

马来酸噻吗洛尔中有关物质的识别和测定*

田珩, 吴纯敏, 严全鸿**

(广东省药品检验所 国家药品监督管理局药用辅料质量控制与评价重点实验室, 广州 510525)

摘要 目的: 采用超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱质谱(UPLC-Q/Orbitrap HRMS)鉴定马来酸噻吗洛尔中的有关物质。方法: 采用 ACE Excel3 C₁₈-AR(150 mm×4.6 mm, 3 μm) 色谱柱, 以含 0.01 mol·L⁻¹ 乙酸铵的 0.2% 甲酸水-甲醇为流动相梯度洗脱, 流速 0.6 mL·min⁻¹, 紫外检测器检测波长 295 nm, 质谱检测器采用 HESI 离子源, 正负离子检测模式, 碎片和裂解分析借助 Mass Frontier 8.0 和 Compound Discover 3.3 软件, 通过对主成分进行破坏可以获得系统适用性溶液对样品中的杂质采用 UPLC-Q/Orbitrap 进行鉴定和分析。结果: 主成分在特定条件下可产生出噻吗洛尔杂质 B{(±)-1-(叔丁氨基)-2-[(4-吗啉基-1,2,5-噻二唑-3-基)氧]-1-丙醇}、噻吗洛尔杂质 D(4-吗啉基-1,2,5-噻二唑)、噻吗洛尔杂质 E((S,Z)-4{(-)-1-(叔丁氨基)-2-[(4-吗啉基-1,2,5-噻二唑-3-基)氧]-4-氧代丁烯二酸})和噻吗洛尔杂质 C{(±)-N-(叔丁氨基)-2,3-二[(4-吗啉基-1,2,5-噻二唑-3-基)氧]-2-丙烷胺}, 噻吗洛尔峰和各杂质峰分离良好, 采用紫外检测器测定, 定量限为 0.05 μg·mL⁻¹, 检测限为 0.015 μg·mL⁻¹。结合 UPLC-Q/Orbitrap HRMS 结果和文献报道, 推测了另外 6 个主要杂质的结构。4 家企业生产的 8 批样品测定结果单个杂质含量在 0.000 4%~0.09%, 总杂质含量在 0.02%~0.12%。结论: 通过主成分破坏可获得系统适用性溶液, 并用于马来酸噻吗洛尔中杂质的检测与鉴定, 结果可为马来酸噻吗洛尔的质量控制提供参考依据。

关键词: 马来酸噻吗洛尔; β-受体阻断剂; 有关物质; 杂质鉴定; 超高效液相色谱-四极杆/静电场轨道阱质谱

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2024)03-0450-12

doi: 10.16155/j.0254-1793.2024.03.10

Identification and determination of related substances of timolol maleate*

TIAN Heng, WU Chun-min, YAN Quan-hong**

(Guangdong Institute for Drug Control, Guangdong Institute for Drug Control NMPA Key Laboratory for Quality Control and Evaluation of Pharmaceutical Excipients, Guangzhou 510525, China)

Abstract Objective: To establish a method for related substances determination in timolol maleate by ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole/orbitrap high resolution mass spectrometry (UPLC-Q/Orbitrap HRMS), by which the impurities both in active pharmaceutical ingredients (APIs) and preparations can be recognized and determined. **Methods:** An ACE Excel3 C₁₈-AR column (150 mm×4.6 mm, 3 μm) was used for the separation and a mixture of 0.01 mol·L⁻¹ ammonium acetate solution with 0.02% formic acid and methanol

* 广东省医学科学技术研究基金项目(B2023406)

** 通信作者 Tel: (020)32447921; E-mail: Email: yanquanhong@gdide.org.cn

第一作者 Tel: (020)32447921; E-mail: dongqingfish@126.com

was employed as the mobile phase by gradient elution, at a flow rate of $0.6 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. The detection wavelength for UV detector was 295 nm, an HESI (heated ESI) ion source was employed in both the positive mode and negative mode. The possible fragmentation patterns prediction was conducted with the help of Mass Frontier 8.0 and Compound Discover 3.3. The related substances could be recognized and determined by means of the forced degradation of the APIs, with the calibration by the correction factors and confirmation by the mass spectrum data from UPLC-Q/Orbitrap HRMS. **Results:** The timolol impurity B[3-(*tert*-butylamino)-2-(4-morpholino-1,2,5-thiadiazol-3-yloxy)propan-1-ol], timolol impurity D(4-morpholino-1,2,5-thiadiazol-2-ol), timolol impurity E((*S,Z*)-4-(1-(*tert*-butylamino)-3-[(4-morpholino-1,2,5-thiadiazol-3-yl)oxy]propan-2-yl)oxy)-4-oxobut-2-enoic acid maleate salt) and timolol impurity C[*N*-(*tert*-butyl)-2,3-bis(4-morpholino-1,2,5-thiadiazol-3-yloxy)propan-1-amine maleate] were produced from the APIs under selected conditions and separated well in the specified HPLC condition, the limit of quantitation was $0.05 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ and the limit of detection was $0.015 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ for HPLC-UV. The contents of individual impurities were between 0.000 4%–0.09% and the results of total impurities were between 0.02%–0.12% for the samples from 4 different manufactures. The probable chemical structures of the 6 unspecified impurities were speculated according to the fragmentation pattern of fragment ions, combined with the fragment information, chemical structure of API and the references. **Conclusion:** The system solution can be obtained by the degradation of the API, and be implied in the impurity analysis for the timolol maleate. The results can be used as a reference for the quality control of timolol maleate.

Keywords: timolol maleate; β -blocker; related substance; identification of impurities; UPLC-Q/Orbitrap HRMS

马来酸噻吗洛尔为非选择性 β 受体阻断剂, 临床用于治疗高血压病、心绞痛、心动过速及青光眼^[1-2]。各国药典均已收载控制马来酸噻吗洛尔中杂质的方法, 其中 2020 年版《中华人民共和国药典》采用薄层色谱法, 专属性较差; USP-NF 2023 和 BP 2023 采用高效液相色谱法, 专属性较好, 不仅需要从国外购买价格昂贵的杂质对照品, 还分别使用了离子对试剂辛烷磺酸钠和峰形改善剂三氟乙酸, 这些试剂对色谱柱损伤较大且无法直接进质谱进行定性分析, 不利于方法的普及和杂质的鉴定^[3-5]。

超高效液相-四极杆静电场轨道阱高分辨质谱 (ultra performance liquid chromatography-quadrupole/electrostatic field orbitrap high resolution mass spectrometry, UPLC-Q/Orbitrap HRMS), 具有高通量、高选择性、高灵敏度等优点, 适用于多种目标化合物的筛查和确证分析, 可用于马来酸噻吗洛尔中杂质的鉴定和分析^[6-7]。

本文采用马来酸噻吗洛尔原料, 在选定条件下, 定向破坏出目标已知杂质 (相关结构式见图 1) 和未知杂质, 对其中的已知杂质进行识别和测定, 建立的

测定方法可同时适用于普通液相的紫外检测器和液质联用仪的质谱检测器。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Q Exactive Focus 四极杆-高分辨静电场轨道阱液质联用仪 (配 Compound Discover 3.3 和 Mass Frontier 8.0 软件辅助二级质谱碎片分析, Thermo Fisher Scientific 公司); LC-20AT 高效液相色谱仪 (SHIMADZU 有限公司); UltiMate3000 高效液相色谱仪 (Thermo Fisher Scientific 公司); Agilent 1290 高效液相色谱仪 (Agilent 公司); 电子天平 (精度 $0.1 \text{ mg}/0.01 \text{ mg}$, Mettler TOLEDO 公司); ACE Excel3 C₁₈-AR (150 mm \times 4.6 mm, 3 μm) 色谱柱; Ultimate XB-C₁₈ (150 mm \times 4.6 mm, 3 μm) 色谱柱; SW22 恒温水浴摇床 (Julabo 公司); ED56 恒温干燥箱 (BINDER 公司)。

1.2 试剂

样品: 马来酸噻吗洛尔原料 (批号 201910001、201910002、201811001, 江苏慈星药业有限公司; 批号 Y1909001、Y1909002、Y1910003, 天津中央药业有限

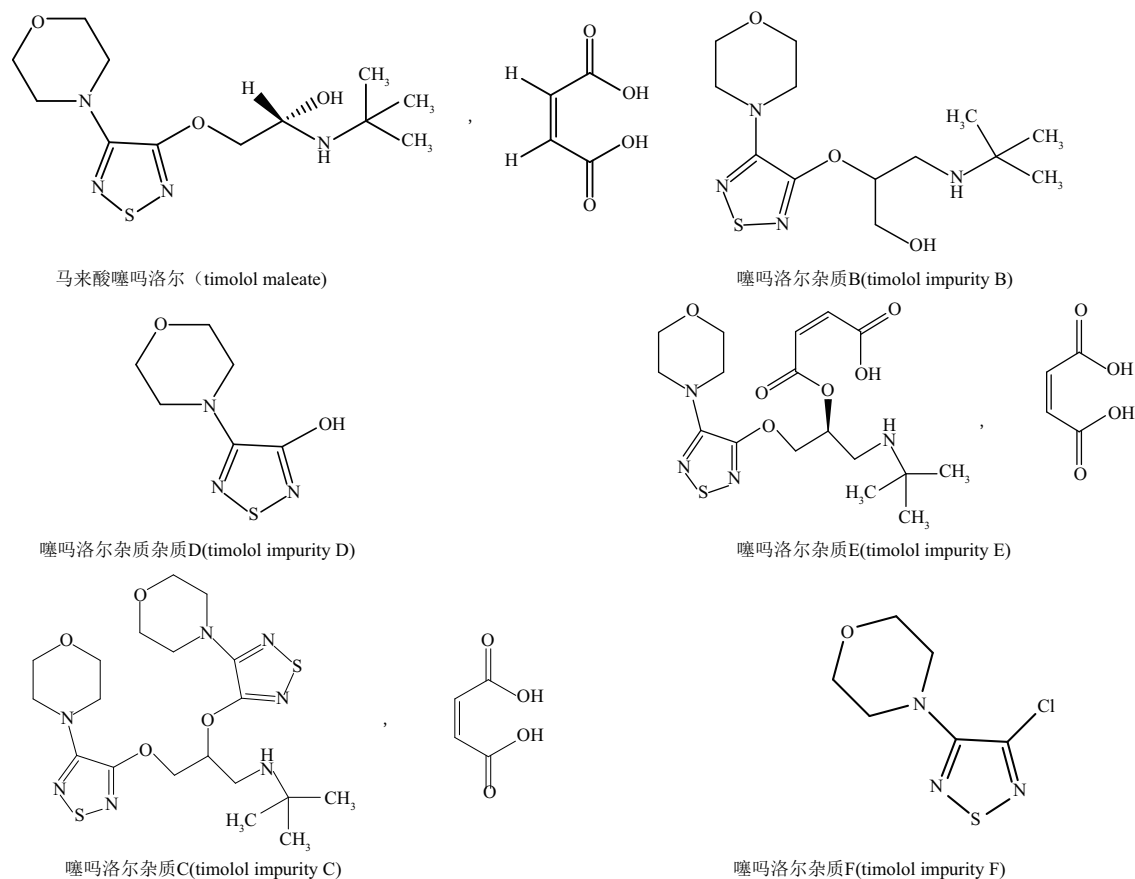


图 1 马来酸噻吗洛尔及其杂质的化学结构

Fig. 1 Chemical structures of timolol maleate and major impurities

公司);马来酸噻吗洛尔滴眼液(批号 20200307,中山大学附属眼科医院;批号 19030711,广东宏盈科技有限公司)。

马来酸噻吗洛尔对照品(批号 4,含量 100%, EDQM);各杂质对照品[噻吗洛尔杂质 B(批号 R073G0,含量 100%, USP),噻吗洛尔杂质 C(批号 R090T0,含量 100%, USP),噻吗洛尔杂质 D(批号 R071X0,含量 100%, USP),噻吗洛尔杂质 E(批号 R073H0,含量 99%, USP),噻吗洛尔杂质 F(批号 R102U0,含量 100%, USP);3-氯-4-吗啉基-1,2,5-噻二唑(批号 D2027109,含量 98.5%,上海阿拉丁生化技术有限公司);叔丁醇(批号 20150331,含量 98.0%,国药集团化学试剂有限公司);叔丁醇钾(批号 C1388730,含量 98%,上海麦克林生化科技有限公司);马来酸(批号 C13523717,含量 99.0%,上海麦克林生化科技有限公司);水为纯净水(屈臣氏),甲酸和甲醇为色谱纯或质谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱和质谱条件

2.1.1 色谱条件 采用 ACE Excel3 C₁₈ - AR (150 mm × 4.6 mm, 3 μm) 色谱柱,流动相 A 为含 0.01 mol · L⁻¹ 乙酸铵的 0.2% 甲酸水溶液,流动相 B 为甲醇;梯度洗脱(0 ~ 10 min, 45% B; 10 ~ 20 min, 45% B ~ 75% B; 20 ~ 28 min, 75% B; 28 ~ 29 min, 75% B ~ 45% B; 29 ~ 37 min, 45% B);检测波长 295 nm,流速 0.6 mL · min⁻¹,柱温 35 °C,进样体积普通液相为 5 μL, UPLC - Q/Orbitrap HRMS 1 μL。

2.1.2 质谱条件 HESI 源,正、负离子模式下分别进行检测;鞘气流速约 6.08 L · min⁻¹;辅助气流速约 10.08 L · min⁻¹;吹扫气流速约 3.75 L · min⁻¹;正喷雾电压 3.5 kV;离子传输管温度 275 °C;干燥器温度 450 °C;扫描模式: Full MS/dd - MS²;质量扫描范围 *m/z* 150 ~ 1 500;分辨率 70 000 (Full MS), 17 500 (MS²);自动增益控制目标离子数 3 × 10⁶。

2.2 溶液制备

2.2.1 供试品溶液 取马来酸噻吗洛尔原料约 50 mg,精密称定,置 10 mL 量瓶中,用溶剂(0.01 mol · L⁻¹乙酸铵的 0.2% 甲酸水溶液-甲醇(50:50),后续试验均用此溶剂)溶解并稀释至刻度,混匀,作为原料供试品溶液;取马来酸噻吗洛尔滴眼液,作为滴眼液供试品溶液。

2.2.2 对照溶液 精密量取供试品溶液 1 mL 至 100 mL 量瓶中,用溶剂稀释至刻度,混匀,从中再精密量取 1 mL 至 10 mL 量瓶中,用溶剂稀释至刻度,即得。

2.2.3 降解溶液 I 取马来酸噻吗洛尔原料约 50 mg,加入 5 mol · L⁻¹氢氧化钠溶液 1 mL,置 75 °C 水浴加热 30 min,冷却,加入 5 mol · L⁻¹盐酸溶液 1 mL,用溶剂稀释至 10 mL,即得。

2.2.4 降解溶液 II 取马来酸噻吗洛尔原料 10 mg 和马来酸 200 mg,避光条件下充分研磨混匀,再置 105 °C 干燥箱中加热 60 min,冷却,取 10 mg 用溶剂溶解并定容至 10 mL,即得。

2.2.5 降解溶液 III 取马来酸噻吗洛尔原料 10 mg,加入含 10% 叔丁醇钾的叔丁醇溶液 1 mL,置 26 °C 水浴 30 min,用溶剂稀释并定容至 10 mL,即得。

2.2.6 降解溶液 IV 取马来酸噻吗洛尔原料 10 mg 和 3-氯-4-吗啉基-1,5,5-噻二唑 20 mg,加入含 10% 叔丁醇钾的叔丁醇溶液 2 mL,置 26 °C 水浴 180 min,用溶剂稀释并定容至 10 mL,即得。

2.2.7 系统适用性溶液 取降解溶液 II 中加热并冷却过的固体粉末约 5 mg,用 5 mL 降解溶液 IV 溶解,即得。

2.2.8 马来酸噻吗洛尔对照品储备液 取马来酸噻吗洛尔对照品约 10 mg,精密称定,置 50 mL 量瓶中,用溶剂溶解并定容至刻度,得质量浓度约为 200 μg · mL⁻¹。

2.2.9 杂质对照品储备液 取对照品噻吗洛尔杂质 B、D、E、C 和 F 各约 10 mg,精密称定,分别置 50 mL 量瓶中,用溶剂溶解并定容至刻度,即得,各杂质质量浓度分别约为 200 μg · mL⁻¹。

2.2.10 杂质对照品溶液 精密量取各杂质对照品储备液各 5 mL,分别用溶剂稀释并定容至 10 mL,即得,质量浓度分别约为 100 μg · mL⁻¹。

2.3 已知杂质的识别

目前 USP 和 BP 分别采用杂质对照品外标法和

加校正因子的主成分自身对照法控制马来酸噻吗洛尔中的噻吗洛尔杂质 B、D、E、C 和 F,涉及使用价格昂贵的杂质对照品^[4-5]。为了避免购买国外的杂质对照品,通过分析马来酸噻吗洛尔和相关杂质的结构特征^[1],结合工艺^[8],通过一定的反应条件生成含有上述杂质组分的定位溶液和系统适用性溶液,从而实现样品中杂质的识别和测定。

2.3.1 降解方法选择 根据主成分和各杂质的结构及预试验结果,噻吗洛尔杂质 B 为噻吗洛尔中丙醇基断裂重排后的同分异构体,可在强碱性加热条件下或叔丁醇钾的叔丁醇溶液催化条件下生成;噻吗洛尔杂质 D 为噻吗洛尔中的叔丁胺基丙醇键断裂后产生的噻二唑吗啉,可在强酸或强碱加热条件下生成;噻吗洛尔杂质 E 为噻吗洛尔与一分子马来酸在醇羟基位加合的产物,可在避光条件下,通过主成分与马来酸研磨混匀后,加热产生;噻吗洛尔杂质 F 为起始物料之一,可通过购买价格低廉的商业化试剂获得;噻吗洛尔杂质 C 为噻吗洛尔中的丙醇基被一分子噻二唑吗啉取代后形成的副产物,可通过混合主成分和噻吗洛尔杂质 F,在叔丁醇钾的叔丁醇溶液催化条件下生产。综合反应原理和预试验结果,最终选择配制降解溶液 I ~ IV 和包含上述杂质及主成分的系统适用性溶液,反应原理见图 2。

2.3.2 降解后杂质的确认 取“2.2”中的降解溶液 I ~ IV 和系统适用性溶液,按“2.1”中色谱条件和质谱条件,分别采用 HPLC-PDA 和 UPLC-Q/Orbitrap HRMS 进行分析,与同法测定的各杂质对照品的 DAD 图谱和一二级质谱图进行比对,保留时间、UV 光谱、一级母离子质荷比及二级碎片离子质荷比结果一致,结合 Mass Frontier 8.0 预测的各杂质裂解途径进行分析,可基本确认降解产生的各色谱峰为目标杂质峰。结果见图 3 和表 1。

2.4 液相色谱方法学验证

为保证建立的方法可适用于普通高效液相色谱仪,采用配 UV 或 PDA 检测器的普通液相色谱进行了方法学的验证。

2.4.1 专属性考察 取“2.2.1”中的供试品溶液和溶剂,分别进行酸(1 mol · L⁻¹盐酸)、碱(1 mol · L⁻¹氢氧化钠)、氧化(30% 过氧化氢)、高温(沸水浴)及光照射(2 000 lx 光照 5 d)等强制破坏试验,按“2.1.1”中色谱条件,采用高效液相色谱仪进行

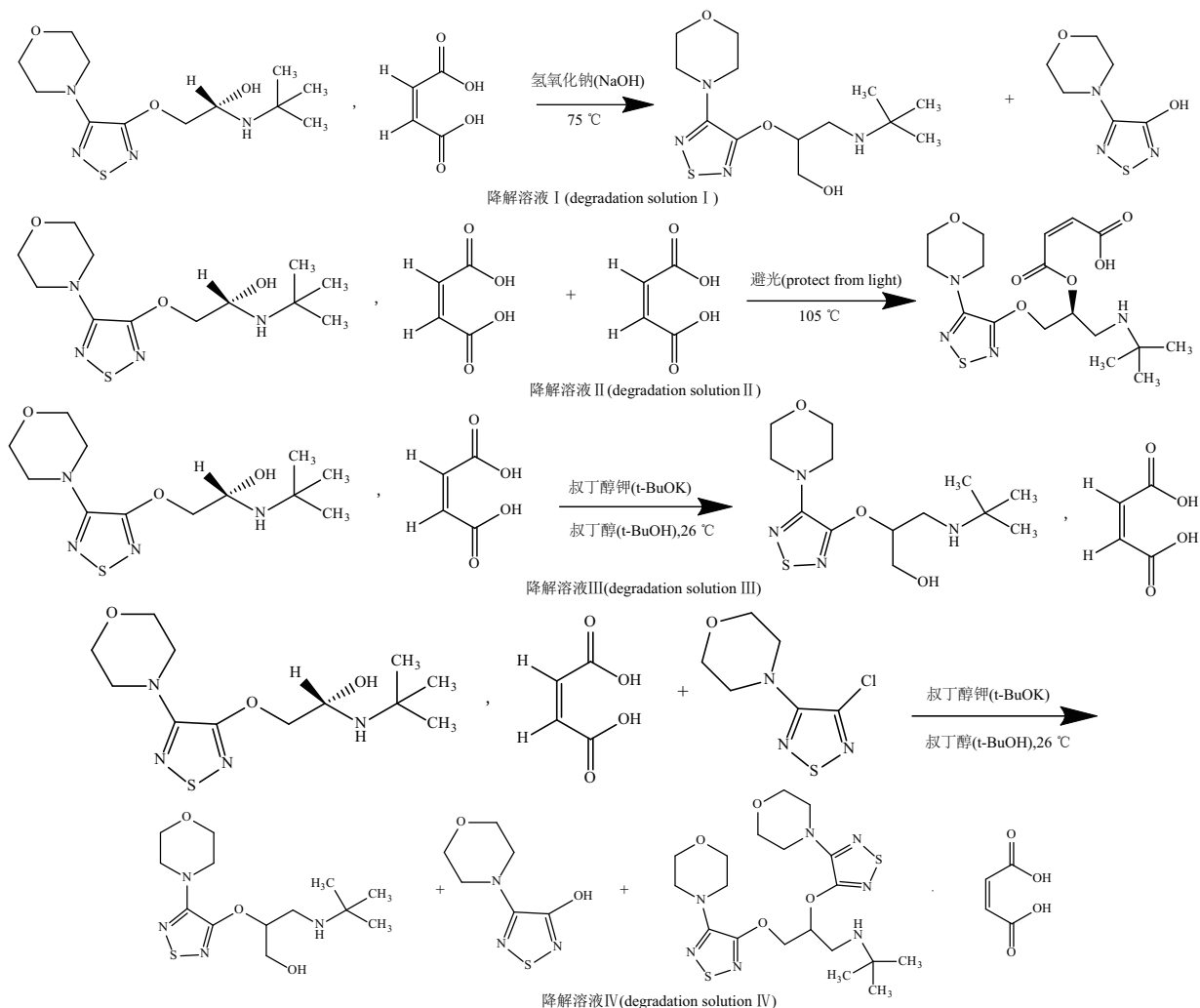
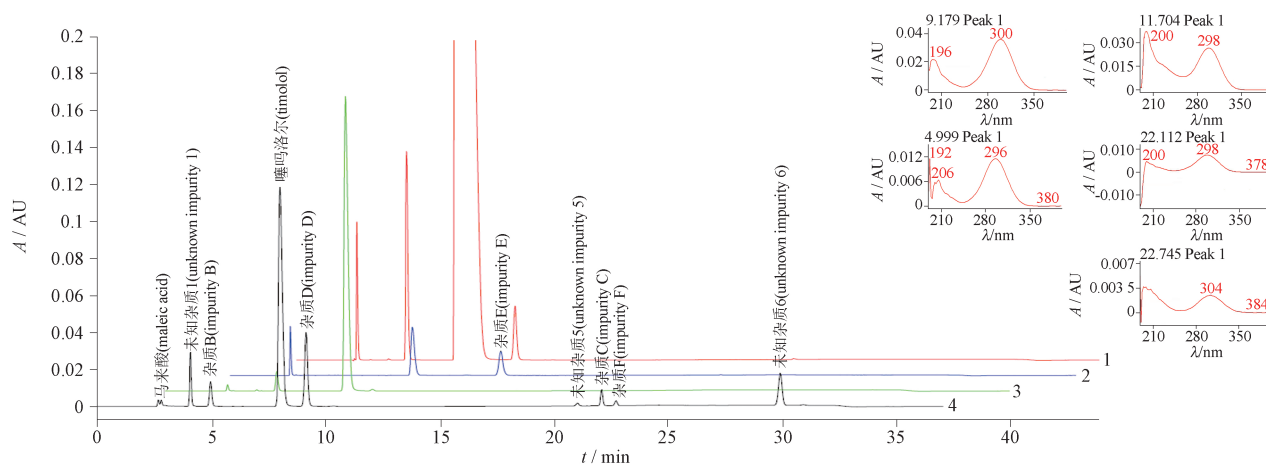


图 2 各降解溶液反应原理

Fig. 2 The reactions in the degradation solutions



1. 降解溶液 I (degradation solution I) 2. 降解溶液 II (degradation solution II) 3. 降解溶液 III (degradation solution III) 4. 降解溶液 IV (degradation solution IV)

图 3 降解溶液色谱图

Fig. 3 The chromatograms of the degradation solutions

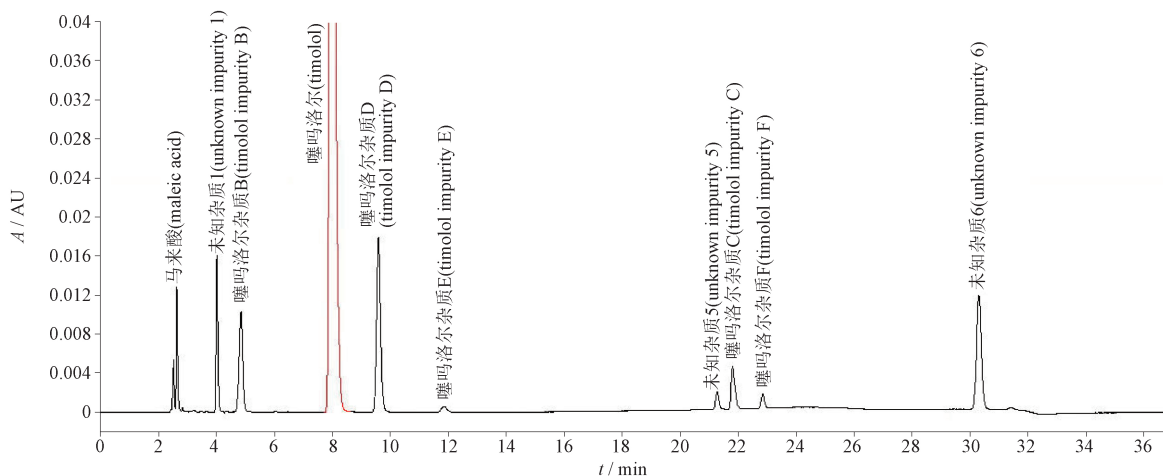


图4 系统适用性溶液色谱图

Fig. 4 The chromatogram of the system suitability solution

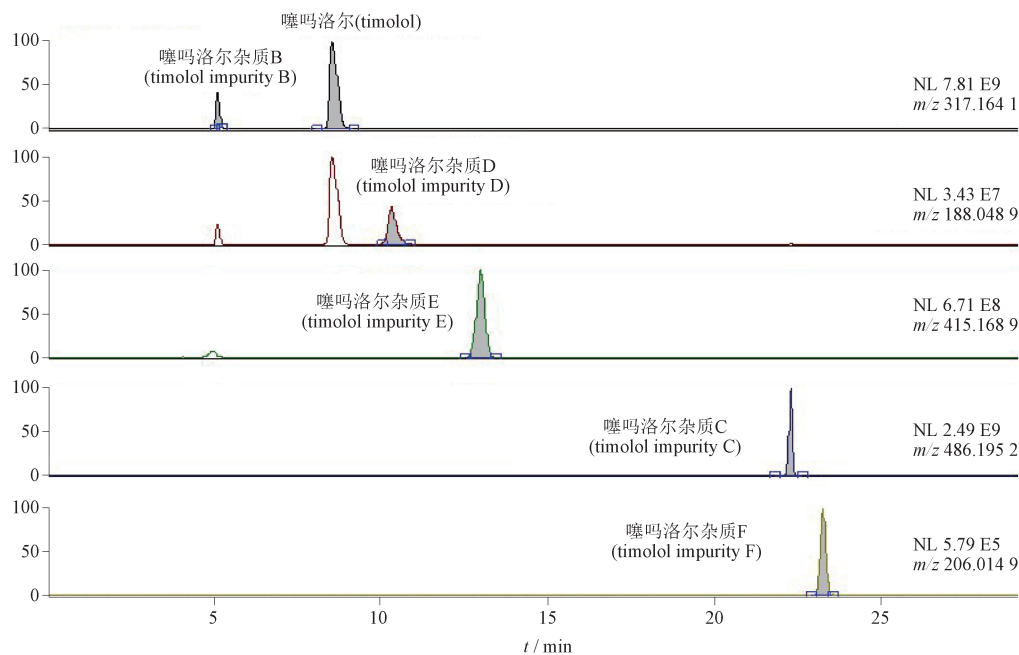


图5 系统适用性溶液色谱图中各杂质选择离子流图

Fig. 5 The EIC of the impurities in the system suitability solution

表1 系统适用性溶液和各对照品溶液中各色谱峰对应的确认([M+H]⁺)

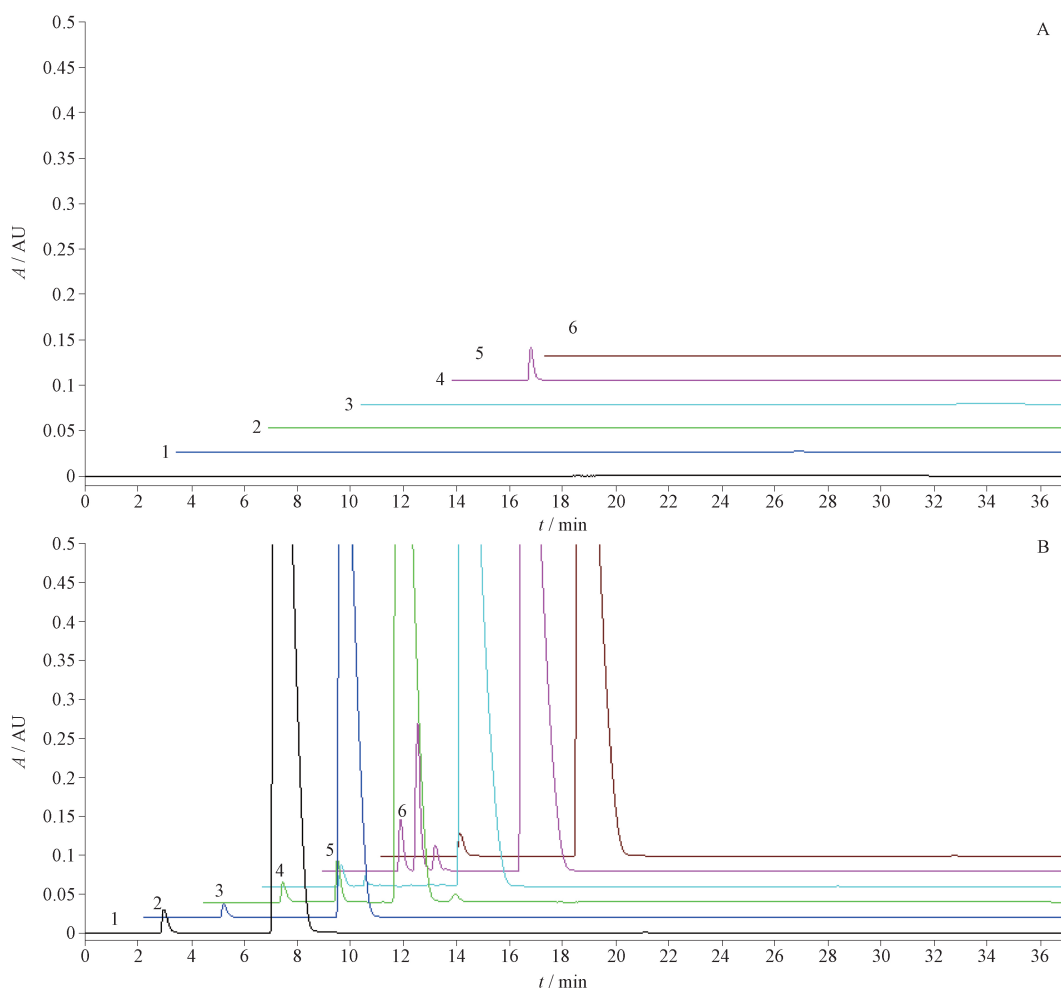
Tab. 1 Summary table of characterized impurities

杂质名称 (impurity name)	离子式 (ion formula) [M+H] ⁺	理论值 (theoretical value) m/z	降解溶液中实测值 (measured value in degradation solution) m/z	对照品溶液中实测值 (measured value in standard solution) m/z	* 偏差 (deviation)/ ×10 ⁶
噻吗洛尔杂质 B(timolol impurity B)	C ₁₃ H ₂₄ N ₄ O ₃ S + H ⁺	317.164 2	317.164 1	317.164 0	0
噻吗洛尔杂质 D(timolol impurity D)	C ₆ H ₉ N ₃ O ₂ S + H ⁺	188.048 8	188.048 9	188.048 8	1
噻吗洛尔杂质 E(timolol impurity E)	C ₁₇ H ₂₆ N ₄ O ₆ S + H ⁺	415.164 6	415.164 2	415.164 5	1
噻吗洛尔杂质 C(timolol impurity C)	C ₁₉ H ₃₁ N ₇ O ₄ S ₂ + H ⁺	486.195 2	486.194 9	486.195 1	0

注 (note): “*” 其中质量偏差为对照品测定结果与各溶液测定结果的偏差 (deviation between the test solutions and the standard solutions)

测定。结果表明,空白溶剂无干扰,在各破坏条件下,产生的各杂质峰与噻吗洛尔峰均能有效分离;空

白溶剂不影响主成分和各降解产物的检出,方法专属性良好。



1. 未破坏 (undamaged) 2. 酸破坏 (damaged by acid) 3. 碱破坏 (damaged by alkali) 4. 高温破坏 (damaged by high temperature) 5. 氧化破坏 (damaged by oxidation) 6. 光照破坏 (damaged by light)

A. 空白溶剂 (blank solutions) B. 供试品溶液 (Y1909001) [samples (Y1909001)]

图6 强制降解试验结果色谱图

Fig. 6 The results of forced degradation

2.4.2 线性及校正因子考察 取“2.2”中的马来酸噻吗洛尔和各杂质对照品储备液,用溶剂逐级稀释为质量浓度分别约为 100、50、20、10、5 和 $2.5 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的系列溶液,分别采用 3 台不同品牌的高效液相色谱仪和 3 根色谱柱,按“2.1.1”中的色谱条件测定,以质量浓度 (X) 对峰面积 (Y) 进行线性回归,并按斜率法计算出各杂质相对于噻吗洛尔的校正因子。除噻吗洛尔杂质 E 不稳定,配制成溶液后较快降解,无法计算校正因子外,噻吗洛尔和其他各杂质在测定浓度范围内线性良好,结果见表 2。

2.4.3 精密度试验 取“2.2.2”中配制的对照溶液 $5 \mu\text{L}$,连续进样 6 次,噻吗洛尔峰峰面积的 $\text{RSD} (n = 6)$ 为 1.2%,精密度良好。

2.4.4 重复性试验 按“2.2”中方法制备 6 份同一批次 (Y1909001) 的供试品溶液,采用液相色谱仪,分别测定有关物质,结果见表 3,表明重复性良好。

2.4.5 定量限与检测限 取“2.2”中配制的马来酸噻吗洛尔对照品储备液,用溶剂逐级稀释,注入 Agilent 液相色谱仪,采用 HPLC-UV 测定,定量限为 $0.05 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} (S/N \approx 10, 0.001\%)$,检测限为 $0.015 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1} (S/N \approx 3, 0.0003\%)$ 。

表 2 线性及校正因子考察结果

Tab. 2 Results of regression equations and correction factors

名称 (name)	线性回归方程和校正因子(liner regression equation and correction factor)		
	Thermo3000 + ACE C ₁₈ -1	SHIMADAZU + ACE C ₁₈ -2	Agilent + UltimateC ₁₈
噻吗洛尔(timolol)	$Y = 9\ 727.23X + 641.94, r = 1.000$	$Y = 13\ 358.81X + 733.206\ 1, r = 1.000$	$Y = 13\ 204.28X + 7\ 310.89, r = 1.000$
噻吗洛尔杂质 F (timolol impurity F)	$Y = 10\ 407.60X + 759.32, r = 1.000, 0.93$	$Y = 14\ 151.91\ X - 50.14, r = 1.000, 0.94$	$Y = 14\ 324.46X + 1\ 080.70, r = 1.000, 0.92$
噻吗洛尔杂质 B (timolol impurity B)	$Y = 9\ 253.72X + 1\ 324.12, r = 1.000\ 0, 1.05$	$Y = 12\ 857.39X + 1\ 153.92, r = 1.000, 1.04$	$Y = 12\ 942.35X + 1\ 174.13, r = 1.000, 1.02$
噻吗洛尔杂质 C (timolol impurity C)	$Y = 10\ 806.51X + 2\ 055.63, r = 1.000, 0.90$	$Y = 15\ 061.58\ X - 322.11, r = 1.000, 0.89$	$Y = 14\ 981.34X + 3\ 465.90, r = 1.000, 0.88$
噻吗洛尔杂质 D (timolol impurity D)	$Y = 18\ 192.08X + 1\ 741.81, r = 1.000, 0.53$	$Y = 25\ 095.73X + 1\ 198.45, r = 1.000, 0.53$	$Y = 25\ 198.09X + 1\ 345.31, r = 1.000, 0.52$

表 3 重复性试验结果 (%)

Tab. 3 Results of repeatability test

噻吗洛尔杂质 D (timolol impurity D)	噻吗洛尔杂质 E (timolol impurity E)	噻吗洛尔杂质 B (timolol impurity B)	噻吗洛尔杂质 F (timolol impurity F)	噻吗洛尔杂质 C (timolol impurity)	最大未知杂质 (unspecified impurity)	总杂质 (total impurities)
0.001	0.002	0.002	/ *	0.01	0.001	0.02
0.001	0.002	0.001	/	0.01	0.001	0.02
0.001	0.002	0.002	/	0.01	0.002	0.02
0.001	0.002	0.002	/	0.01	0.001	0.02
0.001	0.002	0.001	/	0.01	0.001	0.02
0.001	0.002	0.002	/	0.01	0.002	0.02

注 (note): “*”为小于检测限 0.000 3% (means less than the LOD 0.000 3%)

2.4.6 溶液稳定性 取“2.2”中配制的供试品溶液和系统适用性溶液,室温放置 0、2、4、6、8、10 和 12 h 后,分别进样测定,噻吗洛尔杂质 E 峰面积随放置时间增加明显减少,噻吗洛尔峰和其他杂质峰面积未发生明显变化,提示供试品溶液和系统适用性溶液

均应临用新制。

2.5 样品测定结果

取各批次样品,按“2.2”项下方法配制供试品溶液,按“2.1.1”项下的色谱条件采用 Agilent 液相色谱仪测定,结果见表 4。

表 4 有关物质测定结果

Tab. 4 Results of related substances test

批号 (batch No.)	含量(content)/%						
	噻吗洛尔杂质 D (timolol impurity D)	噻吗洛尔杂质 E (timolol impurity E)	噻吗洛尔杂质 B (timolol impurity B)	噻吗洛尔杂质 F (timolol impurity F)	噻吗洛尔杂质 C (timolol impurity C)	最大未知 (unspecified impurity)	总杂 (total impurities)
201910001	0.003	0.000 8	0.000 4	0.001	0.01	0.000 5	0.02
201910002	0.003	0.000 9	0.000 6	0.001	0.02	0.000 4	0.03
201811001	0.002	0.000 5	0.001	0.002	0.03	0.000 6	0.03
Y1909001	0.001	0.002	0.002	/ *	0.01	0.001	0.02
Y1909002	0.001	0.007	0.003	/	0.004	0.001	0.02
Y1910003	0.001	0.008	0.006	/	0.008	0.001	0.02
19030711	0.001	/	0.009	0.003	0.004	0.09	0.11
2020030	0.002	/	0.01	/	0.02	0.09	0.12

注 (note): “*”为 < 检测限 0.000 3% (means less than the LOD 0.000 3%)


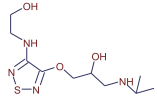
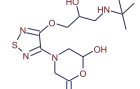
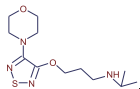


2.6 未知杂质的分析

除“2.3”中涉及的已知杂质外,在马来酸噻吗洛尔降解试验及样品测定中还检出了另外6个未知杂质。采用“2.1”项下的色谱和质谱条件,正负离子切换扫描模式,根据一级质谱的母离子准确 m/z 和二

级碎片 m/z ,结合裂解规律、主成分结构、生产工艺和相关文献,对未知杂质进行分析。各未知杂质的一二级质谱数据和推测的化学结构见表5。其中杂质1~3、5、6 见于文献报道^[1,9-16],部分母离子或碎片离子与文献一致。

表5 未知杂质的质谱数据和推测结构

Tab.5 The mass spectrum data and probable chemical structure of the unknown related substances

编号 (No.)	检出样品 (sample)	t_R / min	离子式 (ion formula) [M+H] ⁺	推测结构式 (estimate chemical structure)	理论值 (theoretical value) m/z	实测值 (measured value) m/z	主要碎片离子 (main fragmentation ion) m/z	偏差 (derivation)/ $\times 10^6$
1	系统适用性溶液 (system suitability solution)	4.1	$C_6H_9N_3O_3S + H^+$		204.043 7	204.043 7**	186.033 4, 160.017 0, 113.070 9** ,69.044 8**	0
2	供试品溶液 (test solution)	6.2	$C_{11}H_{22}N_4O_3S + H^+$		291.148 5	291.148 5**	235.085 9, 162.033 2, 144.022 7,74.060 1	0
3	供试品溶液 (test solution)	7.7	$C_{13}H_{22}N_4O_5S + H^+$		347.138 4	347.138 2**	291.075 5, 245.070 1, 172.017 5,74.060 0	1
4	供试品溶液 (test solution)	12.9	$C_{13}H_{24}N_4O_2S + H^+$		301.169 3	301.169 3	245.106 6, 228.080 1, 188.048 8,58.065 1	0
5	供试品溶液 (test solution)	21.7	$C_7H_{11}N_3O_2S + H^+$		202.064 5	202.064 3**	184.053 7, 158.038 2, 143.014 6	1
6	系统适用性溶液 (system suitability solution)	30.6	$C_{10}H_{17}N_3O_2S + H^+$		244.111 4	244.111 1	188.048 8, 160.017 4, 144.022 6,68.049 5	1

注 (note): “*”其中质量偏差为理论值与各溶液测定结果的偏差 (mass deviation between the test solutions and the standard solutions); “**”为与文献一致的母离子或碎片离子 (the parent ions or the fragment ions were consistent with the literature)

未知杂质1的保留时间约为4.1 min,一级质谱在正负离子模式下母离子精确 m/z 分别为204.043 7和202.028 1,推测为4-(吗啉基-4-基)-1,2,5-噻二唑-3-(2-氢)-1-氧,为噻吗洛尔中的吗啉基噻二唑基团与叔丁氨基丙醇基团断裂后吗啉环上的氧化产物,二级碎片与文献报道一致^[9]。BP 2021 收录了该杂质并命名为噻吗洛尔杂质G,未进行单独控制^[5]。正离子模式下二级碎片与推测的裂解途径一致,见图7。

未知杂质2的保留时间约为6.2 min,一级质谱在正离子模式下母离子的精确 m/z 为291.148 5,推测为1-(1,1-二甲乙氨基)-3-{[4-(2-羟乙

胺基)-1,2,5-噻二唑-3-基]氧}-2-丙醇,为噻吗洛尔的吗啉环断裂产生的杂质,文献报道其为马来酸噻吗洛尔在酸性或光照条件下产生的降解杂质^[10-11],亦为其代谢产物之一,口服后可在尿液中检出, β 受体阻断活性约为马来酸噻吗洛尔的七分之一^[1],正离子模式下的二级碎片与推测的裂解途径一致,见图8。

未知杂质3的保留时间约为7.7 min,一级质谱在正离子模式下母离子精确 m/z 为347.138 2,推测为噻吗洛尔的吗啉环上发生氧化产生的杂质,有文献报道其为马来酸噻吗洛尔的代谢产物之一^[16],正离子模式下二级碎片与推测的裂解途径一致,见图9。

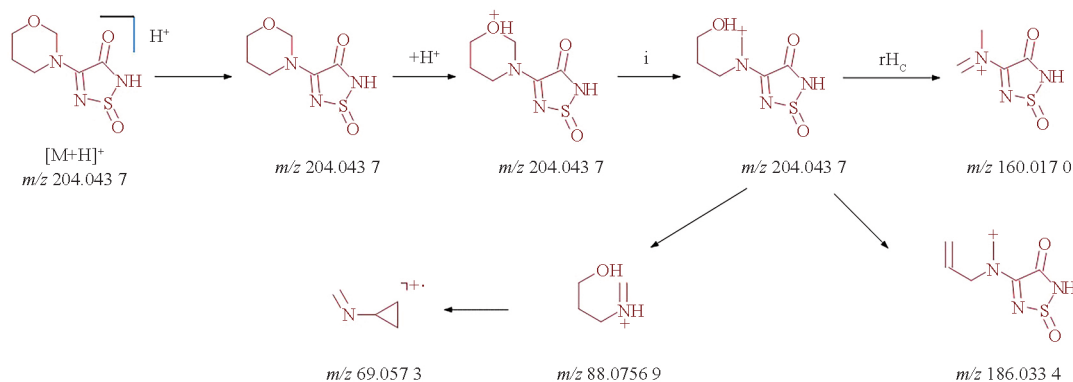


图7 未知杂质1的推测裂解途径

Fig. 7 The Possible fragmentation pathways of unknown impurity 1

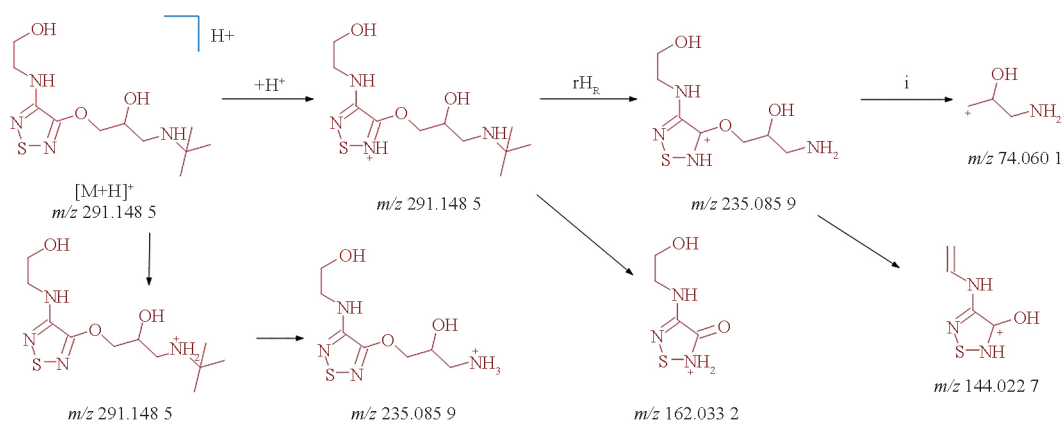


图8 未知杂质2的推测裂解途径

Fig. 8 Possible fragmentation pathways of unknown impurity 2

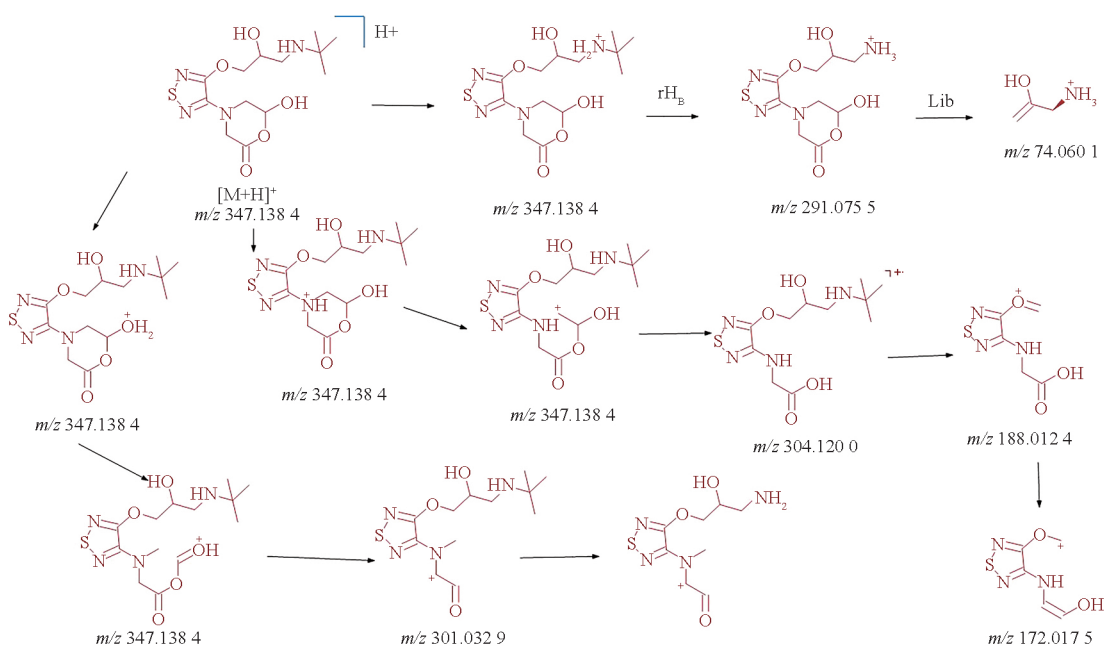


图9 未知杂质3的推测裂解途径

Fig. 9 Possible fragmentation pathways of unknown impurity 3

未知杂质4的保留时间约为12.9 min,一级质谱在正离子模式下母离子精确质荷比为301.169 3,推

测为噻吗洛尔的失去1个醇羟基产生的杂质,正离子模式下二级碎片与推测的裂解途径一致,见图10。

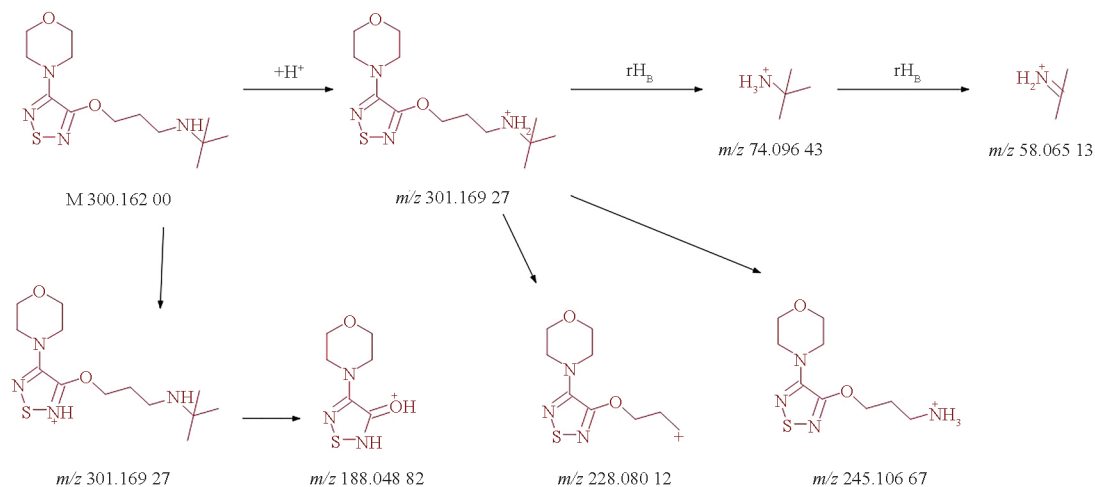


图10 未知杂质4的推测裂解途径

Fig. 10 Possible fragmentation pathways of unknown impurity 4

未知杂质5的保留时间约为21.7 min,一级质谱在正离子模式下母离子精确 m/z 为202.064 3,推测为4-(4-甲氧基-1,2,5-噻二唑-3-基)吗啉,

由3-氯-4-吗啉基-1,3,5-噻二唑在叔丁醇基的作用下发生甲基化产生^[14],正离子模式下二级碎片与推测的裂解途径一致,见图11。

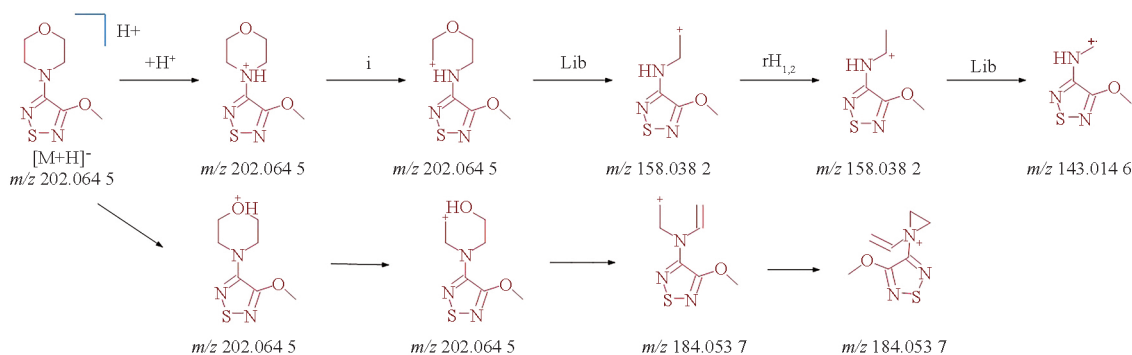


图11 未知杂质5的可能裂解途径

Fig. 11 Possible fragmentation pathways of unknown impurity 5

未知杂质6的保留时间约为30.6 min,一级质谱在正离子模式下母离子精确 m/z 为244.111 4,推测为3-吗啉基-4-(1,1-二甲基乙氨基)-1,2,5-噻二唑,由噻吗洛尔侧链断裂后与叔丁醇基结合产生,文献报道其为马来酸噻吗洛尔的工艺副产物之一^[15],正离子模式下二级碎片与推测的裂解途径一致,见图12。

与主环缩合得到左旋体产物^[7]。经前期调研,目前国内的生产企业均采用第2种,合成方法是以(S)-(-)-3-叔丁胺基-1,2-丙二醇、苯甲醛和3-氯-4-吗啉基-1,2,5-噻二唑为起始原料,在叔丁醇钾存在下反应后,与马来酸成盐制得,原料杂质谱基本一致。除噻吗洛尔杂质F即起始物料3-氯-4-吗啉基-1,2,5-噻二唑外,现行国外药典控制的噻吗洛尔杂质B、D、E和C均为工艺杂质,可在选定条件下破坏产生。经与国外购买到的标准物质进行对比确认,破坏溶液可用于杂质识别和系统

3 讨论

马来酸噻吗洛尔的合成有2种方法,1种为合成消旋体再拆分,另1种是预先合成旋光性侧链,然后

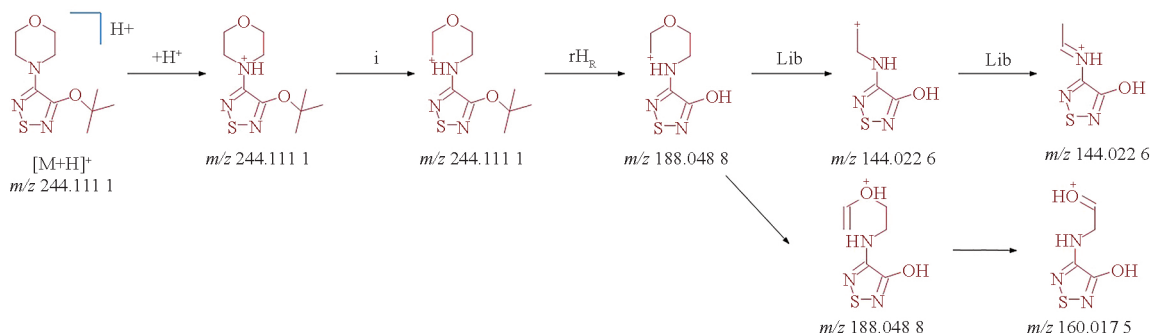


图 12 未知杂质 6 的可能裂解途径

Fig. 12 Possible fragmentation pathways of unknown impurity 6

适用性的控制,方法学试验结果符合液相色谱法要求,各已知杂质在原料和制剂中均有不同程度的检出;其他未知杂质含量较小,仅通过 UPLC - Q/Orbitrap 的一二级质谱分析结果进行结构推测,后续如出现较大的未知杂质,可佐以其他手段进行进一步结构确证。

本文基于 UPLC - Q/Orbitrap 建立了可用于马来酸噻吗洛尔质量控制的有关物质检测方法,无需购买对照品,即可对目前国外药典控制的各已知杂质进行识别和测定。建立的方法可同时用于普通液相的紫外检测器和液质联用仪的质谱检测器,便于方法的推广和新出现杂质的鉴定,亦可应用于马来酸噻吗洛尔滴眼液的有关物质检查。

参考文献

- [1] MAZZO DJ, LOPER AE. Timolol maleate[J]. Anal Profiles Drug Subst, 1987, 16: 641
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典临床用药须知[M]. 2020年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2022: 328
Chinese Pharmacopoeia Commission. Ch. P Clinical Medication instruction[M]. 2020 Ed. Beijing: Chinese Medical Science Press, 2017: 245
- [3] 中华人民共和国药典 2020年版. 二部[S]. 2020: 73
ChP 2020. Vol II[S]. 2020: 73
- [4] USP - NF [S/OL]. Official as of 01 - May - 2020. DOI: https://doi.org/10.31003/USPNF_M83650_06_01
- [5] BP 2023 [S]. 2023:1164
- [6] 贺美莲, 郭常川, 石峰, 等. Orbitrap 高分辨质谱技术在药物分析领域中的应用进展[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(1): 105
HE ML, GUO CC, SHI F, et al. Application progress of Orbitrap high resolution mass spectrometry in the field of pharmaceutical analysis[J]. Chin J Pharm Anal, 2019, 39(1): 105
- [7] 杨彦涛, 李卓伦, 王松, 等. UHPLC - Q - Orbitrap HRMS 法鉴定盐酸阿扎司琼中的有关物质[J]. 药物分析杂志, 2019, 39(9): 1625
YANG YT, LI ZL, WANG S, et al. Identification of related substances in azasetron hydrochloride by UHPLC - Q - Orbitrap HRMS[J]. Chin J Pharm Anal, 2019, 39(9): 1625
- [8] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典二部注释[M]. 2015年版. 北京: 中国医药科技出版社, 2019: 61
Chinese Pharmacopoeia Commission. ChP Vol. II Notes[M]. 2015 Ed. Beijing: Chinese Medical Science Press, 2019: 61
- [9] 刘荷英, 程奇珍, 周敏, 等. 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[J]. 中国药房, 2018, 29(16): 2208
LIU HY, CHENG QZ, ZHOU M, et al. Determination of related substance and impurities qualitative study of timolol maleate eye drops[J]. China Pharm, 2018, 29(16): 2208
- [10] DEVRUKHAKAR PS, SHANKAR MS, SHANKAR G, et al. Proposal of degradation pathway with toxicity prediction for hydrolytic and photolytic degradation products of timolol[J]. J Pharm Biomed Anal, 2018, 154: 7
- [11] CHEN Y, LIANG Q, ZHOU D, et al. Photodegradation Kinetics, products and mechanism of timolol under simulated sunlight[J]. J Hazard Mater, 2013, 252 - 253: 220
- [12] MAZZO DJ, SNYDER PA. High - performance liquid chromatography of timolol and potential degradates on dynamically modified silica[J]. J Chromatogr, 1988, 438(1): 85
- [13] VOLOTINEN M, HAKKOLA J, PELKONEN O, et al. Metabolism of ophthalmic timolol: new aspects of an old drug[J]. Basic Clin Pharm Toxicol, 2011, 108(5): 297
- [14] LACROIX M, DAWSON BA, SEARS RW, et al. HPLC and NMR methods for the quantitation of the (R) - enantiomer in (S) - timolol maleate drug raw materials[J]. Chirality, 1994, 6(6): 484
- [15] CHEN Y, WILLIS MC. An aryne - based route to substituted benzothiazoles[J]. Org Lett, 2015, 17(19): 4786
- [16] VOLOTINEN M, KORJAMO T, TOLONEN A, et al. Effects of selective serotonin reuptake inhibitors on timolol metabolism in human liver microsomes and cryo - preserved hepatocytes[J]. Basic Clin Pharm Toxicol, 2010, 106(4): 302

(本文于 2024 年 1 月 19 日修改回)