艺杂质:5、6、8、11、13、17、18 和 19;11 个为降解产生:1、2、4、7、9、12、14、15、16、20 和 22;3 个既是工艺杂质又是降解杂质:3、10、21。并且有关物质:5、6、8、10、13、17、18 和 21 分别与 USP 43 规定的已知有关物质 A、C、B、D、E、F、G 和 H 相对应。

采用 0.1% 主成分自身对照法估算杂质的含量,盐酸咪达唑仑原料药中仅检测到 1 个有关物质(3)的含量大于 0.1%。

强制降解试验结果表明(表 1),盐酸咪达唑仑在酸、碱破坏条件下,有关物质 3 的含量显著增大,并新增 1 个明显降解产物(有关物质 16)。在高温干法条件下,未见明显降解产物;在高温湿法破坏条件下,产生 4 个主要降解产物(有关物质 7、15、16、21)。在干法光照条件下,新增 1 个明显降解产物(有关物质 4);在湿法光照破坏条件下,产生 6 个主要降解产物(有关物质 2、7、12、14、16、22)。在氧化破坏条件下,产生 9 个主要降解产物(有关物质 1、2、4、7、9、10、14、20、22)。

Table 1 Material balance of the stressed samples of midazolam hydrochloride

Sample	m/mg	Area _{API}	Area _{Impurities}	Total area	Total area/Sample weight	Calibration
Normal	5.12	25 057 041	244 425	25 301 466	4.94×10^6	1.00
Acid	5.02	22 582 999	1 211 053	23 794 052	4.74×10^6	0.96
Alkaline	5.03	22 983 352	630 032	23 613 384	4.69×10^6	0.95
Oxidation	4.96	21 119 501	1 278 797	22 398 298	4.52×10^6	0.91
Dry thermal	5.12	24 484 586	415 227	24 899 813	4.86×10^6	0.98
Wet thermal	5.01	25 184 043	520 509	25 704 552	5.13×10^6	1.04
Dry photolysis	5.05	25 365 361	440 405	25 805 766	5.11×10^6	1.03
Wet photolysis	4.98	26 512 382	748 254	27 260 636	5.47×10^6	1.11

3.2 有关物质鉴定

采用 Q-TOF/MS 高分辨测定各有关物质的母离子及子离子的准确质量和元素组成,并通过合成工艺路线及反应机制的分析,推定各主要有关物质的结构;主要工艺杂质(3、5、6、8、10、11、13、

17、18、19 和 21),均进一步通过制备和对照品比对确证。结果见表 2、图 3 和图 4。

ESI-Q-TOF/MS 测得咪达唑仑 [M+H]⁺ 的准确质量为 326.085 54,与离子式 C₁₈H₁₄ClFN₃⁺ 相应;其主要特征碎片离子(图 5) m/z 291.120 3 (C₁₈H₁₄FN₃⁺)

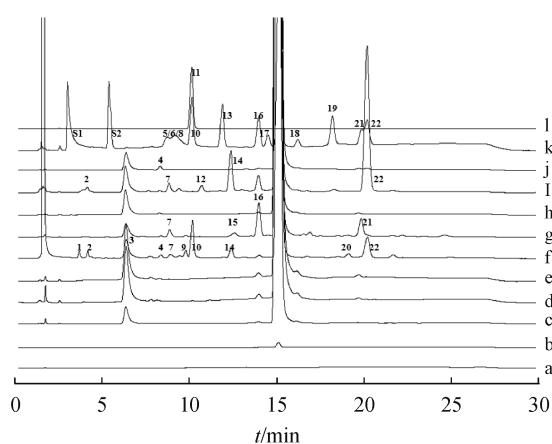


Figure 2 HPLC-UV chromatograms of midazolam hydrochloride
a:Blank; b:Reference 0.1%; c:Active pharmaceutical ingredients(API) and its stressed solutions (d:Acid; e:Alkaline; f:Oxidation; g:Wet thermal; h:Dry thermal; i:Wet photolysis; j:Dry photolysis); k:Impurity references mixture; l:Impurity 11 reference

249.085 0 ($C_{16}H_{10}FN_2^+$)、244.035 7 ($C_{14}H_8ClFN^+$)、223.081 3 ($C_{15}H_{10}FN^+$)和209.065 2 ($C_{14}H_8FN^+$)，分

别是 $[M+H]^+$ 脱去一个Cl原子、同时脱氯与咪唑环裂解脱乙烯亚胺($CH_2=C=NH$)、脱2-甲基咪唑基、脱氯并七元杂环开环重排、或同时脱氯与2-甲基咪唑基单元产生。咪达唑仑的二级质谱和裂解途径分析对解析确证其有关物质结构具有参考意义。

3.2.1 工艺杂质的结构鉴定 根据合成工艺、潜在副产物分析^[13,15]和对照品比对,确证鉴定各工艺有关物质的结构及其来源。

有关物质**3**是成品中存在的特征杂质,并且在强制降解的多个试验条件下极易产生,所以有关物质**3**是咪达唑仑的关键工艺杂质和关键质量指标成分。ESI-Q-TOF/MS测得有关物质**3** $[M+H]^+$ 的准确质量344.095 83,与离子式 $C_{18}H_{16}ClFN_3O^+$ 相应,与咪达唑仑元素组成相比,多1分子水;据文献报道^[16],咪达唑仑制成盐酸盐时,处于酸性环境中,结构中亚胺基会发生可逆性水解开环,有关物

Table 2 LC-MS characteristics of midazolam related substances

No.	t_R/min	$[M+H]^+(m/z)$	Ion formula	Dif./($\times 10^{-6}$)	Product ions (m/z)	Origins
1	3.769	248.058 91	$C_{12}H_{11}ClN_3O^+$	1.588	219, 178, 150, 139, 111, 88	Dr
2	4.268	359.059 55	$C_{18}H_{13}ClFN_2O_3^+$	0.628	315, 297, 240, 222, 123, 95	Dr
3	6.442	344.095 83	$C_{18}H_{16}ClFN_3O^+$	-0.623	315, 297, 274, 123, 109, 95	Pr, Dr
4	8.441	342.080 08	$C_{18}H_{14}ClFN_3O^+$	-0.919	325, 311, 307, 278, 260, 211, 177, 116	Dr
5(A)	8.682	328.101 91	$C_{18}H_{16}ClFN_3^+$	2.378	258, 234, 223, 125, 95	Pr
6(C)	8.975	304.101 13	$C_{16}H_{16}ClFN_3^+$	0.264	287, 246, 211, 109	Pr
7	8.976	358.075 49	$C_{18}H_{14}ClFN_3O_2^+$	0.506	315, 297, 235, 222, 123, 95	Dr
8(B)	9.202	330.116 87	$C_{18}H_{18}ClFN_3^+$	0.273	301, 273, 260, 211, 166, 109, 95	Pr
9	9.866	342.081 55	$C_{18}H_{14}ClFN_3O^+$	3.378	307, 272, 260, 240, 265, 225	Dr
10(D)	10.183	342.080 49	$C_{18}H_{14}ClFN_3O^+$	0.280	322, 320, 281, 253, 204	Pr, Dr
11	10.246	292.124 00	$C_{18}H_{15}FN_3^+$	-1.548	250, 231, 210, 183, 155, 128	Pr
12	10.788	342.080 78	$C_{18}H_{14}ClFN_3O^+$	1.127	325, 297, 262, 234, 109	Dr
13(E)	11.976	348.054 89	$C_{16}H_{12}ClFN_3O_3^+$	0.909	330, 302, 287, 227, 123	Pr
14	12.477	289.054 47	$C_{15}H_{11}ClFN_2O^+$	2.161	261, 259, 226, 206, 165, 140, 109	Dr
15	12.638	326.085 55	$C_{18}H_{14}ClFN_3^+$	0.215	297, 261, 243, 221, 201, 128	Dr
16	14.057	343.064 69	$C_{18}H_{13}ClFN_2O_2^+$	0.816	315, 297, 246, 150, 123, 109, 95	Dr
17(F)	14.566	328.102 03	$C_{18}H_{16}ClFN_3^+$	2.744	297, 258, 222, 205, 109, 95	Pr
API	15.194	326.085 54	$C_{18}H_{14}ClFN_3^+$	0.185	291, 249, 244, 223, 209	API
18(G)	16.273	308.096 07	$C_{18}H_{15}ClN_3^+$	3.792	273, 266, 226, 191, 169, 155, 129	Pr
19	18.267	332.059 25	$C_{16}H_{12}ClFN_3O_2^+$	-1.231	315, 287, 271, 259, 236, 163, 109	Pr
20	19.166	273.059 55	$C_{15}H_{11}ClFN_2^+$	2.268	256, 236, 221, 201	Dr
21(H)	19.928	326.085 76	$C_{18}H_{14}ClFN_3^+$	0.860	299, 258, 250, 222, 189, 128	Pr
22	20.239	273.059 51	$C_{15}H_{11}ClFN_2^+$	2.122	177, 150, 136	Dr

Pr:Process related substance;Dr:Degradation product

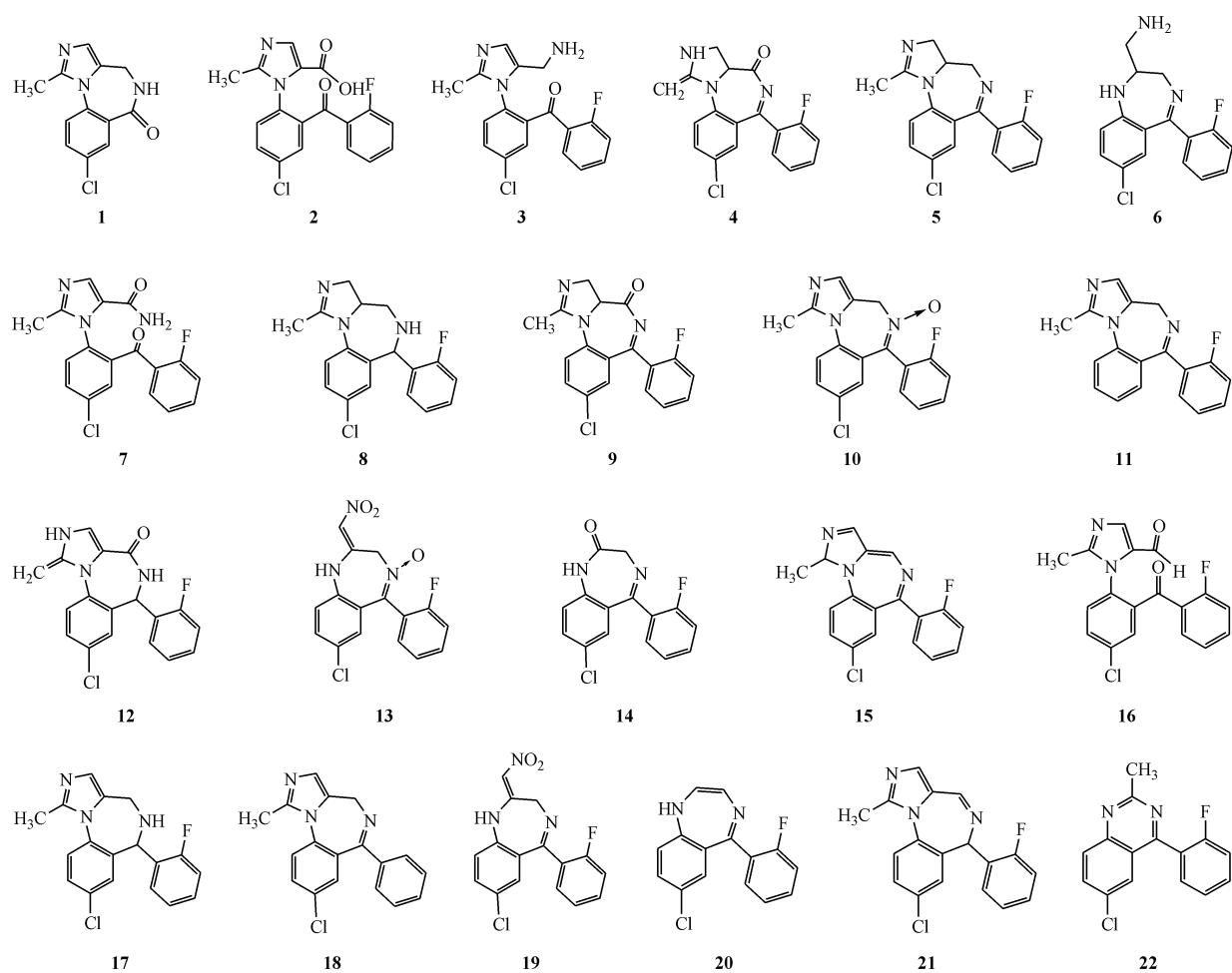


Figure 3 Chemical structures of midazolam related substances 1–22

质 3 是该水解产物。其主要特征碎片(图 6)离子 m/z 315.072 0 ($C_{17}H_{13}ClFN_2O^+$)、274.048 9 ($C_{15}H_{10}ClFN^+$)和 123.025 8 ($C_7H_4FO^+$)均与分子结构中含有二苯酮单元特征相应, 分别与 $[M+H]^+$ + 脱亚胺 ($CH_2=NH$)、咪唑环裂解乙烯亚胺 ($CH_2=C=NH$)、或二苯酮基断裂相应。确证有关物质 3 是咪达唑仑结构中苯并二氮杂草环上亚胺基水解开环, 而形成的二苯酮胺降解或工艺杂质。

有关物质 10 主要在氧化破坏条件下产生, $[M+H]^+$ 的准确质量 342.080 49, 与离子式 $C_{18}H_{14}ClFN_3O^+$ 相应, 与咪达唑仑元素组成相比, 多一个 O 元素。MS 及对照品比对确证鉴定有关物质 10 为咪达唑仑的苯并二氮杂草环上亚胺的 N 氧化副产物(USP 咪达唑仑杂质 D), 其二级质谱碎片离子(图 7)均确证相应结构。

有关物质 21 主要在高温湿法条件下产生,

$[M+H]^+$ 的准确质量为 326.085 76, 与离子式 $C_{18}H_{14}ClFN_3^+$ 相应, 与咪达唑仑相对分子质量一致, 两者互为同分异构体。MS 及对照品比对确证鉴定有关物质 21 是咪达唑仑合成中七元杂环上双键位置异构的副产物(USP 咪达唑仑杂质 H), 其二级质谱碎片离子(图 8)均确证相应结构。

有关物质 5 和 17 $[M+H]^+$ 的准确质量分别为 328.101 91 和 328.102 03, 均与离子式 $C_{18}H_{16}ClFN_3^+$ 相应, 比咪达唑仑相对分子质量多 2; 有关物质 8 $[M+H]^+$ 的准确质量为 330.116 87, 与离子式 $C_{18}H_{18}ClFN_3^+$ 相应, 比咪达唑仑相对分子质量多 4; 结合咪达唑仑合成工艺^[15], MS 及对照品比对确证鉴定。有关物质 5 是咪达唑仑合成过程中的一个中间体(图 1, USP 咪达唑仑杂质 A), 有关物质 8 和 17 是咪达唑仑发生不同程度还原, 而产生的副产物(USP 咪达唑仑杂质 B 和 F)。

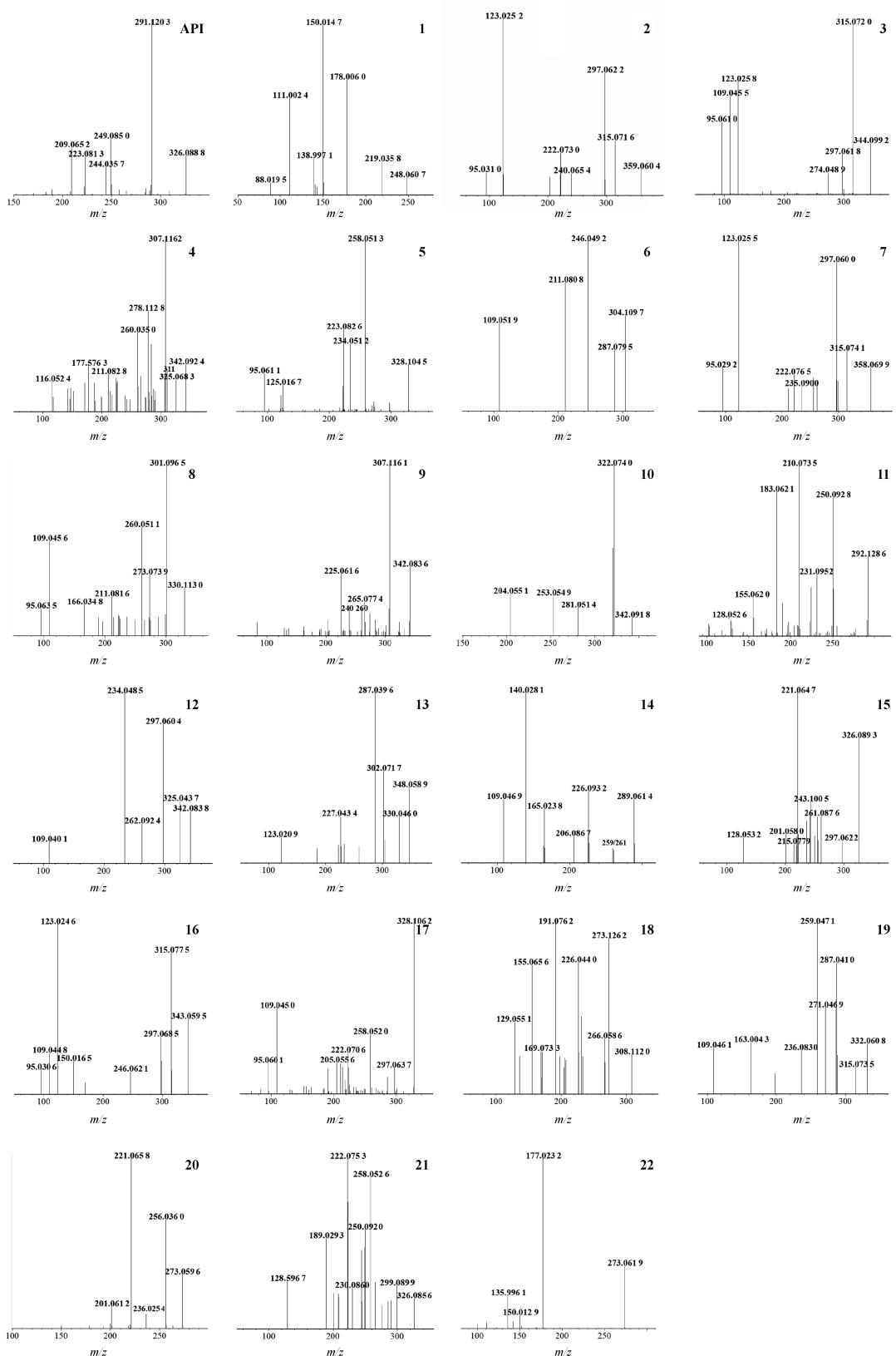


Figure 4 MS/MS spectra of midazolam and its related substances $[M+H]^+$ ions
 API(m/z 326); **1**(m/z 248); **2**(m/z 359); **3**(m/z 344); **4**(m/z 342); **5**(m/z 328); **6**(m/z 304); **7**(m/z 358); **8**(m/z 330); **9**(m/z 342); **10**(m/z 342); **11**(m/z 292); **12**(m/z 342); **13**(m/z 348); **14**(m/z 289); **15**(m/z 326); **16**(m/z 343); **17**(m/z 328); **18**(m/z 308); **19**(m/z 332); **20**(m/z 273); **21**(m/z 326); **22**(m/z 273)

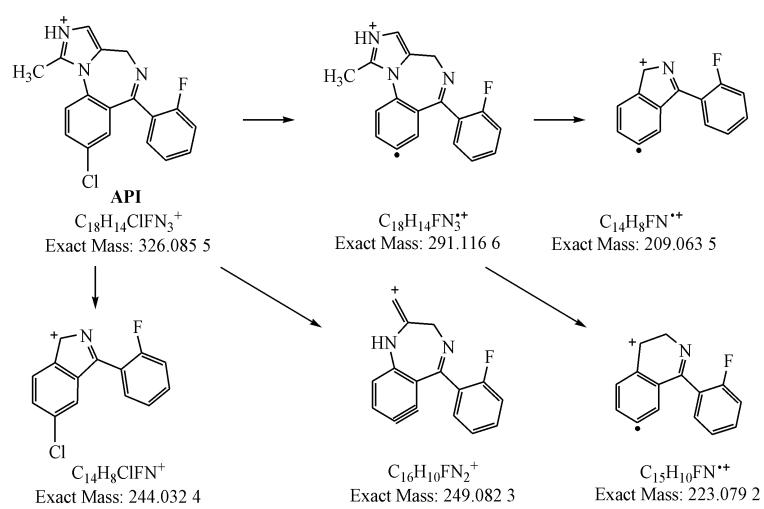


Figure 5 Midazolam $[M+H]^+$ ion MS/MS fragmentation pathways

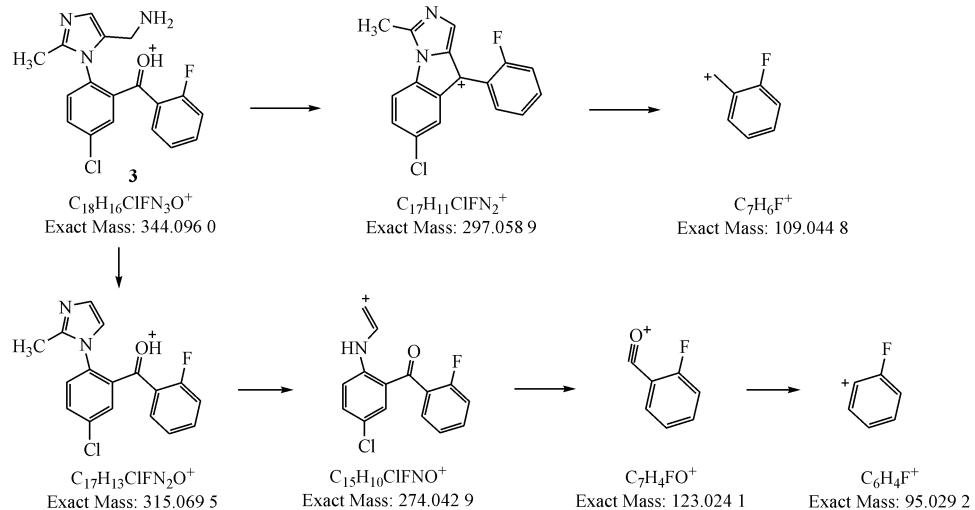


Figure 6 RS 3 $[M+H]^+$ ion MS/MS fragmentation pathways

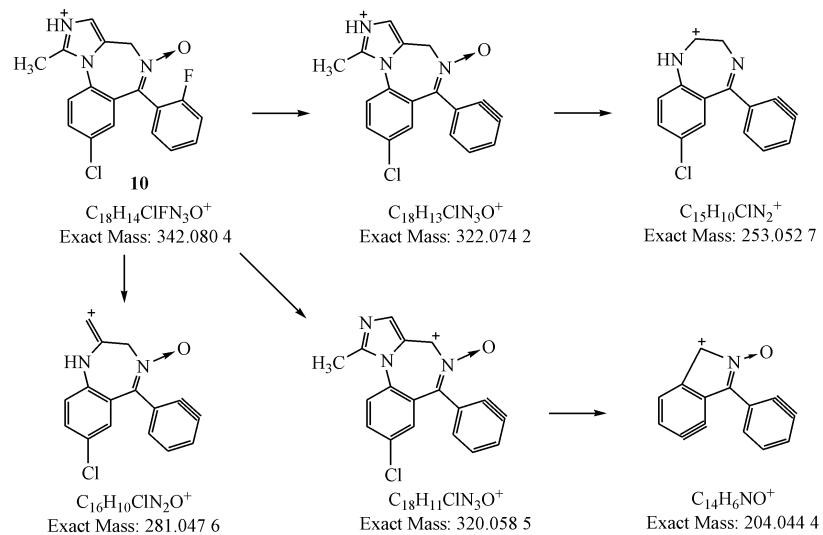


Figure 7 RS 10 $[M+H]^+$ ion MS/MS fragmentation pathways

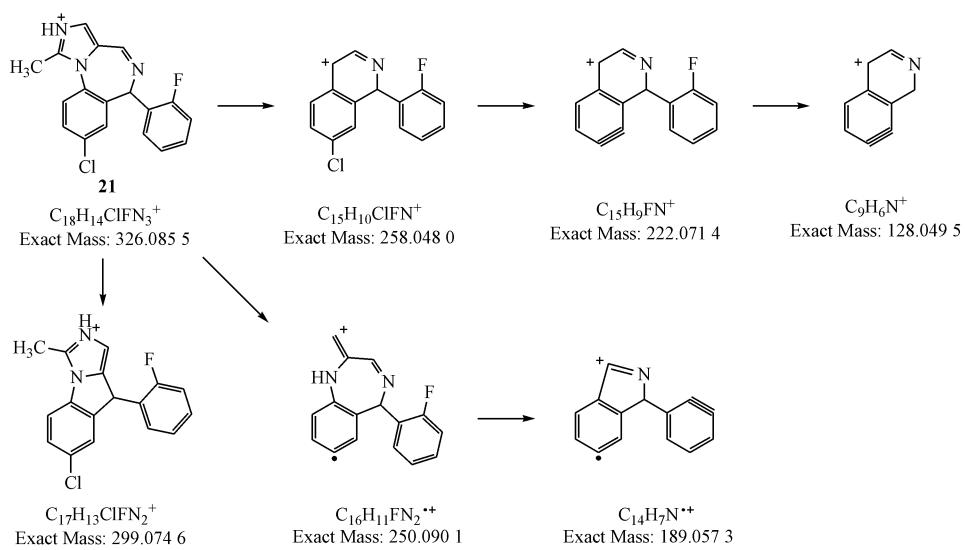


Figure 8 RS 21 $[\text{M}+\text{H}]^+$ ion MS/MS fragmentation pathways

有关物质 **6** $[\text{M}+\text{H}]^+$ 的准确质量为 304.101 13, 与离子式 $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{ClFN}_3^+$ 相应, 其碎片离子 287.079 5 ($\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{ClFN}_2^+$) 比 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 少 17, 与 NH_3 相应; 结合咪达唑仑合成工艺^[15], MS 及对照品比对, 确证鉴定有关物质 **6** 是咪达唑仑合成过程中的一个中间体(图 1, USP 咪达唑仑杂质 C)。

有关物质 **11** $[\text{M}+\text{H}]^+$ 的准确质量为 292.124 00, 与离子式 $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{FN}_3^+$ 相应, 与咪达唑仑元素组成相比, 少 1 个 Cl 元素, 多 1 个 H 元素, 其一级质谱结果中也未出现 Cl 的同位素峰, 说明该杂质与咪达唑仑结构中的 Cl 被 H 替代相应。MS 及对照品比对, 确证鉴定有关物质 **11** 为咪达唑仑的非氯代副产物。

有关物质 **13** $[\text{M}+\text{H}]^+$ 的准确质量为 348.054 89, 与离子式 $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{ClFN}_3\text{O}_3^+$ 相应, 与咪达唑仑元素组成相比, 少两个 C 元素, 多 3 个 O 元素; 其特征碎片 m/z 330.046 0 ($\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{ClFN}_3\text{O}_2^+$)、302.071 7 ($\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{ClFN}_2\text{O}^+$)、287.039 6 ($\text{C}_{15}\text{H}_9\text{ClFN}_2\text{O}^+$), 分别与 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 离子丢失 1 分子 H_2O 、1 分子 NO_2 和硝基亚甲基碎片相应; 确证分子结构中含有硝基取代。结合咪达唑仑合成工艺^[15], MS 及对照品比对, 确证有关物质 **13** 是咪达唑仑合成过程中的一个中间体(图 1, USP 咪达唑仑杂质 E)。

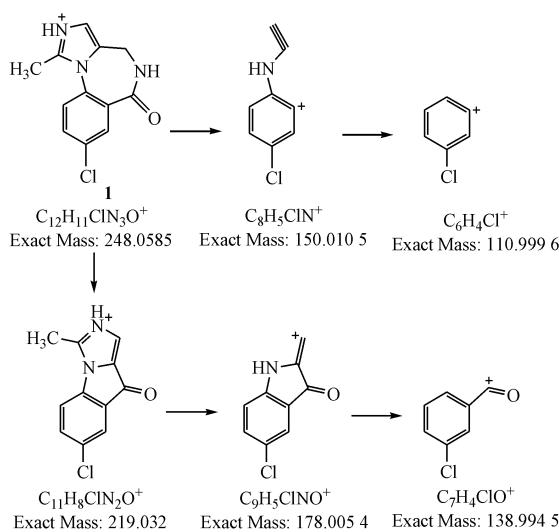
有关物质 **18** $[\text{M}+\text{H}]^+$ 的准确质量为 308.096 07, 与离子式 $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{ClN}_3^+$ 相应, 与咪达唑仑元素组成相比, 少 1 个 F 元素多 1 个 H 元素。MS 及对照品比对, 确证有关物质 **18** 为咪达唑仑非氟代

的副产物(USP 咪达唑仑杂质 G)。

有关物质 **19** $[\text{M}+\text{H}]^+$ 的准确质量为 332.059 25, 与离子式 $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{ClFN}_3\text{O}_2^+$ 相应, 与有关物质 **13** 元素组成相比, 少一个 O 元素; 结合咪达唑仑合成工艺^[15], MS 及合成对照品比对, 确证有关物质 **19** 是咪达唑仑合成过程中的中间体(图 1)。

3.2.2 降解杂质的结构鉴定 通过有关物质 HPLC 定位及质谱特征分析, 测得各降解杂质母离子的准确质量和离子组成及它们的二级质谱特征碎片(图 4), 结合咪达唑仑裂解规律, 对强制降解样品中产生的有关物质进行综合分析, 鉴定它们的结构。

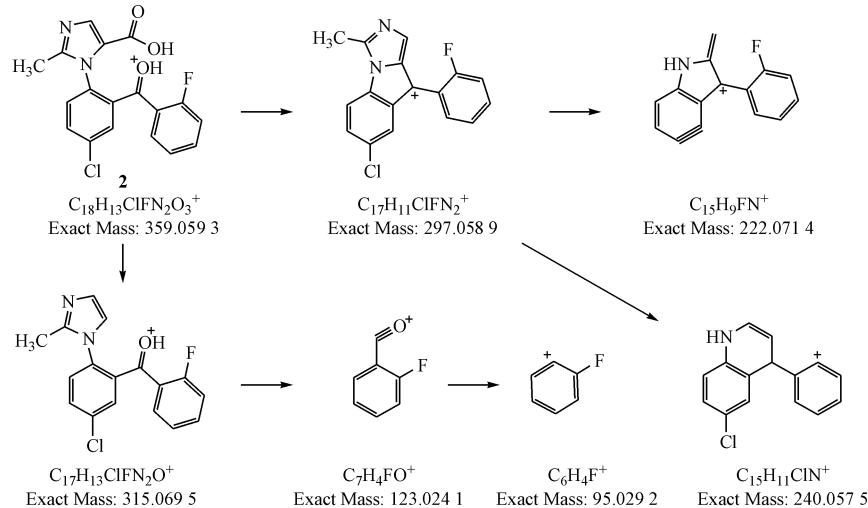
有关物质 **1** 和 **2** 是咪达唑仑的特征氧化降解杂质, 反相色谱保留显著降低, 表明极性显著增大。有关物质 **1** $[\text{M}+\text{H}]^+$ 的准确质量为 248.058 91, 与离子式 $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{ClN}_3\text{O}^+$ 相应, 与咪达唑仑被氧化脱去 2-氟苯基单元的羟基取代转化物相应; 其主要特征碎片(图 9)离子 m/z 219.035 8 ($\text{C}_{11}\text{H}_8\text{ClN}_2\text{O}^+$)、178.006 0 ($\text{C}_9\text{H}_5\text{ClNO}^+$) 和 150.014 7 ($\text{C}_8\text{H}_5\text{ClN}^+$) 分别与 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 开环裂解脱去亚胺($\text{CH}_2=\text{NH}$)、进一步咪唑环裂解($\text{CH}_2=\text{C}=\text{NH}$)、或咪唑环和酰基亚胺($\text{CHO}-\text{N}=\text{CH}_2$)同时脱去相应, 确证了该杂质结构中仍然保留了与咪达唑仑相应的咪唑环并苯并二氮杂草环基本结构特征。同时测得 m/z 138.997 1 ($\text{C}_7\text{H}_4\text{ClO}^+$) 和 111.002 4 ($\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}^+$) 离子, 它们进一步证明了咪达唑仑被氧化脱去 2-氟苯基单元后, 羟基取代亚胺转化成内酰胺的结构特征。

Figure 9 RS 1 $[\text{M}+\text{H}]^+$ ion MS/MS fragmentation pathways

有关物质 2 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 的准确质量为 359.05955, 与离子式 $\text{C}_{18}\text{H}_{13}\text{ClFN}_2\text{O}_3^+$ 相应, 与咪达唑仑元素组成相比, 多 3O、少 NH; 其主要特征碎片(图 10)离子 m/z 315.0716 ($\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{ClFN}_2\text{O}^+$)、

297.0622 ($\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{ClFN}_2^+$) 和 123.0252 ($\text{C}_7\text{H}_4\text{FO}^+$) 均与有关物质 3 的特征碎片一致, 表明其分子结构中也含有二苯酮单元。又 m/z 315 离子与其 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 脱去羧基单元相应。所以, 鉴定有关物质 2 是咪达唑仑结构中苯并二氮杂草环上亚胺基发生水解开环、并氧化成羧酸, 而生成的二苯酮类降解杂质。其极性明显增大, 反相色谱保留显著减弱。

有关物质 7 也是氧化降解杂质, 并在湿法加热和光照条件下产生, 其 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 的准确质量为 358.07549, 与离子式 $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{FClN}_3\text{O}_2^+$ 相应, 与咪达唑仑元素组成相比, 多 2 个 O 元素; 其主要特征碎片(图 11)离子 m/z 315.0741 ($\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{ClFN}_2\text{O}^+$)、297.0600 ($\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{ClFN}_2^+$) 和 123.0255 ($\text{C}_7\text{H}_4\text{FO}^+$) 均与有关物质 3 的特征碎片一致, 表明其分子结构中也含有二苯酮单元。又 m/z 315 离子与其 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 脱去酰胺($\text{O}=\text{C}=\text{NH}$)单元相应。所以, 鉴定有关物质 7 是咪达唑仑苯并二氮杂草环上亚胺基发生水解开环、并氧化成酰胺, 而生成的二苯酮类降解杂质。

Figure 10 RS 2 $[\text{M}+\text{H}]^+$ ion MS/MS fragmentation pathways

有关物质 4 和 9 均主要为氧化降解杂质, 有关物质 12 主要在湿法光照条件下降解产生, 三者 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 的准确质量分别为 342.08008、342.08155 和 342.08078, 均与离子式 $\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{ClFN}_3\text{O}^+$ 相应, 与咪达唑仑元素组成相比, 均多一个 O 元素, 并都与咪达唑仑的氧化副产物 10 互为同分异构体。所以, 在咪达唑仑结构中, 存在多个易被氧化降解的位点, 潜在多种氧化产物结构, 需要结合二级质谱区别确证。

有关物质 4 的主要特征碎片离子(图 12) m/z 325.0683 ($\text{C}_{18}\text{H}_{11}\text{ClFN}_2\text{O}^+$)、311 ($\text{C}_{17}\text{H}_9\text{ClFN}_2\text{O}^+$)、307.1162 ($\text{C}_{18}\text{H}_{14}\text{FN}_3\text{O}^+$)、278.1128 ($\text{C}_{17}\text{H}_{13}\text{FN}^{3+}$) 和 260.0350 ($\text{C}_{14}\text{H}_8\text{ClFNO}^+$), 分别与 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 脱 NH_3 、咪唑环断裂(NH_2-CH_3)、脱 Cl 原子、脱 1 分子 HCl 和羧基单元、或咪唑环断裂脱去相应。因此, 鉴定有关物质 4 为咪达唑仑的甲基与咪唑亚胺双键异构, 并且氮杂草环的 CH_2 被氧化而成的酰基亚胺化合物。

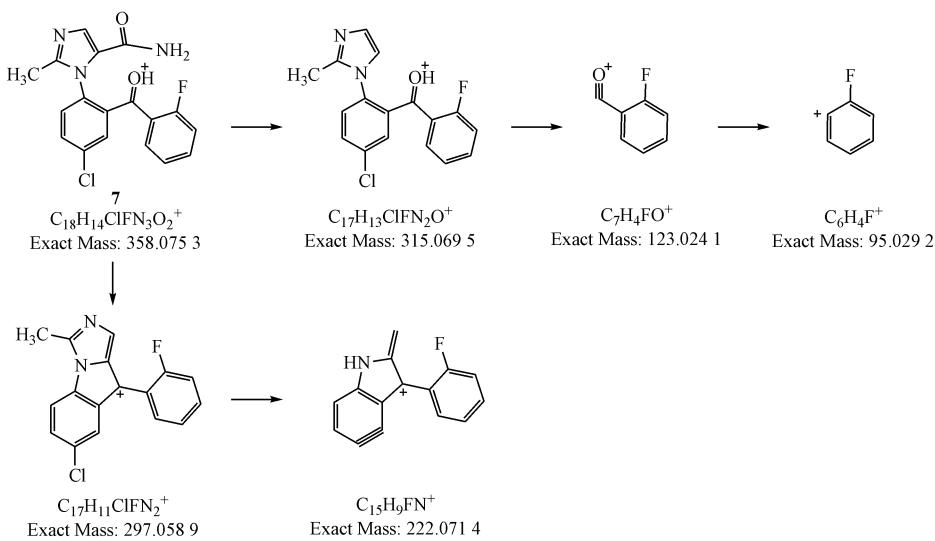


Figure 11 RS 7 $[M+H]^+$ ion MS/MS fragmentation pathways

有关物质⁹的二级质谱图与有关物质⁴相似，也有特征碎片离子 m/z 307.116 1 ($C_{18}H_{14}FN_3O^+$)、260 ($C_{14}H_8ClFN^+$)，推测二者具有类似的特征结构；但是，未见有关物质⁴特有的与 $[M+H]^+$ 脱 NH_3 和咪唑环断裂 (NH_2-CH_3) 碎片 m/z 325.068 3 ($C_{18}H_{11}ClFN_2O^+$) 和 311 ($C_{17}H_9ClFN_2O^+$)；所以，有关物质⁹中的杂环氮均为叔胺状态，其特征碎片 265.077 4 ($C_{16}H_{10}FN_2O^+$) 和 225.061 6 ($C_{14}H_8FNO^+$) 分别与 $[M+H]^+$ 脱去一个 Cl 原子且咪唑环断裂脱乙烯亚胺 ($CH_2=C=NH$)、或咪唑环与苯并二氮杂草环同时断裂特征相应。确证，有关物质⁹为咪达唑仑的咪唑环双键与氮杂草环异构后，再被氧化而成的酰基亚胺化合物（图 12）。

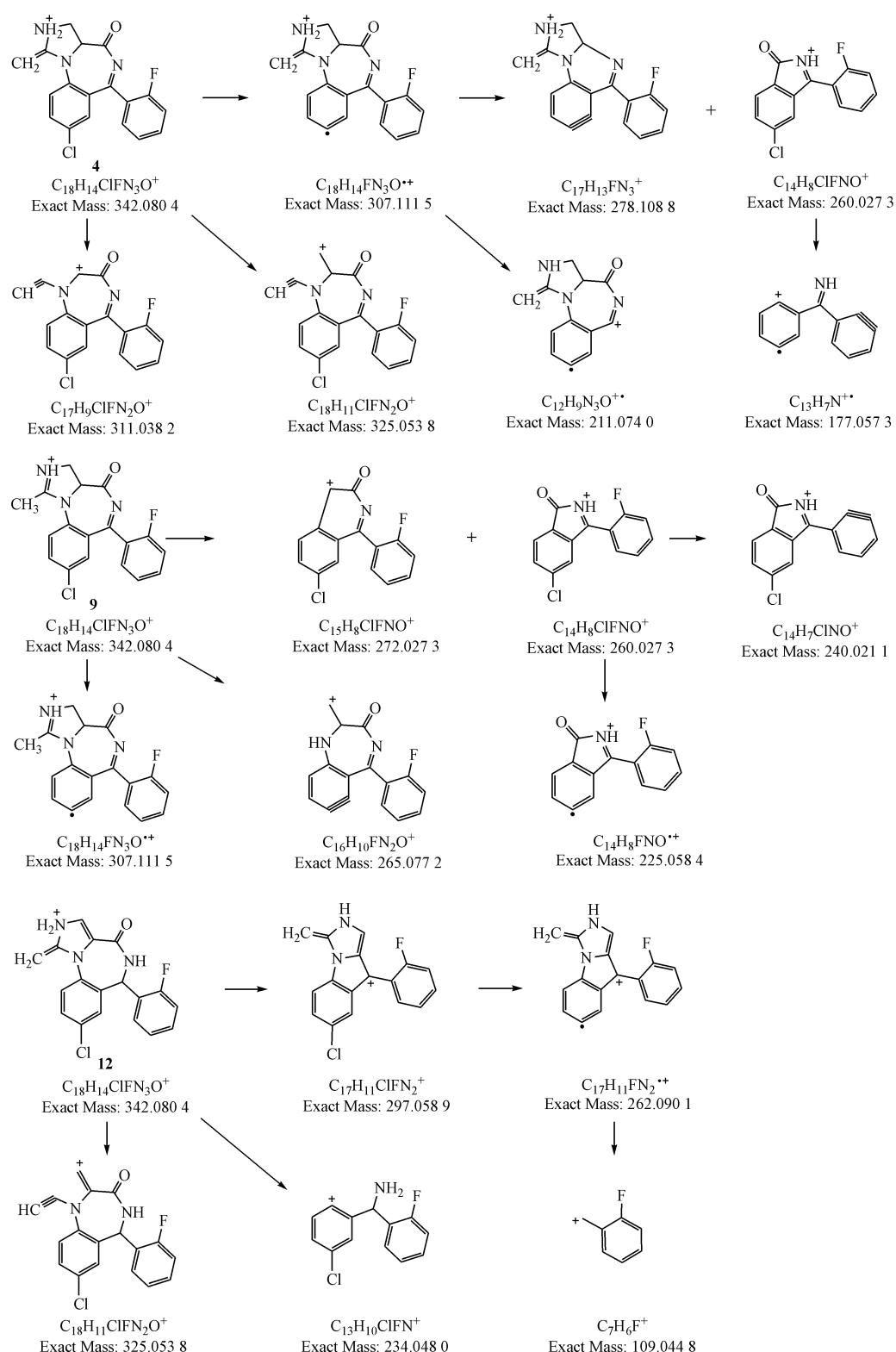
有关物质¹²的主要特征碎片离子（图 12） m/z 325.083 8 ($C_{18}H_{11}ClFN_2O^+$)、297.060 4 ($C_{17}H_{11}ClFN_2^+$) 和 262.092 4 ($C_{17}H_{11}FN_2^+$) 分别与 $[M+H]^+$ 脱去 NH_3 、脱去酰胺 ($O=CH-NH_2$)、或进一步脱去 Cl 原子相应，表明结构中存在内酰胺结构，且易脱去 NH_3 。所以鉴定有关物质¹²是咪达唑仑的甲基与咪唑亚胺双键异构和氮杂草的环亚胺的双键异构并羟基取代转化物（图 12）。

有关物质¹⁴是光照湿法条件的特征杂质，也是氧化降解杂质，其 $[M+H]^+$ 的准确质量为 289.054 47，与离子式 $C_{15}H_{11}FClN_2O^+$ 相应，与咪达唑仑元素组成相比，多 1 个 O 元素，少 C_3H_3N ；其主要特征碎片（图 13） m/z 261 ($C_{14}H_{11}ClFN_2^+$) 和 259 ($C_{14}H_9ClFN_2^+$) 均与 $[M+H]^+$ 脱去羰基相应，226.093 2 ($C_{14}H_{11}FN_2^+$) 与

206.086 7 ($C_{14}H_{10}N_2^+$) 分别为 m/z 261 脱去一个 Cl 原子、进一步脱去 1 分子 HF 而成。确证有关物质¹⁴是咪达唑仑的咪唑环氧化开环脱去，形成内酰胺的降解杂质^[13]。

有关物质¹⁵是高温湿法降解杂质，其 $[M+H]^+$ 的准确质量 326.085 55，与离子式 $C_{18}H_{14}N_3Cl^+$ 相应，与咪达唑仑及有关物质²¹的元素组成一致，三者互为同分异构体，这与咪达唑仑母核中多个双键易发生双键位置异构的特征相应；有关物质¹⁵的特征碎片离子（图 15） m/z 297.062 2 ($C_{17}H_{11}FN_2^+$)、243.100 5 ($C_{16}H_9N_3^+$) 和 221.064 7 ($C_{15}H_8FN^+$) 分别与 $[M+H]^+$ 脱亚胺 ($CH_2=NH$)、脱去 Cl 原子及 1 分子 HF 并咪唑环裂解乙烯 ($CH_2=CH_2$)、或同时脱氯且咪唑环裂解 ($CH=N-C(CH_3)=NH$) 相应； m/z 221.064 7 ($C_{15}H_8FN^+$) 比咪达唑仑特征碎片离子 223.081 3 ($C_{15}H_{10}FN^+$) 少 2，说明有关物质¹⁵是苯并二氮杂草环上为烯双键；除有关物质²¹外咪达唑仑双键位置异构体还存在两种（图 14），相对于化合物^a，化合物^b更容易脱亚胺 ($CH_2=NH$) 产生 m/z 297.062 2。所以，鉴定有关物质¹⁵是咪达唑仑高温条件下产生双键位置异构的化合物（图 15）。

有关物质¹⁶也是高温湿法降解特征杂质，并在湿法光照条件下产生，其 $[M+H]^+$ 的准确质量为 343.064 69，与离子式 $C_{18}H_{13}ClFN_2O_2^+$ 相应；与咪达唑仑元素组成相比，多 2 个 O 元素，少 NH；其主要特征碎片离子（图 16） m/z 315.0775 ($C_{17}H_{13}ClFN_2O^+$)、

**Figure 12** RS 4,9,12 $[\text{M}+\text{H}]^+$ ions MS/MS fragmentation pathways

297.068 5 ($\text{C}_{17}\text{H}_{11}\text{ClFN}_2^+$) 和 123.024 6 ($\text{C}_7\text{H}_6\text{F}^+$) 均与有关物质 3 的特征碎片一致, 表明其分子结构中也含有二苯酮单元, 又 m/z 315 离子与其 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 脱

去 CO 相应。所以, 鉴定有关物质 16 是咪达唑仑苯并二氮杂草环上亚胺基水解开环, 并氧化脱氨成醛, 而形成的二苯酮类化合物, 并通过合成对照品

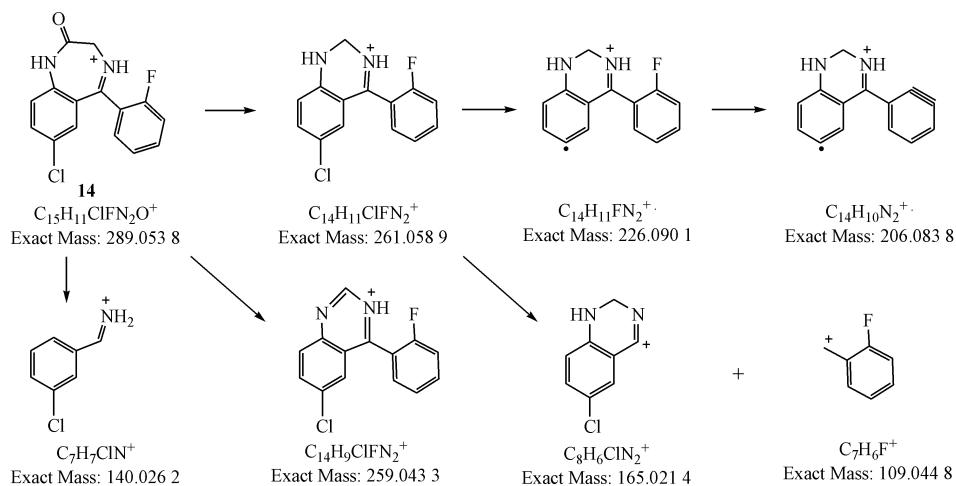


Figure 13 RS 14 $[\text{M}+\text{H}]^+$ ion MS/MS fragmentation pathways

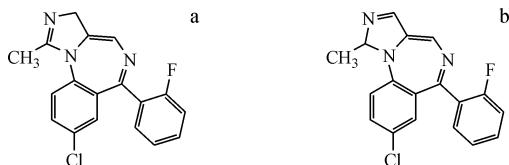


Figure 14 Possible structures of RS 15

比对确证。

有关物质**20**和**22**同为氧化降解杂质,**22**还是湿法光照条件下的特征降解杂质,测得有关物质**20**和**22** $[\text{M}+\text{H}]^+$ 的准确质量分别为273.059 55和273.059 51,均与离子式 $\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{ClFN}_2^+$ 相应,两者互为同分异构体,与咪达唑仑元素组成相比,少 $\text{C}_3\text{H}_3\text{N}$,与咪唑环的开环重排异构化相应。

有关物质**22**的主要特征碎片离子(图18) m/z 177.023 2($\text{C}_9\text{H}_6\text{ClN}_2^+$),比其 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 少96,与其结

构中易发生氟苯基裂解相应,其他裂解特征均与氯苯并1,3-哌嗪特征结构相应;MS及合成对照品比对,确证有关物质**22**其是咪达唑仑上咪唑环断裂,同时七元杂环发生重排产生的特征光降解杂质,在氧化条件下也易生成。

有关物质**20**的主要特征碎片离子 m/z 256.036 0($\text{C}_{15}\text{H}_8\text{ClFN}^+$)、221.065 8($\text{C}_{15}\text{H}_8\text{FN}^+$)和201.061 2($\text{C}_{15}\text{H}_7\text{N}^+$),分别为 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 脱 NH_3 、进一步脱去一个Cl原子、或继续脱去1分子HF产生。推测,咪唑环的开环重排异构化有3种可能的结构(图17),其中化合物**b**不易脱 NH_3 离子,化合物**c**虽易脱 NH_3 ,但其结构中含有伯氨基,极性相对较大。所以,鉴定有关物质**20**具有氮杂草的环烯单亚胺结构的化合物(图17-a,图18)。

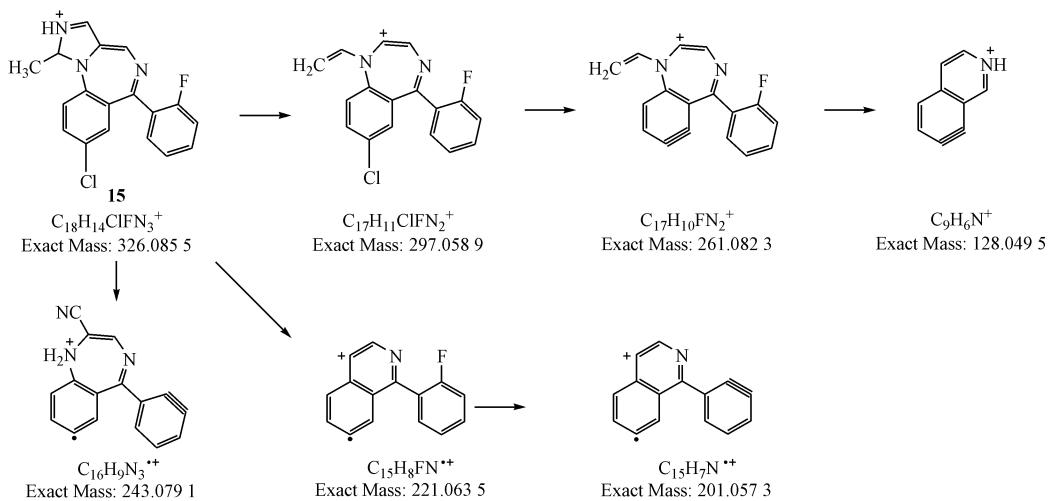


Figure 15 RS 15 $[\text{M}+\text{H}]^+$ ion MS/MS fragmentation pathways

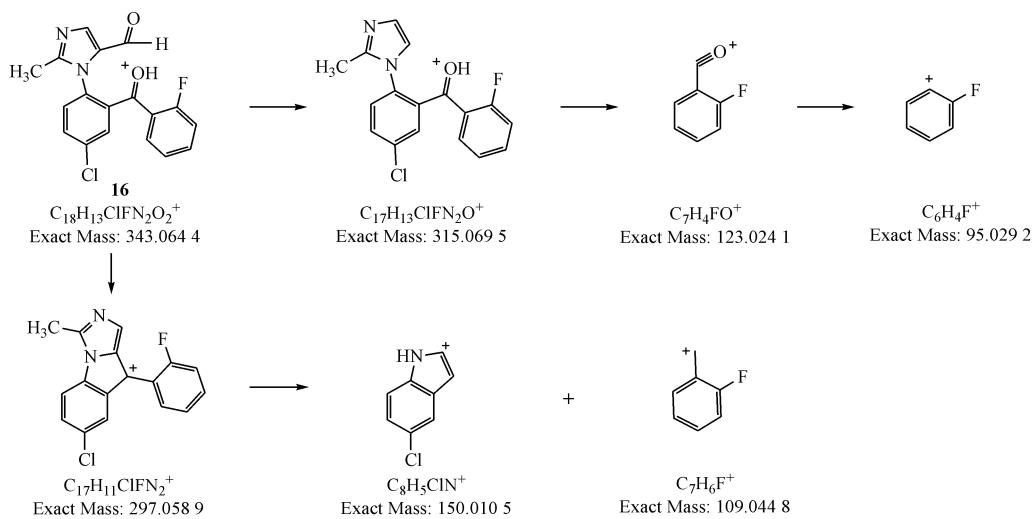
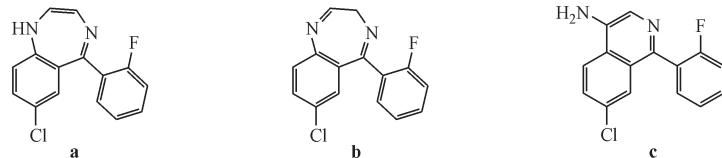
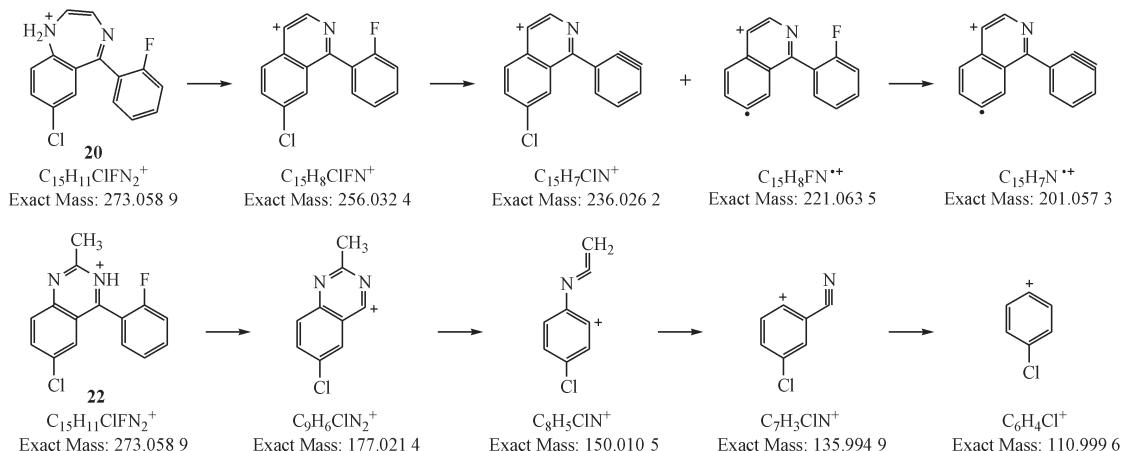
Figure 16 RS 16 $[M+H]^+$ ion MS/MS fragmentation pathways

Figure 17 Possible structures of RS 20

Figure 18 RS 20, 22 $[M+H]^+$ ions MS/MS fragmentation pathways

4 讨 论

在建立的 LC-MC 联用鉴定条件下, 盐酸咪达唑仑与各有关物质均得到有效的分离, 共检测到 22 个有关物质, 其中 8 个为工艺相关的中间体或副产物杂质: **5**、**6**、**8**、**11**、**13**、**17**、**18** 和 **19**; 有 11 个为分降解产物: **1**、**2**、**4**、**7**、**9**、**12**、**14**、**15**、**16**、**20** 和 **22**; 3 个既是工艺杂质也是降解杂质: **3**、**10** 和 **21**。

强制降解试验表明, 盐酸咪达唑仑在酸、碱条

件下咪达唑仑结构中七元杂环上亚胺基易发生水解开环, 生成特征有关物质 **3**; 在高温湿法条件下, 容易产生咪达唑仑异构体(有关物质 **15**、**21**); 在氧化、光照条件下, 咪达唑仑结构中的咪唑环和苯并二氮杂草环上亚胺基易水解开环并氧化为二苯酮类降解杂质, 或氧化为内酰胺、羟基取代转化物和 N 氧化杂质。因此, 盐酸咪达唑仑原料药应避光、阴凉暗处密闭存储。

此外, 临幊上咪达唑仑常被制成糖浆剂^[17], 并

加入枸橼酸等辅料矫味,故枸橼酸也可能参与水解,生成二苯酮胺的枸橼酸酰胺潜在制剂特征有关

物质S1,其脱H₂O则形成有关物质S2(图19),它们均已经通过杂质谱分析、MS及对照品比对确证。

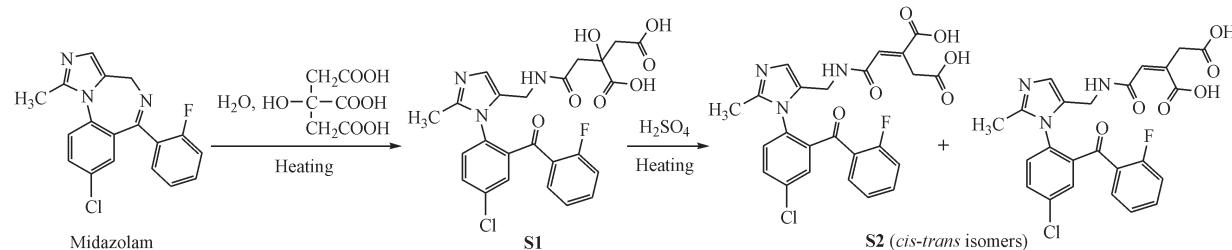


Figure 19 Synthesis of the RS S1 and S2

通过LC-MS技术对盐酸咪达唑仑有关物质进行分析研究,探讨了其杂质来源和降解途径,为其贮藏条件制定、工艺优化提供了依据,为更好的质量控制提供了参考,为稳定性研究奠定了基础^[18-19]。

参 考 文 献

- [1] Conway A, Rolley J, Sutherland JR. Midazolam for sedation before procedures[J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2016(5): CD009491.
- [2] Chen XJ, Mou XQ, He ZY, et al. The effect of midazolam on pain control after knee arthroscopy: a systematic review and meta-analysis[J]. *J Orthop Surg Res*, 2017, **12**(1): 179.
- [3] Grant MC, Kim J, Page AJ, et al. The effect of intravenous midazolam on postoperative nausea and vomiting: a meta-analysis[J]. *Anesth Analg*, 2016, **122**(3): 656–663.
- [4] Reddy SD, Reddy DS. Midazolam as an anticonvulsant antidote for organophosphate intoxication: a pharmacotherapeutic appraisal[J]. *Epilepsia*, 2015, **56**(6): 813–821.
- [5] Shtull-Leber E, Silbergbeit R, Meurer WJ. Pre-hospital midazolam for benzodiazepine-treated seizures before and after the rapid anticonvulsant medication prior to arrival trial: a national observational cohort study [J]. *PLoS One*, 2017, **12** (3) : e0173539. doi:10.1371/journal.pone.0173539.
- [6] Dao K, Giannoni E, Diezi M, et al. Midazolam as a first-line treatment for neonatal seizures: retrospective study[J]. *Pediatr Int*, 2018, **60**(5): 498–500.
- [7] Ng E, Taddio A, Ohlsson A. Intravenous midazolam infusion for sedation of infants in the neonatal intensive care unit [J]. *Cochrane Database Syst Rev*, 2017, **1**(1): CD002052.
- [8] Sivaramakrishnan G, Sridharan K. Nitrous oxide and midazolam sedation: a systematic review and meta-analysis[J]. *Anesth Prog*, 2017, **64**(2): 59–65.
- [9] Santotoribio JD, Parodi Fernández V, Mesa Suárez P. Sedation with midazolam without neurotoxic effects [J]. *Med Clin (Barc)*, 2018, **150**(11): 450.
- [10] Cheng X, Chen L, Huang LN, et al. Determination of related substances of midazolam syrup by RP-HPLC [J]. *Fujian Anal Test*(福建分析测试), 2010, **19**(2): 76–79.
- [11] Huang CY, Chen MH, Cai M, et al. Preliminary exploration and structure identification of related substances of midazolam injection by 2D-LC-IT-TOF/MS[J]. *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2017, **37**(4): 688–694.
- [12] Feng XL, Du G, Hou TY, et al. Characterization of degradation products of midazolam maleate by UHPLC-HR-IT-MSⁿ and NMR[J]. *Pharmazie*, 2017, **72**(2): 73–80.
- [13] Sati B, Sati H, Saklani S, et al. Synthesis of the impurities during the manufacture of bulk drug midazolam and separation of these impurities by HPLC [J]. *Acta Pharm*, 2013, **63**(3) : 385–396.
- [14] The United States Pharmacopeia Convention. United States Pharmacopeia 43[S]. Rockville: The United States Pharmacopeia Convention, 2020: 2952–2953.
- [15] Guo JF, Shan XY, Shi HL. Graphical synthetic routes of midazolam [J]. *Chin J Pharm*(中国医药工业杂志), 2012, **43**(5): 82–84.
- [16] Fu YG, Li L, Li J, et al. Study on conjugated system of midazolam[J]. *Chem Bioeng*(化学与生物工程), 2010, **27**(10): 31–32, 36.
- [17] Hou XY. Study on the stability of midazolam syrup solution(咪达唑仑糖浆混合液稳定性研究)[D]. Bejing: Peking Union Medical College, 2017.
- [18] Yin XY, Wang C, Ming GJ, et al. Identification of the related substances in pioglitazone hydrochloride by hyphenated LC-MS techniques[J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2017, **48**(6): 701–710.
- [19] Ni YL, Han X, Song M, et al. Identification of the related substances of cyclosporin A by LC-MS techniques [J]. *J China Pharm Univ*(中国药科大学学报), 2019, **50**(4): 423–437.