

LC-HRMS 对酒石酸溴莫尼定滴眼液中潜在降解杂质结构鉴定

汪均明¹ 范时根² 徐进² 刘峰^{1*}

1 四川省药品检验研究院/国家药品监督管理局药物制剂体内外相关性技术研究重点实验室

2 四川智强医药科技开发有限公司

DOI:10.12238/fcmr.v7i1.12511

[摘要] 目的: 建立LC-HRMS对酒石酸溴莫尼定滴眼液中潜在降解杂质结构确认方法。方法: 采用液相色谱仪-馏分收集器实现在线除盐、富集降解杂质; 在正离子模式下进行质谱检测, 采用LC-HRMS对富集成功的降解杂质进行结构分析。结果: 通过对降解杂质分子量分析并结合酒石酸溴莫尼定滴眼液工艺路线, 确证了未知杂质分别为溴莫尼定咪唑啉位N-氧化杂质、溴莫尼定去溴二聚体杂质、二聚体杂质。结论: 本研究建立LC-HRMS对酒石酸溴莫尼定滴眼液中潜在降解杂质结构鉴定方法, 并结合分子量和合成工艺确证了未知杂质的结构, 为其滴眼液的工艺改进和质量控制提供依据。

[关键词] LC-HRMS; 酒石酸溴莫尼定滴眼液; 降解杂质; 结构鉴定

中图分类号: R917 文献标识码: A

Structural Confirmation of Potential Degradation Impurities in Brimonidine Tartrate Eye Drops by LC-HRMS.

Junming Wang¹ Shigen Fan² Jin Xu² Feng Liu^{1*}

1 Sichuan Institute for Drug Control/NMPA Key Laboratory for Technical Research on Drug Products in Vitro and in Vivo Correlation

2 Sichuan Zhiqiang Pharmaceutical Technology Development Co., Ltd.

[Abstract] Objective To establish a method for structural confirmation of potential degradation impurities in Brimonidine Tartrate Eye Drops by LC-HRMS. Methods The online desalting and enrichment of degradation impurities were achieved by using a liquid chromatograph - fraction collector; mass spectrometry detection was carried out in positive ion mode, and the structure analysis of the successfully enriched degradation impurities was carried out by LC-HRMS. Results Through the molecular weight analysis of degradation impurities and combined with the Brimonidine Tartrate Eye Drops production process route, the unknown impurities were identified as brimonidine imidazoline N - oxidation impurity, brimonidine debromo - dimer impurity and dimer impurity respectively. Conclusion In this study, a method for structural identification of potential degradation impurities in brimonidine tartrate eye drops by LC-HRMS was established, and the structures of unknown impurities were confirmed by combining molecular weight and synthesis process, which provides a basis for the process improvement and quality control of the eye drops.

[Key words] LC-HRMS; Brimonidine Tartrate Eye Drops; Degradation impurities; Structural confirmation

前言

酒石酸溴莫尼定滴眼液(Brimonidine Tartrate Eye Drops), 是一种高选择性 α_2 肾上腺素能受体激动剂, 适用于降低开角型青光眼及高血压患者的眼压, 其不良反应报道较少, 临床应用广泛^[1-6]。

目前报道主要是关于检测酒石酸溴莫尼定含量的液相方法^[7-8], 针对酒石酸溴莫尼定滴眼液中已知杂质的检测方法报道较少, 四川智强医药科技开发有限公司发表了一篇关于一种酒石酸溴莫尼定滴眼液的质量检测方法的专利, 其主要是采用液

相方法对10种已知杂质含量进行检测。本次研究就是在此篇专利的基础上, 采用高分辨质谱仪(LC-HRMS)对酒石酸溴莫尼定滴眼液中潜在降解杂质(光降解杂质、氧化降解杂质)进行结构鉴定, 并根据酒石酸溴莫尼定合成路线、分子结构、质谱裂解规律等进行定性分析, 推测出目标杂质结构, 为酒石酸溴莫尼定原料药及制剂的工艺改进和质量控制提供依据。

1 仪器与试剂

Vanquish Core高效液相色谱仪(美国赛默飞); 馏分收集器(美国赛默飞); Vanquish Core Q Exactive Plus高分辨液质联

用仪(美国赛默飞)。

水为超纯水(赛多利斯arrium pro),乙腈为色谱纯(Fisher)、甲酸为质谱纯(Fisher)、甲酸铵为质谱纯(Fisher),甲醇为质谱纯(Fisher),30%过氧化氢(AR,成都科隆),庚烷磺酸钠(AR,成都科隆),三乙胺(AR,成都科隆)、冰醋酸(AR,成都科隆)。

色谱柱:Waters Xbridge C18,4.6mm×250mm,5 μm;Inertsil ODS-3 C18,4.6mm×250mm,5 μm;Agilent Poroshell 120 EC-C18,2.1mm×50mm,2.7 μm。

酒石酸溴莫尼定滴眼液仿制制剂(四川智强医药科技有限公司,批号:221103);酒石酸溴莫尼定滴眼液参比制剂(Allergan Sales LLC,批号:T5356)。

2 样品制备

氧化降解样品制备:取酒石酸溴莫尼定滴眼液(批号:221103)3ml,置25ml量瓶中,加入1ml 30%过氧化氢,60℃水浴条件下,放置5小时,取出放冷,用水稀释至刻度。

光照降解样品制备:精密量取酒石酸溴莫尼定滴眼液(裸瓶,照度4500Lx±500Lx,近紫外能量100 μw/cm²,25℃放置17天)3ml,置25ml量瓶中,用水稀释至刻度。

参比制剂18月样品制备:精密量取本品(批号:T5356)3ml,置25ml量瓶中,用水稀释至刻度。

3 实验部分

3.1 液相方法重现

3.1.1 色谱条件。(1) 色谱条件1。以十八烷基硅烷键合硅胶(Waters Xbridge C18,4.6mm×250mm,5 μm)为色谱柱,以含庚烷磺酸钠的甲醇水溶液(称取庚烷磺酸钠2.6g,加甲醇265ml、三乙胺2.5ml、冰醋酸7.5ml,再加水溶解并稀释至1000ml)为流动相;柱温30℃;流速为每分钟1.0ml;检测波长为264nm;进样体积40 μl。

(2) 色谱条件2。以十八烷基硅烷键合硅胶(Inertsil ODS-3 C18,4.6mm×250mm,5 μm)为色谱柱;以含庚烷磺酸钠的甲醇水溶液(称取庚烷磺酸钠2.6g,加甲醇445ml、水545ml、三乙胺2.5ml、冰醋酸7.5ml)为流动相;柱温30℃;流速为每分钟1.0ml;检测波长为264nm;进样体积40 μl。

3.1.2 结果。(1) 结果1。取氧化降解样品和光照降解样品,按色谱条件1,注入液相色谱仪,色谱见图1~2。

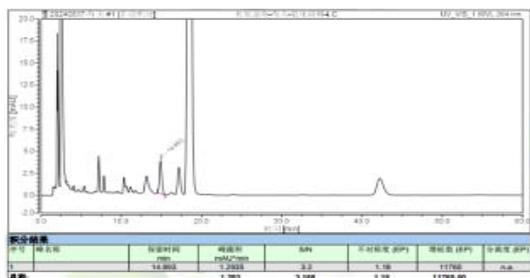


图1 色谱条件1下氧化降解样品中未知杂质(X₁)

结果表明:采用色谱条件1方法进样分析,样品中目标杂质出峰时间和顺序与企业提供的图谱基本一致。

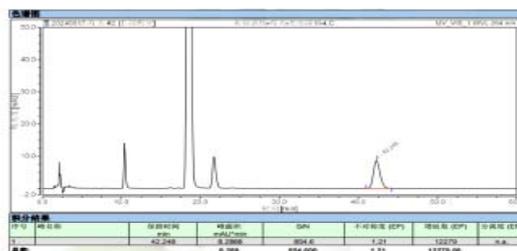


图2 色谱条件1下光照降解样品未知杂质(X₂)

(2) 结果2。取光照降解样品、参比制剂18月样品,按色谱条件2,注入液相色谱仪,色谱见图3~4。

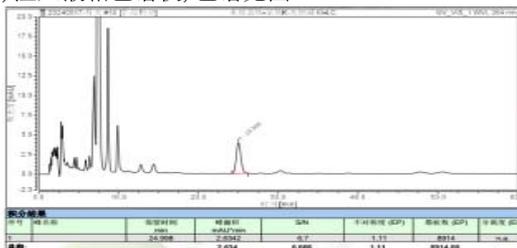


图3 色谱条件2下光照降解样品未知杂质(X₃)

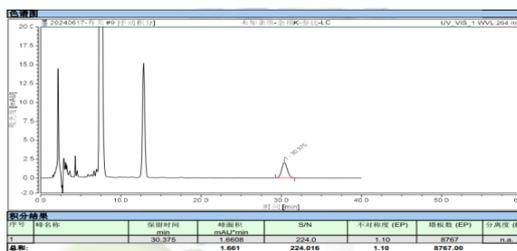


图4 色谱条件2下参比制剂18月样品未知杂质(X₄)

结果表明:采用色谱条件2方法进样分析,样品中目标杂质出峰时间和顺序与企业提供的图谱基本一致。

3.2 在线富集和杂质重现

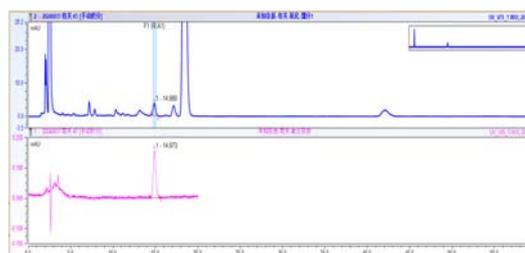


图5 氧化降解未知杂质(X₁)重现比对色谱图

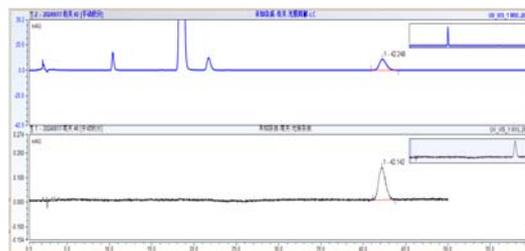


图6 光照降解未知杂质(X₂)重现比对色谱图

3.2.1 结果1。馏分收集器的相关参数:收集方式:按时间收集,延迟体积:10.1 μl;收集周期:30s;收集进样器温度:20

℃; 收集阀模式: 中断。氧化降解未知杂质(X₁)收集时间为14.7~15.1min; 光照降解未知杂质(X₂)收集时间为41.8~42.8min。

其余色谱条件同“色谱条件1”项下。

取在线富集的氧化降解未知杂质(X₁)和光照降解未知杂质(X₂)按上述色谱条件,注入液相色谱仪,色谱见图5~6。

结果表明:在色谱条件1项下,氧化降解杂质(X₁)和光照降解杂质(X₂)在线富集基本成功,且重现率极高。

3.2.2结果2。馏分收集器的相关参数:收集方式:按时间收集,延迟体积:10.1 μl;收集进样器温度:20℃;收集周期:50s;收集阀模式:中断。光照降解未知杂质(X₃)

收集时间为24.7~25.3min;参比制剂18月未知杂质(X₄)收集时间为30.0~40.9min;其余色谱条件同“色谱条件2”项下。

取在线富集的光照降解未知杂质(X₃)和参比制剂18月未知杂质(X₄),按上述色谱条件,注入液相色谱仪,色谱见图7~8。

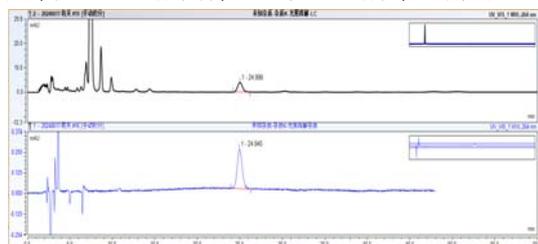


图7 光照降解未知杂质(X₃)重现比对色谱图

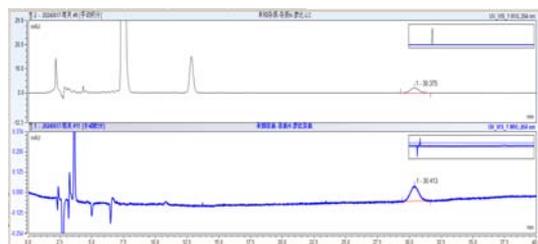


图8 参比制剂18月未知杂质(X₄)重现比对色谱图

结果表明:在色谱条件2项下,光照降解未知杂质(X₃)和参比制剂18月未知杂质(X₄)在线富集基本成功,且重现率极高。

3.3杂质的结构确认

3.3.1供试品溶液。上述富集成功的未知杂质X₁、X₂、X₃、X₄溶液。

3.3.2液相条件。色谱柱为Agilent Poroshell 120 EC-C18, 2.1mm×50mm, 2.7 μm;柱温30℃;流速为每分钟0.8ml;检测波长为264nm;进样体积40 μl, DAD范围为200~400nm。以0.1%甲酸-0.005mol/L甲酸铵溶液为流动相A;乙腈为流动相B梯度洗脱,洗脱程序:0~5min时,B为3%;5~10min时,B为3%~50%;10~15min时,B为50%;15~15.1min时,B为50%~3%;15.1~20min时,B为3%。

3.3.3质谱条件。检测模式:正离子;扫描范围:60~900Da;碰撞能:20、40、60;鞘气流量35;辅助气体流量15;喷雾电压3.80kV;毛细管温度320℃;辅助气体加热器温度350℃;AGC target:3e6。

3.3.4结果。取上述富集成功的未知杂质X₁、X₂、X₃、X₄溶液,按“3.3.2液相条件”和“3.3.3质谱条件”进样分析,注入

高分辨液质联用仪,并根据API合成路线、分子结构、裂解规律和相关文献报道等进行定性分析,推测出目标杂质结构。

(1)未知杂质(X₁)。LC-HRMS谱图在RT 2.61~2.68min下有M/Z峰308.0110和310.0088。为M和M+2峰,同位素峰比例为1:1,含有1个溴原子,见图9。

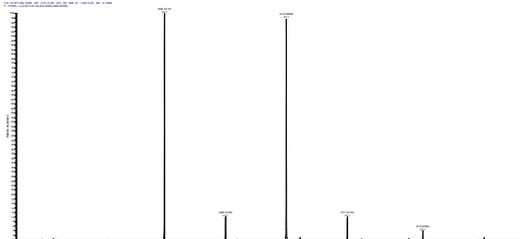
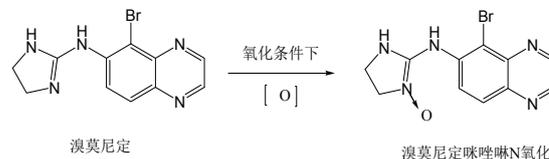
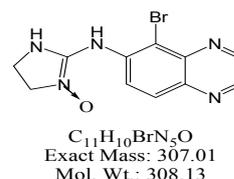


图9 未知杂质(X₁)质谱图

机理分析:M/Z峰308对应可能的化学结构式为:溴莫尼定咪唑啉位N-氧化杂质,生成机理推测如下:



故氧化降解未知杂质X₁结构式如下:



(2)未知杂质(X₂)。LC-HRMS谱图在RT5.94~6.01min下有M/Z峰310.03和312.02,为M和M+2,同位素峰比例为1:1,含有1个溴原子,见图10。

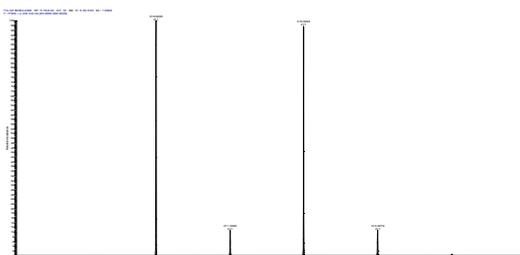
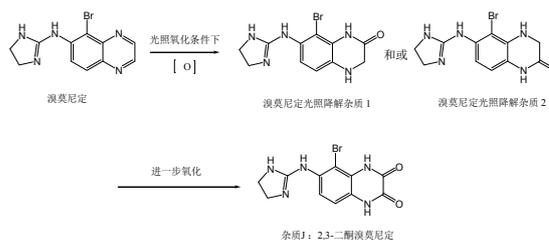
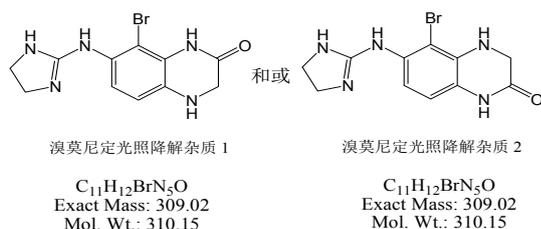


图10 光照降解未知杂质(X₂)质谱图

机理分析:该杂质为溴莫尼定的光照氧化杂质(溴莫尼定光照降解杂质1、溴莫尼定光照降解杂质2),可进一步氧化生成杂质J。生成机理推测如下:



故光照降解未知杂质 X_2 结构式如下:



(3) 未知杂质(X_3)。LC-HRMS谱图在RT5.52~5.92min下有M/Z峰, 503.0991, 505.0970为M和M+2峰, 经分析该结构含有一个溴原子, 见图11。

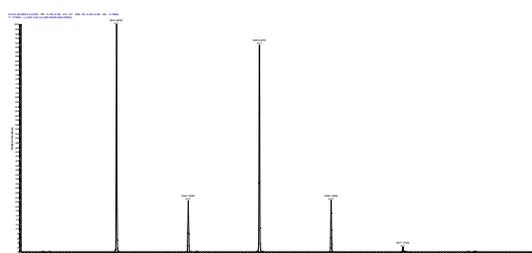
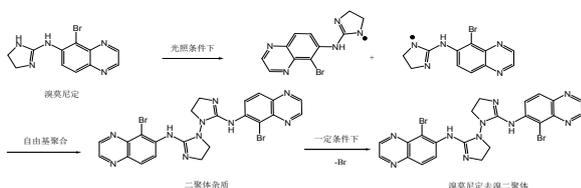
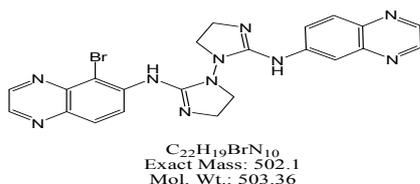


图11 光照降解未知杂质(X_3)质谱图

机理分析: 该杂质的产生过程是两分子溴莫尼定在光照降解条件下发生聚合反应生成二聚体, 同时脱去一个溴原子。生成机理推测如下:



故光照降解未知杂质(X_3)结构式如下:



(4) 参比制剂未知杂质(X_4)。LC-HRMS谱图在RT6.01~6.30min下有M/Z峰581.01、583.01、585.00。其中581.01和585.00为M和M+4峰, 同位素峰比例为1:1, 分析含有两个溴原子, 见图12。

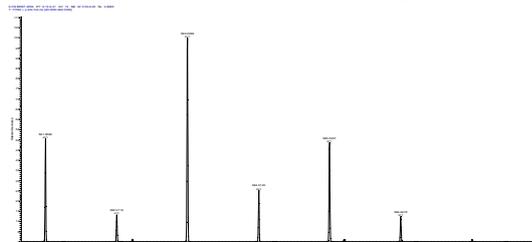
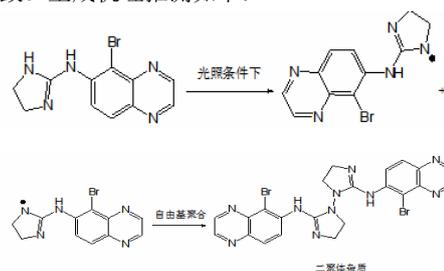


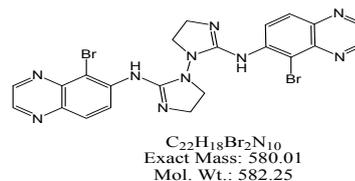
图12 参比制剂未知杂质(X_4)质谱图

机理分析: 该杂质的产生过程是两分子溴莫尼定在一定条件下(高温/光照)条件下发生聚合反应生成二聚体, 与日本IF文

件报道一致。生成机理推测如下:



故参比制剂未知杂质(X_4)结构式如下:



4 结论

本研究基于高分辨质谱(LC-HRMS)技术, 通过对酒石酸溴莫尼定滴眼液的合成路线、分子结构特征及质谱裂解规律的系统分析, 成功鉴定了其滴眼液中氧化降解杂质 X_1 、光降解杂质 X_2 和 X_3 以及参比制剂中未知杂质 X_4 的化学结构。该发现从分子层面阐明了杂质的来源与生成机制, 为酒石酸溴莫尼定原料药及制剂的工艺改进(如反应条件控制、避光包装设计)和质量控制提供依据。

【参考文献】

- [1]车伟,曹明超.酒石酸溴莫尼定滴眼液、盐酸卡替洛尔滴眼液治疗原发性开角型青光眼的效果[J].中国卫生标准管理,2023,14(18):126-130.
- [2]李伟栋.酒石酸溴莫尼定滴眼液抑菌剂苯扎溴铵剂量筛选研究[J].中国医药工业杂志,2019,50(11):1324-1328.
- [3]沈念慈,武蓉,朱敏.酒石酸溴莫尼定滴眼液致眼表毒性反应原因分析[J].临床误诊误治,2010,26(8):774-775.
- [4]彭洁,罗谦,程依琰,等.酒石酸溴莫尼定0.15%滴眼液治疗开角型青光眼及高眼压症的临床研究[J].华眼外伤职业眼病杂志,2014,36(8):569-573.
- [5]王晓瑛,陈珣,周行涛.0.2%酒石酸溴莫尼定滴眼液对改善ICL V4c植入术后眩光及其视觉质量的研究[C].中华医学会第二十二次全国眼科学术会议论文集.2017:1-1.
- [6]练海东,万慧娟,章磊,等.曲伏前列素滴眼液与溴莫尼定滴眼液联合治疗对开角型青光眼患者效果观察[J].医学理论与实践,2024,37(13):2250-2252.
- [7]武洪英,王文义.HPLC法测定酒石酸溴莫尼定滴眼液的含量[J].齐鲁药事,2008,27(10):592-593.
- [8]黄翠云,陈静,张凤,等.HPLC-MS/MS测定酒石酸溴莫尼定滴眼液的含量[J].海峡药学,2020,32(2):52-54.

作者简介:

汪均明(1990--)女,汉族,重庆奉节人,硕士研究生,制药工程师。研究方向:药品检验及研发工作。