

多索茶碱注射液杂质谱研究

王琼芬, 徐虹, 刘婷, 倪东宇

(浙江省舟山市食品药品检验检测研究院, 舟山 316000)

摘要 **目的**:研究多索茶碱注射液的杂质谱,鉴定杂质的结构、明确杂质来源及生产工艺间的关系。**方法**:采用 HPLC 法,色谱柱为 XBridge C₁₈ 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm),以乙腈-磷酸盐缓冲液(pH 5.8)(12:88)为流动相,流速 1.0 mL·min⁻¹,柱温 25 °C,检测波长 273nm,测定多索茶碱注射液有关物质,确定检出杂质,结合酸、碱、氧化、高温、光照破坏试验和工艺分析归属杂质来源,采用 UPLC-MS/MS 技术确证杂质结构。**结果**:4 家企业生产的多索茶碱注射液共检测出 5 种杂质,其中杂质 1 为 7-(2', 2' -二羟基)-1, 3-二甲基-1H-嘌呤-2, 6(3H, 7H)-二酮,杂质 3 为 1-((1, 3-二氧戊环-2-基)甲基)-N-甲基-4-(甲基氨基)-1H-咪唑-5-甲酰胺,杂质 4 为 7-(2-羟乙基)-1, 3-二甲基-1H-嘌呤-2, 6(3H, 7H)-二酮,杂质 2 为茶碱,杂质 5 为 1, 3-二甲基-9-(1, 3-二氧环戊基-2-基)甲基-3, 9-二氢-1H-嘌呤-2, 6-二酮。**结论**:工艺分析结果表明杂质来源,杂质 1、3、4 为降解杂质,杂质 2、5 分别为多索茶碱合成起始原料和合成副产物杂质。**关键词**:多索茶碱注射液;杂质谱;有关物质;高效液相色谱;超高效液相色谱质谱联用;归属杂质来源;确证杂质结构;工艺优化

中图分类号:R 917 文献标识码:A 文章编号:0254-1793(2018)03-0464-05
doi:10.16155/j.0254-1793.2018.03.13

Impurity profile study of doxofylline injection

WANG Qiong-fen, XU Hong, LIU Ting, NI Dong-yu

(Zhoushan Institute for Food and Drug Control, Zhoushan 316000, China)

Abstract Objective:To investigate the impurity profile of doxofylline injection, identify the structures and sources of impurities. **Method**:HPLC separation of all detected impurities was carried out on a Waters XBridge C₁₈ column(4.6 mm×250 mm, 5 μm), with a mobile phase consisting of acetonitrile-phosphate buffer(pH 5.8)(12:88) at a flow rate of 1.0 mL·min⁻¹, the column temperature was 25 °C and the detection wavelength was 273 nm. The sources of impurities were studied by combining degradation test results and synthesis process. The structures of impurities were identified by UPLC-MS/MS. **Result**:Five impurities were detected in four pharmaceutical manufacturers. **Conclusion**:Process analysis showed the source of impurities. Impurity 1, 3, 4 were degradation impurities and impurity 2, 5 were process related substances.

Keywords:doxofylline injection; impurity profile; related substances; HPLC; UPLC-MS/MS; identification of impurity source; confirmation of impurity structure; process optimization

第一作者 Tel:(0580)2033860; Email:wqf6512@aliyun.com

多索茶碱(doxofylline)为甲基黄嘌呤衍生物,是一类新型抗支气管痉挛药,用于治疗支气管哮喘、喘息型慢性支气管炎及其他支气管痉挛引起的呼吸困难^[1],疗效和安全性明显优于传统茶碱类药物^[2-3]。多索茶碱注射液已收载于中国药典2015年版^[4],USP、EP、BP均未收载。药典标准有关物质检查项下仅对单个杂质含量和杂质总量规定限度,文献对多索茶碱有关物质测定方法和限度的研究^[5-9]较多,也有文献^[10-12]对多索茶碱注射液中4个杂质分别有过报道,但对本品全面系统的杂质谱研究阐述未见报道。本文通过对4家企业48批次样品的杂质谱研究,发现共有5个杂质,其中2个为工艺杂质,3个为降解杂质,并采用UPLC-MS/MS技术确证杂质结构,结合强制破坏试验和工艺分析归属杂质结构,旨在为多索茶碱注射液的工艺优化和质量控制提供依据。

1 仪器与试剂

Agilent 1260 高效液相色谱仪(美国安捷伦公司)、LCMS-8040 液相色谱三重四极杆质谱联用仪(岛津企业管理(中国)有限公司)、CPA225D 电子天平(赛多利斯科学仪器(北京)股份公司)、Inertsil ODS-3 色谱柱(十八烷基硅烷键合硅胶;规格:2.1 mm × 75 mm, 2 μm; 日本岛津公司)。

多索茶碱对照品(批号100625-201202,纯度99.9%)、茶碱对照品(杂质2,批号100121-201104,纯度100%)均购自中国食品药品检定研究院;7-(2',2'-二羟基)-1,3-二甲基-1*H*-嘌呤-2,6(3*H*,7*H*)-二酮(杂质1,批号141215,纯度:99.2%)、1-((1,3-二氧戊环-2-基)甲基)-*N*-甲基-4-(甲基氨基)-1*H*-咪唑-5-甲酰胺(简称杂质3,批号141217,纯度:99.8%)、7-(2-羟乙基)-1,3-二甲基-1*H*-嘌呤-2,6(3*H*,7*H*)-二酮(简称杂质4,批号141221,纯度:99.2%)均由黑龙江福和星制药集团股份有限公司提供;1,3-二甲基-9-(1,3-二氧环戊基-2-基)甲基-3,9-二氢-1*H*-嘌呤-2,6-二酮(简称杂质5,批号160323,纯度:99.9%)由福安药业集团宁波天衡制药有限公司提供。48批次多索茶碱注射液样品均为省级药品质量风险考核抽验样品,分别由黑龙江福和星制药集团股份有限公司、安徽恒星制药有限公司、福安药业集团宁波天衡制药有限公司、浙江北生药业汉生制药有限公司4家企业(简

称A~D)生产,6批原料药分别由企业A和C生产。乙腈为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

2 实验方法

2.1 高效液相色谱条件

色谱柱:Waters XBridge C₁₈柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm; 填料:十八烷基硅烷键合硅胶;Waters公司);流动相:乙腈-磷酸盐缓冲液(pH 5.8)(12:88);流速:1.0 mL · min⁻¹;柱温:25 °C;检测波长:273 nm;进样体积:10 μL。

2.2 超高效液相色谱条件

色谱柱:Inertsil ODS-3柱(2.1 mm × 75 mm, 2 μm);流动相:乙腈-0.1%甲酸水溶液(50:50);流速:0.3 mL · min⁻¹;柱温:35 °C;检测波长:273 nm;进样体积:5 μL。

2.3 质谱条件

离子化模式:ESI⁺;扫描模式:MRM;扫描范围:*m/z* 50~300,离子喷雾电压:4.5 kV;雾化气流速:3.0 L · min⁻¹;干燥气流速:15.0 L · min⁻¹;DL温度:250 °C;加热模块温度:400 °C。

2.4 溶液的制备

2.4.1 供试品溶液 量取供试品1 mL,加水稀释制成含多索茶碱1 mg · mL⁻¹的溶液,即得。

2.4.2 对照溶液 精密量取供试品溶液1 mL,置200 mL量瓶中,用水稀释至刻度,即得。

2.4.3 杂质对照品溶液 取杂质1、2、3、4、5对照品适量,精密称定,分别加水溶解并定量制成5 μg · mL⁻¹的杂质对照品储备液。各精密量取上述储备液适量,加水稀释制成0.5 μg · mL⁻¹的混合溶液,摇匀,用于有关物质HPLC外标法测定。精密吸取上述储备液适量,分别加水制成100 ng · mL⁻¹的溶液,摇匀,用于UPLC-MS/MS结构确证。

2.4.4 系统适用性试验溶液 取5种杂质和多索茶碱对照品适量,精密称定,加水稀释制成约10 μg · mL⁻¹的混合溶液,摇匀,即得。

2.5 强制降解试验

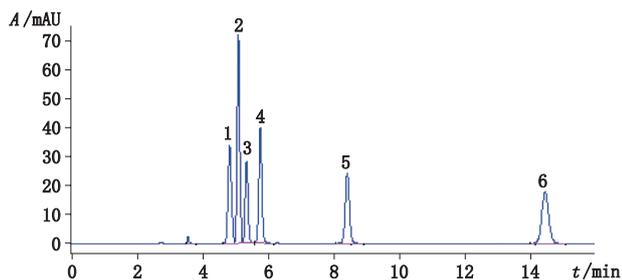
选择企业A样品进行强制降解试验。精密量取供试品2 mL,置20 mL量瓶中,分别进行酸破坏(加1 mol · L⁻¹盐酸溶液2 mL,摇匀,60 °C水浴加热30 min,放冷,中和)、碱破坏(加0.2 mol · L⁻¹氢氧化钠溶液2 mL,摇匀,60 °C水浴加热30 min,放冷,中和)、氧化破坏(加30%过氧化氢溶液2 mL,振摇,室温放置1 h)、高

温破坏(水浴加热 1 h)、光照破坏(4 500 lx 照射 12 h),上述破坏后溶液分别加水定容,摇匀。

3 实验结果

3.1 系统适用性试验溶液

按“2.1”项下色谱条件进样,多索茶碱和各杂质 HPLC 典型色谱图见图 1。按组分流出顺序分别对主成分和各杂质进行编号,多索茶碱和各杂质 HPLC 图见图 1,各杂质间、杂质和主成分间的分离度良好,分离度均大于 1.5,5 种杂质均在主成分前出峰。多索茶碱和各杂质的结构式见图 2。



1. 杂质 1 (impurity 1) 2. 杂质 2 (impurity 2) 3. 杂质 3 (impurity 3) 4. 杂质 4 (impurity 4) 5. 杂质 5 (impurity 5) 6. 多索茶碱 (doxofylline)

图 1 杂质谱研究系统适用性试验 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of system suitability test

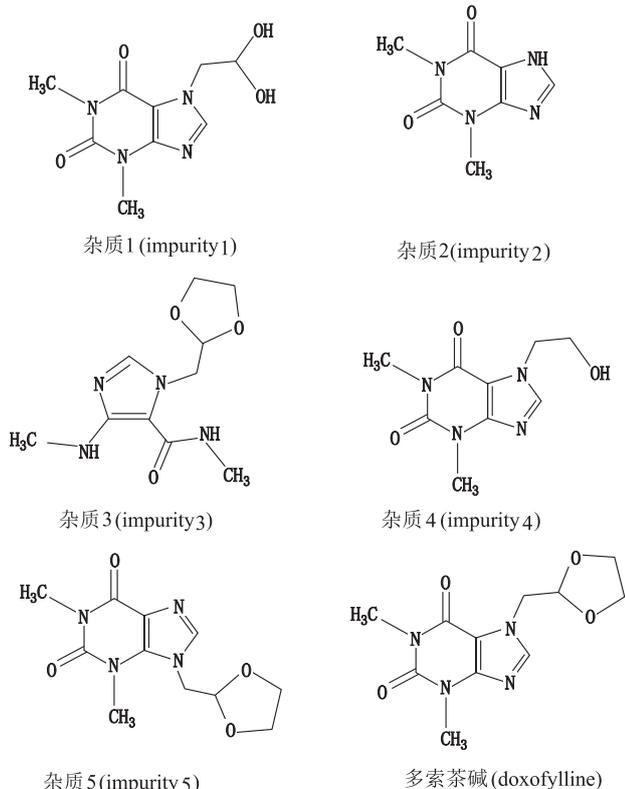


图 2 多索茶碱和各杂质结构式

Fig. 2 Structures of doxofylline and impurity

3.2 强制降解试验溶液

按“2.1”项下色谱条件进样,典型色谱图见图 3。试验结果表明,多索茶碱注射液对光、热稳定,杂质数量与含量基本未变,对酸、碱、氧化不稳定,均有不同程度的降解。酸破坏的主要降解产物是 4.8 min 处的杂质 1 (3.2%),碱破坏的主要降解产物是 5.3 min 处的杂质 3 (2.1%),上述 2 个降解产物峰与杂质对照品峰经 DAD 扫描,光谱图完全一致。氧化破坏显示在 2.6 min 处有一较大色谱峰 (7.2%),在 5.3 min 和 5.8 min 处出现 2 个杂质峰,含量均为 0.1%,同时杂质 1 峰消失,主成分峰面积无明显变化。经对空白溶剂进样分析,显示 2.6 min 处峰为溶剂峰,2 个新增杂质峰保留时间与图 1 中的杂质 3 和杂质 4 一致,通过对杂质 1、3、4 的结构进行分析,推测最大可能是杂质 1 在氧化条件下,进一步降解变成杂质 3,而少量的杂质 4 由多索茶碱氧化降解而成。综上所述,杂质 1、3、4 均为降解杂质,而杂质 2、5 在降解产物中均未发现。

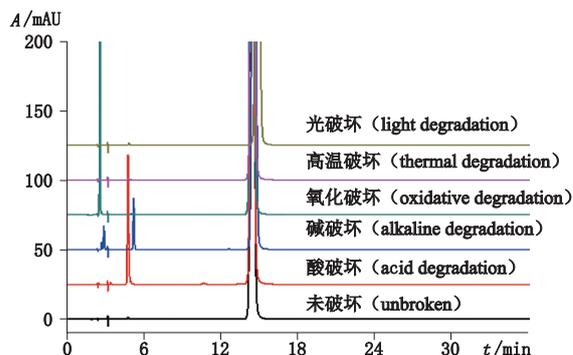


图 3 多索茶碱注射液强制降解试验 HPLC 色谱图

Fig. 3 HPLC chromatography of degradation test solution

3.3 样品有关物质测定结果

对 4 个厂家 48 批次样品按“2.1”项下色谱条件,采用外标法测定有关物质,样品中各杂质测定结果见表 1。由表可见,48 批次样品中均检出杂质 1;杂质 2 和杂质 4 只在企业 B 部分样品中检出;杂质 5 在企业 C 样品中均有检出;所有样品中均未检出杂质 3。

3.4 杂质结构分析确证

取企业 A 样品适量,加水制成约含多索茶碱 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液,按“2.2”、“2.3”项下条件进样,得多索茶碱注射液杂质的总离子流色谱图见图 4。

采用 UPLC-MS/MS 技术对杂质 1、3、4 和 5 进行扫描,得到杂质的一、二级质谱信息,结果见表 2。

表 1 各厂家样品有关物质测定结果(%)

Tab. 1 The determination resultsof related substances in samples from manufacturers

生产 企业 (manu- facturer)	批次 (batch)	杂质 1 (impurity 1)		杂质 2 (impurity 2)		杂质 3 (impurity 3)		杂质 4 (impurity 4)		杂质 5 (impurity 5)	
		检出批次 (detected batch)	含量 (content)								
A	12	12	0.02~0.08	—	—	—	—	—	—	—	—
B	12	12	0.02~0.03	4	0.01	—	—	4	0.01	—	—
C	12	12	0.01~0.02	—	—	—	—	—	—	12	0.02~ 0.06
D	12	12	0.02~0.03	—	—	—	—	—	—	—	—

“—”表示未检出(not detected)

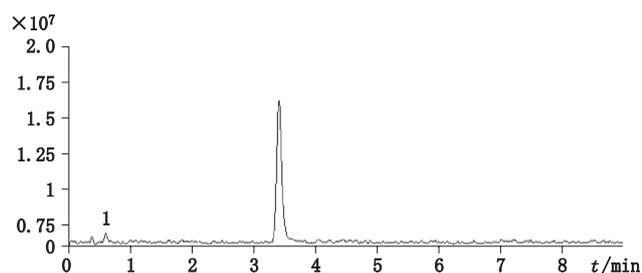


图 4 杂质总离子流色谱图

Fig. 4 TIC of the impurity

4 讨论

4.1 杂质 1

杂质 1 在 48 批次样品中均有检出,含量均值 0.04%,其中企业 A 样品中含量最高,最大值接近药典规定的单个杂质限度值(0.1%),该杂质在 6 批原料中均未检出。杂质 1 为酸破坏降解产物,药典标准中多索茶碱注射液的 pH 范围为 4.5~6.5,48 批次样品 pH 测定结果为 5.5~5.9,药液呈弱酸性,表明多索茶碱在该酸性条件下会发生不同程度的降解。考察

表 2 多索茶碱及杂质 UPLC-MS/MS 测定数据

Tab. 2 UPLC-MS/MS data of doxofylline and impurities

杂质 (impurity number)	分子量 (molecular weight)	分子式 (molecular formula)	[M+H] ⁺ (parent ion)/(m/z)	产物离子 (product ion)/(m/z)
多索茶碱 (doxofylline)	266	C ₉ H ₁₂ N ₄ O ₃	267	181, 138, 124, 87, 69
1	240	C ₉ H ₁₀ N ₄ O ₃	241	181, 138, 124, 96, 69
3	240	C ₁₀ H ₁₆ N ₄ O ₃	241	138, 124, 96, 87, 69
4	224	C ₉ H ₁₂ N ₄ O ₃	225	181, 124, 96, 69
5	266	C ₉ H ₁₂ N ₄ O ₃	267	181, 124, 87, 69

杂质 1 含量与储存时间的相关性,发现同一厂家样品杂质 1 含量随出厂日期先后呈下降趋势,同一批次样品随着储存时间延长,杂质 1 含量均略有增加,表明杂质 1 含量与储存时间呈正相关。

4.2 杂质 5

杂质 5 只企业 C 的 12 批样品中检出,为企业 C 样品中特有的杂质,通过对企业 C 生产的多索茶碱原料有关物质进行测定,发现 3 批原料中也均含有该杂质,推测杂质 5 为原料合成产生的副产物,

对比杂质 1 和杂质 5 的一级质谱图,发现[M+H]⁺均出现 m/z 267,二级质谱图中均出现 m/z 181、m/z 124、m/z 87 和 m/z 69 碎片离子,由此推断杂质 5 为多索茶碱的同分异构体。经过分析企业 C 的原料合成工艺,发现杂质 5 的产生与茶碱和侧链(溴代乙醛乙二醇缩醛)反应所使用的溶媒有关,企业 C 采用的溶媒是 N,N-二甲基乙酰胺,而其他企业采用的溶媒是 N,N-二甲基甲酰胺,表明使用 N,N-二甲基乙酰胺做溶媒易引发茶碱结构中咪唑部分的三原子体系的

互变异构现象。杂质 5 作为多索茶碱的同分异构体,很难在纯化过程除去,作为工艺杂质带入制剂中。杂质 5 的生理活性作用尚未见研究报道,出于安全考虑,建议企业 C 改进原料合成工艺,提高产品质量。

4.3 杂质 3

杂质 3 在 48 批次样品中均未检出,经对强制降解试验结果分析,杂质 3 主要为碱破坏降解产物,因多索茶碱注射液的 pH 控制在弱酸性,故在生产和贮存中不易产生碱降解产物。

4.4 杂质 2

杂质 2(茶碱)作为多索茶碱合成的起始原料 [13-14],已在药典中作为已知工艺杂质按外标法进行控制。国家药典委员会于 2016 年 8 月 22 日发布了关于多索茶碱国家标准的公示,对有关物质中茶碱的限度进行了修订,从原标准的 0.2% 修改为 0.1%。从统计数据看各厂家对茶碱的控制情况,结果表明很有效。

4.5 杂质相对相应因子测定及控制

对 5 种杂质的相对相应因子进行测定,结果杂质 1、杂质 5 的相对相应因子均为 1.0,杂质 2 为 1.6,杂质 3 为 0.7,杂质 4 为 1.2,结合 48 批次多索茶碱注射液的有关物质测定结果,认为药典标准基本合理。鉴于杂质 1 作为最大单个杂质在该制剂中普遍存在,且含量与储存时间存在正相关,建议作为特定杂质进行控制;杂质 2 相对相应因子值虽远超出主成分自身对照法适用范围(0.9~1.1)^[15],但其在原料中已作为特定杂质按外标法进行控制,且各企业对其控制良好,含量远低于 0.1%,故制剂中杂质 2(茶碱)控制未参照原料有关物质检测要求是合理的。

参考文献

- [1] 李丽,詹雨芬,梁再赋. 多索茶碱的药理学研究概述[J]. 世界临床药物, 2001, 2(2): 100
LI L, ZHAN LF, LIANG ZF. Overview of pharmacological study of doxofylline[J]. *World Clin Drug*, 2001, 2(2): 100
- [2] 俞峰,周林福. 氨茶碱和多索茶碱治疗支气管哮喘的临床疗效比较[J]. 中国生化药物杂志, 2014, 34(6): 98
YU F, ZHOU LF. Clinical observation of aminophylline and doxofylline in the treatment of bronchial asthma[J]. *Chin J Biochem Pharm*, 2014, 34(6): 98
- [3] 郑雨霖. 多索茶碱与氨茶碱治疗支气管哮喘的临床疗效对比[J]. 海峡药学, 2016, 28(3): 166
ZHENG YL. Comparison of the clinical efficacy between doxofylline and aminophylline in the treatment of Bronchial[J]. *Strait Pharm J*, 2016, 28(3): 166
- [4] 中国药典 2015 年版. 二部[S]. 2015:383
ChP 2015. Vol II [S]. 2015:383
- [5] 杜加秋,李娟,郑国钢. 多索茶碱注射液中有关注物质的 HPLC 法测定[J]. 中国医药工业杂志, 2014, 45(8): 773
DU JQ, LI J, ZHENG GG. Determination of related substances in doxofylline injection[J]. *Chin J Pharm*, 2014, 45(8): 773
- [6] 李萌,刘斐,孙松,等. 高效液相色谱法测定多索茶碱注射液有关物质与含量[J]. 安徽医药, 2013, 17(12): 2046
LI M, LIU F, SUN S, et al. HPLC analysis of doxofylline for injection and its related substances[J]. *Anhui Med Pharm J*, 2013, 17(12): 2046
- [7] 梁军. 多索茶碱注射液的质量控制[J]. 齐齐哈尔大学学报, 2012, 28(4): 9
LIANG J. Quality evaluation of doxofylline for injection[J]. *J Qiqihar Univ*, 2012, 28(4): 9
- [8] 邢海燕,刘建军,杨永. 反相高效液相色谱法测定多索茶碱注射液的有关物质[J]. 海峡药学, 2014, 26(10): 61
XING HY, LIU JJ, YANG Y. Determination of related substances in doxofylline injection by HPLC[J]. *Strait Pharm J*, 2014, 26(10): 61
- [9] 沙吉达,施友玲,余丽娘. 注射用多索茶碱有关物质和含量的 HPLC 测定法[J]. 中国药事, 2006, 20(10): 616
SHA JD, SHI YL, YU LN. HPLC analysis of doxofylline for injection and its related substances[J]. *Chin Pharm Aff*, 2006, 20(10): 616
- [10] 李娟,何佳佳,朱培曦. 多索茶碱注射液有关物质的结构分析[J]. 中国药学杂志, 2014, 49(4): 334
LI J, HE JJ, ZHU PX, et al. Identification of major impurities in doxofylline injection[J]. *Chin Pharm J*, 2014, 49(4): 334
- [11] 孙煌,姜志红,付瑞莹,等. 核磁共振和液相色谱-质谱法对多索茶碱未知杂质的结构分析[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(3): 443
SUN W, LOU ZH, FU CY, et al. Structural analysis of an unknown impurity in doxofylline injection by NMR spectroscopy and liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *Chin J Pharm Anal*, 2013, 33(3): 443
- [12] 刘绪贵,郝彦齐,丁珊珊. HPLC 法测定多索茶碱注射液中的工艺杂质及降解产物[J]. 药学研究, 2016, 35(11): 646
LIU XG, HAO YQ, DING SS. Determination of process impurities and degradation products in doxofylline injection by HPLC[J]. *Pharm Res*, 2016, 35(11): 646
- [13] 李芳. 多索茶碱注射液制备工艺与质量研究[D]. 武汉: 湖北中医药大学, 2014
LI F. Studies on the Preparation and Quality Standards of Doxofylline Injection[D]. Wuhan: Hubei University of Traditional Chinese Medicine, 2014
- [14] 刘红霞,梁军. 多索茶碱的合成工艺[J]. 齐齐哈尔大学学报, 2002, 18(4): 23
LIU HX, LIANG J. Research on synthesis and technology of doxofylline[J]. *J Qiqihar Univ*, 2002, 18(4): 23
- [15] 中国药典 2010 年版. 二部[S]. 2010: 附录 204
ChP 2010. Vol II [S]. 2010: Appendix 204

(本文于 2017 年 12 月 20 日修改回)