

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2026)14-0099-04
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2026.14.020



高效液相色谱法检测咪达唑仑鼻用喷雾剂中两种杂质*

陈 振, 王贵涛, 孔银弟, 蒋小龙, 许向阳, 董达文[△]

(江苏恩华药业股份有限公司药物研究院·江苏省神经药物工程技术研究中心, 江苏 徐州 221000)

摘要:目的 建立咪达唑仑鼻用喷雾剂中相关杂质含量测定的高效液相色谱(HPLC)法。方法 色谱柱为 Agilent Eclipse XDB C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-甲醇-0.025 mol/L 磷酸盐缓冲液(350:150:500, V/V/V)-乙腈-0.025 mol/L 磷酸盐缓冲液(650:350, V/V)(梯度洗脱), 流速为 1.0 mL/min, 检测波长为 254 nm, 柱温为 35 °C, 进样量为 10 μL。结果 在高温、光照、酸性、碱性及氧化条件下, 样品均有不同程度降解, 产生杂质 A 和杂质 B; 杂质 A、杂质 B、咪达唑仑的质量浓度分别在 0.08~9.17 μg/mL、0.10~7.46 μg/mL、0.23~10.91 μg/mL 的范围内与峰面积线性关系良好($r > 0.999$), 检测限分别为 0.19, 0.29, 0.51 ng, 定量限分别为 0.77, 0.73, 2.04 ng; 中间精密密度、重复性、稳定性、耐用性试验结果的 RSD 均小于 6.00%; 杂质 A 和杂质 B 平均回收率分别为 100%, 102.26%, RSD 分别为 0.82%, 1.05%; 3 批样品中杂质 A 和杂质 B 含量均小于 0.50%, 其他最大单个杂质小于 0.20%, 总杂质小于 2.00%, 符合限度要求。结论 所建方法操作简便, 结果准确, 重复性、稳定性及耐用性均良好, 可用于咪达唑仑鼻用喷雾剂中相关杂质的含量测定。

关键词:咪达唑仑鼻用喷雾剂; 高效液相色谱法; 杂质; 含量测定

Determination of Two Impurities in Midazolam Nasal Spray by HPLC

Chen Zhen, Wang Guitao, Kong Yindi, Jiang Xiaolong, Xu Xiangyang, Dong Dawen[△]

(Pharmaceutical Research Institute of Jiangsu Nhwa Pharmaceutical Co., Ltd. · Jiangsu Engineering Research Center for Neurological Drugs, Xuzhou, Jiangsu 221000, China)

Abstract: Objective To establish a high-performance liquid chromatography (HPLC) method for the determination of related impurities in midazolam nasal spray. **Methods** The chromatographic column was Agilent Eclipse XDB C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was acetonitrile-methanol-0.025 mol/L phosphate buffer (350:150:500, V/V/V)-acetonitrile-0.025 mol/L phosphate buffer (650:350, V/V) (gradient elution). The flow rate was 1.0 mL/min, the detection wavelength was 254 nm, the column temperature was 35 °C, the injection volume was 10 μL. **Results** Under conditions of high temperature, light exposure, acid, base, and oxidative stress, the samples underwent degradation to varying degrees, generating Impurity A and Impurity B. The linear ranges of Impurity A, Impurity B, and midazolam were 0.08-9.17 μg/mL, 0.10-7.46 μg/mL, and 0.23-10.91 μg/mL, respectively ($r > 0.999$). The limits of detection were 0.19, 0.29, and 0.51 ng, and the limits of quantification were 0.77, 0.73, and 2.04 ng, respectively. The RSDs for intermediate precision, repeatability, stability, and robustness test results of Impurity A, Impurity B, and total impurities were all lower than 6.00%. The average recovery rates of Impurity A and Impurity B were 100% and 102.26%, with RSDs of 0.82% and 1.05%, respectively. In the three batches of samples, the contents of Impurity A and Impurity B were both lower than 0.50%; other individual maximum impurities were lower than 0.20%, and total impurities were lower than 2.00%, all of which met the specified limits. **Conclusion** The established method is simple to operate, accurate, and exhibits good repeatability, stability, and robustness, which can be used for the determination of related impurities in midazolam nasal spray.

Key words: midazolam nasal spray; HPLC; impurity; content determination

流行病学调查显示,我国癫痫患者总数已突破900万。在各类发作类型中,癫痫丛集性发作由于短时间内癫痫反复发作(24 h内发作3次或以上),极易进展为癫痫持续状态,进而明显提升躯体损伤概率及神经功能产生永久性损害的风险,需临床紧急介入处理^[1-6]。咪达唑仑鼻喷雾剂临床常用于年龄≥12岁的癫痫丛集性

发作患者的急性治疗^[7-10],目前该制剂尚无质量控制标准^[11-13]。为系统梳理咪达唑仑鼻用喷雾剂中潜在杂质的种类及含量分布、保障临床用药的安全性与可靠性,本研究中建立了测定咪达唑仑鼻用喷雾剂中杂质含量的高效液相色谱(HPLC)法,以期为该制剂的质量标准建立提供参考。现报道如下。

*基金项目:江苏省徐州市科技项目[KC23418]。

第一作者:陈振,女,大学本科,中级工程师,研究方向为药物制剂与分析,(电子信箱)574096760@qq.com。

[△]通信作者:董达文,男,博士,副主任药师,研究方向为药物制剂,(电子信箱)dongdawen@nhwa-group.com。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent 1260型高效液相色谱仪(美国Agilent Technologies公司);ME403T、XSE205、XPR10/A型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司,精度分别为1,0.01,0.001 mg);SHH-200GD-2型药物强光照试验箱(重庆永生实验仪器厂);DGG-9240A型电热恒温鼓风干燥箱(上海森信实验仪器有限公司);ORION 3 STAR型酸度计(美国Thermo Fisher Scientific公司)。

1.2 试药

咪达唑仑对照品(中国食品药品检定研究院,批号为171265-201402,含量99.8%); $C_{18}H_{12}ClFN_2O_3$ (杂质A)对照品(批次1,含量89.5%), $C_{18}H_{13}ClFN_3O_3$ (杂质B)对照品(批次1、批次2,含量72.0%、79.7%),均购自长沙晨辰医药科技有限公司;咪达唑仑鼻用喷雾剂(批次1、批次2、批次3,规格为0.1 mL:5 mg,单喷),咪达唑仑原料药(批次1,含量100%),均购自江苏恩华药业股份有限公司;甲醇、乙腈均为色谱纯,其余试剂均为分析纯,聚乙二醇-6甲醚、聚乙二醇400、丙二醇、无水乙醇均为药用辅料,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent Eclipse XDB C_{18} 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m);流动相:乙腈-甲醇-0.025 mol/L磷酸盐缓冲液(350:150:500, V/V/V, A)-乙腈-0.025 mol/L磷酸盐缓冲液(650:350, V/V, B),梯度洗脱(0~15 min时0%B, 15~20 min时0%B→100%B, 20~45 min时100%B, 45~47 min时100%B→0%B, 47~55 min时0%B);流速:1.0 mL/min;检测波长:254 nm;柱温:35℃;进样量:10 μ L。

2.2 溶液制备

对照品溶液:取咪达唑仑对照品适量,精密称定,加80%甲醇溶解并稀释,摇匀,制成每1 mL含咪达唑仑约2 μ g的咪达唑仑对照品溶液。分别取杂质A和杂质B对照品各适量,精密称定,分别加甲醇溶解并稀释,摇匀,制成每1 mL中含各杂质约0.1 mg的杂质对照品贮备液;分别精密量取各杂质对照品贮备液0.5 mL,置同一10 mL容量瓶中,加80%甲醇稀释并定容,摇匀,即得杂质混合对照品溶液。

供试品溶液:精密量取样品适量,加80%甲醇溶解并稀释,摇匀,制成每1 mL含咪达唑仑约1 mg的供试品溶液。

阴性对照品溶液:按咪达唑仑鼻用喷雾剂处方比例精密量取聚乙二醇-6甲醚、聚乙二醇400、丙二醇、无水乙醇、水各适量,置25 mL容量瓶中,摇匀;精密量

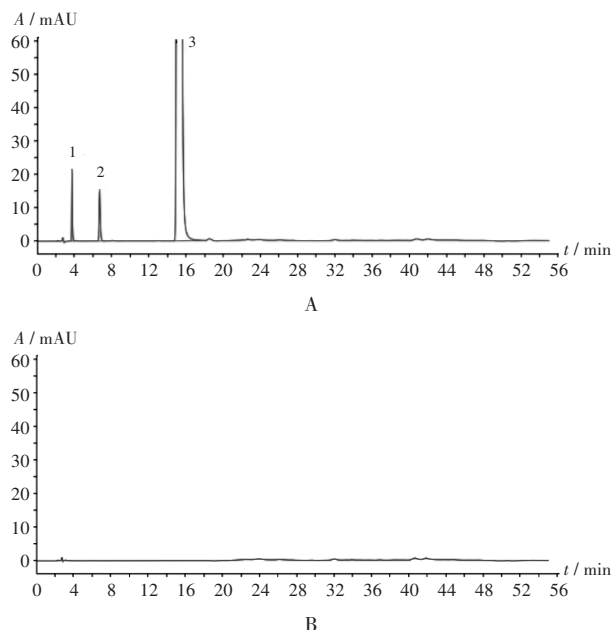
取100 μ L至5 mL容量瓶中,加80%甲醇稀释并定容,摇匀,即得。

系统适用性溶液:取咪达唑仑对照品适量,精密称定,加入各杂质对照品贮备液各适量,加80%甲醇溶解并稀释,摇匀,制成每1 mL含咪达唑仑约1 mg、各杂质约5 μ g的系统适用性溶液。

加样供试品溶液:分别精密量取样品200 μ L及各杂质对照品贮备液0.5 mL,置同一10 mL容量瓶中,加80%甲醇稀释并定容,摇匀,即得。

2.3 方法学考察

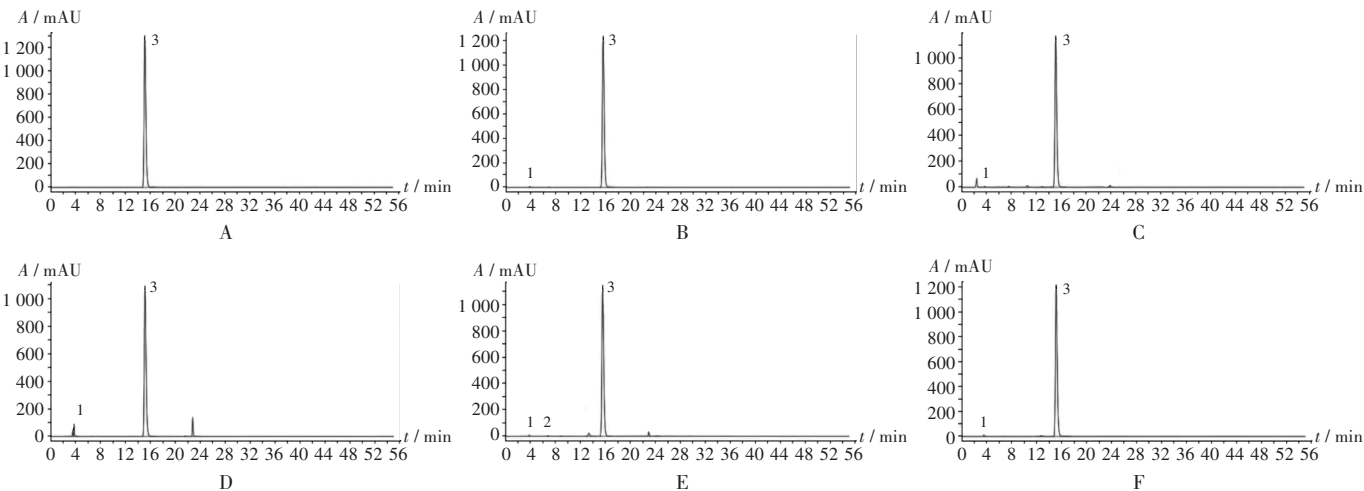
系统适用性及专属性试验:精密量取2.2项下系统适用性溶液和阴性对照品溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样测定,记录色谱图。结果咪达唑仑主成分与2种待测杂质色谱峰均实现基线分离,分离效果良好,且阴性对照无干扰。详见图1。



1. 杂质A 2. 杂质B 3. 咪达唑仑
A. 系统适用性溶液 B. 阴性对照品溶液
图1 系统适用性及专属性试验高效液相色谱图
1. Impurity A 2. Impurity B 3. Midazolam
A. System suitability solution B. Negative control solution

Fig. 1 HPLC chromatograms of the system suitability and specificity test

破坏性试验:精密量取2.2项下供试品溶液适量,分别以酸降解条件(1 mol/L盐酸溶液,60℃水浴避光静置24 h)、碱降解条件(1 mol/L氢氧化钠溶液,60℃水浴避光静置24 h)、氧化降解条件(3%过氧化氢溶液,60℃水浴避光静置24 h)、高温降解条件(120℃静置72 h)、光照降解条件(照度5 000 lx、紫外照度90 μ W/cm²,静置120 h)处理。取处理前、后的供试品溶液各适量,按2.1项下色谱条件进样测定,记录峰面积,结果与处理前比较,碱降解条件下,杂质A明显增加;



1. 杂质 A 2. 杂质 B 3. 咪达唑仑

A. 处理前 B. 光照降解 C. 氧化降解 D. 碱降解 E. 高温降解 F. 酸降解

图 2 破坏性试验高效液相色谱图

1. Impurity A 2. Impurity B 3. Midazolam

A. Before treatment B. Light exposure degradation C. Oxidative stress degradation D. Alkali degradation E. High temperature degradation F. Acid degradation

Fig. 2 HPLC chromatograms of the destructive test

光照、酸及氧化降解条件下,杂质 A 均略有增加;高温降解条件下,杂质 A、B 均略有增加(碱降解中 23 min 时出的峰为原料中已控制杂质峰,其余产生未知峰,为咪达唑仑的体内代谢产物,故按非特定杂质进行控制)。且主成分峰和已知杂质峰与相邻杂质峰之间分离度 ≥ 1.0 。详见图 2。

线性关系与校正因子考察:取 2.2 项下咪达唑仑对照品溶液及各杂质对照品贮备液各适量,分别加 80% 甲醇稀释,制成不同浓度梯度的标准曲线溶液。由 3 名实验员于不同时间采用同一品牌 3 台仪器使用不同厂家色谱柱,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,以待测成分的质量浓度($X, \mu\text{g}/\text{mL}$)为横坐标、峰面积(Y)为纵坐标进行线性回归,并计算相应校正因子。结果见表 1。

检测限与定量限考察:精密量取 2.2 项下咪达唑

表 1 线性关系、校正因子、检测限与定量限确定试验结果

Tab. 1 Results of determining linear relationship, correction factor, detection limit, and quantification limit test							
待测成分	回归方程	r	线性范围 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	校正因子	校正因子均值	检测限 (ng)	定量限 (ng)
杂质 A	$Y_1' = 24.656 X_1' - 0.1897$	0.99998	0.08~9.62	0.97			
	$Y_1'' = 24.119 X_1'' + 1.0586$	0.99989	0.07~9.17	0.95	0.97	0.19	0.77
	$Y_1''' = 27.633 X_1''' + 0.6383$	0.99999	0.08~9.45	0.98			
杂质 B	$Y_2' = 31.026 X_2' - 0.4961$	0.99986	0.07~7.46	0.77			
	$Y_2'' = 29.85 X_2'' + 0.7912$	0.99998	0.08~7.91	0.77	0.77	0.29	0.73
	$Y_2''' = 35.343 X_2''' + 0.9111$	0.99999	0.10~9.72	0.77			
咪达唑仑	$Y_3' = 23.894 X_3' - 1.817$	0.99986	0.22~10.91	1.00			
	$Y_3'' = 22.894 X_3'' - 0.6043$	0.99998	0.23~11.69	1.00	1.00	0.51	2.04
	$Y_3''' = 27.173 X_3''' + 0.3542$	0.99999	0.22~10.91	1.00			

仑对照品溶液和杂质对照品贮备液各适量,置容量瓶中,加 80% 甲醇逐级稀释,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积,以信噪比(S/N)为 3:1 时的进样量为检测限,以 S/N 为 10:1,且连续 6 次进样所得峰面积的 $RSD \leq 10.00\%$ 时的进样量为定量限。结果见表 1。

重复性试验:精密量取 2.2 项下加样供试品溶液适量,共 6 份,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果杂质 A、杂质 B 及总杂质的 RSD 分别为 5.36%, 3.57%, 5.96%, 均小于 6.00% ($n=6$),表明方法重复性良好。

中间精密度试验:精密量取 2.2 项下加样供试品溶液适量,由不同实验人员于不同时间使用不同品牌的高效液相色谱仪,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果杂质 A、杂质 B 及总杂质的 RSD 分别为 5.24%, 2.58%, 4.76%, 均小于 6.00% ($n=12$),表明方法中间精密度良好。

稳定性试验:精密量取 2.2 项下加样供试品溶液各适量,分别于室温放置 0, 4, 8, 12, 18, 24, 36, 48, 60, 72 h 时按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果杂质 A、杂质 B 及总杂质的 RSD 分别为 0.53%, 0.66%, 0.57%, 均小于 1.00% ($n=10$),表明加样供试品溶液室温放置 72 h 内基本稳定。

回收试验:取咪达唑仑原料药 20 mg,精密称定,共 9 份,分别置 20 mL 容量瓶中,加咪达唑仑鼻用喷雾剂处方比例空白辅料 400 μL ,精密量取 2.2 项下各杂质对照品贮备液 0.5, 1.0, 1.5 mL,置 20 mL 容量瓶中,分别加 80% 甲醇定容,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算回收率。结果见表 2。

表 2 回收试验结果 (n = 9)
Tab. 2 Results of the recovery test (n = 9)

加入量(μg)		测得量(μg)		回收率(%)		$\bar{X}$ (%)		RSD(%)	
杂质 A	杂质 B	杂质 A	杂质 B	杂质 A	杂质 B	杂质 A	杂质 B	杂质 A	杂质 B
45.712 1	40.726 7	46.120 3	42.072 2	100.89	103.30				
45.712 1	40.726 7	46.184 8	42.162 5	101.03	103.53				
45.712 1	40.726 7	46.259 9	42.402 8	101.20	104.12				
91.424 3	81.453 4	91.060 2	82.841 4	99.60	101.70				
91.424 3	81.453 4	91.195 7	82.983 0	99.75	101.88	100.00	102.26	0.82	1.05
91.424 3	81.453 4	91.243 1	82.729 0	99.80	101.57				
137.136 4	122.180 1	136.035 2	123.747 0	99.20	101.28				
137.136 4	122.180 1	136.397 7	123.993 8	99.46	101.48				
137.136 4	122.180 1	135.886 7	124.027 0	99.09	101.51				

耐用性试验:精密量取 2.2 项下系统适用性溶液、对照品溶液与加样供试品溶液各适量,分别考察不同检测波长(252 nm、254 nm、256 nm),柱温(33 °C、35 °C、37 °C),及流速(0.9 mL/min、1.0 mL/min、1.1 mL/min)对色谱峰的影响。结果各条件下色谱峰分离度良好,杂质 A、杂质 B 及总杂质与主成分峰峰面积的 RSD 分别为 0.78%,0.73%,0.82%,均小于 1.00%(n = 7),表明方法耐用性良好。

2.4 样品含量测定

取 2.2 项下 3 批供试品溶液各适量,按 2.1 项下色谱条件进样测定,记录峰面积。按加校正因子的自身对照法计算含量。结果 3 批样品中杂质 A、杂质 B 含量均小于 0.50%,其他最大单个杂质小于 0.20%,总杂质小于 2.00%,符合限度要求。

3 讨论

3.1 制剂杂质谱分析

样品中可能存在的工艺杂质主要来源于原料药,但工艺杂质均较小且在原料中已进行控制,且在制剂方法中均可检出,制剂中不再研究控制;样品破坏性试验结果显示,在高温、光照、酸、碱及氧化降解条件下本样品均有不同程度的降解,主要会降解产生杂质 A 和杂质 B,分析其分子结构可知,杂质 B 为咪达唑仑的氧化降解产物,杂质 A 为杂质 B 的水解产物。综合分析各杂质的来源及结合咪达唑仑鼻用喷雾剂后期稳定性检出情况,最终将杂质 A、杂质 B 作为研究对象。

3.2 杂质限度确定

样品最大日剂量为 10 mg(以咪达唑仑计),按人用药品技术要求国际协调理事会(ICH)Q3B R2 新药制剂中杂质^[14]新药制剂中杂质的要求,本品报告阈值为 0.1%,鉴定阈值为 0.2%,界定阈值为 0.5%;参考参比制剂 FDA 审批文档[Product Quality Review(S),https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2019/211321Orig1s000TOC.html]中本品杂质限度为 0.5%,

并结合 2025 年版《中国药典(四部)》9101 分析方法验证指导原则^[15],将本品有关物质限度设定为:拟定样品中杂质 A、杂质 B 不得超过标示量的 0.5%,其他单个杂质不得超过 0.2%,总杂质不得超过 2.0%。

3.3 方法评价

本研究中建立的方法操作简便,专属性强,具备良好的重复性、稳定性及耐用性,准确度及精密度均较高,可用于咪达唑仑鼻用喷雾剂中相关杂质的含量测定。

参考文献

[1] 中华医学会. 临床诊疗指南-癫痫病分册[M]. 北京:人民卫生出版社,2007:35-36.

[2] 常琳,王小珊. 中国癫痫流行病学调查研究进展[J]. 国际神经病学神经外科学杂志,2012,39(2):161-164.

[3] Patricia P E, Rao V R, Long L, et al. Benzodiazepines for the Treatment of Seizure Clusters[J]. CNS Drugs, 2024, 38(2): 125-140.

[4] Borowicz - Reutt K, Czernia J, Krawczyk M, et al. Genetic Background of Epilepsy and Antiepileptic Treatments[J]. International Journal of Molecular Sciences,2023,24(22):16280.

[5] Chen B B, Choi H, Hirsch L J, et al. Prevalence and risk factors of seizure clusters in adult patients with epilepsy[J]. Epilepsy Res,2017,133:98-102.

[6] Penovich P E, Buelow J, Steinberg K, et al. Burden of seizure clusters on patients with epilepsy and caregivers: Survey of patient, caregiver, and clinician perspectives[J]. Neurologist, 2017,22(6):207-214.

[7] 邓雯,曹璐. 抗癫痫丛集发作新药——Nayzilam 鼻腔喷雾剂[J]. 中国临床药理学杂志,2020,36(12):1733-1735.

[8] 范晓玲,张华年. 咪达唑仑经鼻给药及其临床应用进展[J]. 中国药师,2005,8(2):156-157.

[9] 郑洪文,高静,梅蕾蕾,等. 美国 FDA 批准鼻脑给药相关的鼻喷雾剂说明书分析[J]. 中国现代应用药学,2023,40(20): 2872-2877.

[10] Botner S, Sintov A C. Intranasal Delivery of Two Benzodiazepines,Midazolam and Diazepam,by a Microemulsion System[J]. Scientific Research,2011,2:180-188.

[11] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:二部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2025:956-957.

[12] 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.

[13] 陈道鹏,金鑫,高梓真,等. 咪达唑仑原料药及其注射液中有杂质的发现和合成[J]. 中国医药工业杂志,2023,54(4):528-532.

[14] ICH. Impurities in New Drug Products Q3B(R2)[EB/OL]. (2006-06-02)[2023-12-01]. <https://www.ich.org/page/quality-guidelines>.

[15] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典:四部[M]. 北京:中国医药科技出版社,2025:676-682.

(收稿日期:2025-12-01;修回日期:2026-05-02)