研究论文

咪达唑仑原料药及其注射液中有关物质的发现和合成

陈道鹏[1,2]，金　鑫[1,2]，高梓真[1,2]，杨相平[1,2]，许向阳[1,2]*

（1. 江苏恩华药业股份有限公司，江苏徐州 221116；2. 江苏省中枢神经药物研究重点实验室，江苏徐州 221116）

摘要：采用 HPLC 法检测出咪达唑仑原料药中的有关物质Ⅰ，且它在注射液中会逐渐转化为有关物质Ⅱ。根据 LC/MS 所测定的相对分子质量，推测有关物质Ⅰ为 8- 氯 -4- 乙氧基 -6-（2- 氟苯基）-1- 甲基 -4*H*- 咪唑并［1,5-*a*］［1,4］苯并二氮䓬，有关物质Ⅱ为 1-［4- 氯 -2-（2- 氟苯甲酰基）苯基］-2- 甲基 -1*H*- 咪唑 -5- 甲醛，该发现为首次报道。以咪达唑仑为原料定向合成了这 2 个化合物，其结构均经过高分辨质谱、红外吸收光谱和核磁共振光谱确证。通过 HPLC 定位确认所制备的化合物即为咪达唑仑原料药和注射液中的有关物质Ⅰ和有关物质Ⅱ。

关键词：咪达唑仑；有关物质；合成；结构确证

中图分类号：TQ460.6　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255（2023）04-0528-05

DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2023.04.007

Discovery and Synthesis of the Related Substances of Midazolam in the Bulk Drug and Its Injection

CHEN Daopeng[1,2], JIN Xin[1,2], GAO Zizhen[1,2], YANG Xiangping[1,2], XU Xiangyang[1,2]*

（*1. Jiangsu Nhwa Pharma. Corp., Xuzhou 221116;*
2. Jiangsu Key Lab. of Central Nervous System Drug Research and Development, Xuzhou 221116）

ABSTRACT: The related substance Ⅰ was detected by HPLC in midazolam, and it was found that the related substance Ⅰ gradually transformed into the related substance Ⅱ in the injection. According to the relative molecular weight determined by LC/MS, it was speculated that the related substance Ⅰ should be 8-chloro-4-ethoxy-6-(2-fluorophenyl)-1-methyl-4*H*-imidazo[1,5-*a*][1,4]benzodiazepine, and the related substance Ⅱ should be 1-[4-chloro-2-(2-fluorobenzoyl)phenyl]-2-methyl-1*H*-imidazole-5-carbaldehyde. This discovery was reported unprecedentedly. These two compounds were synthesized with midazolam as the starting material. Their structures had been confirmed by ESI-HRMS, IR and NMR. The prepared compounds were in consistence with the related substances Ⅰ and Ⅱ in the midazolam bulk drug and its injection by HPLC.

Key Words: midazolam; related substance; synthesis; structural confirmation

咪达唑仑（midazolam，**1**），化学名为 1- 甲基 -8- 氯 -6-（2- 氟苯基）-4*H*- 咪唑并［1,5-*a*］［1,4］苯并二氮䓬，其注射液于 1982 年首次在瑞士获准上市，目前上市规格有 5 mL ∶ 5 mg、1 mL ∶ 5 mg、2 mL ∶ 10 mg、3 mL ∶ 15 mg 和 10 mL ∶ 50 mg。本品是一种短效的苯并二氮䓬类中枢神经系统抑制药，具有催眠、抗焦虑和镇静作用，起效快、作用时间短[1—2]。

文献[3—9]已报道多条 **1** 的合成路线，其中图 1 所示的路线反应条件温和，试剂较为廉价，也是目

收稿日期：2022-10-13

基金项目：江苏省中枢神经药物研究重点实验室资助项目（BM2019004）

作者简介：陈道鹏（1979—），男，硕士，高级工程师，从事药物工艺的研究与开发。

通信作者：许向阳（1971—），男，博士，研究员，从事中枢神经系统药物的研究。

E-mail：xuxiangyang@nhwa-group.com

前的工业化路线[3]。

1 原料药中除了《欧洲药典》和《美国药典》规定的有关物质（A、B、C、D、E、F、G、H、I、J）外，本实验室采用 HPLC 法检测出 1 个未知有关物质Ⅰ，且有关物质Ⅰ在 **1** 注射液中会逐渐转化为未知的有关物质Ⅱ。

根据人用药品技术要求国际协调理事会（ICH）要求，为了保证用药安全，药物活性成分中的每一个有关物质都必须进行安全性评估，以建立合理的有关物质限度。因此，需要对未知有关物质Ⅰ和Ⅱ进行结构确认，并制定合理的有关物质限度，同时为合成工艺过程控制、原料药贮存、制剂工艺控制和药品贮存提供参考。

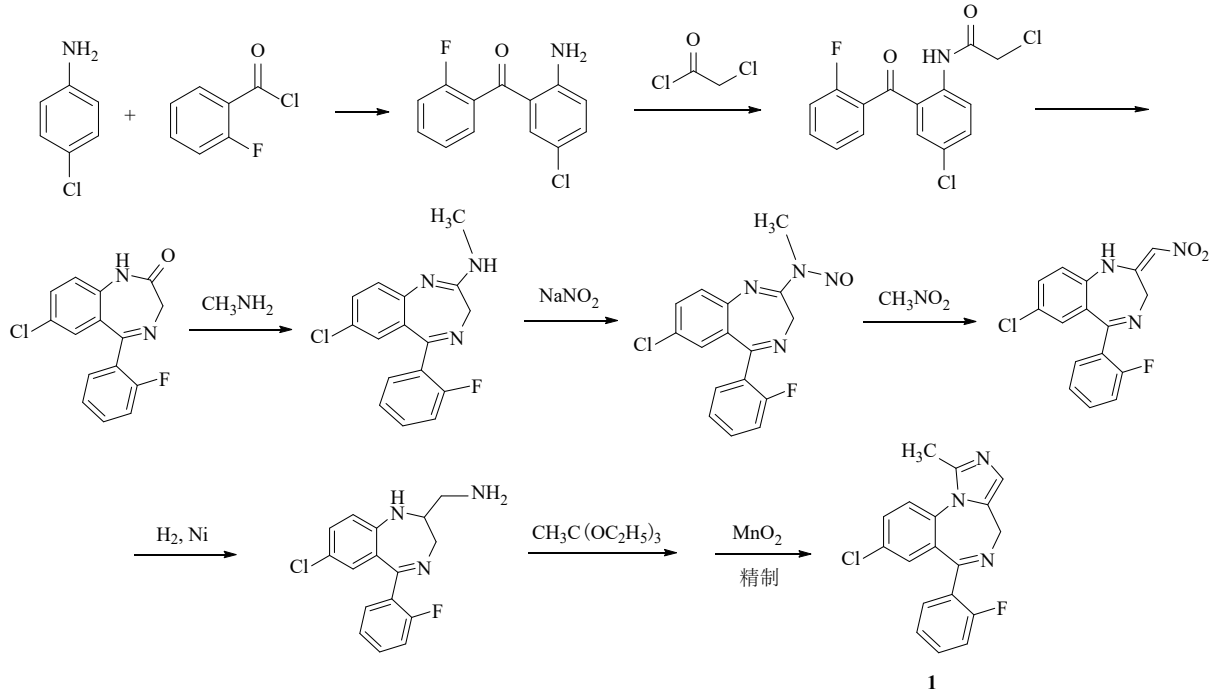
经 Agilent 6530 Q-TOF 型 LC/MS 联用仪测得有关物质Ⅰ的相对分子质量为 369.104 4，(+)-ESI-TOF MS/MS 图谱中可观察到 370.111 4[M+H]$^+$的主要碎片离子峰（*m*/*z*）分别为 234.047 0、109.039 2。有关物质Ⅱ相对分子质量为 342.057 1，(+)-ESI-TOF MS/MS 图谱中观察到 343.064 1[M+H]$^+$的主要碎片离子峰（*m*/*z*）分别为 315.068 3、297.058 3、274.042 4、123.022 3、95.029 0。根据 **1** 的合成工艺，推断有关物质Ⅰ［8-氯-4-乙氧基-6-(2-氟苯基)-1-甲基-4*H*-咪唑并［1,5-*a*］[1,4］苯并二氮䓬］和有关物质Ⅱ［1-［4-氯-2-(2-氟苯甲酰基）苯基］-2-甲基-1*H*-咪唑-5-甲醛］的结构及其转化过程，结果如图 2 所示。

基于此，本实验室对推测的有关物质进行了定向合成（图 3），并通过高分辨质谱、红外吸收光谱和核磁共振光谱确证其结构。通过 HPLC 定位确认所制备的化合物即为 **1** 原料药及其注射液中的有关物质Ⅰ和有关物质Ⅱ。本制备方法已申请专利并获得授权[10]。

实验部分

咪达唑仑氮氧化物（**2**）

将 **1**（自制，65.00 g，0.20 mol）与二氯甲烷（1.2 L）加至反应瓶中，搅拌溶解，用冰浴控温于 10 ℃以下，分批加入间氯过氧苯甲酸（103.80 g，0.60 mol），室温反应 40 h。向反应液中加入 1 mol/L 盐酸（1 L），分液，有机相用 1 mol/L 盐酸（1 L×2）萃取，合并水相，加入二氯甲烷（1 L），搅拌下加



1

图 1　1 的合成路线

Fig.1　Synthetic Route of **1**

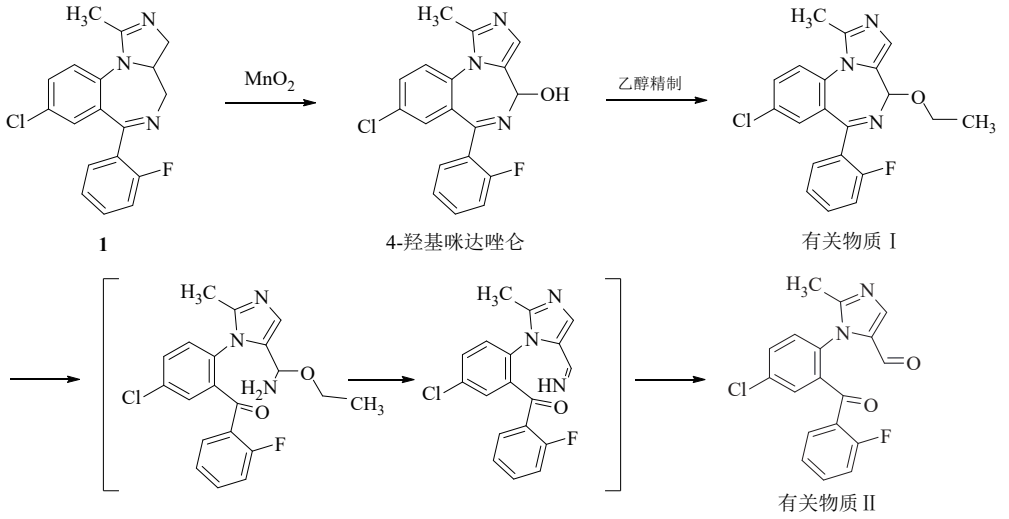


图 2　有关物质Ⅰ和Ⅱ的生成路径

Fig.2　Generation Path of the Related Substances Ⅰ and Ⅱ

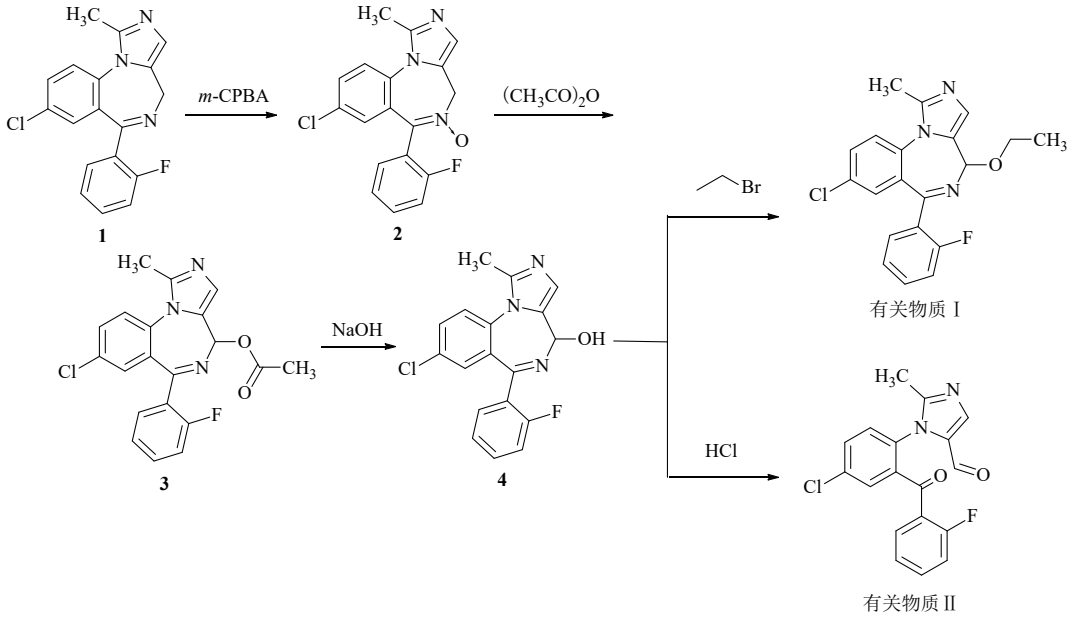


图 3　有关物质Ⅰ和Ⅱ的结构及合成路线

Fig.3　Structures and Synthetic Routes of the Related Substances Ⅰ and Ⅱ

氨水调至 pH 9 ～ 10，分液，水相再用二氯甲烷（1 L×2）萃取，合并二氯甲烷相，用水（1 L）洗涤，有机相用无水硫酸镁干燥，抽滤，滤液减压蒸除溶剂，剩余土黄色固体中加入乙酸乙酯（500 mL），加热回流打浆 2 h，移去热源，室温搅拌 4 h，抽滤，滤饼于（50±5）℃减压干燥 18 h，得淡黄色固体 **2**（13.06 g，19.15％），mp 245.4 ～ 246.5 ℃（文献[3]：245 ～ 246 ℃）。

4- 乙酰氧基咪达唑仑（3）

将 **2**（12.76 g，0.037 mol）和乙酸酐（320 mL）

加至反应瓶中，搅拌下加热至（100±5）℃反应 24 h，TLC 跟踪反应［展开剂：二氯甲烷和甲醇（体积比 10 ∶ 1）的混合溶液，下同］。将反应液减压蒸除溶剂，向残留物中加入二甲苯（100 mL），再减压蒸除溶剂，加入二氯甲烷（200 mL）搅拌，加硅胶（50.00 g）后搅拌均匀，减压蒸除溶剂备用。用 75 ～ 150 μm（100 ～ 200 目）硅胶（250.00 g）和乙酸乙酯湿法装柱，如上所得产物干法上样［洗脱剂：先用二氯甲烷 2 L，再用二氯甲烷和乙酸乙酯（体积比 10 ∶ 1）的混合溶液 8 L］，减压蒸除溶剂，得类白色固体 **3**（7.48 g，52.20%），mp 201.7 ～ 202.6 ℃（文献[3]：201 ～ 202 ℃）。ESI-HRMS（*m*/*z*）：384.094 1［M+H]$^+$。

4- 羟基咪达唑仑（4）

将 **3**（7.23 g，0.019 mol）和甲醇（400 mL）加至反应瓶中，搅拌溶解，冰浴下于 0 ～ 10 ℃缓慢滴加含氢氧化钠（3.01 g）的甲醇（80 mL）溶液，加毕继续保温反应 1 h，TLC 监测至反应完全。将反应液减压蒸除溶剂，剩余物中加入二氯甲烷（250 mL）和水（250 mL），搅拌，分液，水相用二氯甲烷（200 mL×2）萃取。有机相合并后用水（200 mL）洗涤，经无水硫酸镁干燥，抽滤，滤液减压蒸除溶剂，得类白色固体 **4**（4.91 g，76.24%），mp 184.5 ～ 185.6 ℃（文献[3]：185 ～ 186 ℃）。ESI-HRMS（*m*/*z*）：342.080 5［M+H]$^+$。

8- 氯 -4- 乙氧基 -6-（2- 氟苯基）-1- 甲基 -4*H*- 咪唑并［1,5-*a*］［1,4］苯并二氮䓬（有关物质Ⅰ）

将 **4**（2.40 g，0.007 mol）和二噁烷（280 mL）加至反应瓶中，搅拌至全溶，加入氢氧化钾（2.11 g，0.038 mol），搅拌下用冰水浴降温至 11 ℃，滴加含溴乙烷（3.83 g，0.035 mol）的二噁烷（20 mL）溶液，滴毕于（25±5）℃反应 24 h，TLC 跟踪反应。

将反应液减压浓缩，向残留物中加入水（150 mL）和二氯甲烷（100 mL），搅拌，分液，水相用二氯甲烷（100 mL×2）萃取。有机相合并后用水（100 mL）洗涤，经无水硫酸镁干燥，抽滤，滤液减压蒸除溶剂，剩余油状物（1.82 g）待用。用 75 ～ 150 μm（100 ～ 200 目）硅胶（55.00 g）和乙酸乙酯湿法装柱，如上所得油状物干法上样［洗脱剂：先用二氯甲烷 2 L，再用二氯甲烷和乙酸乙酯（体积比 10 ∶ 1）的混合溶液 4 L］。减压蒸除溶剂，剩余物用甲基叔丁醚（20 mL）室温打浆 3 h，抽滤，滤饼于（40±5）℃减压干燥 2 h，得白色固体有关物质Ⅰ（1.12 g，43.08%），纯度 99.4%［HPLC 归一化法：色谱柱 Angilent Eclipse XDB C_8 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相 A 为乙酸盐缓冲液（取乙酸铵 7.7 g，加水溶解并稀释至 1 L，用冰乙酸调至 pH 5.2）和甲醇（体积比 50 ∶ 50）的混合溶液，B 为乙酸盐缓冲液和甲醇（体积比 35 ∶ 65）的混合溶液，线性梯度洗脱（0—20 min，A 100%；20—55 min，A 0；55—65 min，A 100%）；流速 1.2 mL/min；柱温 35 ℃；检测波长 254 nm；进样量 15 μL。与 **1** 的相对保留时间为 1.48］。^{1}H NMR（400 MHz, $CDCl_3$）δ: 7.66 ～ 7.70（m, 1H）, 7.57（d, *J*=8.8 Hz, 1H）, 7.42 ～ 7.47（m, 1H）, 7.40（d, *J*=8.4 Hz, 1H）, 7.28 ～ 7.29（m, 1H）, 7.21 ～ 7.25（m, 1H）, 7.06（s, 1H）, 7.00 ～ 7.05（m, 1H）, 5.32（s, 1H）, 4.12 ～ 4.06（m, 1H）, 3.65 ～ 3.72（m, 1H）, 2.55（s, 3H）, 1.37 ～ 1.41（t, 3H）；^{13}C NMR（100 MHz, $CDCl_3$）δ: 161.74, 159.06, 143.79, 135.80, 133.51, 132.74, 132.49, 131.86, 131.27, 131.24, 129.27, 126.82, 125.64, 124.40, 122.86, 116.38, 86.09, 64.29, 15.14, 14.80；ESI-HRMS（*m*/*z*）：370.111 4［M+H]$^+$；IR（KBr）υ/（cm^{-1}）：3 055（=C-H）, 2 972, 2 932, 2 873（—CH）, 1 580, 1 486（Ar-C=C）。

1-［4- 氯 -2-（2- 氟苯甲酰基）苯基］-2- 甲基 -1*H*- 咪唑 -5- 甲醛（有关物质Ⅱ）

将 **4**（2.40 g，0.007 mol）和无水乙醇（50 mL）加至反应瓶中，搅拌下滴加 2 mol/L 盐酸（24 mL），滴毕于室温反应 2.5 h。向反应液中加入水（250 mL），减压蒸除约一半体积的溶剂，加入二氯甲烷（150 mL），搅拌下滴加氨水调至 pH 9 ～ 10，分液，水相用二氯甲烷（150 mL×2）萃取，二氯甲烷相合并后依次用水（100 mL）和饱和氯化钠溶液（100 mL）洗涤，经无水硫酸镁干燥，抽滤，滤液减压蒸除溶剂，剩余淡黄色油状物中加入甲基叔丁醚（12 mL），搅拌 2 h，抽滤，滤饼于（40±5）℃减压干燥 14 h，得

类白色固体有关物质Ⅱ（2.21 g，91.70%），纯度99.5%（HPLC归一化法，色谱条件同有关物质Ⅰ，与**1**的相对保留时间为0.59）。^{1}H NMR（400 MHz, $CDCl_3$）δ: 9.46（s, 1H）, 7.64 ～ 7.67（m, 1H）, 7.62 ～ 7.63（m, 2H）, 7.50 ～ 7.54（m, 1H）, 7.45 ～ 7.49（m, 1H）, 7.28（d, *J*=7.6 Hz, 1H）, 7.16 ～ 7.19（m, 1H）, 7.06 ～ 7.10（m, 1H）, 2.27（s, 3H）；^{13}C NMR（100 MHz, $CDCl_3$）δ: 190.18, 177.59, 162.01, 153.42, 142.29, 138.20, 135.74, 134.98, 133.06, 133.04, 132.54, 131.56, 130.48, 130.09, 125.22, 124.35, 116.73, 13.54；ESI-HRMS（*m*/*z*）: 343.064 1［M+H］$^{+}$；IR（KBr）υ/（cm^{-1}）: 3 055（=C-H）, 1 663（C=O）, 1 611（C=N）, 1 594, 1 484（Ar-C=C）。

参考文献：

［1］ 赵艳敏, 王志敏, 郑爱萍. 苯二氮䓬类药物药剂学研究新进展[J]. 中国新药杂志, 2012, **21**(23): 2771-2775.

［2］ 黄春苹. 咪达唑仑的临床应用现状[J]. 山西医药杂志, 2009, **38**(12): 1091-1093.

［3］ BENJAMIN L, FLYNN T. Quinazolines and 1,4-benzodiazepines. 84. Synthesis and reactions of imidazo[1,5-*a*][1,4]benzodiazepines [J]. *J Org Chem*, 1978, **43**(5): 936-944.

［4］ WALSER A, FRYER R I. Quinazolines and 1,4-benzodiazepines. XCIII. Synthesis of imidazo[1,5-*a*][1,4]-benzodiazepines from nitrooximes [J]. *J Heterocycl Chem*, 1983, **20**(3): 551-558.

［5］ POZO C, MACIAS A, ALONSO E, *et al*. Reactions of benzodiazepinic *N*-nitrosoamidines with tosylmethyl isocyanide: synthesis of midazolam [J]. *Synthesis*, 2004, (16): 2697-2703.

［6］ WALSER A, FRYER R I. Imidazodiazepines and processes therefor: US, 4401597 [P]. 1983-08-30.

［7］ HUBER J E. Process to produce midazolam: US, 5831089 [P]. 1998-11-03.

［8］ KHANNA J M, KUMAR N, KHANDURI C, *et al*. Process for the manufacture of 8-chloro-6-(2-fluorophenyl)-1-methyl-4*H*-imidazo[1,5-*a*][1,4]benzodiazepine(midazolam): US, 5792874 [P]. 1998-08-11.

［9］ FIELD G F, ZAILY W J. 2-[[2-Methyl-1-[2-benzoyl(or benzyl)-phenyl]-1*H*-imidazol-5-yl]methyl]-1*H*-isoindole-1,3(2*H*)-diones: US, 4194049 [P]. 1980-03-18.

［10］ 陈道鹏, 李　超, 庄　涛, 等. 咪达唑仑或其药物组合物的有关物质 A 和有关物质 B 及其用途: 中国, 111410658 [P]. 2020-03-30.