

## 枸橼酸坦度螺酮中间体中潜在基因毒性杂质1,4-二溴丁烷的控制研究

徐意华<sup>1,2</sup>, 山广志<sup>1\*</sup>, 代相成<sup>2</sup>

1. 中国医学科学院医药生物技术研究所, 北京 100050

2. 致卓医药科技(北京)有限责任公司, 北京 101102

**摘要:** 目的 建立枸橼酸坦度螺酮原料药中间体中潜在基因毒性杂质1,4-二溴丁烷的控制检测方法。方法 采用高效气相色谱(GC)法,使用色谱柱Agilent DB-624(30 m×320 μm, 1.8 μm),升温程序:初始柱温95℃,保持2 min,以20℃/min升温至220℃,保持5 min。进样口温度250℃,检测器温度250℃,体积流量3 mL/min;分流比1:1;进样量1 μL。进行专属性、线性范围、灵敏度、稳定性、重复性、回收率、耐用性方法学考察。结果 1,4-二溴丁烷在0.1095~1.0948 μg/mL内峰面积与质量浓度线性关系良好( $r=0.9986$ );检测限为0.1095 μg/mL,定量限为0.2737 μg/mL,平均回收率为116.2%,方法学考察均符合要求。各批次样品中1,4-二溴丁烷的质量分数均小于0.0025%。结论 建立的方法专属性强、灵敏度高、测定结果准确、操作简单,可用于枸橼酸坦度螺酮原料药中间体中1,4-二溴丁烷的检测。

**关键词:** 枸橼酸坦度螺酮; 基因毒性杂质; 1,4-二溴丁烷; 高效气相色谱

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2021)09-1923-04

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.09.016

## Study on potential genotoxic impurities in tandospirone citrate intermediate

XU Yihua<sup>1,2</sup>, SHAN Guangzhi<sup>1</sup>, DAI Xiangcheng<sup>2</sup>

1. Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100050, China

2. Zhi zhuo medical technology (Beijing) Co., Ltd, Beijing 101102, China

**Abstract: Objective** To establish a controlled method for the detection of the potential genotoxic impurity 1,4-dibromobutane in the intermediate of tandospirone citrate API. **Methods** Agilent DB-624 (30 m × 320 μm, 1.8 μm) was used. The initial column temperature was 95 °C for 2 min, and the temperature was 20 °C/min to 220 °C for 5 min. The injection port temperature was 250 °C, the detector temperature was 250 °C, the flow rate was 3 mL/min, the split ratio was 1:1, and the injection volume was 1 μL. **Results** The linear range of 1,4-dibromobutane was 0.1095 — 1.0948 μg/mL ( $r = 0.9986$ ); the limit of detection was 0.1095 μg/mL, the limit of quantification was 0.2737 μg/mL, the average recovery ( $n=9$ ) was 116.2%, and the content of 1,4-dibromobutane in each batch was less than 0.0025%. **Conclusion** The method is specific, sensitive, accurate and simple. It can be used for the determination of 1,4-dibromobutane in the intermediate of tandospirone citrate.

**Key words:** tandospirone citrate; genotoxic impurity; 1,4-dibromobutane; GC

枸橼酸坦度螺酮是一种5-羟色胺受体激动剂<sup>[1]</sup>,主要用于焦虑症的治疗<sup>[2-4]</sup>。在对其合成工艺分析研究时发现使用到了烷基化试剂1,4-二溴丁烷,由于1,4-二溴丁烷属于潜在基因毒性杂质,需要严格控制。参考ICH-M7<sup>[5]</sup>、《药物遗传毒性研究技术指导原则》<sup>[6]</sup>和《中国药典》2020年版9306遗传毒性杂质控制指导原则<sup>[7]</sup>相关规定,将其可接受的限度按照最严格的要求制定为1.5 μg/d,按照枸橼

酸坦度螺酮最大日剂量60 mg计算,1,4-二溴丁烷的限度为0.0025%,需要建立其质控方法。为保证最终成品枸橼酸坦度螺酮的质量,将其放在枸橼酸坦度螺酮成盐前的中间体TDM3(1*S*,2*R*,6*S*,7*R*)-4-[4-[4-(2-噻啶基)哌嗪]-1-基]丁基]-4-氮杂三环[5.2.1.0<sup>2,5</sup>]癸烷-3,5二酮中进行控制。本研究建立气相色谱(GC)法检测枸橼酸坦度螺酮中间体TDM3中的1,4-二溴丁烷。

收稿日期: 2021-03-31

第一作者: 徐意华(1985—),男,湖北黄冈人,在职硕士研究生,研究方向为药物分析。E-mail: 1113145258@qq.com

\*通信作者: 山广志,男,副研究员,硕士研究生导师,研究方向为药物分析。Tel: (010)67019851

## 1 材料

### 1.1 主要仪器

高效气相色谱仪, Agilent 7890, FID 检测器; 十万分之一电子天平 MS105DU (梅特勒托利多电子天平)。

### 1.2 药品与主要试剂

枸橼酸坦度螺酮中间体 TDM3 [致卓医药科技(北京)有限责任公司, 批号 TD170906M3-05, 质量分数 99.87%; 连云港贵科药业有限公司, 批号 17003180401、质量分数 99.86%, 批号 17003180402、质量分数 99.89%, 批号 17003180403、质量分数 99.85%]; 甲醇(赛默飞世尔科技公司, 色谱级); 1,4-二溴丁烷(批号 BH-RB01020037-170601, 上海瀚鸿科技股份有限公司, 质量分数 99.3%)。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件

色谱柱 Agilent DB-624 (30 m × 320 μm, 1.8 μm), 进样口温度 250 °C, 检测器温度 250 °C, 流量分流比 1:1, 体积流量 3 mL/min, 进样量 1 μL; 升温程序: 初始柱温 95 °C, 保持 2 min; 以 20 °C/min 升温至 220 °C, 保持 5 min。

### 2.2 溶液的配制

**2.2.1 供试品溶液的制备** 取 TDM3 约 200 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加甲醇(超声)溶解并稀释至刻度, 摇匀。

**2.2.2 对照品溶液的制备** 取 1,4-二溴丁烷约 25 mg, 精密称定, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得贮备液; 再精密量取 50 μL 至 100 mL 量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 摇匀, 作为 1,4-二溴丁烷对照品溶液。

**2.2.3 混合溶液的制备** 取 TDM3 约 200 mg, 精密称定, 置 10 mL 量瓶中, 加 1,4-二溴丁烷对照品溶液超声溶解并稀释至刻度摇匀。

### 2.3 专属性试验

取甲醇、1,4-二溴丁烷对照品溶液、混合溶液按照“2.1”项色谱条件进样检测, 结果如图 1 所示, 1,4-二溴丁烷的出峰时间 6.46 min, 甲醇及 TDM3 均不干扰 1,4-二溴丁烷的检测。

### 2.4 线性关系考察

取 1,4-二溴丁烷对照品适量, 加甲醇制成 0.109 5、0.273 7、0.437 9、0.547 4、0.656 9、0.821 1、0.985 3、1.094 8 μg/mL 的溶液, 按照“2.1”项色谱条件, 测定其线性关系, 结果显示 1,4-二溴丁烷在 0.109 5~1.094 8 μg/mL 内线性关系良好, 线性

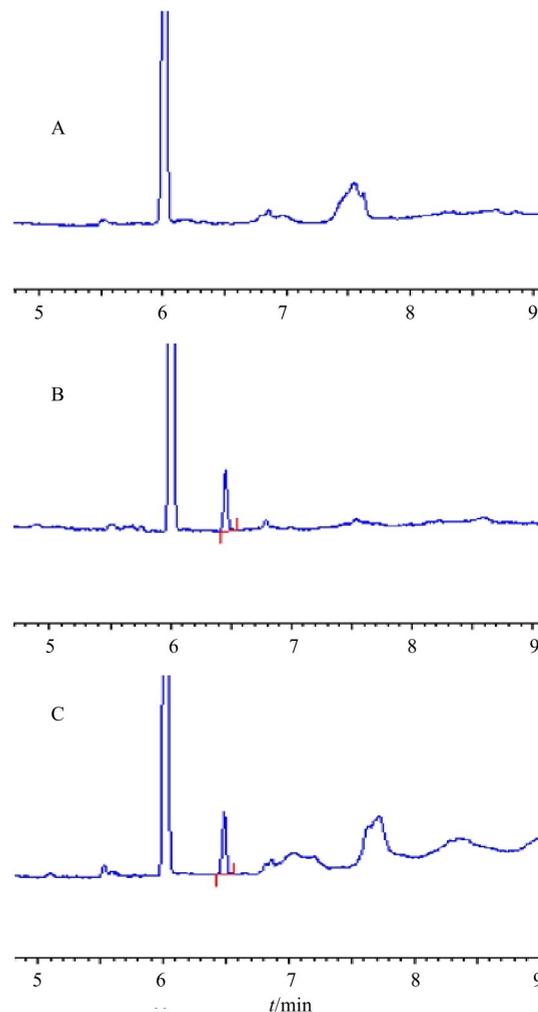


图1 空白溶剂(甲醇)(A)、1,4-二溴丁烷对照品溶液(B)、1,4-二溴丁烷与 TDM3 混合溶液(C)色谱图  
Fig. 1 Chromatogram of solvent blank (methanol)(A), 1,4-dibromobutane reference solution (B), and 1,4-dibromobutane and TDM3 mixed solution (C)

方程为  $y = 17\,902.481\,6x + 573.005\,5$ ,  $r = 0.998\,6$ 。

### 2.5 灵敏度试验

取 1,4-二溴丁烷适量, 加甲醇并逐级稀释至信噪比(S/N)约为 10, 得定量限溶液; 加溶剂溶解并逐级稀释至 S/N 约为 3, 得检出限溶液。测得 1,4-二溴丁烷的定量限为 0.273 7 μg/mL, 相当于供试品溶液质量浓度的 0.001 4%; 检出限为 0.109 5 μg/mL, 相当于供试品溶液质量浓度的 0.000 5%。

### 2.6 稳定性试验

取 1,4-二溴丁烷对照品溶液, 分别于室温条件下 0、2、4、6、8 h 不同时间段, 按照“2.1”项色谱条件进样检测, 结果显示, 1,4-二溴丁烷对照品溶液在室温 8 h 内峰面积无明显变化(RSD 为 0.72%), 溶液稳定性良好。

### 2.7 重复性试验

取 TDM3 (批号 TD170906M3-05), 按照“2.2.1”

项供试品溶液配制方法制备6份样品,按照“2.1”项色谱条件进样检测,试验结果显示,6份样品均未检出1,4-二溴丁烷。

## 2.8 回收率试验

取TDM3(批号TD170906M3-05)约200 mg,精密称定,分别置10 mL量瓶中(共9份),加入1,4-二溴丁烷2.5、5.0、7.5  $\mu\text{g/mL}$ 的溶液各制备3份混合供试品溶液,并用含1,4-二溴丁烷5  $\mu\text{g/mL}$ 的溶液作为对照品溶液,按照“2.1”项色谱条件进行试验,以外标法计算1,4-二溴丁烷的回收率。测得1,4-二溴丁烷平均回收率( $n=9$ )为116.2%,RSD为4.02%。

## 2.9 耐用性试验

分别调整载气体积流量( $3.0 \pm 0.2$ ) mL/min、进样口温度( $250 \pm 5$ ) $^{\circ}\text{C}$ 、初始柱温( $95 \pm 5$ ) $^{\circ}\text{C}$ 、检测器温度( $250 \pm 5$ ) $^{\circ}\text{C}$ ,峰面积的RSD分别为3.96%、2.08%、4.83%、5.54%,结果显示,各色谱条件的微小调整对1,4-二溴丁烷的检出无明显影响。

## 2.10 样品检测

取不同批次的TDM3配制供试品溶液,按照“2.1”项色谱条件进样检测,结果显示各批次TDM3检出的1,4-二溴丁烷均小于0.002 5%。结果见表1。

表1 不同批次的TDM3中1,4-二溴丁烷检测结果  
Tabel 1 Test results of 1,4-dibromobutane in different batches of TDM3

TDM3批号	1,4-二溴丁烷/%
TD170906M3-05	未检出
17003180401	0.001 0
17003180402	未检出
17003180403	0.000 6

## 3 讨论

### 3.1 研究对象及检测方法的确定

目前只有《中国药典》2020年版收载有枸橼酸坦度螺酮的质量标准<sup>[8]</sup>,其余各国药典并未收载其质量标准。有关于枸橼酸坦度螺酮的杂质的研究只局限于一般工艺杂质<sup>[9-10]</sup>,并未对其可能残留的潜在基因毒性杂质进行研究和报道。本研究对枸橼酸坦度螺酮的合成工艺进行分析发现其存在潜在的基因毒性杂质1,4-二溴丁烷,为确保枸橼酸坦度螺酮的质量和用药安全,需要对1,4-二溴丁烷的残留量进行质量研究。鉴于质量源于设计,将其放在中间体中进行过程控制较为合理。基因毒性杂质由于其毒性相对较高,引起了国内外药物工作者的

高度重视,各药品管理机构发布了相应的指导原则。

基因毒性杂质由于其限度相对较低,对其研究和检测一般选用气相色谱-质谱联用仪(GC-MS)和高效液相色谱-质谱(HPLC-MS)等技术手段进行控制<sup>[11]</sup>。由于GC-MS和HPLC-MS使用及运行维护成本相对较高,在国内药厂应用并不普及。因此选择开发一个检测成本相对较低,应用较为普及的检测方法较为实用。GC法检测灵敏度较高,应用较为普及,因此选择了GC法进行实验。

### 3.2 GC色谱条件的选择和优化

在对TDM3可能残留的1,4-二溴丁烷进行研究时,由于1,4-二溴丁烷的沸点相对较高,约为197~198  $^{\circ}\text{C}$ ,不适合选用顶空进样,宜采用直接进样。经过条件的摸索,确定了本色谱条件,可以满足1,4-二溴丁烷的检测,其定量限约为供试品溶液浓度的0.001 4%,低于限度值0.002 5%,满足其定量和定性检测需求。

### 3.3 溶剂的选择

在对TDM3进行溶解性考察时发现,选用甲醇作为溶剂,溶解度可以达到0.2 g/mL。可能残留的1,4-二溴丁烷可以很好地完全溶解,且甲醇和TDM3均不干扰1,4-二溴丁烷的检测,因此选用甲醇作为溶剂。

本研究建立了GC法检测枸橼酸坦度螺酮原料中间体(TDM3)中可能残留的潜在基因毒性杂质1,4-二溴丁烷的检测方法,并对其进行了方法学验证,结果显示,4个批次的TDM3中的1,4-二溴丁烷残留量均低于限度0.002 5%要求,本检测方法能满足TDM3中1,4-二溴丁烷的检测需求,能保证TDM3中的1,4-二溴丁烷的质量可控。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

### 参考文献

- [1] Ishizumi K, Kojima A, Antoku F. Synthesis and anxiolytic activity of N-substituted cyclic imides (1R\*, 2S\*, 3R\*, 4S\*)-N-[4-[4-(2-pyrimidinyl)-1-piperazinyl]butyl]-2, 3-bicyclo [2.2.1] heptanedicarboximide (tandospirone) and related compounds [J]. Chem Pharm Bull, 1991, 39(9): 2288-2300.
- [2] 宋轶任,廖峻,黄劼,等. 枸橼酸坦度螺酮用于失眠伴焦虑状态的疗效评价 [J]. 世界睡眠医学杂志, 2020, 7(10): 1682-1684.
- Song Y R, Liao J, Huang J, et al. Efficacy of tandospirone citrate in the treatment of insomnia with

- anxiety [J]. *World J Sleep Med*, 2020, 7(10): 1682-1684.
- [3] 范小冬, 谢星星, 张春燕, 等. 坦度螺酮与丁螺环酮治疗广泛性焦虑症的系统评价 [J]. *药物评价研究*, 2017, 40(3): 400-405.
- Fan X D, Xie X X, Zhang C Y, et al. Systematic review of tandospirone and buspirone in treatment of patients with generalized anxiety disorder [J]. *Drug Eval Res*, 2017, 40(3): 400-405.
- [4] 周 娅, 黄雪飞, 陈 昆, 等. 枸橼酸坦度螺酮治疗广泛性焦虑症有效性和安全性的系统评价 [J]. *医药导报*, 2018, 37(3): 368-373.
- Zhou Y, Huang X F, Chen K, et al. Efficacy and safety of citric acid tandospirone citrate in the treatment of generalized anxiety disorder: A systematic review [J]. *Herald Med*, 2018, 37 (3): 368-373.
- [5] ICH. Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk [S]. 2017.
- [6] 国家食品药品监督管理总局. 药物遗传毒性研究技术指导原则 [S]. 2018.
- National Medical Products Administration. Guidelines on drug genotoxicity research [S]. 2018.
- [7] 中国药典 [S]. 四部. 2020: 527-530.
- Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume IV. 2020: 527-530.
- [8] 中国药典 [S]. 二部. 2020: 883-885.
- Pharmacopoeia of the People's Republic of China [S]. Volume II. 2020: 883-885.
- [9] 陈功政, 胡和平, 王永朝, 等. 枸橼酸坦度螺酮及其制备方法、制剂和质量控制方法: 中国, CN101362751B [P]. 2011-05-11
- Chen G Z, Hu H P, Wang Y C, et al. Tandospirone citrate, preparation method thereof, formulations and quality control method: China, CN101362751B [P]. 2011-05-11.
- [10] 何宇新, 李 玲, 鲍文娟, 等. 枸橼酸坦度螺酮胶囊有关物质研究 [J]. *西华大学学报: 自然科学版*, 2011, 30(4): 104-108.
- He Y X, Li L, Bao W J, et al. Study on related substances of tandospirone citrate capsules [J]. *J Xihua Univ: Nat Sci Ed*, 2011, 30(4): 104-108.
- [11] 王 萍, 徐彩虹, 陈 仙, 等. 原料药中基因毒性杂质控制的研究进展 [J]. *中国现代应用药学*, 2015, 32(1): 119-126.
- Wang P, Xu C H, Chen X, et al. Development of genotoxic impurities control in active pharmaceutical ingredient [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2015, 32(1): 119-126.

[责任编辑 兰新新]