

制为主。

### 3 讨论

由表 3 方差分析结果中 2 h 累积释放度释药前期的  $X_1$ ,  $X_2$  的系数可知, HPMC、乳糖和淀粉对释放度的影响是反向的, 即 HPMC 对药物释放起促进作用, 而乳糖和淀粉起阻碍作用。可能因为乳糖是一种亲水性稀释剂, 具有较强的亲水性, 可与 HPMC 竞争片面上的水分, 使凝胶骨架片水化程度下降, 且乳糖本身为非膨胀性的水溶性辅料, 可降低 HPMC 骨架片的膨胀能力。由 6 h 累积释放度的二次模型拟合方程中的  $X_1$ ,  $X_2$  系数可知 HPMC、乳糖和淀粉对释放度的影响是同向的, 共同起到阻滞药物释放的作用。可能因为 HPMC 形成的凝胶层逐渐增厚, 凝胶强度增大, 药物释放速度趋于缓慢, 乳糖基本水化完全, 淀粉为水不溶性但遇水微弱膨胀的填充剂, 保留在凝胶结构内, 表现为阻塞水通道的阻滞释放的作用。在释药后期, 骨架溶蚀或溶解, 因此表现为

药物受 HPMC、乳糖和淀粉的影响减弱, 释药速度加快。

参考文献:

- [1] 亚森·吐尔逊, 田如玮. 中华人民共和国卫生部药品标准[S]. 维吾尔药分册. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 1999: 181.
- [2] 赵杰, 薛文华, 梁淑红. 香青兰提取物对体外培养乳鼠心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护[J]. 郑州大学学报(医学版) 2010, 45(3): 485-487.
- [3] 杨秀, 邢建国, 王新春, 等. 香青兰总黄酮 HPMC 骨架片释放度影响因素的研究[J]. 中国实验方剂学杂志 2010, 16(18): 6-10.
- [4] 吴伟, 崔光华, 陆斌. 实验设计中多指标的优化: 星点设计和总评“归一值”的应用[J]. 中国药理学杂志 2000, 35(8): 530-533.
- [5] Krajnik P, Kopac J, Sluga A. Design of grinding factors based on response surface methodology[J]. J Mater Process Technol 2005, (162-163): 629-636.
- [6] 刘艳杰, 项荣武. 星点设计效应面法在药学试验设计中的应用[J]. 中国现代应用药学杂志 2007, 24(6): 554-754.
- [7] 陈飞, 张悦, 潘卫三, 等. 星点设计法优化盐酸小檗碱树脂复合胃黏附给药系统的研究[J]. 药学报 2008, 43(9): 963-968.

[收稿日期] 2010-11-15

## 双苯氟嗪中杂质的结构分析

陈汝红<sup>1</sup>, 王熳<sup>1</sup>, 刘松雁<sup>2</sup>, 边铭<sup>2</sup>, 赵曦<sup>3</sup>, 王永利<sup>4</sup> (1. 河北省药品检验所, 河北 石家庄 050011; 2. 石家庄市兽产品质量监测中心, 河北 石家庄 050041; 3. 石药集团中奇制药技术有限公司, 河北 石家庄 050051; 4. 河北医科大学药学院, 河北 石家庄 050017)

**[摘要]** 目的: 采用高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)和高效液相色谱-二极管阵列检测(HPLC-PDA)法对双苯氟嗪中的杂质进行结构分析。方法: 采用  $C_{18}$  柱, 甲酸铵溶液(用甲酸调节 pH 至 3.2)-甲醇为流动相, 线性梯度洗脱, 流速  $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ , 柱温  $45^\circ\text{C}$ , MS/MS 和 PDA 分别检测。结果: 双苯氟嗪中的主要杂质有效分离, 通过解析获取的质谱和紫外信息, 结合原料合成工艺, 对其中 3 个未知杂质的结构进行了推断。结论: 本实验分离鉴别了双苯氟嗪中的主要杂质, 为双苯氟嗪的质量控制和工艺优化提供了参考。

**[关键词]** 双苯氟嗪; 杂质; 结构分析; 高效液相色谱-串联质谱; 高效液相色谱-二极管阵列检测

[中图分类号] R917 [文献标识码] A [文章编号] 1001-5213(2011)15-1241-04

## Structure analysis on impurities in dipfluzine

CHEN Ru-hong<sup>1</sup>, WANG Man<sup>1</sup>, LIU Song-yan<sup>2</sup>, BIAN Ming<sup>2</sup>, ZHAO Xi<sup>3</sup>, WANG Yong-li<sup>4</sup> (1. Hebei Provincial Institute for Drug Control, Hebei Shijiazhuang 050011, China; 2. Shijiazhuang Animal Products Quality Monitoring Center, Hebei Shijiazhuang 050041, China; 3. Pharmaceutical Research Institute of Shijiazhuang Pharmaceutical Group Co. Ltd., Hebei Shijiazhuang 050051, China; 4. School of Pharmacy, Hebei Medical College, Hebei Shijiazhuang 050017, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To analyze structures of impurities in dipfluzine by means of HPLC-MS/MS and HPLC-PDA. **METHODS** The HPLC separation was carried on an ODS column by linear gradient elution with a mixture solution of ammonium formate solution (adjust pH to 3.2 with formic acid) and methanol. The flow rate was  $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$  and the column temperature was  $45^\circ\text{C}$ . Sample was detected by MS/MS and PDA respectively. **RESULTS** Major impurities in dipfluzine could be effectively separated. Through analysing informations of MS and UV acquired and combining synthetic process of raw material, deduced structures of three un-

**[基金项目]** 国家一类新药—双苯氟嗪的开发; 国家高科技研究发展计划(863 计划) 资助项目(编号: 2002AA2Z3132) **[作者简介]** 陈汝红, 女, 硕士, 副主任药师, 电话: 0311-85212007-8029, E-mail: crh030227@sohu.com **[通讯作者]** 王永利, 男, 博士, 教授, 电话: 0311-86266432, E-mail: wangyl52@heinfo.net

known impurities in dipfluzine. **CONCLUSION** The test separated and identified major impurities in dipfluzine sample and was useful for its quality control and process optimization .

**KEY WORDS:** dipfluzine; impurities; structure analysis; HPLC-MS/MS; HPLC-PDA

双苯氟嗪是国内研制开发的一类新药,属于哌嗪类钙拮抗剂,结构式见图 1。药理学研究<sup>[1]</sup>表明,双苯氟嗪能选择性扩张脑血管,作用强于同类药物氟桂利嗪、桂利嗪,还具有抗血栓、抗缺血性脑损伤、改善缺血性脑水肿和改善记忆障碍等作用。ICH<sup>[2]</sup>要求,应对新原料药中实际存在的、含量大于 0.10% (最大剂量 ≤ 2 g/日) 的杂质的结构特征进行描述。文献<sup>[3]</sup>仅对双苯氟嗪进行了有关物质的分离和测定,未见对其未知杂质结构分析的报道。本实验采用高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)和高效液相色谱-二极管阵列检测(HPLC-PDA)法,通过分析获取的质谱和紫外信息,结合原料合成工艺,对液相分离得到的 3 个主要杂质的结构进行了推断,为双苯氟嗪的质量控制和工艺优化提供参考。

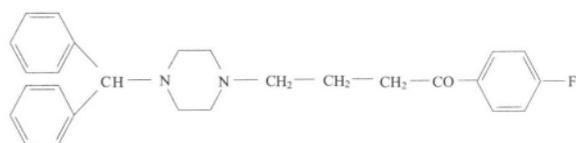


图 1 双苯氟嗪的结构式  
Fig 1 Structure of dipfluzine

## 1 材料

**1.1 仪器** Agilent 1200 高效液相色谱仪, Agilent 6410B 三重四级杆质谱仪(美国 Agilent 公司); 岛津 LC-20A 高效液相色谱仪(日本岛津公司), API 4000 三重四级杆质谱仪(美国 Applied Biosystems 公司); Waters 2695 高效液相色谱仪, Waters 2487 紫外检测器(美国 Waters 公司); 岛津 LC-10ADvp 高效液相色谱仪, SPD-M10Avp 二极管阵列检测器(日本岛津公司); 岛津 LC-20AT 高效液相色谱仪, SPD-M20A 二极管阵列检测器(日本岛津公司)。

**1.2 试药** 双苯氟嗪原料(河北医科大学,批号 020905、020919、020928); 二苯甲基哌嗪原料(由河北医科大学提供); 甲醇为色谱纯,甲酸铵、甲酸为分析纯。

## 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 色谱柱: Phenomenex Gemini C<sub>18</sub> (250 mm × 4.60 mm, 3 μm); 流动相 A: 10 mmol · L<sup>-1</sup> 甲酸铵溶液(用甲酸调节 pH 至 3.2); 流动相 B: 甲醇; 流速: 0.5 mL · min<sup>-1</sup>, 线性梯度洗脱。柱温: 45 °C (见表 1)。

**2.2 质谱条件** 离子化模式: 电喷雾离子源(ESI), 正离子模式; 毛细管电压: 4 000 V; 雾化器压

表 1 色谱条件

Tab 1 Conditions of chromatography

时间/min	流动相 A/%	流动相 B/%
0	45	55
30	15	85
45	15	85
46	45	55
60	45	55

力: 40 psi; 干燥气流速: 10 L · min<sup>-1</sup>; 干燥气温度: 350 °C; 全扫描模式; 扫描范围: m/z 100 ~ 700; 裂解电压: 120.0 V; 碰撞能量: 15.0 ~ 25.0 V (安捷伦 6410B 三重四级杆质谱仪)。

**2.3 供试品溶液的制备** 取双苯氟嗪原料 10 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇 15 mL 使溶解, 再加上上述甲酸铵溶液稀释至刻度, 摇匀。

**2.4 杂质的分离** 采用上述色谱条件, 取供试品溶液 50 ~ 100 μL 注入液相色谱仪, 检测波长 230 nm, 记录色谱图, 见图 2。

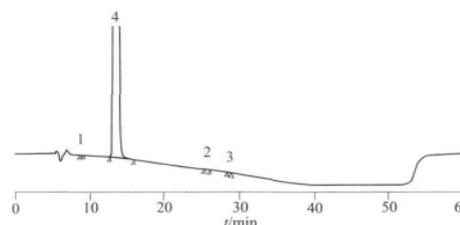


图 2 双苯氟嗪的杂质分离色谱图

1-杂质 1; 2-杂质 2; 3-杂质 3; 4-双苯氟嗪

Fig 2 Separation chromatogram of impurities in dipfluzine

1-impurity No. 1; 2-impurity No. 2; 3-impurity No. 3; 4-dipfluzine

## 2.5 杂质的分析

**2.5.1** 在 ESI 正离子模式下, 对供试品进行一级质谱扫描, 得到杂质 2 的准分子离子 [M + H]<sup>+</sup> 为 m/z 545.3; 对其进行二级质谱扫描, 裂解碎片离子为 m/z 377.2, 210.1, 167.1。杂质 2 的一级(扣除背景)和二级质谱见图 3。

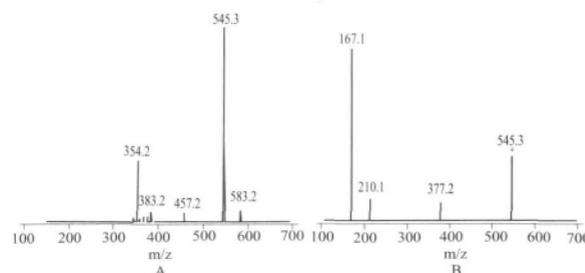


图 3 杂质 2 的一级(A)和二级(B)质谱图

Fig 3 ESI-MS(A) and ESI-MS/MS(B) of impurity No. 2

双苯氟嗪是由 4-氯-1-(4-氟苯基)-1-丁酮分子末端的氯被二苯甲基哌嗪取代而生成。根据一级和二级质谱信息,结合以上合成工艺,借助 High Chem Mass Frontier 1.0 质谱解析软件,推断杂质 2 的分子结构(见图 4)。

质谱解析软件给出的杂质 2 二级质谱的裂解途径

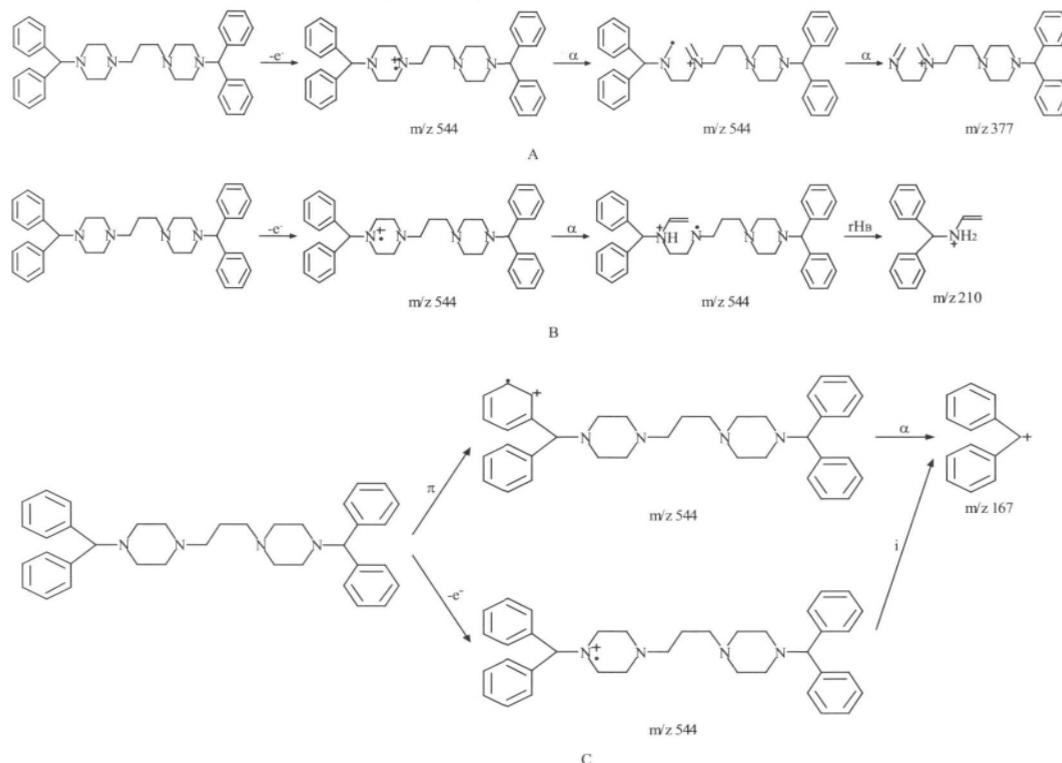


图 5 杂质 2 的二级质谱裂解途径

Fig 5 Proposed fragmentation pathway of impurity No. 2 in ESI-MS/MS

2.5.2 杂质 3 的准分子离子  $[M + H]^+$  为  $m/z$  649.3, 对其进行二级质谱扫描, 裂解碎片离子为  $m/z$  397.2、167.0。杂质 3 的一级(扣除背景)和二级质谱见图 6。

同法推断杂质 3 的分子结构, 见图 7。

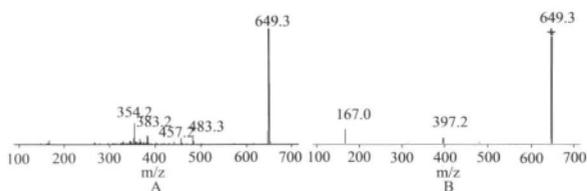


图 6 杂质 3 的一级(A)和二级(B)质谱图

Fig 6 ESI-MS(A) and ESI-MS/MS(B) of impurity No. 3

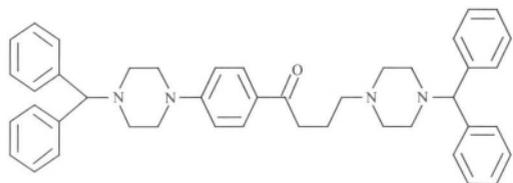


图 7 杂质 3 的分子结构

Fig 7 Structure of impurity No. 3

径如图 5 所示。

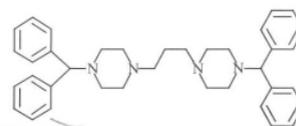


图 4 杂质 2 的分子结构

Fig 4 Structure of impurity No. 2

质谱解析软件给出的杂质 3 二级质谱的裂解途径和图 8 所示。

2.5.3 采用文献[3]的 HPLC 法及 PDA 检测, 比较 6 种反应物或中间体溶液的主峰和粗品溶液中的未知杂质峰的峰位和紫外吸收图谱, 结果粗品溶液中的杂质 1 与中间体二苯甲基哌嗪的保留时间和光谱特征一致。采用本实验的 HPLC-MS/MS 及 HPLC-PDA 法验证, 杂质 1 的保留时间、紫外光谱与二苯甲基哌嗪一致, 准分子离子均为  $m/z$  253.2, 二级裂解碎片离子均为 167, 164, 152。鉴于二者色谱保留值、光谱特征、相对分子质量及质谱裂解行为的一致性, 确定杂质 1 为二苯甲基哌嗪, 分子结构如图 9 所示。

### 3 讨论

文献[3]采用的流动相含四丁基溴化铵, 不适合直接用于液质联用检测, 宜选用低浓度挥发性的添加剂。双苯氟嗪中的杂质含量较低, 均在 0.3% 以下。使用羧酸或羧酸铵盐时, 短波长处本底吸收较

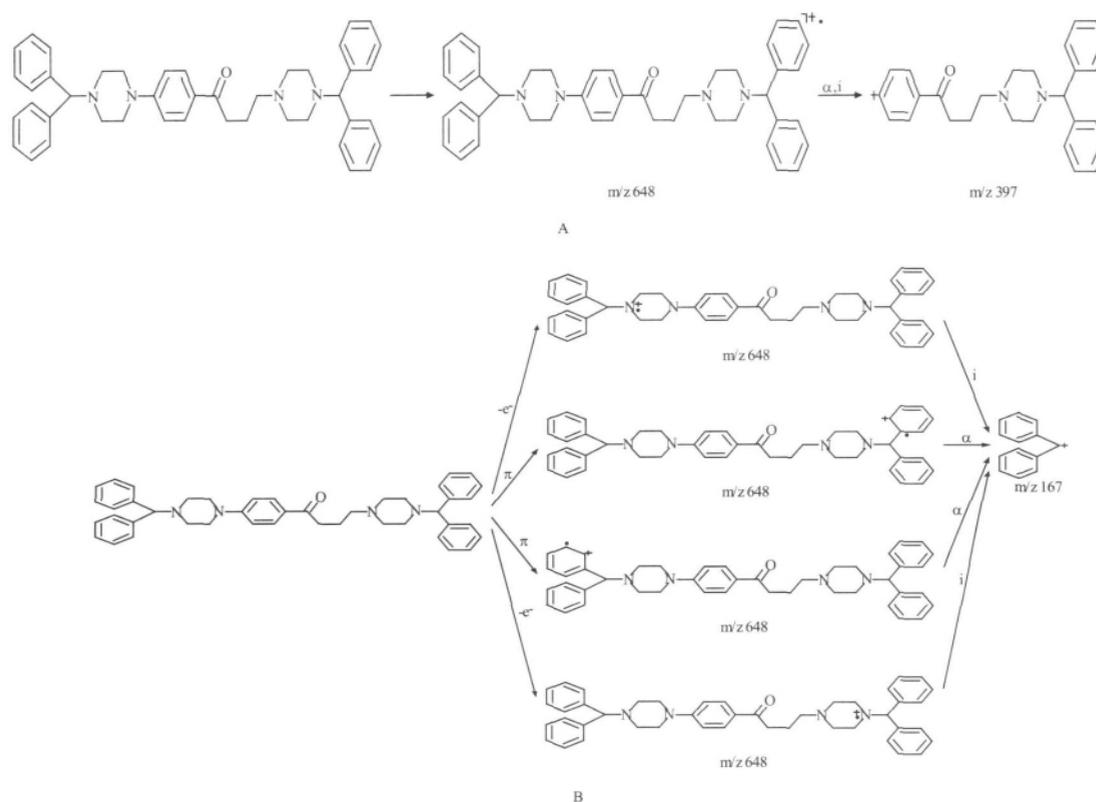


图 8 杂质 3 的二级质谱裂解途径

Fig 8 Proposed fragmentation pathway of impurity No. 3 in ESI-MS/MS

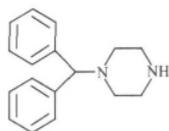


图 9 杂质 1 的分子结构

Fig 9 Structure of impurity No. 1

大, 尝试采用等度洗脱, 检测灵敏度低, 紫外检测器难以检出杂质。为提高检测灵敏度, 缩短分析时间, 改用线性梯度洗脱, 并对甲酸、醋酸、甲酸铵和醋酸铵 4 种常用的添加剂进行筛选, 调整 pH 和浓度, 确定上述色谱条件。HPLC-PDA 检测显示, 3 个杂质峰未检出不纯物。

采用两台不同型号的液质联用仪, 对样品进行一级质谱扫描, 结果 3 个未知杂质的准分子离子  $m/z$  一致。对二级质谱的碰撞能量进行了选择, 使杂质母离子裂解产生合适数量的碎片离子以供分析。

本实验通过对比杂质 1 和中间体二苯甲基哌嗪的保留时间、光谱特征、相对分子质量及裂解行为,

确定为同一物质。利用 HighChem Mass Frontier 1.0 质谱解析软件, 解析质谱给出的结构信息, 并结合双苯氟嗪的合成路线, 推断了杂质 2、3 的化学结构, 二者可能为原料合成过程中产生的副产物。杂质 2 由二苯甲基哌嗪取代 4-氯-1-(4-氟苯基)-1-丁酮分子两端的氯和对氟苯甲酮生成, 杂质 3 则由二苯甲基哌嗪取代 4-氯-1-(4-氟苯基)-1-丁酮分子两端的氯和氟生成。3 个杂质结构的推断, 为该新药的进一步质量工艺研究提供了实验参考。

参考文献:

- [1] 陈汝红, 郭毅, 刘铁钢. 哌嗪类钙拮抗剂的研究进展[J]. 中国药房, 2006, 17(2): 142-144.
- [2] ICH 指导委员会. 药品注册的国际技术要求 2007 质量部分[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2006: 101-111.
- [3] 陈汝红, 郭毅, 刘铁钢, 等. 反相高效液相色谱法测定双苯氟嗪及其片剂的含量和有关物质[J]. 药物分析杂志, 2006, 26(4): 486-490.

[收稿日期]2011-02-14