

中图分类号: R943 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2024)21-0023-05
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2024.21.007



酒石酸唑吡坦关键中间体的有关物质检测与主要杂质合成*

李 翼¹, 刘 秀¹, 王玲兰¹, 钟超泽¹, 朱跃芳^{2△}

(1. 株洲千金药业股份有限公司, 湖南 株洲 412000; 2. 湖南省株洲市食品药品检验所, 湖南 株洲 412000)

摘要:目的 控制酒石酸唑吡坦关键中间体化合物3的质量。方法 采用高效液相色谱法检测化合物3中有关物质, 色谱柱为 Agilent Pursuit 5 C₁₈ 柱(150 mm × 3.9 mm, 5 μm), 流动相为 pH 6.0 磷酸盐缓冲液-甲醇-乙腈(梯度洗脱), 流速为 1.2 mL/min, 柱温为 30 °C, 检测波长为 254 nm, 进样量为 20 μL。合成化合物3中的主要杂质, 并通过质谱法、核磁共振波谱法对其进行结构确认。结果 化合物3的质量浓度在 0.092 8 ~ 556.768 9 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好($r = 0.999\ 7, n = 5$); 检测限为 1.0 ng, 定量限为 2.0 ng; 精密度、稳定性、重复性试验的结果均符合要求。6批化合物3的纯度均大于 90%, 均检出有关物质杂质1、杂质2、未知杂质、化合物2, 其相对保留时间分别为 0.32, 1.12, 2.23, 1.67。以化合物3为原料, 合成得到杂质1和杂质2, 纯度分别为 99.04% 和 98.72%。结论 该方法专属性强、准确度高、稳定性好, 可为酒石酸唑吡坦的质量控制提供参考。合成的杂质纯度高, 可作为杂质对照品使用。

关键词: 酒石酸唑吡坦; 中间体化合物; 有关物质; 杂质合成; 高效液相色谱法; 质谱法; 核磁共振波谱法

Detection of Related Substances of Key Intermediates of Zolpidem Tartrate and Synthesis of Main Impurities

LI Yi¹, LIU Xiu¹, WANG Linglan¹, ZHONG Chaoze¹, ZHU Yuefang²

(1. Zhuzhou Qianjin Pharmaceutical Co., Ltd., Zhuzhou, Hunan, China 412000; 2. Zhuzhou Institute for Food and Drug Control of Hunan Province, Zhuzhou, Hunan, China 412000)

Abstract: **Objective** To control the quality of key intermediate compound 3 of zolpidem tartrate. **Methods** High-performance liquid chromatography (HPLC) method was used to detect the related substances in compound 3, the chromatographic column was Agilent Pursuit 5 C₁₈ column (150 mm × 3.9 mm, 5 μm), the mobile phase was pH 6.0 phosphate buffer-methanol-acetonitrile (gradient elution), the flow rate was 1.2 mL/min, the column temperature was 30 °C, the detection wavelength was 254 nm, and the injection volume was 20 μL. The main impurities in compound 3 were synthesized and their structures were confirmed by the mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Results** The linear range of compound 3 was 0.092 8 - 556.768 9 μg/mL ($r = 0.999\ 7, n = 5$). The limit of detection (LOD) was 1.0 ng, and the limit of quantification (LOQ) was 2.0 ng. The precision, stability, and repeatability test results all meet the requirements. The purity of six batches of compound 3 was higher than 90%, with the detected relevant substances being impurity 1, impurity 2, unknown impurity, and compound 2, and their relative retention time was 0.32, 1.12, 2.23, and 1.67, respectively. With compound 3 as the raw material, impurity 1 and impurity 2 were synthesized with purities of 99.04% and 98.72%, respectively. **Conclusion** The method has strong specificity, high accuracy, and good stability, which can provide a reference for the quality control of zolpidem tartrate. The synthesized impurities have high purity and can be used as impurity reference standards.

Key words: zolpidem tartrate; intermediate compounds; related substances; impurity synthesis; HPLC; mass spectrometry; nuclear magnetic resonance spectroscopy

酒石酸唑吡坦化学名为 *N,N*-6-三甲基-2-(4-甲基苯基)-咪唑并[1,2- α]吡啶-3-乙酰胺-*L*(+)-酒石酸盐, 是一种非苯二氮䓬类镇静催眠药物, 具有起效快、疗效好、不良反应少等优点^[1-6]。酒石酸唑吡坦的主要合成手段是以 *N,N*-二甲基-2-氧乙酰胺(化合物1)和 6-甲基-2-(4-甲基苯基)-咪唑并[1,2- α]吡啶(化合物2)为原料, 经缩合反应得中间体 *N,N*-6-三甲基-2-(4-甲基苯基)-咪唑并[1,2- α]吡啶-3- α -

羟基乙酰胺(化合物3), 经还原反应得唑吡坦, 再与 *L*(+)-酒石酸成盐得酒石酸唑吡坦^[7-12]。其中, 化合物3是各主流路线合成唑吡坦的关键中间体, 是构建唑吡坦药物分子的主体结构, 该中间体的纯度较大程度地决定了酒石酸唑吡坦原料药的质量^[13-15], 而有机杂质的控制是药物质量控制的重点项目。目前, 该中间体中有关物质检测方法的相关报道较少。故本研究建立了检测酒石酸唑吡坦关键中间体化合物3中有关物质

*基金项目: 湖南省自然科学基金[2022JJ80048]。

第一作者: 李翼, 男, 硕士研究生, 工程师, 研究方向为药品合成与质量研究, (电子信箱)870245203@qq.com。

△通信作者: 朱跃芳, 女, 大学本科, 主任药师, 研究方向为药品检验, (电子信箱)1062582981@qq.com。

的高效液相色谱(HPLC)法,合成主要有机杂质,并进行结构确证。现报道如下。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters e2695 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);Agilent 1100 - Thermo - LTQ ORBITRAP XL(TI - 0027)型质谱仪[测试条件为加热电喷雾电离(HESI)源,正离子模式],Agilent 400 MR(TI - 0008)型超导脉冲傅里叶变换核磁共振波谱仪,均购自美国 Aglient 公司;MS105DU 型电子天平(瑞士 Mettler Toledo 公司,精度为 0.01 mg);KQ - 500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率为 400 W,频率为 40 kHz)。

1.2 试药

酒石酸唑吡坦中间体化合物 3(湖南千金湘江药业股份有限公司,批号分别为 191101,191102,200102,20191126x,20191216x,20200301);盐酸(国药集团化学试剂有限公司)。

2 方法与结果

2.1 有关物质检测

2.1.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Pursuit 5 C₁₈柱(150 mm × 3.9 mm, 5 μm);流动相:pH 6.0 磷酸盐缓冲液(A) - 甲醇(B) - 乙腈(C),梯度洗脱(程序见表 1);流速:1.2 mL/min;柱温:30 °C;检测波长:254 nm;进样量:20 μL。

表 1 流动相梯度洗脱程序(%)

Tab. 1 Gradient elution program of the mobile phase (%)

时间	流动相 A	流动相 B	流动相 C
0 ~ 3 min	76	10	14
3 ~ 38 min	76 → 48	10 → 36	14 → 16
38 ~ 48 min	48	36	16
48 ~ 49 min	48 → 20	36 → 55	16 → 25
49 ~ 63 min	20	55	25
63 ~ 63.01 min	20 → 76	55 → 10	25 → 14
63.01 ~ 70 min	76	10	14

2.1.2 溶液制备

取中间体化合物 3 10 mg,精密称定,置 20 mL 容量瓶中,加 pH 6.0 磷酸盐缓冲液 - 甲醇 - 乙腈(50:20:30, V/V/V)适量,超声使溶解,再加 pH 6.0 磷酸盐缓冲液 - 甲醇 - 乙腈(50:20:30, V/V/V)定容,摇匀,即得供试品溶液。

2.1.3 方法学考察

专属性试验:取空白溶剂(流动相)和 2.1.2 项下供试品溶液各适量,按 2.1.1 项下色谱条件进样测定。结果空白溶剂不干扰化合物 3 及杂质的检测,表明专属性良好。

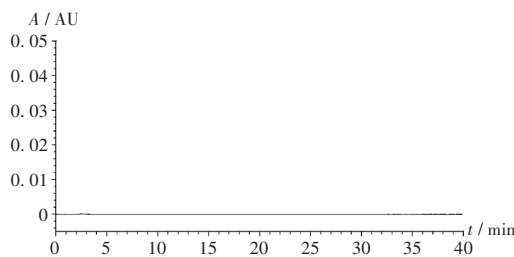


图 1 流动相专属性试验高效液相色谱图

Fig. 1 HPLC chromatogram of the specificity test of the mobile phase

线性关系考察:精密量取 2.1.2 项下供试品溶液适量,加 pH 6.0 磷酸盐缓冲液 - 甲醇 - 乙腈(50:20:30, V/V/V)逐级稀释为质量浓度分别为 556.768 9, 463.974 1, 231.987 0, 4.639 7, 0.092 8 μg/mL 的系列供试品溶液,按 2.1.1 项下色谱条件进样测定,以质量浓度(X, μg/mL)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程 $Y = 78\,694 X + 64\,320$ ($r = 0.999\,7$, $n = 5$)。结果表明,化合物 3 的质量浓度在 0.092 8 ~ 556.768 9 μg/mL 范围内与峰面积线性关系良好。

检测限与定量限确定:取 2.1.2 项下供试品溶液适量,按 2.1.1 项下色谱条件进样测定,以信噪比(S/N)为 3 倍响应值的结果为检测限, S/N 为 10 倍响应值的结果为定量限。结果检测限为 1.0 ng, 定量限为 2.0 ng。

精密度试验:精密量取 2.1.2 项下供试品溶液适量,按 2.1.1 项下色谱条件连续进样测定 6 次,记录色谱图。结果化合物 3 峰面积的 RSD 为 0.20% ($n = 6$);或由不同人员在不同日期按 2.1.1 项下色谱条件分别进样测定,采用峰面积归一化法计算各杂质的含量,结果杂质 2、化合物 2、最大单个杂质[相对保留时间(RRT) = 0.24]、总杂质含量的极差分别为 0.12%, 0.05%, 0.06%, 0.27% ($n = 12$)。结果表明,仪器精密度良好。

重复性试验:取样品,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液 6 份,按 2.1.1 项下色谱条件进样测定,记录色谱图,采用峰面积归一化法计算各杂质的含量。结果杂质 2、化合物 2、最大单个杂质(RRT = 0.23)、总杂质含量的极差分别为 0.01%, 0.03%, 0.02%, 0.04% ($n = 6$),表明方法重复性良好。

稳定性试验:取样品,按 2.1.2 项下方法制备供试品溶液,分别于室温下放置 0, 6 h 后按 2.1.1 项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果杂质 2、化合物 2、最大单个杂质(RRT = 0.24)、总杂质含量的极差分别为 0, 0.03%, 0.01%, 0.04% ($n = 2$),表明供试品溶液在室温下放置 6 h 稳定性良好。

耐用性试验:考察不同流速(1.1, 1.3 mL/min), 流动相 pH(5.9, 6.1), 色谱柱(Agilent A6 - 2 柱和 Agilent A34 柱)对有关物质含量测定结果的影响。结果杂质 2、

化合物2、最大单个杂质($RRT = 0.23$)、总杂质含量的极差分别为0.08%, 0.03%, 0.02%, 0.16%, 表明方法耐用性良好。

2.1.4 有关物质含量测定

取6批(批号分别为20191126x, 20191216x, 191101, 191102, 200102, 20200301)样品,精密称定,按2.1.2项下方法制备供试品溶液,按2.1.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图,按峰面积归一化法计算杂质和主峰占比。结果化合物3($RRT = 1.00$)的纯度均大于90%,有关物质主要为杂质1($RRT = 0.32$)、杂质2($RRT = 1.12$)、未知杂质($RRT = 2.23$)、化合物2($RRT = 1.67$)。详见表2。

表2 化合物3中有关物质含量测定结果及其纯度(%)

Tab. 2 Results of the content determination of related substance in compound 3 and their purities (%)

批号	杂质1	杂质2	化合物2	未知杂质	总杂质	化合物3
20191126x	0.56	2.53	0.10	0.07	3.36	96.64
20191216x	0.21	0.80	0.04	0.02	1.14	98.86
191101	0.37	1.80	0.25	0.24	2.88	97.12
191102	0.76	2.55	0.45	1.45	8.26	91.74
200102	0.61	1.83	0.25	1.74	5.26	94.74
20200301	0.70	1.41	0.12	0.08	2.42	97.58

2.2 主要杂质合成与结构确认

杂质1:向反应容器中加入浓盐酸、水各75 mL,搅拌,降温至0℃左右,加化合物3 15 g,溶解后升温至95℃,回流反应4 h,薄层色谱(TLC)监控反应完成,降温至室温,用氢氧化钠调pH至6.0,滤过,滤饼固体经柱层析分离纯化,浓缩,干燥,得杂质1,收率为96.3%,纯度为99.04%。杂质1的合成路线见图2, HPLC图见图3, 质谱图见图4。MS m/z 297.1 $[M+H]^+$ 。 1H NMR (400 MHz, Methanol- d_4) δ : 2.38~2.44(s, 3H), 2.46~2.53(d, $J = 1.2$ Hz, 3H), 5.79~5.85(s, 1H), 7.39~7.48(m, 2H), 7.69~7.76(m, 2H), 7.84~7.96(t, $J = 1.1$ Hz, 2H), 8.70~8.77(q, $J = 1.3$ Hz, 1H)。 ^{13}C NMR (101 MHz, Methanol- d_4) δ : 171.15(C-17), 141.35(C-5), 138.42(C-8), 136.47(C-12), 134.68(C-3), 129.81(C-11, C-14), 128.79(C-10, C-15), 128.18(C-9), 125.84(C-2), 122.89(C-6), 119.39(C-4), 111.17(C-7), 63.72(C-16), 20.12(C-13), 16.89(C-1)。

杂质2:向反应容器中加入杂质1 8 g和15.2%氯化氢-甲醇溶液80 mL,搅拌,升温至30℃,反应过夜, TLC监控反应完成,减压浓缩,加乙酸乙酯和水,用饱和碳酸钠溶液调pH至8.0~9.0,滤过,滤饼用乙酸乙酯和水打浆,滤过,滤饼固体经柱层析分离纯化,干燥得,

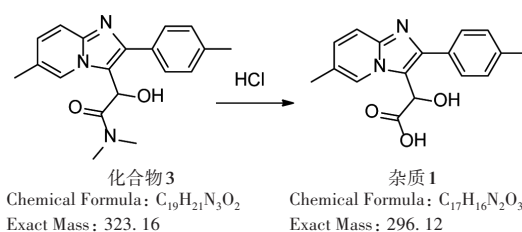


图2 杂质1的合成路线

Fig. 2 Synthesis route of the impurity 1

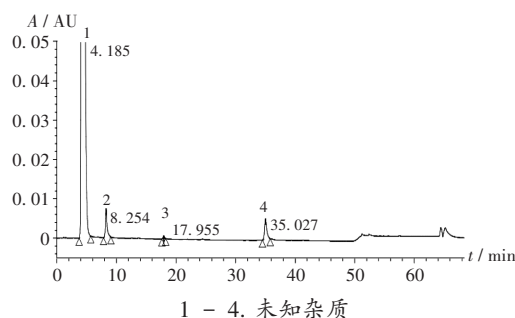


图3 杂质1的高效液相色谱图

1 - 4. Unknown impurities

Fig. 3 HPLC chromatogram of the impurity 1

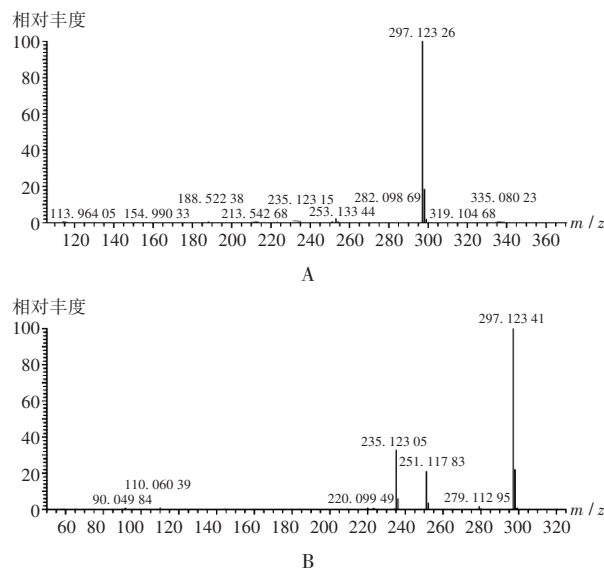


图4 杂质1的质谱图

A. Primary mass spectrum B. Secondary mass spectrum

Fig. 4 Mass spectrum of the impurity 1

杂质2,收率为62.8%,纯度为98.72%。杂质2的合成路线见图5, HPLC图见图6, 质谱图见图7。MS m/z 311.1 $[M+H]^+$ 。 1H NMR (400 MHz, Methanol- d_4) δ : 2.41~2.45(m, 6H), 3.69~3.73(s, 3H), 5.81~5.84(s, 1H), 7.33~7.41(m, 2H), 7.53~7.60(dd, $J = 9.2, 1.6$ Hz, 1H), 7.60~7.67(m, 3H), 8.47~8.54(q, $J = 1.3$ Hz, 1H)。 ^{13}C NMR (101 MHz, Methanol- d_4) δ : 170.92(C-17), 141.32(C-5), 139.78(C-8), 132.69(C-12), 129.49(C-11, C-14), 129.33(C-10, C-15),

128.63 (C - 9), 126.69 (C - 2), 125.37 (C - 6), 124.67 (C - 3), 117.95 (C - 4), 113.15 (C - 7), 64.30 (C - 16), 52.03 (C - 18), 19.96 (C - 13), 16.81 (C - 1)。

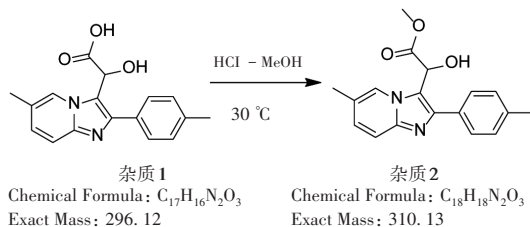


图5 杂质2的合成路线

Fig. 5 Synthesis route of the impurity 2

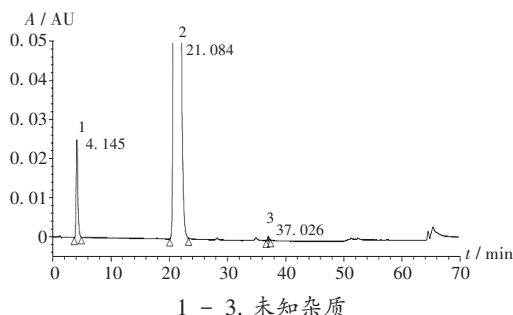


图6 杂质2的高效液相色谱图

1 - 3. Unknown impurities

Fig. 6 HPLC chromatogram of the impurity 2

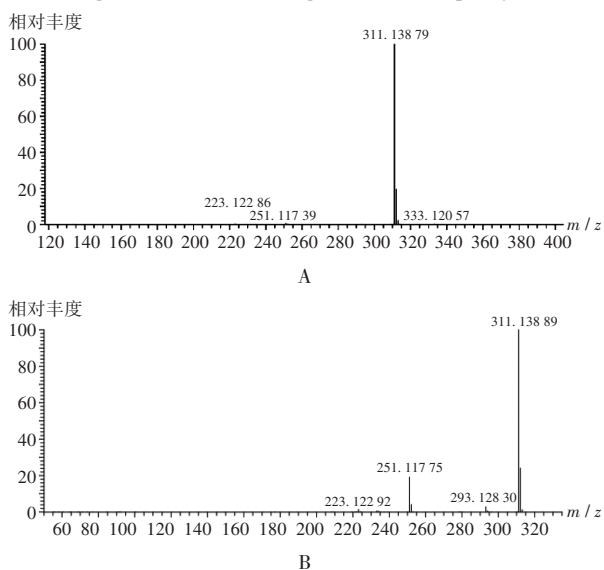


图7 杂质2的质谱图

A. Primary mass spectrum B. Secondary mass spectrum

Fig. 7 Mass spectrograms of the impurity 2

3 讨论

3.1 流动相选择

化合物3为弱酸性化合物,为获得良好的色谱峰峰形和分离效果、稳定的保留时间,流动相pH应考虑化合物3的酸碱性。曾尝试采用不同pH的流动相(pH 5.0磷酸盐缓冲液-甲醇、pH 6.5磷酸盐缓冲液-乙腈、pH 6.0磷酸盐缓冲液-甲醇-乙腈),采用等度洗脱或

梯度洗脱,最终流动相选择pH 6.0磷酸盐缓冲液-甲醇-乙腈,并采用2.1.1项下梯度洗脱程序。

3.2 样品提取与处理方法选择

化合物3难溶于水和乙腈,易溶于甲醇,曾考察不同提取溶剂(水、乙腈、甲醇、流动相)和提取方法(超声提取、振摇提取)对提取效果的影响。结果显示,提取溶剂为水和乙腈时的加样回收率偏低,为甲醇时会产生空白溶剂峰而干扰检测,为流动相时的分离效果良好,故提取溶剂选择流动相;超声提取的效果优于振摇提取,则考察了不同超声提取时间(5, 10, 15 min)对提取效果的影响,延长超声时间,测定结果基本无变化,故提取方法选择超声提取5 min。

3.3 样品中有关物质检测结果分析

目前,鲜有关于酒石酸唑吡坦关键中间体化合物3中有关物质检测方法和检测结果的报道。本研究中采用HPLC法检测了多批次化合物3样品,发现其中有2个主要杂质(杂质1、杂质2),分析鉴定出这2个杂质的结构式。以化合物3为原料,合成得到高纯度杂质1和杂质2(纯度分别为99.04%和98.72%),可作为杂质对照品使用。

3.4 方法评价

本研究中建立的酒石酸唑吡坦关键中间体的有关物质检测方法专属性强、准确度高、稳定性好,可为酒石酸唑吡坦的质量控制提供参考。通过化学合成得到高纯度产物杂质1和杂质2,通过高分辨质谱、¹H NMR、¹³C NMR等方法确定其结构,可作为杂质对照品用于酒石酸唑吡坦中间体的质量控制,可为国内酒石酸唑吡坦生产企业优化工艺和提高产品质量提供参考。

参考文献

- [1] 许琦. 酒石酸唑吡坦与阿普唑仑治疗失眠症的成本-效果比较[J]. 中国药业, 2018, 27(5): 90-92.
- [2] 吴亚利, 毛士龙. 酒石酸唑吡坦舌下片的研制及质量评价[J]. 中国药业, 2013, 22(14): 81-82.
- [3] HOEHNS JD, PERRY PJ. Zolpidem: a nonbenzodiazepine hypnotic for treatment of insomnia[J]. Clin Pharm, 1993, 12(11): 814-828.
- [4] LANGTRY HD, BENFIELD P. Zolpidem: a review of its pharmacodynamics and pharmacokinetic properties and therapeutic potential[J]. Drugs, 1990, 40(2): 291-313.
- [5] 吴红, 李舜伟. 非苯二氮䓬类的镇静催眠药唑吡坦[J]. 中国新药杂志, 1997, 6(1): 59-61.
- [6] 张宏根, 赵靖平, 陈光远. 唑吡坦治疗失眠症双盲研究[J]. 临床精神医学杂志, 2001, 11(3): 146-147.
- [7] 吉锁兴. 酒石酸唑吡坦的合成[J]. 中国药业, 2014, 23(5): 16-17.
- [8] WANG Y, ZHANG B, ZHENG QX. Practical and scalable preparation of Minodronic acid and Zolpidem from 2-chloroimidazole [1, 2- α] pyridines[J]. Tetrahedron, 2019, 75(8): 1064-1071.