

药用辅料苯扎氯铵中未知杂质的结构鉴定及应用

张春丽^{1,2}, 周小华^{3,4}, 施海蔚^{3,4}, 袁耀佐^{3,4}, 王娅², 唐辉^{1*}, 王保成^{2*}

(1. 石河子大学药学院 新疆植物药资源利用教育部重点实验室, 石河子 832003; 2. 南京威尔药业集团股份有限公司, 南京 210047; 3. 江苏省食品药品监督检验研究院, 南京 210019; 4. 国家药品监督管理局化学药品杂质谱研究重点实验室, 南京 210019)

摘要 目的: 参照 ICH Q3A 的要求, 对代表性药用辅料苯扎氯铵样品中含量 > 0.1% 的未知杂质进行结构鉴定及来源归属。**方法:** 运用新建立的适合于苯扎氯铵有关物质结构推定的 LC-MS 方法, 采用 Acclaim 120 C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以甲醇 (A) - 20 mmol · L⁻¹ 的甲酸铵水溶液 (pH 3.5) (B) 为流动相, 梯度洗脱, 流速 1 mL · min⁻¹, 柱后分流 (1 : 3); 采用电喷雾离子源, 选择正离子模式进行扫描, 采集代表性样品中主成分和未知杂质的质谱信息, 借助“诊断碎片离子延伸策略”对未知杂质结构进行推定, 通过比较未知杂质与对照品的色谱质谱行为, 对未知杂质进行结构确证, 并对色谱系统中检出杂质进行来源归属和毒性预测。**结果:** 采用新建立的 LC-MS 方法, 在苯扎氯铵代表性样品中共检出 5 个未知杂质, 并推定了结构, 利用商业途径获得的 2 个杂质对照品及定向合成的另外 2 个杂质对照品对其中 4 个杂质结构进行了确证, 杂质 D 为二苄基二甲基氯化铵, 杂质 E 为甲基二苄胺, 杂质 G 为 N-甲基-N-十二烷基苄胺, 杂质 H 为 N,N-二苄基-N-甲基十二烷-1-氯化铵, 杂质 F 可能是分子式为 C₁₅H₁₇N 的同分异构体。Nexus 2.6.0 软件预测结果显示, 上述杂质均为 5 类杂质, 无基因毒性; 此外, 还利用杂质对照品, 对 USP 苯扎氯铵有关物质测定方法中检测的 4 个未知杂质进行了定位。**结论:** 本文对苯扎氯铵潜在杂质的结构及安全风险进行了系统研究, 对完善国内外药典标准及提高苯扎氯铵的质量控制水平具有指导意义。

关键词: 药用辅料; 苯扎氯铵; 未知杂质; 结构鉴定; 离子阱-飞行时间质谱

中图分类号: R 917

文献标识码: A

文章编号: 0254-1793(2025)01-164-11

doi: 10.16155/j.0254-1793.2024-0252

Structure identification and application of unknown impurities in benzalkonium chloride pharmaceutical excipients

ZHANG Chun-li^{1,2}, ZHOU Xiao-hua^{3,4}, SHI Hai-wei^{3,4}, YUAN Yao-zuo^{3,4}, WANG Ya²,
TANG Hui^{1*}, WANG Bao-cheng^{2*}

(1. College of Pharmacy, Shihezi University, Key Laboratory of Xinjiang Phytomedicine Resource and Utilization, Ministry of Education, Shihezi 832003, China; 2. Nanjing Well Pharmaceutical Group Co., Ltd., Nanjing 210047, China; 3. Jiangsu Institute for Food and Drug Control, Nanjing 210019, China; 4. NMPA Key Laboratory for Impurity Profile of Chemical Drugs, Nanjing 210019, China)

Abstract Objective: To identify the structure and determine the source of unknown impurities present at levels

* 通信作者 唐辉 Tel: 13909938508; E-mail: tanghuishz@qq.com

王保成 Tel: 13601589387; E-mail: wangbch@163.com

第一作者 张春丽 Tel: 18699592909; E-mail: 1647428696@qq.com

周小华 Tel: 13814083424; E-mail: 64946661@qq.com

greater than 0.1% in representative pharmaceutical excipient benzalkonium chloride samples, in accordance with ICH Q3A guidelines. **Methods:** A new LC-MS method suitable for the structure prediction of related substances of benzalkonium chloride was established. The separation was performed on an Acclaim 120 C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) using a mobile phase consisting of methanol (mobile phase A) and 20 mmol · L⁻¹ ammonium formate aqueous solution (pH 3.5, mobile phase B) with gradient elution at a flow rate was 1 mL · min⁻¹. The post-column split was set to 1 : 3. MS data were collected in positive ion mode using an electrospray ionization (ESI) source. The structures of unknown impurities were inferred using a “Diagnostic fragment ion extension strategy” and confirmed by comparing the chromatographic and mass spectrometric behaviors of the impurities with those of reference substances. Additionally, the source attribution and genotoxicity prediction of the detected impurities were performed. **Results:** A total of five unknown impurities were detected in a representative sample of benzalkonium chloride by the newly established LC-MS method, and their structures were inferred. The structures of four impurities were confirmed using two commercially available reference substances and two reference substances synthesized in a directionally oriented manner. Impurity D was identified as *N*-benzyl-*N,N*-dimethyl-1-phenylmethanaminium chloride. Impurity E as *N*-benzyl-*N*-methyl-1-phenylmethanamine. The impurity G as *N*-benzyl-*N*-methyldodecan-1-amine, and impurity H as *N,N*-dibenzyl-*N*-methyldodecane-1-ammonium chloride. Impurity F was hypothesized to be an isomer of the formula C₁₅H₁₇N. Predictions using Nexus 2.6.0 software indicated that all the above impurities fell into category 5 and had no genotoxic potential. Furthermore, the method successfully located four unknown impurities detected by the USP method in benzalkonium chloride related substances using impurity reference standards. **Conclusion:** This study systematically examines the structure and safety risks of potential impurities in benzalkonium chloride, providing valuable insights for enhancing quality control standards and pharmacopoeia criteria both domestically and internationally.

Keywords: pharmaceutical excipients; benzalkonium chloride; unknown impurities; structure identification; ion trap-time of flight mass spectrometry

苯扎氯铵 (benzalkonium chloride, BAC) 是通式为 [C₆H₅CH₂N(CH₃)₂R]Cl 的烷基苄基二甲基氯化铵的混合物, 其中 R 表示烷基的混合物, 主要由 *n*-C₁₂H₂₅ (C12-BAC) 和 *n*-C₁₄H₂₉ (C14-BAC) 组成, 苯扎氯铵兼具亲水及疏水性, 可通过静电吸附和离子交换达到抑菌效果^[1-2], 因其抗菌谱广, 起效快, 广泛用于滴眼剂中的抑菌剂^[3], 并被多国药典收载。

近年来, 随着化学原料药及制剂的杂质谱研究的深入, 药用辅料的杂质研究也越来越受到关注^[4-5], USP-NF (official as of 01-Aug-2023)^[6] 和 EP 11.2^[7] 中, 均收载了苯扎氯铵中已知杂质 A、B、C 及检测方法, 苯扎氯铵及其已知杂质的化学结构见图 1。杂质 B 和杂质 C 是国外药典指定严格控制的杂质, 但 2020 年版《中华人民共和国药典》^[8] 收载的苯扎氯铵品种未设置该检查项, 缺少全面控制苯扎氯铵质量的关键一环^[9], 彭琳等^[10] 曾报道发现 1 个未知杂质, 但未进行定性研究。日常使用 USP 方法检测国内苯

扎氯铵药用辅料过程中还发现, 不同厂家的产品中, 除 USP 规定的 3 个杂质外, 均可检出较多的未知杂质, 且不同厂家间未知杂质含量存在明显差异, 药用辅料中杂质可能会影响药品的稳定性、安全性和有效性^[11-12], 故对其杂质谱的系统了解很有必要。但迄今为止, 未见对苯扎氯铵中的杂质谱研究的系统报道, 本文拟对苯扎氯铵的未知杂质进行分离和结构鉴定。由于目前药用辅料还没有杂质研究的指导原则, 研究过程中参考 ICH Q3A, 对含量 ≥ 0.1% 的杂质进行研究。

本研究开发了 1 个 LC-MS 方法, 可实现对苯扎氯铵药用辅料中未知杂质的在线分离和质谱检测, 共分离出 5 个未知杂质, 通过比较杂质对照品和样品中杂质的色谱和质谱行为确证了其中 4 个未知杂质的结构, 并将其应用于 USP 方法中分离出的未知杂质的确认。该研究还推测了未知杂质可能的来源, 为提高产品质量控制水平提供一定指导意义。

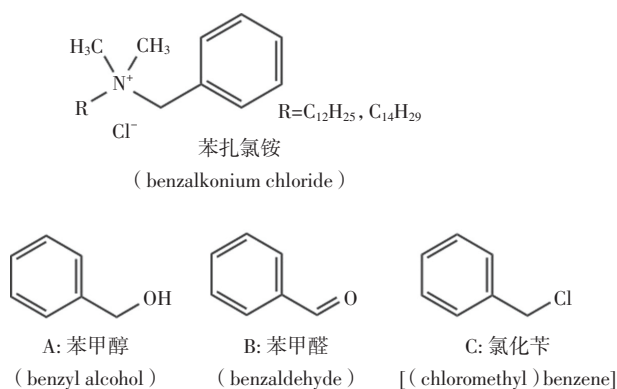


图1 苯扎氯铵及3个已知杂质
Fig. 1 The chemical structures of benzalkonium chloride and three known impurities

1 仪器与试剂

LC-MS-IT-TOF 高效液相色谱 (PDA 检测器) - 离子阱 - 飞行时间质谱仪 (Shimadzu 公司); Avance HD 核磁共振波谱仪 (Bruker 公司); Bransonic 3510 EMT 超声仪 (Branson 公司); Milli-Q 超纯水机 (Millipore 公司); DZF-6022 真空干燥箱 (上海一恒科学仪器有限公司)。

对照品苯甲醇 (批号 190019-202205, 含量 100%)、苯甲醛 (批号 11650-202106, 含量 99.6%) 均购自中国食品药品检定研究院; 甲基二苄胺 (批号 C15363842, 含量 97%), 购自上海麦克林生化科技股份有限公司; 十二烷基苄胺 (批号 DPC988, 含量 98.8%), 购自上海毕得医药科技有限公司; *N*-甲基-*N*-十二烷基苄胺 (含量 97%), 购自天津易创成医药技术有限公司; 苯扎氯铵 (A 厂家, 批号 20230601; B 厂家, 批

号 20230602; C 厂家, 批号 20230603; D 厂家, 批号 20230604); 色谱级甲醇 (ACS 公司)。

2 色谱 - 质谱条件

2.1 液相色谱条件

采用 Acclaim 120 C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm, Thermo Fisher Scientific) 色谱柱, 以甲醇 (A) - 20 mmol · L⁻¹ 的甲酸铵水溶液 (甲酸调节 pH 至 3.5) (B) 为流动相, 梯度洗脱 (0~19 min, 35%A; 19~21 min, 35%A → 75%A; 21~54 min, 75%A; 54~55 min, 75%A → 80%A; 55~65 min, 80%A; 65~66 min, 80%A → 35%A; 65~75 min, 35%A), 流速 1 mL · min⁻¹, 柱后分流 (1 : 3), 柱温 30 °C, 检测波长 210 nm, 进样体积 20 μL。

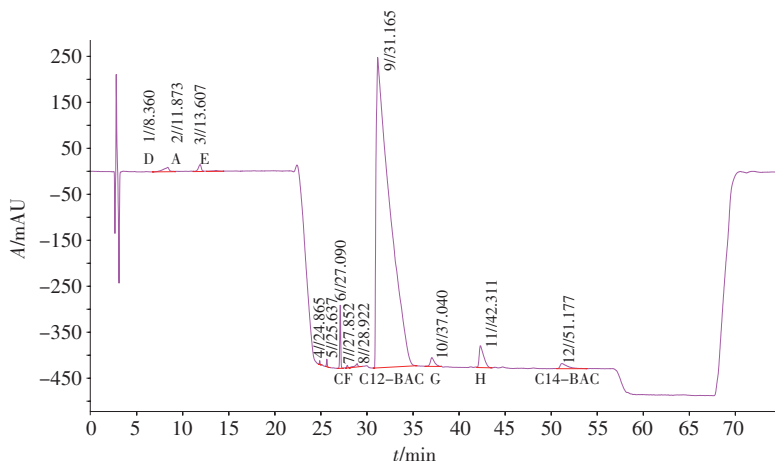
2.2 质谱条件

离子源为 ESI 源, 离子扫描质量范围为 *m/z* 50~500, 加热模块温度 200 °C, 曲形脱溶剂管 (CDL) 温度 200 °C, 雾化气流速 1.5 L · min⁻¹, 干燥气体压力 94.0 kPa, 正离子模式检测。

3 结果

3.1 质谱信息的采集

精密称取苯扎氯铵样品适量, 用甲醇溶解并稀释成质量浓度为 5 mg · mL⁻¹ 的溶液, 作为供试品溶液, 分别按“2”项下条件测定 A、B、C 和 D 厂家的各 1 批样品, 其中 A 厂家产品中检出杂质最多, 其色谱图见图 2, 共得到 5 个未知杂质的质谱信息, 根据出峰顺序依次命名为杂质 D~H, 苯扎氯铵及其未知杂质的质谱信息和化学结构分别见表 1、2。



A. 苯甲醇 (benzyl alcohol) C. 氯化苄 [(chloromethyl) benzene] D~H. 未知杂质 D~H (unknown impurities D~H)

图2 苯扎氯铵液相色谱图

Fig. 2 HPLC chromatogram of benzalkonium chloride

表 1 苯扎氯铵及其未知杂质的质谱信息及推测结构

Tab. 1 Mass spectrum information and inferred structure of benzalkonium chloride and its unknown impurities

化合物 (compound)	保留时间 (retention time)/min	[M+H] ⁺ m/z	碎片离子 (fragment ion)	推测结构 (presumed structure)
杂质 D (impurity D)	8.360	226.157 0*	91.053 0、134.096 3、166.078 8、 181.100 3	二苄基二甲基氯化铵 (<i>N</i> -benzyl- <i>N,N</i> -dimethyl-1-phenylmethanaminium chloride)
杂质 E (impurity E)	13.607	212.141 4	91.053 4、120.082 4、181.101 1	甲基二苄胺 (<i>N</i> -benzyl- <i>N</i> -methyl-1-phenylmethanamine)
杂质 F (impurity F)	27.852	276.266 8	91.052 7、184.205 8	十二烷基苄胺 (<i>N</i> -benzyl-dodecan-1-amine)
杂质 G (impurity G)	37.040	290.282 7	91.050 5、198.220 8	<i>N</i> -甲基- <i>N</i> -十二烷基苄胺 (<i>N</i> -benzyl- <i>N</i> -methyldodecan-1-amine)
杂质 H (impurity H)	42.311	380.328 9*	134.095 6、166.076 4、181.101 2、 198.221 3、288.267 1	<i>N,N</i> -二苄基- <i>N</i> -甲基十二烷-1-氯化铵 (<i>N,N</i> -dibenzyl- <i>N</i> -methyldodecane-1-ammonium chloride)
C12-BAC	31.165	304.329 1*	212.244 7、136.112 3	十二烷基二甲基苄基氯化铵 (<i>N</i> -benzyl- <i>N,N</i> -dimethyldodecan-1-aminium chloride)
C14-BAC	51.177	332.329 3*	240.266 7、136.111 9	十四烷基二甲基二苄基氯化铵 (<i>N</i> -benzyl- <i>N,N</i> -dimethyltetradecan-1-aminium chloride)

注 (note): *. [M-Cl]⁺ 碎片离子 ([M-Cl]⁺ fragment ion)

表 2 苯扎氯铵及 5 个未知杂质的化学结构

Tab. 2 The chemical structures of benzalkonium chloride and 5 unknown impurities

化合物 (compound)	R ₁	R ₂	R ₃	X
杂质 D (impurity D)*	Me	Bn	Me	Cl ⁻
杂质 E (impurity E)	Me	Bn	/	/
杂质 F (impurity F)	H	C ₁₂ H ₂₅	/	/
杂质 G (impurity G)	Me	C ₁₂ H ₂₅	/	/
杂质 H* (impurity H)	Me	Bn	C ₁₂ H ₂₅	Cl ⁻
C12-BAC*	Me	C ₁₂ H ₂₅	Me	Cl ⁻
C14-BAC*	Me	C ₁₄ H ₂₉	Me	Cl ⁻

注 (note): *. 杂质 D、杂质 H、12-BAC 和 14-BAC 中的 N 均为 N⁺ 离子 (the N in impurity D, impurity H, 12-BAC, and 14-BAC is the N⁺ ion)

3.2 主成分质谱裂解规律的解析

通过液相色谱定位及质谱定性,并与市售对照品

对比鉴定了 C12-BAC 和 C14-BAC 的结构。主成分

碎片离子可能的裂解模式见图 3。

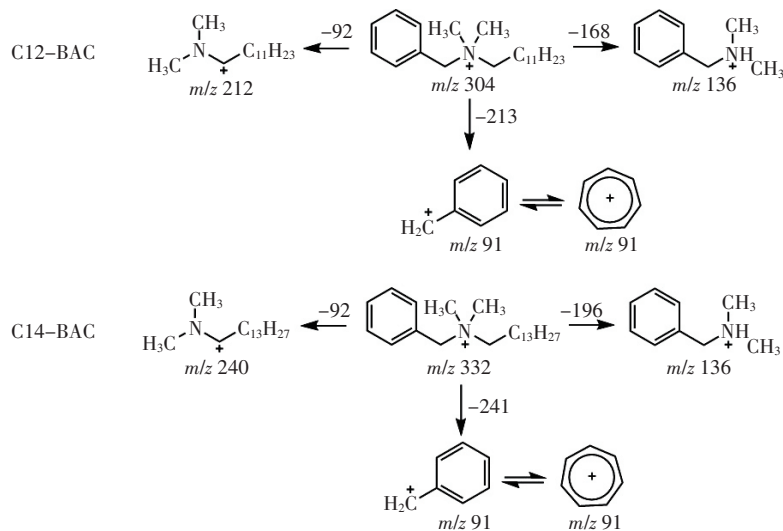


图 3 C12-BAC 和 C14-BAC 可能的裂解途径

Fig. 3 The probable fragment pathways of C12-BAC and C14-BAC

C12-BAC 在 m/z 304.329 1 处有 $[M-Cl]^+$ 离子峰, 与离子式 $C_{21}H_{38}N^+$ 相应。 m/z 212.244 7 和 m/z 136.112 3 是分别失去了 1 个甲苯 (m/z 92) 和十二烷基 (m/z 168) 形成的。

C14-BAC 的 m/z 332.329 3 处有 $[M-Cl]^+$ 离子峰, 与离子式 $C_{23}H_{42}N^+$ 相应。 m/z 240.266 7 和 136.111 9 是分

别失去 1 个甲苯 (m/z 92) 和十四烷基 (m/z 196) 形成的。

3.3 未知杂质结构推定

使用 Formula Predictor 预测未知杂质的元素组成, 通过已知物质 (如 C12-BAC 等) 与未知杂质多级质谱行为的异同性推测结构。未知杂质可能的裂解途径见图 4。

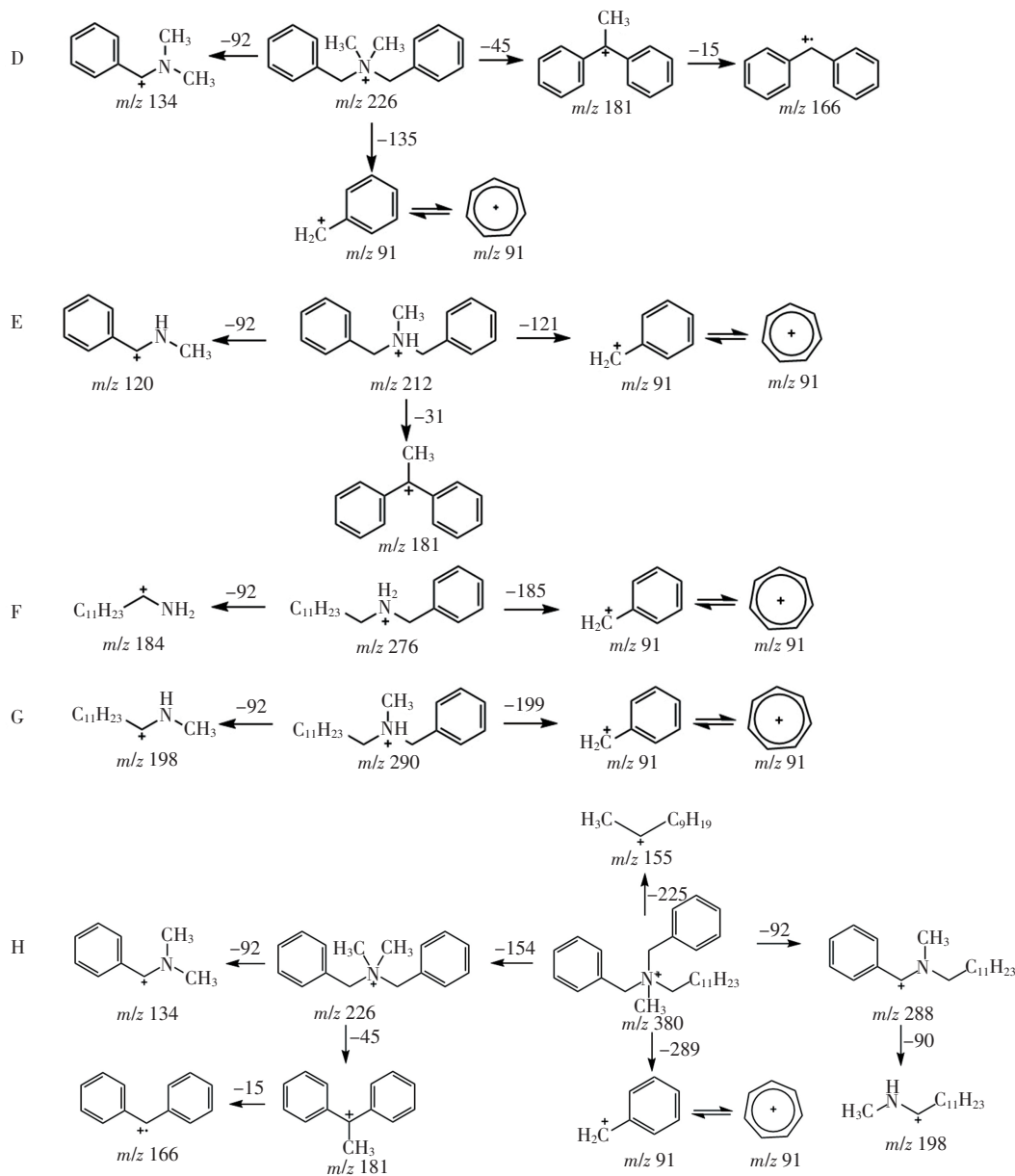


图 4 未知杂质 D-H 可能的裂解途径

Fig. 4 The probable fragment pathways of unknown impurities D-H

3.3.1 杂质 D 的结构推定 杂质 D 可能的裂解模式见图 4-D, 在 m/z 226.157 0 处有 $[M-Cl]^+$ 离子峰, 与离子式 $C_{16}H_{20}N^+$ 相应, 较 C12-BAC 的 m/z $[M-Cl]^+$ 少

78, m/z 91.053 0 表明杂质 D 存在苄基, 故杂质 D 无十二烷基。碎片离子 m/z 181.100 3 是丢失 1 个二甲胺并重排形成的, m/z 166.078 8 较 m/z 181.100 3 少

1个甲基(m/z 15)。 m/z 134.096 3是丢失1个甲苯(m/z 92)形成的。故推断该结构为二苄基二甲基氯化铵, CAS为100-94-7。

3.3.2 杂质E的结构推定 杂质E可能的裂解模式见图4-E,在 m/z 212.141 4处有 $[M+H]^+$ 离子峰,与离子式 $C_{15}H_{18}N^+$ 相应,较杂质D的 m/z 226.157 0少14,即1个亚甲基。 m/z 181.101 1、 m/z 91.053 4与杂质D碎片离子相似,提示可能存在2个苄基。而 m/z 120.082 4为丢失1个甲苯(m/z 92)形成的,较杂质D的碎片离子 m/z 134.096 3少14,表明比杂质D缺少1个亚甲基。故推测结构为甲基二苄胺, CAS为102-05-6。

3.3.3 杂质F的结构推定 杂质F可能的裂解模式见图4-F,在 m/z 276.266 8处有 $[M+H]^+$ 离子峰,与离子式 $C_{19}H_{34}N^+$ 相应,较C12-BAC的 m/z $[M-Cl]^+$ 少28,说明缺少2个亚甲基。 m/z 91.052 7说明杂质F存在苄基, m/z 184.205 8为母离子失去1个甲苯(m/z 92)形成的,较C12-BAC的碎片离子 m/z 212.244 7少2个亚甲基(m/z 28)。根据主成分结构推断该杂质为十二烷基苄胺, CAS为1687-68-9。

3.3.4 杂质G的结构推定 杂质G可能的裂解模式见图4-G,在 m/z 290.282 7处有 $[M+H]^+$ 离子峰,与离子式 $C_{20}H_{36}N^+$ 相应,较C12-BAC的 m/z $[M-Cl]^+$ 少14; MS/MS谱图中最丰富的离子位于 m/z 198.220 8处,为丢失1个甲苯(m/z 92)形成的,较C12-BAC的碎片离子 m/z 212.244 7少14,即1个亚甲基; m/z 91.050 5表明杂质G存在苄基。故推断杂质G的结构为*N*-甲基-*N*-十二烷基苄胺, CAS为68397-57-9。

3.3.5 杂质H的结构推定 杂质H可能的裂解模式见图4-H,在 m/z 为380.328 9处有 $[M-Cl]^+$ 离子峰,与离子式 $C_{27}H_{42}N^+$ 相应,较C12-BAC的 m/z $[M-Cl]^+$ 多76,较杂质D母离子多154,即十一烷基, m/z 198.221 3与杂质G碎片离子相似,说明杂质H存在十二烷基;较杂质G多1个苄基(m/z 90)。 m/z 134.095 6、 m/z 166.076 4、 m/z 181.101 2与杂质D碎片离子相似,且 m/z 289.270 6是丢失1个甲苯(m/z 92)形成的,198.221 3为丢失1个苄基(m/z 90)并结合了1个氢形成的,说明存在2个苄基。故推断杂质H的结构为*N,N*-二苄基-*N*-甲基十二烷基氯化铵, CAS为108789-53-3。

3.4 杂质D和杂质H的合成及纯度分析

3.4.1 杂质D和杂质H的合成 取对照品*N,N*-二

甲基苄胺 3.0 g和氯化苄 3.0 g置于顶空瓶1,取对照品*N*-甲基-*N*-十二烷基苄胺 5.0 g和氯化苄 2.5 g置于顶空瓶2,密封,常温放置48 h,当顶空瓶中液体变为乳白色凝胶块,即得粗品。将粗品溶于乙酸乙酯中,于4℃冰箱重结晶12 h,取乙醚300 mL分3次洗涤过滤,50℃真空干燥12 h,即得杂质D和杂质H的精制品。

3.4.2 杂质D和杂质H的纯度分析 取“3.4.1”项下制备纯化的杂质精制品,制成杂质质量浓度为0.005 mg·mL⁻¹的甲醇溶液,按“2.1”项下液相色谱条件进样6次,采用峰面积归一化法计算,结果所制备的杂质D纯度($n=6$)为97.1%,杂质H纯度($n=6$)为97.8%。

3.5 合成杂质的结构确证

3.5.1 结构确证方法 红外吸收光谱(IR):取除水干燥后的“3.4.1”项下杂质精制品约5 mg与溴化钾粉末500 mg研磨均匀,压片,置于红外光谱仪中测定。

质谱(MS):取“3.4.1”项下杂质精制品适量,制成杂质质量浓度分别为0.005 mg·mL⁻¹的甲醇溶液,液质联用仪直接进样,以80%甲醇水溶液为流动相,流速0.3 mL·min⁻¹;离子扫描质量范围为 m/z 100~600,采用ESI源进行正离子模式和负离子模式扫描。

氢谱(¹H-NMR):取“3.4.1”项下杂质精制品各约10 mg,杂质D用氘代氯仿(CDCl₃)溶解,杂质H用氘代二甲亚砜(DMSO-*d*₆)溶解,分别转移至5 mm内径的核磁管中。核磁共振波谱仪采用zg30脉冲序列,重复扫描16次,工作频率为400 MHz进行¹H-NMR的扫描。

碳谱(¹³C-NMR):取“3.4.1”项下杂质精制品各约50 mg,分别用DMSO-*d*₆溶解,并转移至5 mm内径的核磁管中。核磁共振波谱仪采用zgpg30脉冲序列,重复扫描512次,工作频率为400 MHz进行¹³C-NMR的扫描。

3.5.2 杂质D结构确证 IR图见图5-a,3 027.96 cm⁻¹处的中强峰为苯环C-H的伸缩振动吸收峰,2 961.89、2 806.98 cm⁻¹为甲基和亚甲基的伸缩振动峰,1 995.83、1 929.37、1 848.24、1 734.75 cm⁻¹为单取代苯环上的C-H面外弯曲振动吸收峰,1 597.55、1 479.30 cm⁻¹为苯环C=C骨架伸缩振动吸收峰,1 454.24 cm⁻¹为季铵盐的特征吸收峰。

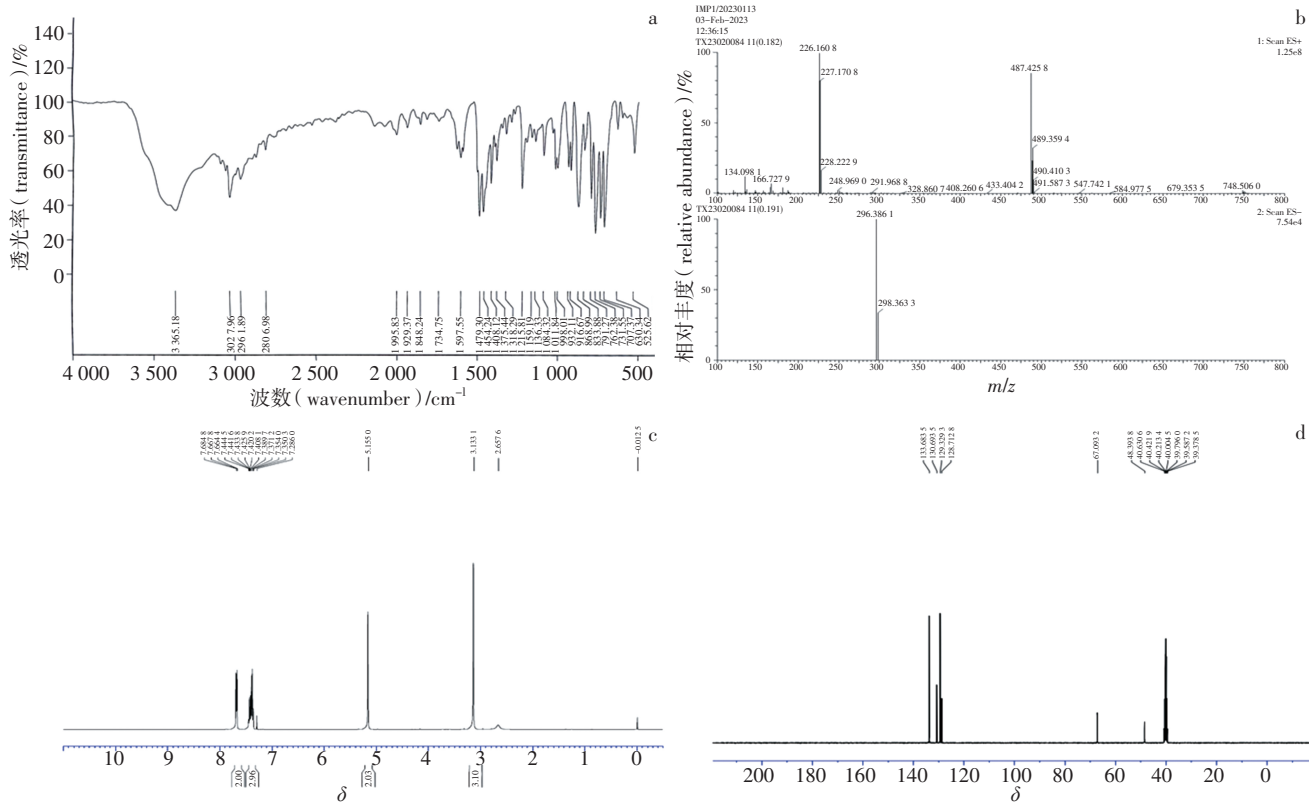


图5 杂质D的IR (a)、MS (b)、¹H-NMR (c)、¹³C-NMR (d)
Fig. 5 IR (a), MS (b), ¹H-NMR (c), ¹³C-NMR (d) of impurity D

MS图见图5-b,以正离子方式检测的一级全扫描质谱得到 m/z 226.160 8 $[M-Cl]^+$,与未知杂质D的一级质谱信息一致; m/z 487.475 8 $[2M-Cl]^+$ 和 m/z 489.359 4的丰度比为3 : 1,提示有1个氯离子。负离子模式检测得到 m/z 296.386 1 $[M+Cl]^-$ 。因此可以确认该化合物质谱的相对分子质量为261.61,这与二苄基二甲基氯化铵的相对分子质量是一致的。

¹H-NMR图见图5-c,¹H-NMR图谱共出现4组峰(除溶剂峰外),积分比为2 : 3 : 2 : 3。由谱图化学位移值得得 δ (7.717, t, 2 H) (7.445, m, 3 H),苯环上的氢; δ (5.221, s, 2 H),连接苯环和氮正离子的亚甲基; δ (3.219, s, 3 H),氮正离子相连的甲基。这与Chemdraw软件预测的二苄基二甲基氯化铵的氢谱图一致。

¹³C-NMR图和碳原子编号分别见图5-d和图6, δ : 133.683 5 (C-5/9/12/16)、130.693 5 (C-4/11)、129.329 3 (C-6/8/13/15)、128.712 8 (C-7/14)、67.093 2 (C-3/10)、48.393 8 (C-1/2)。这与Chemdraw软件预测的二苄基二甲基氯化铵的碳谱图一致。综上,合成的杂质D即是二苄基二甲基氯化铵。

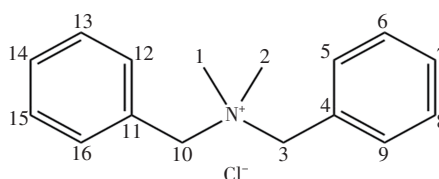


图6 杂质D碳原子编号
Fig. 6 Carbon atom number of impurity D

3.5.3 杂质H结构确证

IR图见图7-a, 2 923.47、2 852.84 cm^{-1} 为甲基和亚甲基的伸缩振动峰,1 997.69、1 916.95、1 834.05、1 796.75 cm^{-1} 为单取代苯环上的C-H面外弯曲振动吸收峰,1 597.55、1 479.30 cm^{-1} 为苯环C=C骨架伸缩振动吸收峰,1 454.24 cm^{-1} 为季铵盐的特征吸收峰。

MS图见图7-b,以正离子模式检测的一级全扫描质谱得到 m/z $[M-Cl]^+$ 380.330 47,与未知杂质H的一级质谱信息一致。负离子模式检测得到 m/z 470.327 79,推测 $[M-Cl]^+$ 结合了1个苄基又失去了1个氢。因此可以确认该化合物质谱的相对分子质量为415.78,这与N,N-二苄基-N-甲基十二烷-1-氯化铵的相对分子质量是一致的。

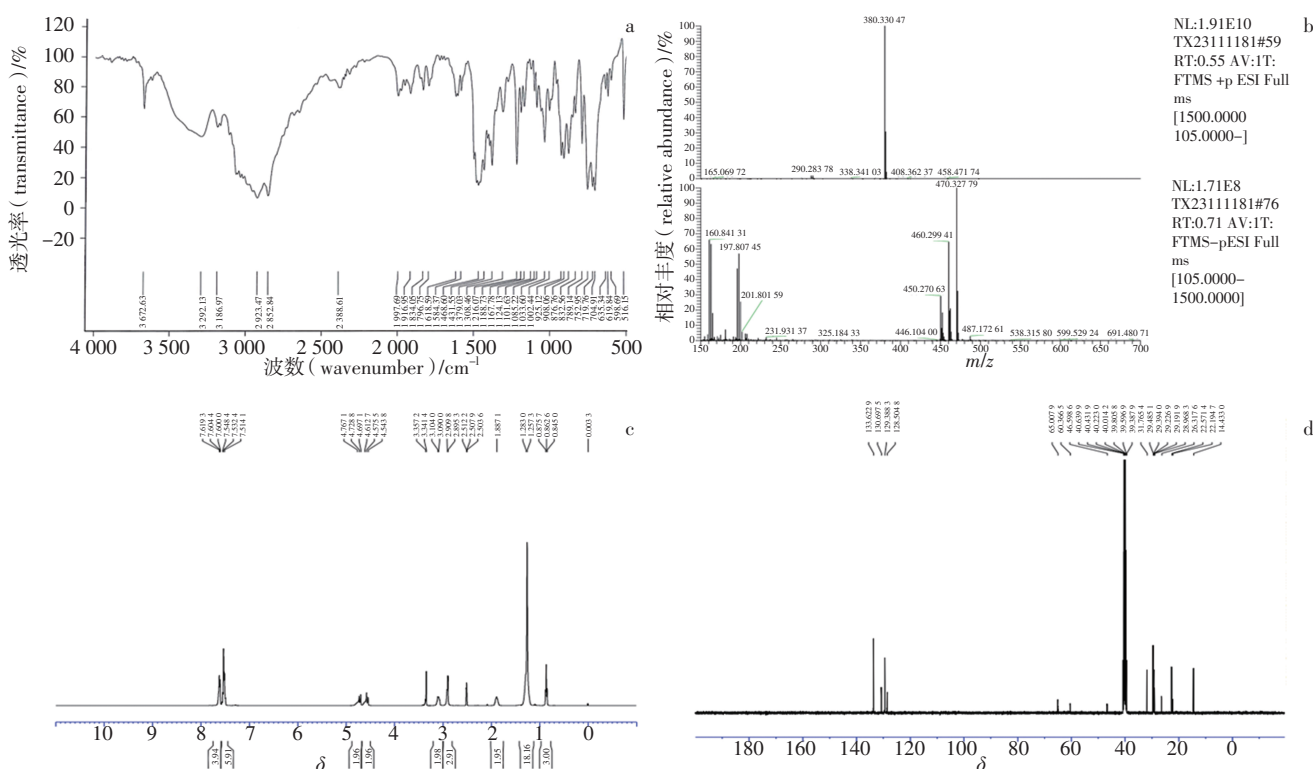


图7 杂质H的IR (a)、MS (b)、¹H-NMR (c)、¹³C-NMR (d)
Fig.7 IR (a), MS (b), ¹H-NMR (c), ¹³C-NMR (d) of impurity H

¹H-NMR 图见图 7-c, 共有 9 组峰(除溶剂峰外), 积分比为 4 : 6 : 2 : 2 : 2 : 3 : 2 : 18 : 3。由谱图化学位移值得得 δ:(7.604 4, t, 4 H)(7.532 4, t, 6 H), 苯环上的氢;(4.728 8, t, 2 H)(4.575 5, t, 2 H), 连接吸电子基和苯环的亚甲基;(3.104 0, d, 2 H), 连接氮正离子的亚甲基;(2.909 8, d, 3 H), 连接氮正离子的甲基;(1.887 1, s, 2 H), 连接烷基的亚甲基;(1.257 3, d, 18 H), 连接烷基的亚甲基;(0.862 6, t, 3 H), 连接烷基的甲基。这与 Chemdraw 软件预测的 *N,N*-二苄基-*N*-甲基十二烷-1-氯化铵的氢谱图一致。

¹³C-NMR 图和碳原子编号分别见图 7-d 和图 8, δ: 133.622 9(C-16/20/23/27), 130.697 5(C-15/22), 129.388 3(C-17/19/24/26), 128.504 8(C-18/25), 65.007 9(C-14/21), 60.366 5(C-12), 46.598 6(C-13), 31.765 4(C-11), 29.485 1(C-5/6), 29.394 0(C-7), 29.226 9(C-8), 29.191 9(C-9), 28.968 3(C-10), 26.317 6(C-4), 22.571 4(C-3), 22.194 7(C-2), 14.433 0(C-1)。这与 Chemdraw 软件预测的 *N,N*-二苄基-*N*-甲基十二烷-1-氯化铵的碳谱图一致。综上, 可得合成的杂质 H 即是 *N,N*-二苄

基-*N*-甲基十二烷-1-氯化铵。

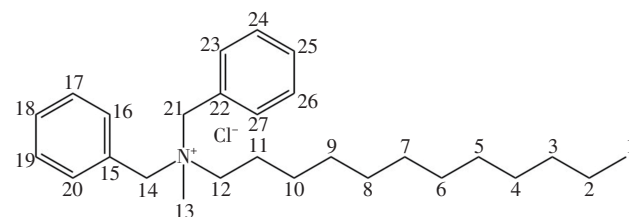


图8 杂质H碳原子编号
Fig.8 Carbon atom number of impurity H

3.6 小结

将利用商业途径购买的杂质 E(甲基二苄胺)、杂质 F(十二烷基苄胺)、杂质 G(*N*-甲基-*N*-十二烷基苄胺)对照品及定向合成的杂质 D(二苄基二甲基氯化铵)和杂质 H(*N,N*-二苄基-*N*-甲基十二烷-1-氯化铵)对照品, 根据“2.1”和“2.2”项下的条件进样测定, 结果表明样品中杂质 D、E、G、H 和相应杂质对照品的色谱和质谱行为一致, 而杂质 F 不一致, 表明杂质 F 不是十二烷基苄胺。故杂质 D 为二苄基二甲基氯化铵; 杂质 E 为甲基二苄胺; 杂质 F 可能是分子式为 C₁₅H₁₇N 的同分异构体; 杂质 G 为 *N*-甲基-*N*-十二烷基苄胺; 杂质 H 为 *N,N*-二苄

基-N-甲基十二烷-1-氯化铵。

4 讨论

4.1 主要杂质的安全风险分析

4.1.1 已知杂质 Lhasa Carcinogenicity Database^[13]检索结果显示,杂质 A 对大鼠和小鼠致癌作用为阴性,杂质 B 和杂质 C 对大鼠为阳性;由国际人用药物注册技术要求协调会(ICH M7)^[14]可知,杂质 B 有基因毒性警示结构(芳香醛),为潜在的基因毒性杂质;杂质 C 在体外具有致突变性和遗传毒性,虽然在哺乳动物体内不具有致突变性和遗传毒性,但其对人体的致癌性较高,为 2A 类致癌性物质,每日允许暴露量为 44 μg 。

4.1.2 未知杂质 采用 Nexus 2.6.0 软件,对新发现的 4 个未知杂质毒性进行预测,结果表明 4 个杂质均为 5 类普通杂质,无基因毒性。

4.2 色谱质谱条件的选择

USP 方法使用甲醇-50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸二氢钠水溶液为流动相,该方法中流动相体系与质谱不兼容,且未知杂质不能达到基线分离,因此优化流动相为甲

醇-20 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲酸铵水溶液,各色谱峰峰形较好,分离效果较好。

苯扎氯铵为季铵盐,在溶液状态下易离子化,故离子源选择了电喷雾离子化方法,实验分别对比了正负 2 种模式对苯扎氯铵及其主要杂质的灵敏度,结果显示,正离子模式灵敏度远强于负离子模式,可能是因为流动相为偏酸性的甲酸铵溶液,提供氢离子,故选择正离子模式检测。实验中分别用正负离子 2 种模式测定杂质 A、杂质 B、杂质 C 对照品,均无质谱信号,可能是由于仪器对相对分子质量在 100 左右的离子灵敏度不高,故通过杂质对照品与样品中的杂质峰对应确证已知杂质结构。

4.3 实际样品中杂质检测及评价

为归属 USP 方法中苯扎氯铵的未知杂质,将杂质 D、E、G、H 对照品根据 USP 方法进样测定,色谱图见图 9,杂质 D、E、G、H 的保留时间分别为 19.412、21.378、48.748、49.727 min, A 厂家样品中存在相应保留时间的杂质峰。

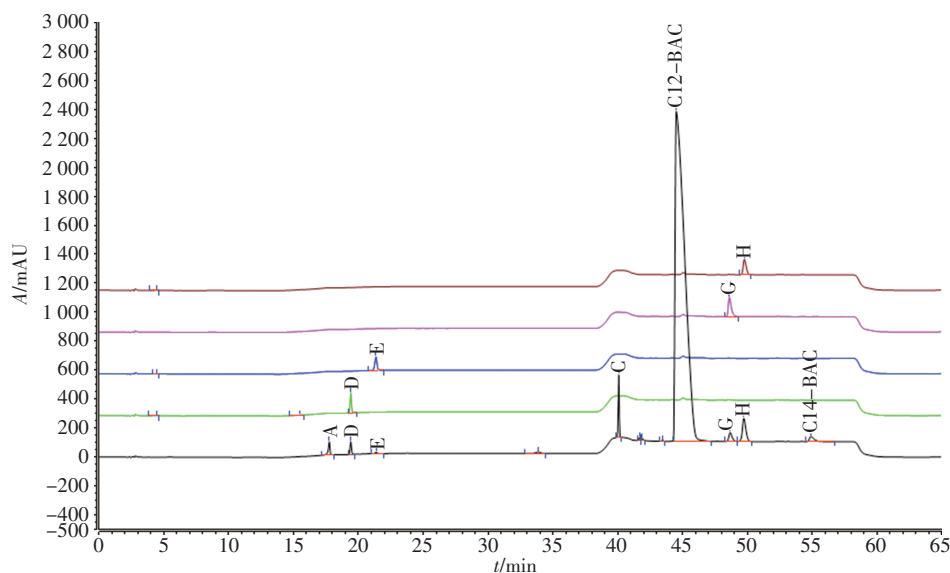
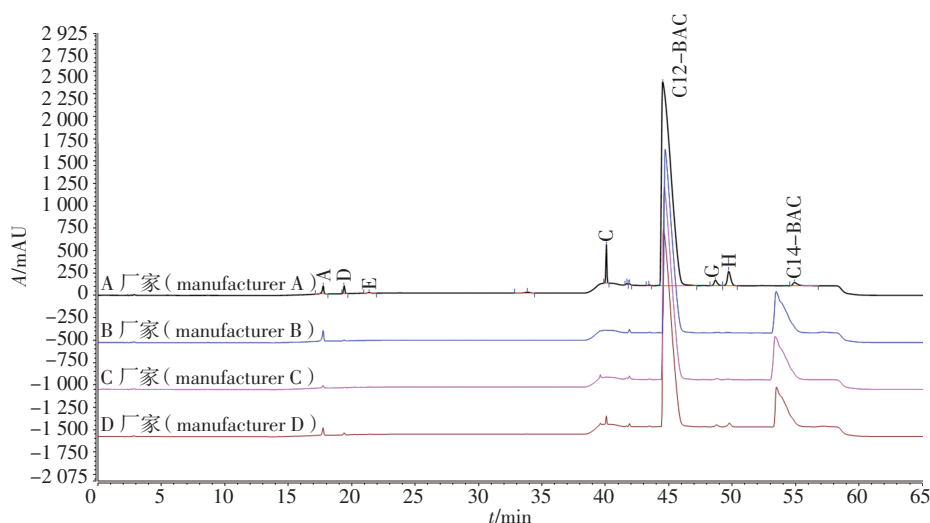


图 9 杂质 D、E、G、H 对照品及 A 厂家苯扎氯铵在 210 nm 下的液相色谱图

Fig. 9 HPLC chromatograms of impurities D, E, G, H reference substances and benzalkonium chloride of manufacturer A at 210 nm

本研究采用 USP 有关物质色谱条件检测了国内 4 个厂家的苯扎氯铵样品,已知杂质 A、B、C 按照 USP 方法计算含量,杂质 D、E、G、H 除空白和已知杂质外按面积归一化法计算含量,由图 10 和表 3 可见各厂家杂质含量存在明显差异。C 厂家样品总杂质

含量最少;A 厂家杂质数量和含量最多,其中杂质 D、E、G、H 含量均超过 0.1%,且有基因毒性和致癌性的杂质 C 含量远远超过 USP 限度(0.05%)。A 厂家对于苯扎氯铵的杂质控制水平较低,生产工艺还需改善。不同杂质校正因子的测定工作还在进行中。



A. 苯甲醇 (benzyl alcohol) C. 氯化苄 ((chloromethyl) benzene) D-H. 未知杂质 D-H (unknown impurities D-H)

图 10 不同厂家苯扎氯铵的液相色谱图 (210 nm)

Fig. 10 HPLC chromatograms of various manufacturers in benzalkonium chloride (210 nm)

表 3 不同厂家苯扎氯铵的 HPLC 检测结果

Tab. 3 HPLC results of benzalkonium chloride from different manufacturers

化合物 (compound)	保留时间 (retention time)/min	含量 (content) /%			
		A 厂家 (manufacturer)	B 厂家 (manufacturer)	C 厂家 (manufacturer)	D 厂家 (manufacturer)
杂质 A (impurity A)	17.755	0.17	0.34	0.12	0.22
杂质 B (impurity B)	20.113	0.09	/	0.08	0.02
杂质 C (impurity C)	40.080	0.59	/	/	0.11
杂质 D (impurity D)	19.412	0.53	0.08	0.05	0.14
杂质 E (impurity E)	21.378	0.10	/	0.03	0.04
杂质 G (impurity G)	48.748	0.87	0.07	0.19	0.31
杂质 H (impurity H)	49.727	2.43	0.12	0.14	0.59
C12-BAC	44.503	93.95	74.60	75.42	78.63
C14-BAC	54.327	0.79	23.51	23.64	19.29

注 (note): “/”: 未检出 (not detected); 杂质 B 于 257 nm 下测定 (impurity B was measured at 257 nm)

研究还发现各厂家烷基组成比例也存在较大差异, A 厂家 C12-BAC 的含量高达 99% 以上, 实际是苯度氯胺, 目前市场上仍存在苯度氯胺和苯扎氯铵混用的情况, 故药典应完善和增加有关物质和烷基组成比例检查项以保证产品的安全有效。

研究表明^[15-16], 季铵盐类化合物被热解时会产生叔胺。未知杂质可能的来源见图 11, 杂质 E 和杂质 G 可能为季铵盐的热解产物, 杂质 D 和杂质 H 可能为 C12-BAC 的霍夫曼降解产物 2 和热解产物杂质 G 分别与氯化苄发生季铵化反应生成的杂质, 相应的降解验证实验还在进行中。叔胺与氯化苄在常

温下极易发生季铵化反应得到季铵盐杂质, 因此在苯扎氯铵合成中应尽量降低工艺温度并严格控制氯化苄杂质含量以合成质量更高的苯扎氯铵产品。

5 结论

本文通过液质联用的方法定性苯扎氯铵药用辅料中 4 个未知杂质的结构, 分别为二苄基二甲基氯化铵、甲基二苄胺、N-甲基-N-十二烷基苄胺和 N,N-二苄基-N-甲基十二烷-1-氯化铵, 本研究还推测了未知杂质的可能来源, 对苯扎氯铵的产品工艺改进及质量控制水平提高具有借鉴意义且为中国药典标准的完善提供参考。

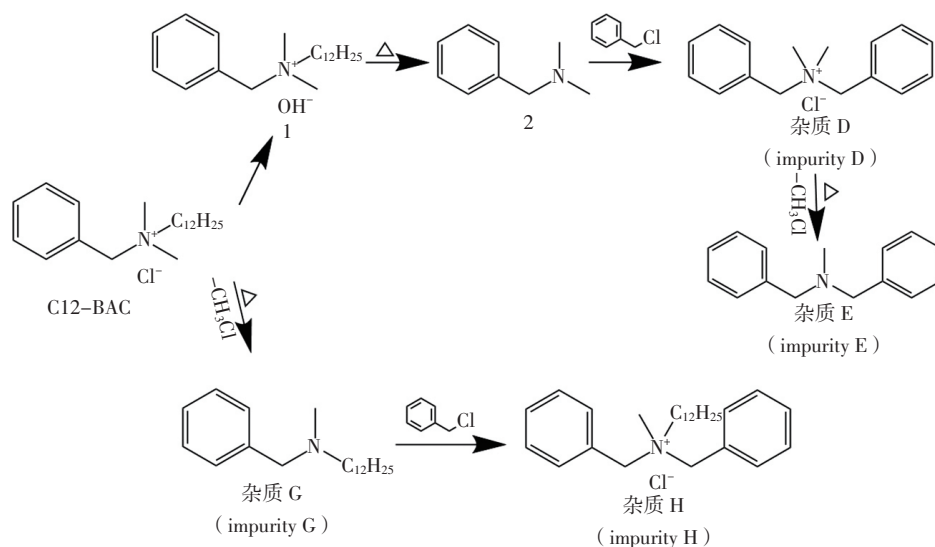


图 11 苯扎氯铵中未知杂质可能的来源

Fig. 11 Possible source of unknown impurities in benzalkonium chloride

参考文献

[1] LENOIR S, PAGNOULLE C, GALLEN M, *et al.* Polyolefin matrixes with permanent antibacterial activity: preparation, antibacterial activity, and action mode of the active species [J]. *Biomacromolecules*, 2006, 7(8): 2291

[2] GILBERT P, MOORE LE. Cationic antiseptics: diversity of action under a common epithet [J]. *J Appl Microbiol*, 2005, 99(4): 703

[3] 洪满珠, 黄莹, 李利, 等. 滴眼剂中防腐剂成分分析及选用 [J]. *眼科学报*, 2019, 34 (2): 90
HONG MZ, HUANG Y, LI L, *et al.* Analysis and selection of preservatives in eye drops [J]. *Eye Sci*, 2019, 34(2): 90

[4] CREEKMORE R, MORETON C, HOUCK M, *et al.* The complexity of setting compendial specifications for excipient composition and impurities [J/OL]. *Pharm Forum*, 2018, 44(3)(2018-05-06) [2024-05-10]. <http://www.usppf.com/pf/pub/in-dex.html>

[5] MORETON C, HOLLOWAY G, SHEEHAN C, *et al.* USP responses to comments on stimuli article: “the complexity of setting compendial specifications for excipient composition and impurities” [J/OL]. *Pharm Forum*, 2020 (2020-09-01) [2024-05-10]. https://online.usppf.com/usppf/document/GUID-7F954FA0-1B24-471E-B5D6-A1F864C2F971_10101_en-US

[6] USP 2023 [S]. 2023: 680

[7] EP 11.1 [S]. 2023: 2058

[8] 中华人民共和国药典 2020 年版. 四部 [S]. 2020: 742
ChP 2020. Vol IV [S]. 2020: 742

[9] 栾爽, 韩春晖, 窦佳, 等. 我国与国外药典中苯扎氯铵的质量控制标准及相关方法比较 [J]. *中国药房*, 2017, 28 (6): 4
LUAN S, HAN CH, DOU J, *et al.* Comparison of standards and related methods of the quality control of benzalkonium chloride in pharmacopoeias of China and foreign [J]. *China Pharm*, 2017, 28(6): 4

[10] 彭琳, 刘雁鸣, 龙海燕, 等. 国内外苯扎氯铵的有关物质比较 [J]. *中国药师*, 2016, 19 (10): 1996
PENG L, LIU YM, LONG HY, *et al.* Comparison of the related substances in benzalkonium chloride at home and abroad [J]. *China Pharm*, 2016, 19(10): 1996

[11] 张卉. 药用辅料对药品安全性的影响 [J]. *生物化工*, 2017, 3 (6): 118
ZHANG H. Effects of pharmaceutical excipients on drug safety [J]. *Biol Chem Eng*, 2017, 3(6): 118

[12] 杨锐, 孙会敏, 于丽娜, 等. 药用辅料对药品安全性的影响 [J]. *药物分析杂志*, 2012, 32 (7): 1309
YANG R, SUN HM, YU LN, *et al.* The impact of pharmaceutical excipients on the drug safety [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2012, 32(7): 1309

[13] Lhasa Carcinogenicity Database (LCDB) [DB/OL]. [2024-05-10]. <https://carcdb.lhasalimited.org/>

[14] ICH M7. Assessment and Control of DNA Reactive (Mutagenic) Impurities in Pharmaceuticals to Limit Potential Carcinogenic Risk [EB/OL]. (2017-03-31) [2024-05-10]. https://database.ich.org/sites/default/files/ICH_M7%28R2%29_Gu-ideline-Step4_2023_0216_0.pdf

[15] LAYCOCK HH, MULLEY BA. Determination of the homologue composition of some alkyltrimethyl quaternary ammonium antibacterial agents by gas chromatography [J]. *J Pharm Pharmacol*, 1966, 18(1S): 9S

[16] CYBULSKI ZR. Determination of benzalkonium chloride by gas chromatography [J]. *J Pharm Sci*, 1984, 73(12): 1700

(本文于 2024 年 4 月 14 日收到)