

HPLC-MS/MS 法测定盐酸曲唑酮 原料药中相关杂质的研究*

奉艳花, 邓鸣**

(广西壮族自治区药品检验研究院, 南宁 530021)

摘要 目的:建立高效液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)法测定盐酸曲唑酮中相关杂质的含量。**方法:**采用 Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm), 以 0.1% 甲酸溶液-乙腈为流动相, 梯度洗脱, 流速 0.2 mL · min⁻¹, 柱温 30 °C, 采用电喷雾离子化源(ESI), 多反应检测(MRM)模式, 正离子模式扫描。**结果:**测定了盐酸曲唑酮原料药中的 5 个相关杂质, 分别为三唑并吡啶酮、曲唑酮-N-氧化物、脱氯曲唑酮、4-乙基曲唑酮、曲唑酮异丁醚类似物, 杂质在测定的质量浓度范围内线性关系良好, r 均 ≥ 0.999 5; 平均回收率为 91.9% ~ 99.4%, RSD ≤ 3.9%; 测定的 3 批原料药中均检出了曲唑酮 N-氧化物和脱氯曲唑酮, 其中 2 批还检测到极微量的 4-乙基曲唑酮。**结论:**建立的方法可测定盐酸曲唑酮原料药中的 5 种相关杂质, 能更有效的评估和控制其质量。

关键词:高效液相色谱-串联质谱法; 盐酸曲唑酮; 相关杂质; 含量测定

中图分类号: R 921.2

文献标识码: A

文章编号: 1009-3656(2024)04-0372-04

doi: 10.19778/j.chp.2024.04.008

Determination of related impurities in trazodone hydrochloride API by HPLC-MS/MS*

FENG Yanhua, DENG Ming**

(Guangxi Institute for Drug Control, Nanning 530021, China)

Abstract Objective: To establish an HPLC-MS/MS method for the determination of related impurities in trazodone hydrochloride API. **Methods:** The impurities were separated on an Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ column (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm) using a gradient elution of 0.1% formic acid solution and acetonitrile at a flow rate of 0.2 mL · min⁻¹ at column temperature of 30 °C, and determined by electrospray ionization source (ESI) combined with multiple reaction detection (MRM) in the positive ion mode. **Results:** The related impurities (triazolopyridone, trazodone N-oxide, dechlorinated trazodone, 4-ethyltrazodone, and trazodone isobutyl ether analogue) in trazodone hydrochloride API were determined. The linear relationship of five impurities was good in corresponding concentration ranges with correlation coefficients (r) of more than 0.999 5. The average recoveries varied between 91.9% and 99.4% with RSD ≤ 3.9%. Trazodone N-oxide and dechlorinated trazodone were detected in all three batches, and extremely trace amounts of 4-ethyltrazodone were detected in two batches. **Conclusion:** The established method can determine the content of five related impurities in trazodone hydrochloride API, and can more

* 基金项目: 广西壮族自治区药品监督管理局药品安全科研项目(桂药监科直属[2023]047号); 广西壮族自治区药品监督管理局科研计划项目(桂药监直属2022-08)

第一作者简介: 奉艳花, 硕士, 工程师, 研究方向: 药品质量控制与研究。Tel: 15676725916; E-mail: 1142930711@qq.com

** 通讯作者简介: 邓鸣, 硕士, 副高, 研究方向: 药品质量控制。Tel: 18078180022; E-mail: 34482178@qq.com

effectively evaluate and control the quality of trazodone hydrochloride API.

Key words: HPLC-MS/MS; trazodone hydrochloride; related impurities; content determination

盐酸曲唑酮是三唑吡啶的衍生物^[1],是一种非典型的四环类抗抑郁药物,其毒性较传统抗抑郁药低,起效快,发生副作用的概率小,在用药安全性上有较大优势^[2]。盐酸曲唑酮原料药收载于 *BP* 和 *USP-NF*, *BP* 2022^[3] 采用 HPLC 法系统 A 和系统 B 分别控制了已知杂质 D、E 和 B; *USP-NF* 38^[4] 采用 HPLC 法测定了八个已知杂质的量,分别为三唑并吡啶酮、曲唑酮 *N*-氧化物、脱氯曲唑酮、曲唑酮相关物质 C、曲唑酮相关物质 D、4-乙基曲唑酮、曲唑酮异丁醚类似物、双哌嗪类似物。盐酸曲唑酮原料药在《中国药典》2020 年版中未收载,国内现行标准为国家药品监督管理局国家药品标准 WS1-XG-027-2021^[5],该标准中有关物质项采用 HPLC 法仅控制了一个已知杂质 II。目前采用 HPLC-MS 法主要研究盐酸曲唑酮两个基因毒性杂质^[6,7],其他杂质研究采用 HPLC 法^[8,9]。HPLC-MS/MS 法选择性、灵敏度、分离效率等均较高,能准确有效的定性和定量物质。因此,本文采用 HPLC-MS/MS 法测定了盐酸曲唑酮原料药中三唑并吡啶酮、曲唑酮 *N*-氧化物、脱氯曲唑酮、4-乙基曲唑酮、曲唑酮异丁醚类似物五个已知杂质,为国内盐酸曲唑酮杂质的研究及其质量标准完善的完善提供实验基础。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Agilent6460 高效液相色谱-串联质谱仪; METTLER XS205DU 电子天平; Millipore 超纯水机。

1.2 试药

盐酸曲唑酮原料药(批号分别为 2021-1、2021-2、

2021-3),三唑并吡啶酮对照品(批号 RS/IZD/1804, 色谱纯度 99.97%),曲唑酮 *N*-氧化物物质对照品(批号 RS/IZD/1704, 色谱纯度 97.97%),脱氯曲唑酮对照品(批号 RS/IZD/1803, 色谱纯度 97.50%),4-乙基曲唑酮杂质对照品(批号 RS/IZD/1701, 色谱纯度 96.63%),曲唑酮异丁醚类似物对照品(批号 RS/IZD/1801, 色谱纯度 98.33%),以上原料药及对照品均来源于 Piramal 公司。乙腈(赛默飞世尔公司, GR, 批号 213448),甲酸(天津市科密欧化学试剂有限公司, GR, 批号 20150710)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

Agilent ZORBAX Eclipse Plus C₁₈ (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm) 液相色谱柱; 柱温 30 °C, 进样体积 5 μL, 以 0.1% 甲酸溶液为流动相 A, 乙腈为流动相 B, 梯度洗脱, 洗脱程序见表 1。

表 1 LC 洗脱程序

Tab. 1 LC gradient elution procedure

时间/min	A/%	B/%
0.00	80	20
11.00	50	50
12.00	80	20
22.00	80	20

2.2 质谱条件

采用电喷雾正离子化(ESI⁺)测定。优化后的仪器参数见表 2。

表 2 MS 采集参数

Tab. 2 MS collection parameters

组分名称	母离子	子离子		碎裂电压	碰撞能量
		定量离子	定性离子		
三唑并吡啶酮	136	93	66	110	20
曲唑酮- <i>N</i> -氧化物	388	176	148	110	20
脱氯曲唑酮	338	176	148	150	22
4-乙基曲唑酮	400	176	148	165	22
曲唑酮异丁醚类似物	311	209	237	115	22

2.3 溶液的制备

2.3.1 供试品溶液 精密称取盐酸曲唑酮原料药,

加乙腈-水(20:80)溶解并稀释成每 1 mL 中含盐酸曲唑酮约 0.5 mg 的溶液。

2.3.2 对照品储备液 精密称取三唑并吡啶酮、曲唑酮-*N*-氧化物、脱氯曲唑酮、4-乙基曲唑酮、曲唑酮异丁醚类似物对照品各适量,加乙腈-水(20:80)溶解并稀释成每1 mL中含三唑并吡啶酮、曲唑酮-*N*-氧化物、脱氯曲唑酮、4-乙基曲唑酮、曲唑酮异丁醚类似物分别为0.05、0.1、0.2、0.02、0.1 μg的对照品储备液。

2.3.3 对照品溶液 精密量取对照品储备液,加乙

腈-水(20:80)稀释成每1 mL中含三唑并吡啶酮、曲唑酮-*N*-氧化物、脱氯曲唑酮、4-乙基曲唑酮、曲唑酮异丁醚类似物分别为2、4、8、1、4 ng的对照品溶液。

2.4 专属性

在所建立的色谱-质谱条件下分析,各杂质峰完全分离,峰型良好,空白稀释剂、供试品溶液对各杂质的测定无干扰,见图1。

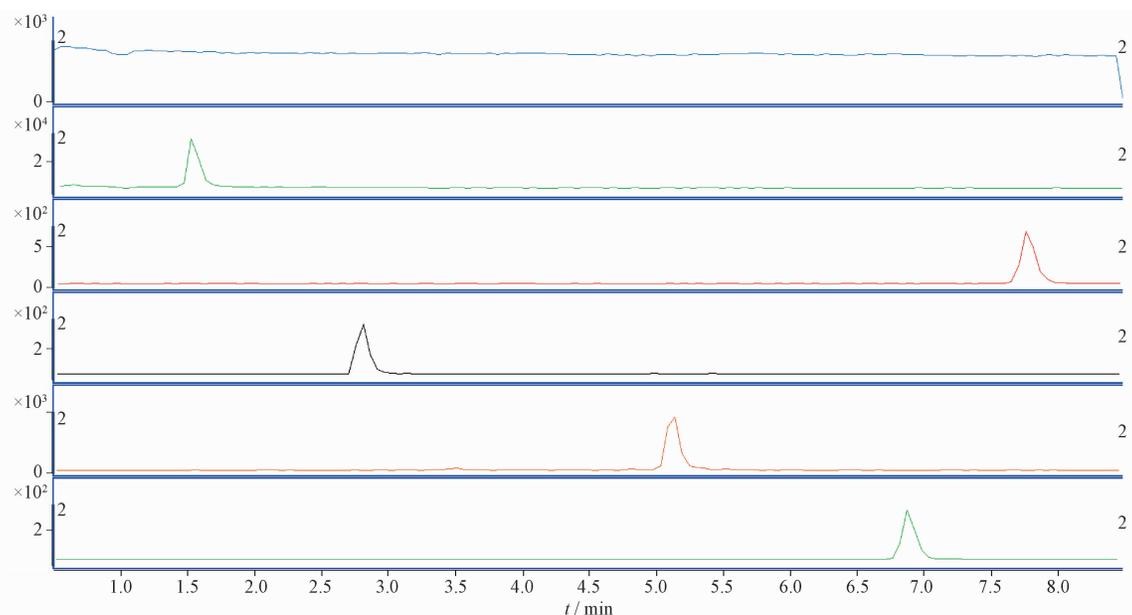


图1 各杂质组分MRM图谱

Fig.1 The MRM spectra of impurity components

2.5 线性试验

精密量取“2.3.2”项下对照品储备液,加乙腈-水(20:80)逐级稀释制成系列浓度的对照品线性溶液,照“2.1和2.2”项下条件测定。同时取线性溶

液最低浓度作为检测限(LOD)和定量限(LOQ)计算溶液,记录各杂质峰信噪比 S/N ,计算其定量限和检出限,结果见表3。

表3 线性关系、检出限和定量限结果

Tab.3 The results of linear regression analysis, LOQ and LOD

组分名称	线性范围/(ng · mL ⁻¹)	回归方程	<i>r</i>	LOQ/(ng · mL ⁻¹)	LOD/(ng · mL ⁻¹)
三唑并吡啶酮	0.246 1 ~ 3.691 2	$y = 387x + 56\ 653$	0.999 6	0.24	0.07
曲唑酮- <i>N</i> -氧化物	0.549 4 ~ 8.241 4	$y = 6\ 819x + 1\ 533$	0.999 5	0.54	0.16
脱氯曲唑酮	0.100 8 ~ 30.246 9	$y = 11\ 685x - 2\ 798$	0.999 6	0.10	0.03
4-乙基曲唑酮	0.113 8 ~ 1.706 8	$y = 8\ 454x - 74$	0.999 5	0.09	0.03
曲唑酮异丁醚类似物	0.520 9 ~ 7.813 0	$y = 4\ 941x - 428$	0.999 5	0.39	0.12

2.6 重复性和稳定性

按“2.3.1”项下平行制备供试品溶液6份,照“2.1和2.2”项下条件分别进样,记录峰面积,检出曲唑酮-*N*-氧化物和脱氯曲唑酮含量的RSD分别为5.9%和1.8%,均未检出三唑并吡啶酮、4-乙基曲唑

酮和曲唑酮异丁醚类似物。

2.7 加样回收率试验

精密称取盐酸曲唑酮原料药10 mg,置20 mL量瓶中,用“2.3.3”项下对照品溶液溶解并稀释至刻度,摇匀,即得100%回收率试验溶液,平行制备6

份,照“2.1和2.2”项下条件测定,结果见表4。

表4 加样回收率试验结果

Tab. 4 The results of average recovery

组分名称	回收率/%	RSD($n=6$)/%
三唑并吡啶酮	99.37	1.2
曲唑酮- <i>N</i> -氧化物	94.66	3.1
脱氯曲唑酮	91.94	3.9
4-乙基曲唑酮	98.37	2.5
曲唑酮异丁醚类似物	98.64	2.7

2.8 稳定性

取“2.3.1”项下供试品溶液分别于0、2、4、8、12 h进样,记录峰面积,结果曲唑酮-*N*-氧化物和脱氯曲唑酮峰面积RSD分别为1.0%和2.3%,未检出三唑并吡啶酮、4-乙基曲唑酮和曲唑酮异丁醚类似物,表明供试品溶液在12 h内稳定。

2.9 样品测定

取盐酸曲唑酮原料药3批,分别按“2.3.1”项下制备供试品溶液,照“2.1和2.2”项下条件测定,结果见表5。

表5 样品测定结果($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)

Tab. 5 The results of related impurities in trazodone hydrochloride API

组分名称	批号		
	2021-1	2021-2	2021-3
三唑并吡啶酮	未检出	未检出	未检出
曲唑酮- <i>N</i> -氧化物	1.33	1.60	1.58
脱氯曲唑酮	6.44	6.83	7.86
4-乙基曲唑酮	未检出	< 检出限	< 检出限
曲唑酮异丁醚类似物	未检出	未检出	未检出

3 讨论

3.1 测定结果

本次试验参照USP-NF2024中盐酸曲唑酮杂质测定方法同时测定这3批原料药中的有关物质,结果也检测出曲唑酮-*N*-氧化物和脱氯曲唑酮。采用建立的HPLC-MS/MS方法测定,结果不仅检出曲唑酮-*N*-氧化物和脱氯曲唑酮,其中有2批还检测到微量4-乙基曲唑酮,约为0.02和0.03 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 。HPLC-MS/MS法灵敏度高,专属性强,选择性好,可有效测定微量杂质。

3.2 小结

三唑并吡啶酮、脱氯曲唑酮、4-乙基曲唑酮、曲唑酮异丁醚类似物是盐酸曲唑酮合成过程中残留和产生的中间体或工艺杂质,曲唑酮-*N*-氧化物是盐酸曲唑酮经氧化形成的降解产物,本实验建立的HPLC-MS/MS方法能准确有效的测定其含量,为国内盐酸曲唑酮杂质的研究及其质量标准的完善提供实验基础。

参考文献

- [1] 陈国良,谈冬生,徐莉英,等. 盐酸曲唑酮的合成[J]. 中国药物化学杂志,2002,12(2):92.
CHEN GL, TAN DS, XU LY, *et al.* Synthesis of trazodone hydrochloride[J]. Chin J Med Chem, 2002, 12(2):92.
- [2] 陆艺,李万顺,赵玲. 盐酸曲唑酮临床应用的相关研究[J]. 精神医学杂志,2010,23(4):312.
LU Y, LI WS, ZHAO L. Study on the clinical application of trazodone hydrochloride[J]. J Psychiatry, 2010, 23(4):312.
- [3] BP [S]. 2022:1207.
- [4] USP-NF38[S]. 2020:4472.
- [5] 国家药品监督管理局国家药品标准 XS1-XG-027-2021[S]. 2022.
National Medical Products Administration National Drug standards XS1-XG-027-2021[S]. 2022.
- [6] 万君玥,陈华,尹婕. UPLC-MS/MS法测定盐酸曲唑酮片剂中遗传毒性杂质双(2-氯乙基)胺盐酸盐和1-(3-氯苯基)-4-(3-氯丙基)哌嗪盐酸盐[J]. 药科学报,2021,56(5):1439.
WAN JY, CHEN H, YIN J. Determination of bis(2-chloroethyl)amine hydrochloride and 1-(3-chloropropyl)-4-(3-chlorophenyl)piperazine hydrochloride in trazodone hydrochloride by UPLC-MS/MS[J]. Acta Pharm Sin, 2021, 56(5):1439.
- [7] 宋东伟,陈静,王欣,等. LC-MS/MS法测定盐酸曲唑酮原料药中1-(3-氯苯基)-4-(3-氯丙基)哌嗪盐酸盐[J]. 广东化工,2014,41(16):186.
SONG DW, CHEN J, WANG X, *et al.* Determination of 1-(3-chlorophenyl)-4-(3-chloropropyl)piperazine hydrochloride in trazodone hydrochloride by LC-MS/MS[J]. Guangdong Chem Ind, 2014, 41(16):186.
- [8] 万红艳. HPLC梯度洗脱法对盐酸曲唑酮片的杂质检查[J]. 海峡药学,2021,33(10):60.
WANG HY. Related impurities determination of trazodone hydrochloride tablets by HPLC[J]. Strait Pharm J, 2021, 33(10):60.
- [9] 邹国芳,闫鹏,孙玉静,等. HPLC同时测定盐酸曲唑酮中的7种有关物质[J]. 华西药理学杂志,2014,29(4):452.
ZOU GF, YAN P, SUN YJ, *et al.* Simultaneous determination of seven related substances of trazodone hydrochloride by HPLC[J]. West China J Pharm Sci, 2014, 29(4):452.

(收稿日期:2024-06-06)