

马来酸噻吗洛尔滴眼液中有关物质的测定及杂质定性研究^Δ

刘荷英*,程奇珍#,周敏,易巧(江西省药品检验检测研究院/江西省药品与医疗器械质量工程技术研究中心,南昌 330029)

中图分类号 R927.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2018)16-2208-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2018.16.11

摘要 目的:建立测定马来酸噻吗洛尔滴眼液中有关物质的方法,并对其杂质进行定性。方法:采用高效液相色谱法测定有关物质的含量,色谱柱为 ACES C₁₈,流动相为甲醇与 4.32 g/L 辛烷磺酸钠溶液(冰醋酸调 pH 至 3.0)的混合溶液(50:50, V/V)-甲醇(梯度洗脱),流速为 1.0 mL/min,检测波长为 295 nm,柱温为 30 ℃,进样量为 20 μL。采用制备液相色谱法制备杂质纯品,色谱柱为 YMC-PACK ODS-A,流动相为甲醇-0.01% 三氟乙酸(40:60, V/V)和甲醇-0.01% 三氟乙酸(20:80, V/V),流速为 8 mL/min,检测波长为 295 nm,柱温为 20 ℃,进样量为 0.8 mL。采用液相色谱串联质谱法进行结构推测,色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈,流动相为甲醇-5 mmol/L 甲酸铵溶液(含 0.05% 甲酸)(梯度洗脱),流速为 0.2 mL/min,柱温为 20 ℃,进样量为 2 μL;采用电喷雾离子源,以质谱全扫描模式检测母离子,以子离子扫描模式检测碎片离子。采用氢谱、碳谱进行结构确证和推测。结果:马来酸噻吗洛尔检测质量浓度线性范围为 0.501~10.02 μg/mL($r=0.9999$);定量限为 3.012 ng,检出限为 1.004 ng;精密度试验的 RSD 为 0.2%,稳定性和重复性试验的 RSD 均小于 5%。确证了杂质 I、II、III 的结构,并推测了杂质 IV 和 V 的结构。结论:该方法快速、准确、专属性好,可用于马来酸噻吗洛尔滴眼液的质量控制。

关键词 马来酸噻吗洛尔;有关物质;降解杂质;高效液相色谱法;制备液相色谱;液相色谱串联质谱法;氢谱;碳谱;测定;结构推测

Determination of Related Substance and Impurities Qualitative Study of Timolol Maleate Eye Drops

LIU Heying, CHENG Qizhen, ZHOU Min, YI Qiao (Jiangxi Institute for Drug Control/Jiangxi Provincial Engineering Research Center for Drug and Medical Device Quality, Nanchang 330029, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the determination of related substances in Timolol maleate eye drops, and to conduct qualitative analysis of its degradation impurities. METHODS: HPLC method was adopted for determination of related substance. The determination was performed on ACES C₁₈ column with mobile phase consisted of the mixed solution of methanol and 4.32 g/L sodium octane sulfonate (pH adjusted to 3.0 with glacial acetic acid) (50:50, V/V)-methanol (gradient elution) at flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength was set at 295 nm, and column temperature was 30 ℃. The sample size was 20 μL. Preparative LC method was used to prepare pure impurities. The determination was performed on YMC-PACK ODS-A column with mobile phase consisted of methanol-0.01% trifluoroacetic acid (40:60, V/V) and methanol-0.01% trifluoroacetic acid (20:80, V/V) at flow rate of 8 mL/min. The detection wavelength was set at 295 nm, and column temperature was 20 ℃. The sample size was 0.8 mL. LC-MS/MS method was adopted. The determination was performed on Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ column with mobile phase consisted of methanol-5 mmol/L ammonium formate (0.05% formic acid) (gradient elution) at flow rate of 0.2 mL/min. The column temperature was 20 ℃. The sample size was 2 μL. The electrospray ionization source was conducted, detecting parent ion by MS full scan and fragment ion by daughter ion scan. The structure was confirmed and speculated by ¹H-NMR and ¹³C-NMR. RESULTS: The linear range of timolol maleate was 0.501-10.02 μg/mL ($r=0.9999$). The limit of quantitation was 3.012 ng, and the limit of detection was 1.004 ng. RSD of precision test was 0.2%. RSDs of stability and reproducibility tests were all lower than 5%. The structures of impurity I, II and III were confirmed, and those of impurity IV and V were speculated. CONCLUSIONS: The method is rapid, accurate and specific. It can be used for the determination of related substance in Timolol maleate eye drops.

KEYWORDS Timolol maleate; Related substance; Degradation impurity; HPLC; Preparative LC; LC-MS/MS; ¹H-NMR; ¹³C-NMR; Determination; Structure speculation

[20] 刘月新,党玉洁,邹茜. 四物汤传统汤剂中微量元素含量测定[J]. 亚太传统医药,2016,12(24):27-29.

Δ 基金项目:国家药品评价抽验计划质量评价分析项目;江西省食品药品监督管理局科技计划项目(No.2015yp11)

* 主管药师,硕士研究生。研究方向:药物分析。电话:0791-88158656。E-mail:276553071@qq.com

通信作者:主任药师。研究方向:药物分析。电话:0791-88158656。E-mail:cqz1110@sina.com

[21] 刘雨田,郭中文. 微量元素硼的营养研究进展[J]. 郑州牧业工程高等专科学校学报,2000,20(4):265-266.

[22] 谢伟,徐国茂,叶琴. 微量元素硼与人体健康[J]. 微量元素与健康研究,2010,27(1):65-66.

[23] 曾琦斐. 微量元素与人体健康[J]. 中国科技信息,2008. DOI:10.3969/j.issn.1001-8972.2008.03.101.

(收稿日期:2018-03-06 修回日期:2018-06-14)

(编辑:陈宏)

马来酸噻吗洛尔滴眼液是治疗原发性开角型青光眼及无晶状体眼性青光眼的药物。该滴眼液及其原料药的现行标准均收载于2015年版《中国药典》(二部)^[1],滴眼液标准中无有关物质检查项,原料药标准中采用薄层色谱法控制有关物质,而该方法灵敏度和专属性均较差。2017年版《英国药典》^[2]中马来酸噻吗洛尔滴眼液及其原料药标准均设置了有关物质检查项,以高效液相色谱法(HPLC)测定杂质B、C、D、E、F和其他杂质,并收载了杂质A、B、C、D、E、F、G、H、I、J的结构。《美国药典》(40版)^[3]中仅对马来酸噻吗洛尔原料药标准设置了有关物质检查项,也以HPLC法测定杂质B、C、D、E、F和其他杂质,但色谱条件与2017年版《英国药典》^[2]不同。《日本药典》(17版)^[4]中仅收载了马来酸噻吗洛尔原料药标准,该标准采用HPLC法,以主成分自身对照法计算单个杂质和总杂质的含量。《欧洲药典》(9.0版)^[5]中仅收载了马来酸噻吗洛尔原料药标准,其有关物质测定方法与2017年版《英国药典》^[2]完全一致。目前,国内外有关文献^[6-10]报道的马来酸噻吗洛尔滴眼液或原料药中有关物质的测定方法均为HPLC法。有研究将系统适用性试验中通过碱破坏后的样品与《欧洲药典》(9.0版)^[5]对比以确定杂质B、D、G^[6];另有研究采用HPLC法测定了马来酸噻吗洛尔滴眼液中主成分和3个可能的降解杂质(其结构与杂质B、D、G结构一致)^[10]。此外,未见其他有关马来酸噻吗洛尔降解杂质的报道。有研究认为,马来酸噻吗洛尔进入人体后,噻吗洛尔吗啉环上的碳原子首先被羟化,而后进一步代谢为噻吗洛尔乙醇胺^[11]。目前,国内企业生产的马来酸噻吗洛尔滴眼液中添加的抑菌剂有4种,分别为羟苯乙酯、苯扎溴铵、硫柳汞和醋酸苯汞^[12],有关物质测定时需排除抑菌剂的色谱峰干扰。本课题组参考2017年版《英国药典》^[2]马来酸噻吗洛尔原料药标准中有关物质测定的色谱条件,建立了马来酸噻吗洛尔滴眼液中有关物质的测定方法,同时通过强制降解试验考察了马来酸噻吗洛尔滴眼液中的主要降解杂质,并以液相色谱串联质谱法(LC-MS/MS)、氢谱(¹H-NMR)、碳谱(¹³C-NMR)对杂质的结构进行了确证或推测,旨在为其质量控制提供参考。

1 材料

1.1 仪器

U3000型HPLC仪,包括U3000四元泵、U3000柱温箱、U3000二极管阵列检测器(DAD)等(美国戴安公司);LC-6AD型LC仪,包括LC-6AD二元泵、SIL-20A自动进样器、CTO-20A柱温箱、SPD-M20A DAD、FRC-10A馏分收集器(日本岛津公司);Xevo TQ-S型液相色谱-串联三重四级杆质谱仪,包括Acquity UPLC自

动进样器、Acquity UPLC四元泵、Acquity UPLC柱温箱、Acquity UPLC DAD(美国沃特世公司);Bruker 600 MHz核磁共振谱仪(德国布鲁克公司);MS105型电子分析天平(瑞士梅特勒-托利多公司)。

1.2 药品与试剂

马来酸噻吗洛尔滴眼液[武汉五景药业有限公司,批号:16050101、16040105、16040106,规格:5 mL:25 mg(按噻吗洛尔计)];马来酸噻吗洛尔原料药(武汉五景药业有限公司,批号:150207,纯度:>99%);噻吗洛尔系统适用性对照品(《欧洲药典》(9.0版),欧洲药品质量管理局,ID:001E12,规格:5 mg/支,含马来酸噻吗洛尔和杂质B、C、D、F的混合物);辛烷磺酸钠(离子对色谱用试剂,北京百灵威科技有限公司);甲醇、甲酸、三氟乙酸、甲酸铵均为色谱纯,冰醋酸等其他试剂均为分析纯,水为纯化水。

2 方法与结果

2.1 有关物质测定的HPLC色谱条件

色谱柱:ACES C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇与4.32 g/L辛烷磺酸钠溶液(冰醋酸调pH至3.0)的混合溶液(50:50, V/V)(A)-甲醇(B),梯度洗脱(0~14 min, 97.5% A; 14~15.5 min, 97.5% A→70% A; 15.5~25 min, 70% A; 25~25.5 min, 70% A→97.5% A; 25.5~32 min, 97.5% A);流速:1.0 mL/min;检测波长:295 nm;柱温:30 °C;进样量:20 μL。

2.2 制备杂质纯品的LC色谱条件

色谱柱:YMC-PACK ODS-A(250 mm×20 mm, 5 μm);流动相:甲醇-0.01%三氟乙酸溶液(40:60, V/V)(流动相①)和甲醇-0.01%三氟乙酸溶液(20:80, V/V)(流动相②);流速:8 mL/min;检测波长:295 nm;柱温:20 °C;进样量:0.8 mL。

2.3 杂质结构推测的LC-MS/MS条件

2.3.1 色谱条件 色谱柱:Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈(50 mm×2.1 mm, 1.7 μm);流动相:甲醇(A)-5 mmol/L甲酸铵溶液(含0.05%甲酸)(B),梯度洗脱(0~5 min, 20% A→35% A; 5~8 min, 35% A→60% A; 8~8.1 min, 60% A→20% A; 8.1~11 min, 20% A);流速:0.2 mL/min;柱温:20 °C;进样量:2 μL。

2.3.2 质谱条件 离子源:电喷雾离子源(ESI)/大气压化学离子源(APCI),正离子化(ESI⁺);去溶剂温度:400 °C;干燥气流量:8 L/h;毛细管电压:1.5 kV;锥孔电压:40 V;母离子扫描模式:质谱全扫描模式检测母离子,扫描范围:m/z 100~1 000;碰撞能量:30 V;子离子扫描模式:子离子扫描模式检测碎片离子,扫描范围根据母离子质荷比而定。

2.4 溶液的制备

2.4.1 供试品溶液 精密量取马来酸噻吗洛尔滴眼液样品适量,加水稀释制成每1 mL中含马来酸噻吗洛尔2.5 mg的溶液,经0.45 μm微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

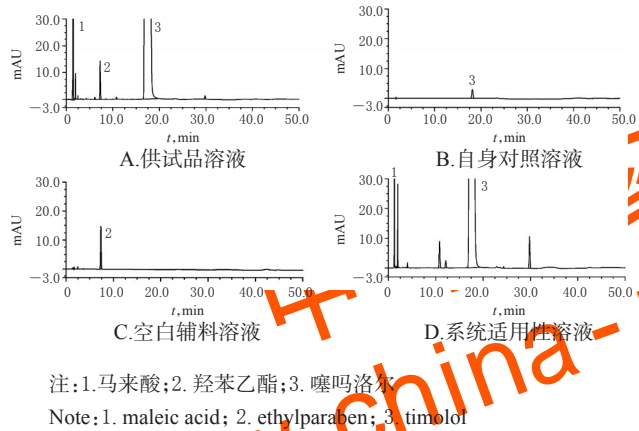
2.4.2 自身对照溶液 精密量取供试品溶液1 mL,置于100 mL量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,精密量取5 mL,置于50 mL量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,即得。

2.4.3 空白辅料溶液 按马来酸噻吗洛尔滴眼的制备工艺制备不含马来酸噻吗洛尔的阴性样品,取适量按“2.4.1”项下方法制备空白辅料溶液。

2.4.4 系统适用性溶液 取噻吗洛尔系统适用性对照品1支,精密加入“2.1”项下流动相(A)2 mL溶解,摇匀,即得。

2.5 系统适用性试验

分别量取“2.4”项下供试品溶液、自身对照溶液、空白辅料溶液、系统适用性溶液各20 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,详见图1。由图1可知,杂质峰之间、主成分与杂质峰之间均能达到基线分离,分离度均大于1.5,空白辅料对测定无干扰。



注:1.马来酸;2.羟苯乙酯;3.噻吗洛尔
Note:1. maleic acid; 2. ethylparaben; 3. timolol

图1 系统适用性试验高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms of system suitability tests

2.6 强制降解试验

2.6.1 碱破坏 精密量取马来酸噻吗洛尔滴眼液样品和阴性样品各5 mL,分别置于10 mL量瓶中,加2 mol/L氢氧化钠溶液2 mL,置于100 °C水浴上加热1 h,放冷后加2 mol/L盐酸溶液2 mL中和,加水稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液20 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,详见图2A、图2B。

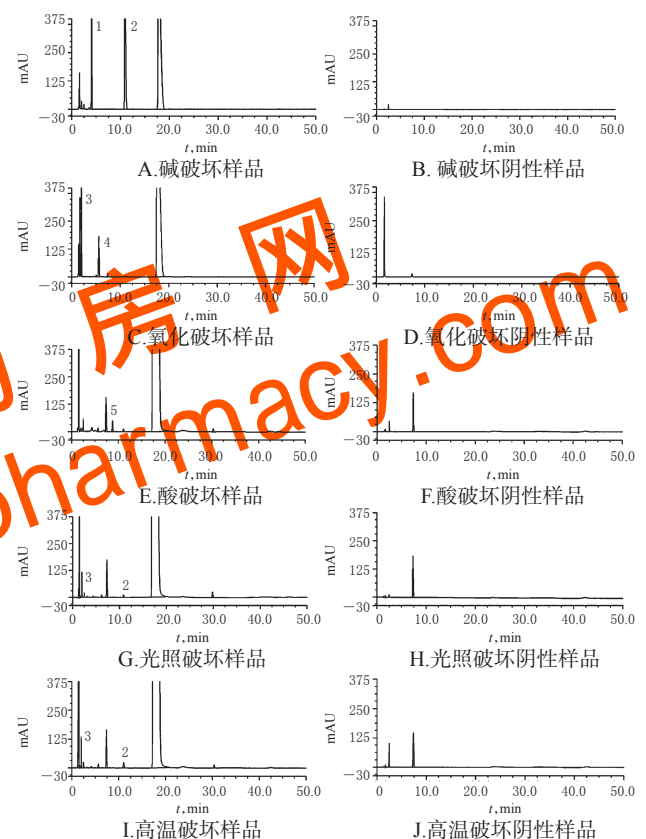
2.6.2 氧化破坏 精密量取马来酸噻吗洛尔滴眼液样品和阴性样品各5 mL,分别置于10 mL量瓶中,加30%过氧化氢溶液2 mL,室温放置1 h,加水稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液20 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,详见图2C、图2D。

2.6.3 酸破坏 精密量取马来酸噻吗洛尔滴眼液样品和阴性样品各5 mL,分别置于10 mL量瓶中,加2 mol/L盐酸溶液2 mL,置于100 °C水浴上加热1 h,放冷后加2

mol/L氢氧化钠溶液2 mL中和,加水稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液20 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,详见图2E、图2F。

2.6.4 光照破坏 精密量取马来酸噻吗洛尔滴眼液样品和阴性样品各5 mL,分别置于10 mL量瓶中,于4 500 lx紫外灯下照射24 h,加水稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液20 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,详见图2G、图2H。

2.6.5 高温破坏 精密量取马来酸噻吗洛尔滴眼液样品和阴性样品各5 mL,分别置于10 mL量瓶中,置于100 °C水浴上加热1 h,放冷后加水稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液20 μL,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱图,详见图2I、图2J。



注:1.杂质 I ; 2.杂质 II ; 3.杂质 III ; 4.杂质 IV ; 5.杂质 V
Note:1. impurity I ; 2. impurity II ; 3. impurity III ; 4. impurity IV ; 5. impurity V

图2 强制降解试验高效液相色谱图

Fig 2 HPLC chromatograms of destructive tests

由图2可知,马来酸噻吗洛尔滴眼液样品在碱破坏条件下可降解出杂质 I 和杂质 II,相对于噻吗洛尔峰的保留时间分别为0.24和0.63;在氧化破坏条件下降解出杂质 III 和杂质 IV,相对于噻吗洛尔峰的保留时间分别为0.11和0.32;在酸破坏条件下主要降解出杂质 V,相对于噻吗洛尔峰的保留时间为0.50;在光照和高温破坏条件下均降解出杂质 II 和杂质 III。阴性样品经上述破坏后

均发生降解,但其降解产物的色谱峰不干扰杂质 I ~ V 的测定。

2.7 线性关系考察

精密称取马来酸噻吗洛尔原料药 10.02 mg,置于 100 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,分别精密量取 0.5、1.0、2.5、5.0、10.0 mL,置于 100 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,得质量浓度分别为 0.501、1.002、2.505、5.010、10.02 $\mu\text{g/mL}$ 的线性关系考察系列溶液。精密量取上述线性关系考察系列溶液各 20 μL ,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以马来酸噻吗洛尔质量浓度(x , $\mu\text{g/mL}$)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归,得回归方程为 $y=0.388x-0.002$ ($r=0.9999$)。结果表明,马来酸噻吗洛尔检测质量浓度线性范围为 0.501~10.02 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.8 定量限与检出限考察

精密称取马来酸噻吗洛尔原料药 25.10 mg,置于 10 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,精密量取 1 mL,置于 100 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,精密量取 5 mL,置于 50 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,分别精密量取 3、1 mL,置于 50 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,得马来酸噻吗洛尔质量浓度分别为 150.60、50.20 ng/mL 的溶液。分别量取上述溶液 20 μL ,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并计算定量限(信噪比为 10:1)、检出限(信噪比为 3:1)。结果,马来酸噻吗洛尔的定量限为 3.012 ng ,检出限为 1.004 ng 。

2.9 精密度试验

取“2.4.2”项下自身对照溶液(批号:16050101)20 μL ,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定 6 次,记录峰面积。结果,马来酸噻吗洛尔峰面积的 RSD 为 0.2% ($n=6$),表明本方法精密度良好。

2.10 稳定性试验

取“2.4.1”项下供试品溶液(批号:16050101)适量,分别于室温下放置 0、2、4、8、10、12、24 h 时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,杂质 II、杂质 III、其他杂质 1、其他杂质 2 峰面积的 RSD 分别为 2.8%、2.1%、3.6%、2.9% ($n=7$),表明供试品溶液在室温下放置 24 h 内基本稳定。

2.11 重复性试验

取马来酸噻吗洛尔滴眼液样品(批号:16050101)适量,按“2.4.1”和“2.4.2”项下方法分别制备供试品溶液和对照溶液,各 6 份,分别精密量取两种溶液各 20 μL ,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并按不加校正因子的主成分自身对照法计算样品中各杂质的含量。结果,杂质 II、杂质 III、其他杂质 1、其他杂质 2 的平均含量分别为 0.02%、0.05%、0.01%、0.03%,峰面积的

RSD 分别为 3.4%、3.0%、4.8%、3.8% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.12 样品有关物质测定

取 3 批马来酸噻吗洛尔滴眼液样品各适量,按“2.4.1”和“2.4.2”项下方法分别制备供试品溶液和对照溶液,各 3 份,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积,并按不加校正因子的主成分自身对照法计算样品中各杂质的含量,结果见表 1。

表 1 样品有关物质测定结果($n=9$, %)

Tab 1 Results of related substance determination of samples($n=9$, %)

杂质	批号		
	16050101	16040105	16040106
杂质 I	未检出	未检出	未检出
杂质 II	0.02	0.02	0.02
杂质 III	0.05	0.05	0.05
杂质 IV	未检出	未检出	未检出
杂质 V	未检出	未检出	未检出
其他杂质 1	0.01	0.01	0.01
其他杂质 2	0.03	0.01	0.04
合计	0.11	0.09	0.12

2.13 杂质 I、II、III 的结构确证

取马来酸噻吗洛尔原料药 0.1 g,置于 10 mL 量瓶中,加 1 mol/L 氢氧化钠溶液 1 mL,置于 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴上加热 6 h,放冷后加 1 mol/L 盐酸溶液 1 mL 中和,用水稀释至刻度,摇匀,滤过,得滤液①(续滤液)。量取滤液① 0.8 mL,按“2.2”项下色谱条件进样,采用流动相①进行分离,分别收集杂质 I、II 的流出液。取马来酸噻吗洛尔原料药 0.1 g,置于 10 mL 量瓶中,加 30% 过氧化氢溶液 1 mL,室温放置 4 h,加水稀释至刻度,摇匀,滤过,得滤液②(续滤液)。量取滤液② 0.8 mL,按“2.2”项下色谱条件进样,采用流动相②进行分离,收集杂质 III 的流出液。将杂质 I、II、III 的流出液分别于 40 $^{\circ}\text{C}$ 水浴上旋转蒸发至干,残渣加少量水复溶,冻干,得杂质 I、II、III 的纯品。采用 LC-MS/MS 法对杂质 I、II、III 的结构进行初步推测(分别取杂质 I、II、III 的纯品适量,加水溶解,制成杂质 I、II、III 质量浓度均为 1 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液,按“2.3”项下色谱与质谱条件进样分析,得质谱扫描的母离子和子离子信息),并采用 $^1\text{H-NMR}$ 和 $^{13}\text{C-NMR}$ 对杂质 I、II、III 的结构进行确证(溶剂为氘代二甲基亚砜),结果见表 2。

2.14 杂质 IV 的结构推测

笔者在试验中发现,杂质 IV 不稳定,在制备纯品过程中极易发生降解,很难制备其纯品,因此仅通过 LC-MS/MS 法进行结构推测。精密量取“2.6.3”项下经氧化破坏的马来酸噻吗洛尔滴眼液样品溶液 1 mL,置于 10 mL 量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液 2 μL ,按“2.3”项下色谱与质谱条件进样分析(为避免污染

表2 杂质 I、II、III 的 LC-MS/MS 和 ¹H-NMR、¹³C-NMR 数据及确证结构

Tab 2 LC-MS/MS, ¹H-NMR and ¹³C-NMR data and confirmed structures of impurities I, II, III

杂质	母离子, <i>m/z</i>	子离子, <i>m/z</i>	¹ H-NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz)	¹³ C-NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , 600 MHz)	确证结构
I	317.4	261.2, 244.2, 188.1, 130.2, 74.0	δ: 3.74 (2H, m, H-1), 5.05 (1H, m, 1-OH), 8.44 (1H, m, H-2), 3.34 (2H, dd, <i>J</i> =6.0, 6.0 Hz, H-3), 8.98 (1H, s, NH-3), 3.50 (2H, m, H-3'), 3.69 (4H, m, H-4', H-5'), 3.44 (2H, m, H-6'), 1.29 (9H, d, H-2'', H-3'', H-4'')	δ: 59.82 (C-1), 78.39 (C-2), 42.68 (C-3), 153.01 (C-1'), 150.65 (C-2'), 47.91 (C-3'), 66.08 (C-4'), 66.08 (C-5'), 47.91 (C-6'), 57.33 (C-1''), 25.36 (C-2''), 25.36 (C-3''), 25.36 (C-4'')	
II	188.0	144.1, 127.0, 99.0, 74.0	δ: 3.43 (4H, t, <i>J</i> =4.8, 4.8 Hz, H-3, H-6), 3.69 (4H, t, <i>J</i> =4.8, 4.8 Hz, H-4, H-5)	δ: 161.16 (C-1), 156.47 (C-2), 44.90 (C-3), 65.93 (C-4), 66.51 (C-5), 47.51 (C-6)	
III	204.2	113.1, 69.1	δ: 3.72 (2H, m, H-3), 3.68 (4H, m, H-4, H-5), 4.28 (2H, m, H-6)	δ: 161.16 (C-1), 156.47 (C-2), 44.90 (C-3), 65.93 (C-4), 66.51 (C-5), 47.51 (C-6)	

离子源,通过阀切换将0~1.2 min、2.8~4.6 min的样品溶液切换到废液,不进MS仪,根据各色谱峰的DAD光谱图判断杂质IV的峰位(色谱图见图3,总离子流图见图4)。杂质IV在该LC-MS/MS条件下分裂为两个峰,两个峰的DAD光谱图与一级质谱以及二级质谱图完全相同(杂质IV的DAD光谱图见图5,全扫描质谱图见图6,子离子扫描质谱图见图7),推测两个峰为旋光异构体。由图6、图7可知,杂质IV的母离子为*m/z* 333.4,推测为[M+H]⁺峰;子离子分别为*m/z* 260.1、214.2、173.2、161.1、130.2、117.1、112.1、74.0,推测杂质IV为噁吗洛尔噻唑环上的硫原子氧化产物,为1-(叔丁氨基)-3-[(4-吗啉基-1,2,5-噻二唑-1-氧-3-基)氧]-2-丙醇。因其2位碳原子为手性原子,推测其质谱裂解途径见图8。

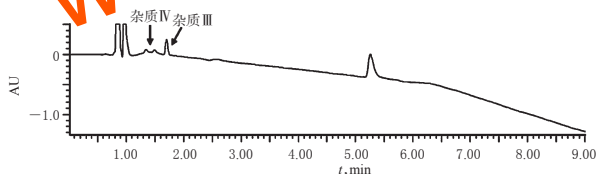


图3 马来酸噁吗洛尔滴眼液样品氧化破坏色谱图
Fig 3 HPLC chromatogram of oxidation-degraded Timolol maleate eye drops

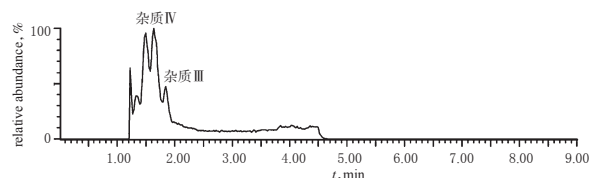


图4 马来酸噁吗洛尔滴眼液样品氧化破坏总离子流图
Fig 4 TIC of oxidation-degraded Timolol maleate eye drops

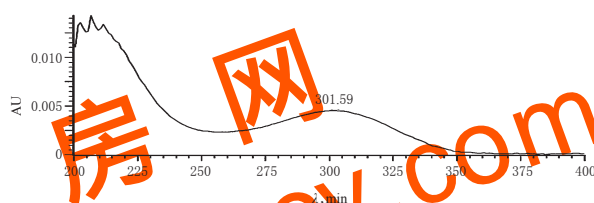


图5 杂质IV DAD光谱图
Fig 5 DAD Spectrogram of impurity IV

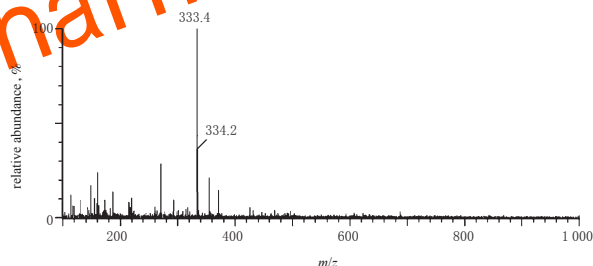


图6 杂质IV全扫描质谱图(ESI⁺)
Fig 6 MS spectrogram of impurity IV (ESI⁺)

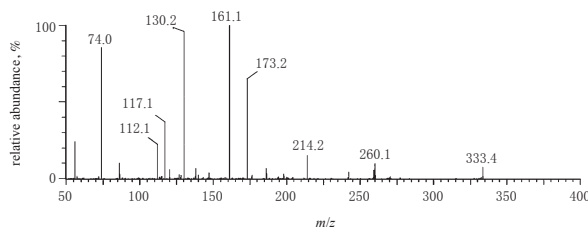


图7 杂质IV子离子扫描质谱图(ESI⁺)
Fig 7 Daughter ion scanning MS spectrum of impurity IV (ESI⁺)

2.15 杂质V的结构推测

由于杂质V含量较低,试验中发现对酸破坏条件进行优化后仍无法提高其含量,很难制备其纯品,因此仅通过LC-MS/MS法进行结构推测。同时,马来酸噁吗洛

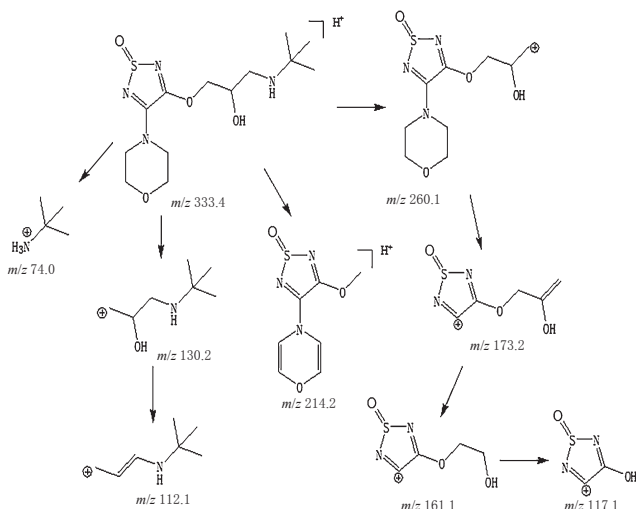


图8 杂质IV质谱裂解途径推测

Fig 8 MS fragmentation pathway of impurity IV

尔滴眼液样品经酸破坏后,辅料羟苯乙酯峰与杂质V峰保留时间相近,为避免干扰,用原料药进行酸破坏后分析。称取马来酸噻吗洛尔原料药约10 mg,置于10 mL量瓶中,加2 mol/L盐酸溶液2 mL,置于100 °C水浴上加热1 h,放冷后加2 mol/L氢氧化钠溶液2 mL中和,用水稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液20 μL,按“2.1”项下色谱条件进样,结果原料药经酸破坏后产生的主要杂质峰与马来酸噻吗洛尔滴眼液样品经酸破坏后产生的主要杂质峰的保留时间和DAD光谱图一致,均为杂质V。再量取上述续滤液2 μL,按“2.3”项下色谱与质谱条件进样分析(为避免污染离子源,通过阀切换将0~1.5 min、4.0~9.0 min的样品溶液切换到废液,不进MS仪)。根据各色谱峰的DAD光谱图判断杂质V的峰位和推测结构(色谱图见图9,总离子流图见图10,杂质V的DAD光谱图见图11,全扫描质谱图见图12,子离子扫描质谱图见图13)。由图12、图13可知,杂质V的母离子为 m/z 313.4,子离子分别为 m/z 184.1、152.1、130.2、74.1,推测杂质V为噻吗洛尔吗啉环脱氢产物,可能为1-(叔丁基氨基)-3-{[4-(4H-1,4-噁嗪-4-基)-1,2,5-噻二唑-3-基]氧基}-2-丙醇,推测其质谱裂解途径见图14。

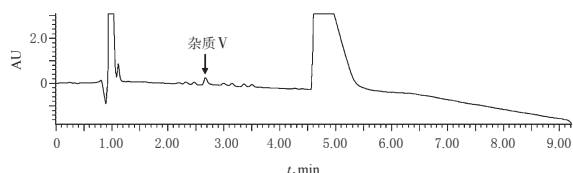


图9 马来酸噻吗洛尔原料药酸破坏色谱图

Fig 9 Destruction chromatogram of timolol maleate crude drug

3 讨论

国外仅有1篇文献报道了噻吗洛尔的核磁数据^[13];虽然2017年版《英国药典》^[2]和《美国药典》(40版)^[13]中均

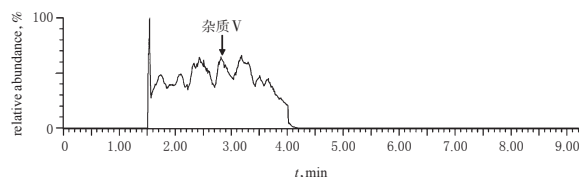


图10 马来酸噻吗洛尔原料药酸破坏总离子流图

Fig 10 TIC of acid-degraded timolol maleate crude drug

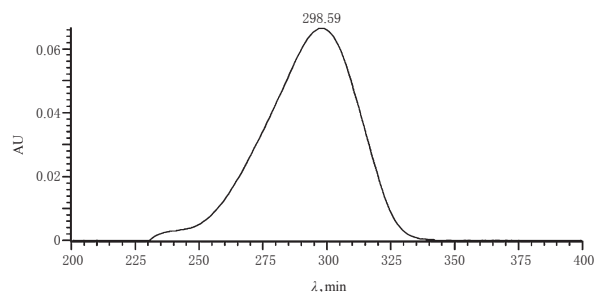


图11 杂质V DAD光谱图

Fig 11 DAD Spectrogram of impurity V

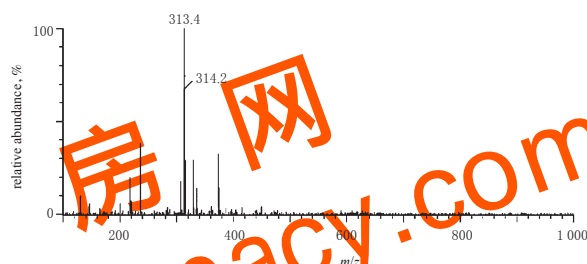


图12 杂质V全扫描质谱图(ESI⁺)

Fig 12 MS spectrogram of impurity V (ESI⁺)

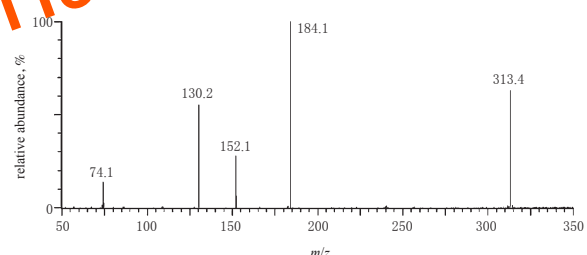


图13 杂质V子离子扫描质谱图(ESI⁺)

Fig 13 Daughter ion scanning MS spectrum of impurity V (ESI⁺)

收载了其多个已知杂质,但均无噻吗洛尔降解杂质的核磁数据。本研究中,经¹H-NMR和¹³C-NMR确证,碱破坏产生的杂质I和II结构分别与2017年版《英国药典》^[2]中的杂质B和D一致,杂质B化学名为3-[(1,1-二甲基乙基)氨基]-2-[4-(吗啉-4-基)-1,2,5-噻二唑-3-基]氧基丙烷-1-醇,杂质D化学名为4-(吗啉-4-基)-1,2,5-噻二唑-3-醇;氧化破坏产生的杂质III结构与2017年版《英国药典》^[2]中的杂质G一致,化学名为4-(吗啉-4-基)-1,2,5-噻二唑-3(2H)-1-氧化物。

对于样品中含量较低或不稳定的杂质,可采用LC-MS/MS法进行结构推测,本研究即采用LC-MS/MS

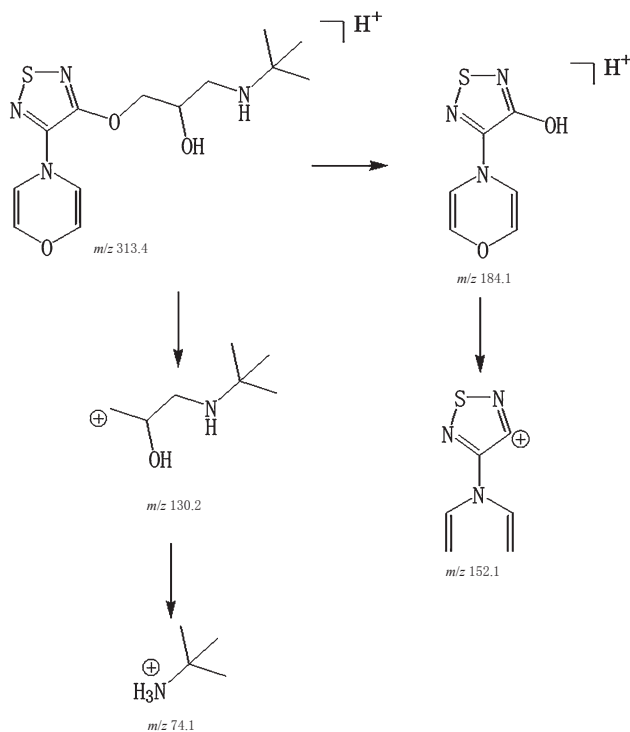


图 14 杂质 V 的质谱裂解途径推测

Fig 14 MS fragmentation pathway of impurity V

法推测了杂质 IV、V 的结构。目前已有多篇文献报道了 LC-MS/MS 法用于杂质的结构推测^[14-16], 但该方法仅通过质谱推测结果可能产生偏差。对于降解杂质的定性研究, 一般可通过强制降解试验来加速药物降解, 以提高降解杂质的含量, 药物经破坏后杂质含量若能达到 20% 以上, 则易通过制备 LC 法来分离和纯化杂质, 得到杂质纯品后可经核磁、红外、紫外等方法进行结构确认, 准确度较高。

马来酸噻吗洛尔滴眼液在氧化破坏、碱破坏、酸破坏条件下均可发生较明显的降解, 其中在氧化破坏和碱破坏条件下降解较快、降解率较高。马来酸噻吗洛尔氧化破坏时硫原子首先发生氧化破坏, 生成杂质 IV, 后醚键水解生成杂质 III; 碱破坏时易生成杂质 I, 后醚键水解生成杂质 II; 酸破坏时加热后吗啉环脱氢生成杂质 V。其中, 杂质 IV、V 均为未知杂质, 且均为首次报道。

综上所述, 本方法快速、准确、专属性好, 可为马来酸噻吗洛尔滴眼液的质量控制提供参考。

参考文献

[1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 二部[S]. 2015 年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 65-66.
 [2] The British Pharmacopoeia Commission. *British Pharmacopoeia* 2017: Vol II [S]. London: The Stationery Office

on behalf of the Medicines and Healthcare products Regulatory Agency (MHRA), 2016: 1080-1082.

[3] The United States Pharmacopeial Convention. *The United States Pharmacopeia* 40: Vol 3[S]. Baltimore: United Book Press, 2017: 6479-6480.
 [4] 日本药典委员会. 日本药典[S]. 17 版. 东京: 厚生省药物局, 2016: 1062-1063.
 [5] Council of Europe. *European Pharmacopoeia: Vol 2017: Vol III* [S]. 9th edition. Strasbourg: Convention on the Elaboration of a European Pharmacopoeia, 2016: 3789-3791.
 [6] 胡兵, 单晓芸. HPLC 法测定马来酸噻吗洛尔滴眼液中有关物质[J]. 中国药师, 2012, 15(8): 1138-1140.
 [7] 霍秀敏. 反相离子对色谱法测定马来酸噻吗洛尔及其滴眼液中有关物质[J]. 药物分析杂志, 2000, 20(3): 181-184.
 [8] 税庆华, 李志明, 于盛茂. HPLC 法测定马来酸噻吗洛尔滴眼液中的有关物质[J]. 食品与药品, 2005, 7(12): 41-42.
 [9] 左明, 段更利, 曹志娟. 高效液相色谱法测定右旋噻吗洛尔及其对映体含量[J]. 中国新药与临床杂志, 2003, 22(9): 539-542.
 [10] MAZZO DJ, SNYDER PA. High-performance liquid chromatography of Timolol and potential degradates on dynamically modified silica[J]. *J Chromatogr*, 1988, 438(1): 85-92.
 [11] LENNARD MS, LEWIS RV, BRAUN LA, et al. Timolol metabolism and debrisquinone oxidation polymorphism: a population study[J]. *Br J Clin Pharmacol*, 1989, 27(4): 429-434.
 [12] 刘荷英, 周敏, 程奇珍, 等. 马来酸噻吗洛尔滴眼液中抑菌剂的质量控制[J]. 中国药房, 2015, 26(7): 995-999.
 [13] ZIELIŃSKA-PISKLAK MA, PISKLAK DM, WAWER L. ¹H and ¹³C NMR characteristics of β-blockers[J]. *Magn Reson Chem*, 2011, 49(5): 284-290.
 [14] 刘荷英, 程奇珍, 钟振华, 等. 液相色谱-质谱法对倍丙酯注射剂中有关物质的初探与结构解析[J]. 药物分析杂志, 2018, 38(3): 470-478.
 [15] 杨倩, 王志英, 唐素芳. 二维超高效液相色谱-QTOF 质谱联用技术在盐酸博来霉素杂质谱研究中的应用[J]. 药物分析杂志, 2016, 36(7): 1231-1242.
 [16] 缪文玲, 侯玉荣, 孙晶, 等. 阿莫西林克拉维酸钾片的杂质谱研究[J]. 中国药理学杂志, 2017, 52(24): 2202-2208.

(收稿日期: 2018-02-14 修回日期: 2018-06-15)

(编辑: 陈宏)