

LC-Q-TOF/MS 技术鉴定阿替洛尔中氨基醇类有关物质

齐文竹, 邹桐, 管艺同, 宋敏, 杭太俊*

(中国药科大学药学院药物分析系, 南京 210009)

摘要 研究鉴定阿替洛尔中氨基醇类有关物质。阿替洛尔及其强制降解样品中的有关物质采用 9-芴甲氧羰酰氯柱前衍生化, 以 Inertsil ODS-SP (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 甲醇-乙酸铵缓冲液为流动相进行梯度洗脱分离, 电喷雾正离子化-高分辨 Q-TOF/MS 测定这些有关物质衍生物的母离子及碎片离子的准确质量和元素组成, 经光谱解析和合成路线分析鉴定各有关物质结构。所建立的方法, 阿替洛尔及其氨基醇类有关物质均分离良好, 共检测并鉴定出 14 个杂质峰, 其中 12 个为有关物质, 2 个为衍生化反应副产物。建立的 LC-MS 方法可为阿替洛尔有关物质检查和质量控制提供参考依据。

关键词 阿替洛尔; 氨基醇类有关物质; 降解产物; 衍生化; LC-Q-TOF/MS; 结构鉴定

中图分类号 R917 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2020)05-0544-12

doi: 10.11665/j.issn.1000-5048.20200506

引用本文 齐文竹, 邹桐, 管艺同, 等. LC-Q-TOF/MS 技术鉴定阿替洛尔中氨基醇类有关物质[J]. 中国药科大学学报, 2020, 51(5): 544 - 555.

Cite this article as: QI Wenzhu, ZOU Tong, GUAN Yitong, *et al.* Identification of amino alcohols related substances of atenolol by LC-Q-TOF/MS[J]. *J China Pharm Univ*, 2020, 51(5): 544 - 555.

Identification of amino alcohols related substances of atenolol by LC-Q-TOF/MS

QI Wenzhu, ZOU Tong, GUAN Yitong, SONG Min, HANG Taijun*

Department of Pharmaceutical Analysis, School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China

Abstract To identify the amino alcohols related substances in atenolol. The related substances in atenolol and its stressed samples were pre-column derivatized with 9-fluorenylmethyl chloroformate. The separation was carried out on an Inertsil ODS-SP column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) with linear gradient elution by methanol-ammonium acetate solution as the mobile phases. Electrospray positive ionization high-resolution Q-TOF/MS was used for the determination of the accurate masses and elemental compositions of the parent and fragment ions of these related substance derivatives. The structures of all the detected substances were identified by spectral analysis and synthetic analysis. Under the established conditions, atenolol and its amino alcohols related substances were well separated, and a total of 14 impurity peaks were detected and identified, of which 12 were related substances and 2 were derivatization reaction by-products. The established LC-MS method provides a reference for the examination and quality control of atenolol related substances.

Key words atenolol; amino alcohols related substances; degradation products; derivatization; LC-Q-TOF/MS; structure identification

芳基氧丙醇胺是选择性 β-受体拮抗剂类药物的主要结构特征, 其中阿替洛尔、美托洛尔等是治疗高血压、心肌梗死等心血管疾病最为常见的处方药^[1-4]。已有文献报道以阿替洛尔等 β-受体拮抗剂为模型构建不同催化体系, 模拟其经过氧化、光

降解等作用发生的化学或生物降解, 并对降解产物和降解途径进行推测和分析^[5-8]。然而, 由于这类药物的降解杂质中, 除芳基杂质外, 还可能生成紫外吸收弱、极性大的氨基醇类杂质, 并且采用常规的反相液相色谱以及联用质谱技术进行氨基醇

类杂质的直接检测^[9-10]的方法灵敏度低、可靠性差。

本研究对阿替洛尔(4-[3-[(1-甲基乙基)氨基-2-羟基]丙氧基]苯乙酰胺)及其强制降解试验样品中氨基醇类有关物质,建立了9-芴甲氧羰酰氯(FMOC-Cl)柱前衍生化RP-HPLC检查法,反应产物稳定^[11],提高了检测灵敏度^[12],共检出14个杂质峰;并结合电喷雾-四极杆-飞行时间串联质谱法(ESI-Q-TOF/MS)对它们进行高分辨质谱分析与结构鉴定,同时采集不同碰撞解离能数据信息的能力^[13-14],全面分析杂质结构,为阿替洛尔中无紫外响应和含量较低的有关物质检查提供参考依据。

1 材料

1.1 药品与试剂

阿替洛尔(批号:180101,中国食品药品检定研究院);乙酸铵、甲酸(AR级,南京化学试剂股份有限公司);甲醇(CR级,德国Merck公司);去离子水(市售娃哈哈纯净水)。

1.2 仪器

9030 Q-TOF LC/MS液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱仪、LabSolutions软件(日本Shimadzu公司);BS 21S分析天平(德国Sartorius公司)。

2 方法

2.1 色谱条件

采用Inertsil ODS-SP色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm),流动相A为0.05%乙酸铵0.1%甲酸缓冲溶液;流动相B为甲醇,线性梯度洗脱(A:B):0 min(60:40)→30 min(10:90)→40 min(10:90)→41 min(60:40)→45 min(60:40),流速1.0 mL/min,柱温30℃,检测波长265 nm,进样量20 μL。

2.2 质谱条件

电喷雾正离子化(ESI⁺),NaI溶液准确质量校正,高分辨Q-TOF/MS测定,接口电压4.0 kV,雾化气(氮气)流速3.0 L/min,加热气(干空气)流速10.0 L/min,干燥气(氮气)流速10.0 L/min,接口温度300℃。质量数扫描范围 m/z 100~1 000。二级质谱扫描氩气CID能量20~40 eV。

2.3 供试品溶液配制

取阿替洛尔供试品适量,精密称定,加入初始比例流动相溶解并定量稀释制成每毫升约含

0.5 mg的溶液,作为供试品溶液。精密量取供试品溶液适量,加入初始比例流动相定量稀释,分别配制成1.0%和0.10%的自身稀释对照溶液。

2.4 强制降解试验溶液配制

取阿替洛尔约5 mg,加4 mol/L盐酸溶液1 mL 40℃水浴放置10 min,加4 mol/L氢氧化钠溶液1 mL 40℃水浴放置20 min,加3%过氧化氢溶液1 mL 40℃水浴放置40 min,置120℃烘箱放置24 h,或加初始比例流动相1 mL溶解后光照(4 500 lx)放置36 h,分别处理后,各加初始比例流动相溶解(酸碱处理溶液先中和)并稀释至10 mL,配制成质量浓度约为0.5 mg/mL的强制降解试验溶液。同时采用空白溶液进行平行对照试验。

2.5 pH 9.0 硼酸盐缓冲溶液配制

取四硼酸钠适量,加水配制成浓度为0.05 mol/L的硼砂溶液,加0.2 mol/L的硼酸溶液调节pH至9.0。

2.6 衍生化反应样品制备

将上述供试品溶液、强制降解试验溶液及强制降解空白溶液调节pH至8.0~9.0,分别精密量取200 μL,置于5 mL离心管中,精密加入pH 9.0硼酸盐缓冲溶液和FMOC-Cl乙腈溶液(8 mg/mL)各600 μL,涡旋1 min后室温静置20 min,加入正己烷1.4 mL涡旋1 min萃取过量的衍生化试剂,弃去上层正己烷并重复萃取1次,加4 mol/L盐酸溶液约15 μL调节pH至3.0~4.0后混匀。

3 结果与讨论

3.1 有关物质检查

阿替洛尔供试品及其各强制降解溶液衍生化反应后的HPLC检查结果见图1。采用自身0.1%对照法估算有关物质含量,并按照相对保留时间顺序对大于0.1%的杂质进行编号和结构鉴定。结果表明,与阿替洛尔相应的主成分峰为**8**,供试品中有关物质含量均未超过0.1%,与合成工艺相关的有关物质在本品的合成过程中能够被有效控制。

强制降解试验样品中,除主成分峰**8**外,共检出14个杂质峰。其中12个为阿替洛尔有关物质;酸破坏和碱破坏产生3个降解杂质(**12**、**14**、**15**,图1-d,e);氧化破坏产生5个降解杂质(**1**、**2**、**3**、**9**、**11**,图1-f);光照破坏产生6个降解杂质(**5**、**6**、**7**、**12**、

14、15,图1-g);高温破坏产生3个降解杂质(13、14、15,图1-h)。另有2个衍生化副产物(4、10)。不同条件下的降解行为有所不同,各有关物质峰均与主峰分离良好。

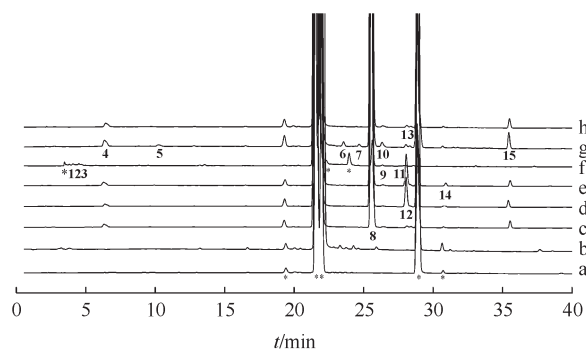


Figure 1 Pre-column derivatization HPLC-UV chromatograms of atenolol test and stressed solutions.

a: Blank; b: 0.1% Reference; c: API; d: Acid; e: Alkaline; f: Oxidation; g: Light; h: High temperature. Peaks 1-15 represent fifteen derivative products; * blank peaks

3.2 有关物质结构鉴定

根据LC-Q-TOF/MS检测得到衍生化后各产物母离子和碎片离子的准确质量和分子式(图2),对比主成分阿替洛尔衍生化后母离子和碎片离子的裂解特征,并结合有机化学反应机制,合理分析氨基醇类有关物质和其他降解产物的元素组成和裂解途径,最终推定各有关物质的结构(图3,表1)。

阿替洛尔的MS/MS特征LC-Q-TOF/MS测得阿替洛尔衍生物8的 $[M+H]^+$ 准确质量为489.237 2,与离子式 $C_{29}H_{33}N_2O_5^+$ 相应,证明阿替洛尔与FMOC-Cl衍生化反应物质的量比为1:1。测得其二级质谱图(图2)中的主要特征碎片离子: m/z 445.247 4($C_{28}H_{33}N_2O_3^+$)、 m/z 293.148 9($C_{15}H_{21}N_2O_4^+$)、 m/z 267.169 8($C_{14}H_{23}N_2O_3^+$)、 m/z 248.127 5($C_{14}H_{18}NO_3^+$)、 m/z 179.085 1($C_{14}H_{11}^+$)和 m/z 145.064 2($C_{10}H_9O^+$),分别与 $[M+H]^+$ 中氨基甲酸酯单元脱去中性分子 CO_2 、脱去9-苄醇、脱去9-苄氧甲酯、脱去9-苄醇和甲酰胺、生成9-苄正离子、以及脱甲酰胺及氨基醇并与苯环环合相应。确证了结构中氨基醇单元的FMOC-酰胺化和苯乙酰胺结构。阿替洛尔衍生物的二级质谱裂解分析(图4),对其他有关物质结构的分析鉴定具有参考意义。

有关物质1:有关物质1、2、3均是阿替洛尔的氧化降解杂质,在反相色谱上的保留很弱,相应结构具有较大的极性。质谱测得1 $[M+H]^+$ 的准确质量为206.080 8,与离子式 $C_{11}H_{12}NO_3^+$ 相应,与阿替洛尔的元素组相比,少 $C_3H_{11}N$,可能与阿替洛尔的氧化脱异丙氨基单元相应,并且在衍生化反应条件下,没有被FMOC-Cl衍生化,所以该杂质在结构中不含有活泼氢烷基氨基团。二级质谱(图2)中测得 m/z 161.059 4($C_{10}H_9O_2^+$)和 m/z 133.064 4

Table 1 Related substances identified in atenolol by LC-Q-TOF/MS

Code No.	RRT*	Parent ion (m/z)	Ion formula	Diff. (10^{-6})	Product ion (m/z)	Origin
1	0.159	206.080 8	$C_{11}H_{12}NO_3^+$	0.34	161, 133, 103, 79, 77	Oxidation
2	0.171	239.102 4	$C_{11}H_{15}N_2O_4^+$	-0.93	206, 189, 176, 161, 131, 107, 77	Oxidation
3	0.175	255.097 6	$C_{11}H_{15}N_2O_5^+$	0.01	210, 190, 176, 152, 145, 131, 107, 104, 91, 77	Oxidation
4	0.280	295.164 5	$C_{15}H_{23}N_2O_4^+$	0.50	277, 267, 260, 232, 190, 173, 162, 144, 102, 100	By-product
5	0.403	266.137 7	$C_{14}H_{20}NO_4^+$	0.58	248, 161, 144, 133, 105, 102, 100	Light
6	0.926	505.231 2	$C_{29}H_{33}N_2O_6^+$	0.21	487, 443, 338, 291, 179, 160, 116	Light
7	0.968	356.184 9	$C_{21}H_{26}NO_4^+$	0.77	179, 160, 134	Light
8(API)	1.000	489.237 2	$C_{29}H_{33}N_2O_5^+$	1.78	445, 293, 267, 248, 179, 145	API
9	1.028	391.164 5	$C_{23}H_{23}N_2O_4^+$	1.68	374, 196, 179, 152, 107	Oxidation
10	1.032	517.233 2	$C_{30}H_{33}N_2O_6^+$	0.30	277, 232, 218, 179, 145, 126	By-product
11	1.091	505.233 2	$C_{29}H_{33}N_2O_6^+$	0.21	487, 283, 265, 223, 206, 190, 179, 165, 145, 131, 114, 107	Oxidation
12(G)	1.095	490.221 1	$C_{29}H_{32}NO_6^+$	1.73	446, 294, 268, 248, 226, 179, 145	Degradant
13	1.102	471.226 9	$C_{29}H_{31}N_2O_4^+$	1.86	427, 293, 275, 249, 207, 179, 172, 145, 116	High temperature
14	1.200	504.237 3	$C_{30}H_{34}NO_6^+$	0.53	460, 308, 282, 248, 240, 205, 179, 145, 116	Degradant
15	1.372	728.331 1	$C_{44}H_{46}N_3O_7^+$	1.69	711, 489, 471, 293, 276, 248, 190, 179	Degradant

*RRT: relative retention time with reference to atenolol derivative

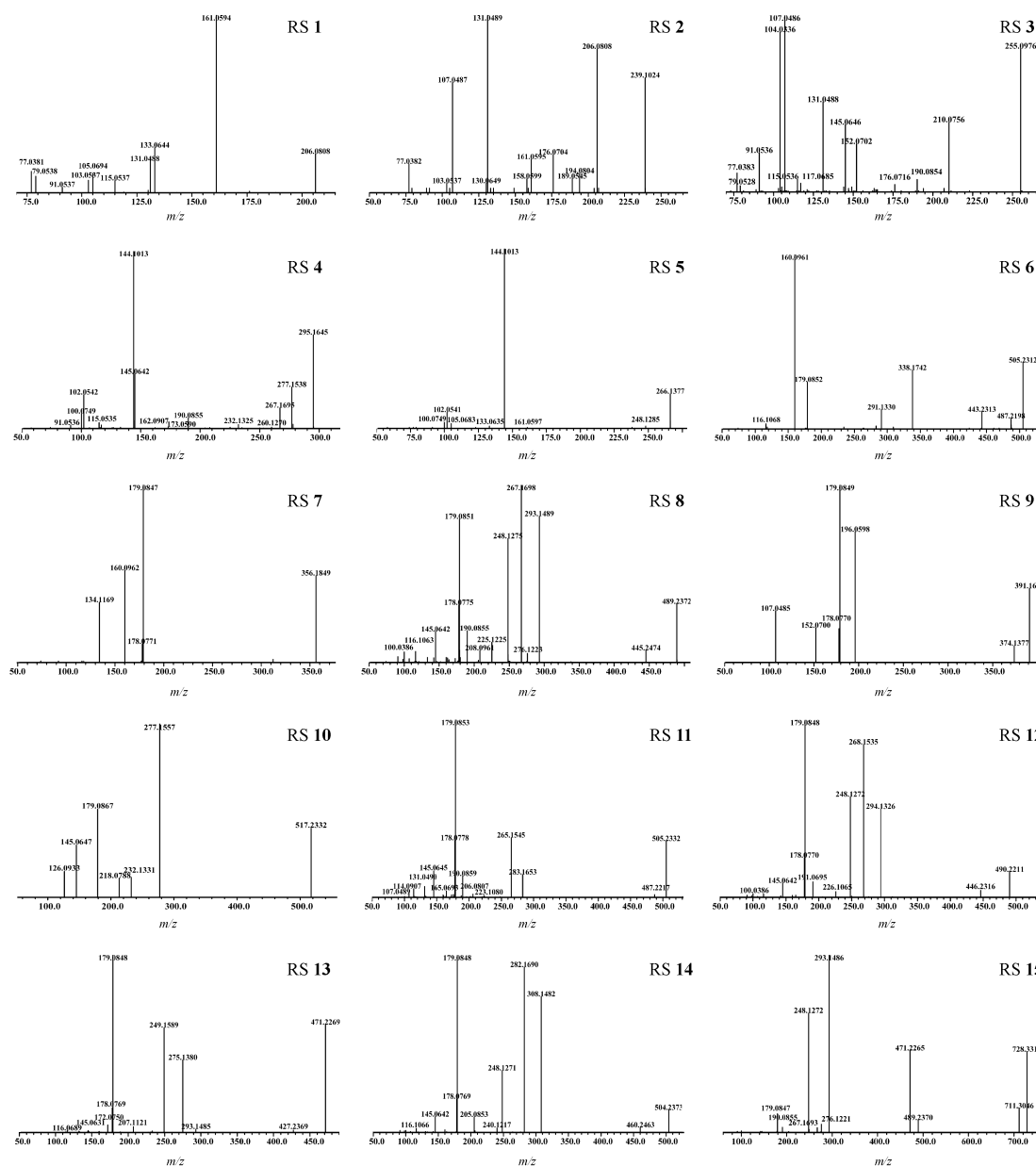


Figure 2 MS/MS spectra of atenolol and its related substances with FMOCl derivatization

($C_9H_9O^+$)的特征碎片离子,分别与 $[M+H]^+$ 离子裂解脱去苯乙酰胺的酰胺基,并进一步脱羰基相应。所以,推定有关物质1是阿替洛尔在强制氧化条件下,氨基醇单元上氧化脱异丙氨基成醛、并进一步脱水的降解杂质:4-(3-甲酰基-丙烯氧基)苯乙酰胺。由于氨基醇单元的氨基被氧化水解脱去,所以在FMOCl衍生化条件下,没有形成衍生物,极性大,色谱保留弱。二级质谱特征碎片离子(图5),均确证了有关物质1为阿替洛尔的氨基醇单元的氧化脱异丙氨基成醛基并脱水的特征结构。

有关物质2:质谱测得有关物质2 $[M+H]^+$ 的准确质量为239.1024,与离子式 $C_{11}H_{15}N_2O_4^+$ 相应,与阿替洛尔的元素组相比,少 C_3H_7 、多1个O原子,故与阿替洛尔的氨基醇单元被氧化脱异丙基单元相应;并且在衍生化反应条件下,没有被FMOCl衍生化,所以该杂质在结构中不含有活泼氢烷基氨基团。MS/MS(图2)的特征碎片离子 m/z 206.0808($C_{11}H_{12}NO_3^+$)与 $[M+H]^+$ 裂解脱去羟氨中性分子相应。所以,该杂质是阿替洛尔的氨基醇单元被氧化成含有 α -羟基取代的酰胺基结构的化合物:4-

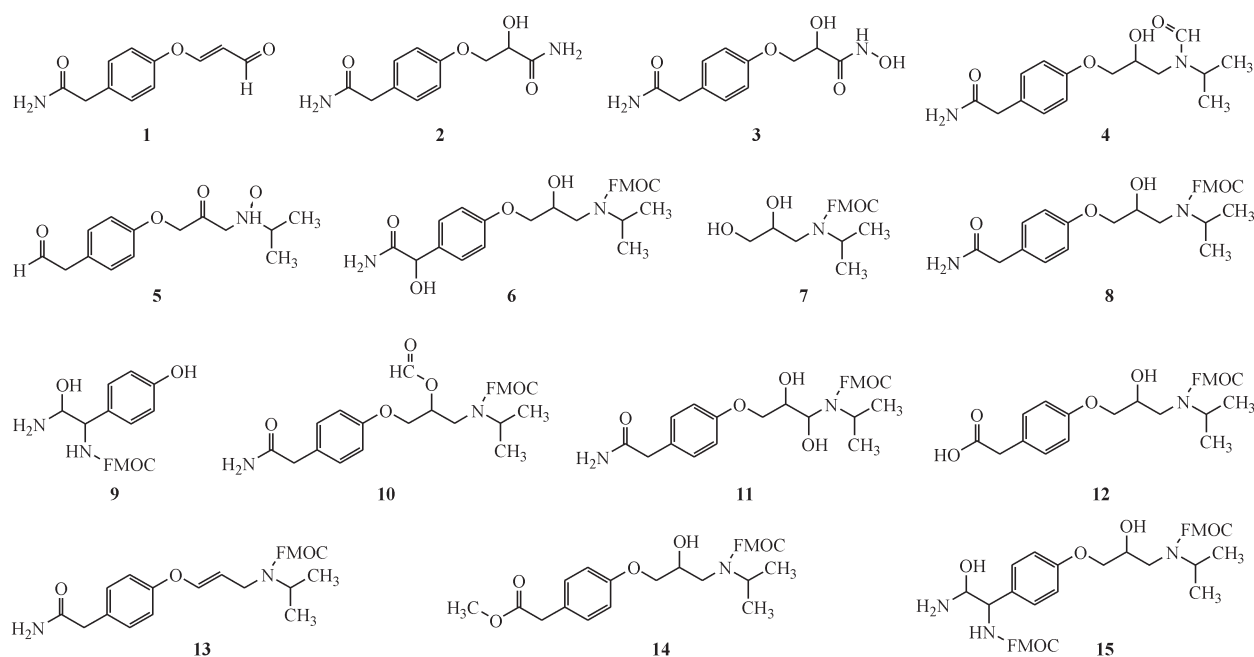


Figure 3 Chemical structures of atenolol and its related substances with FMOCl derivatization

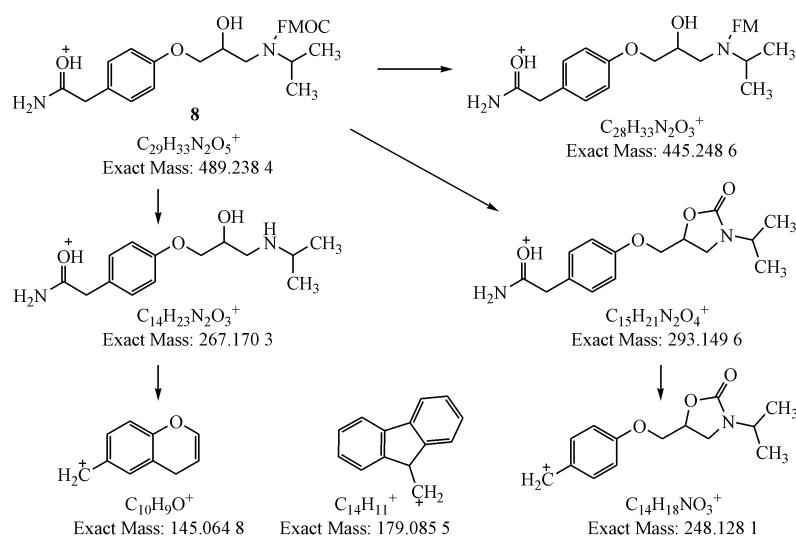


Figure 4 Fragmentation pathways of atenolol derivative 8 $[M+H]^+$ ion

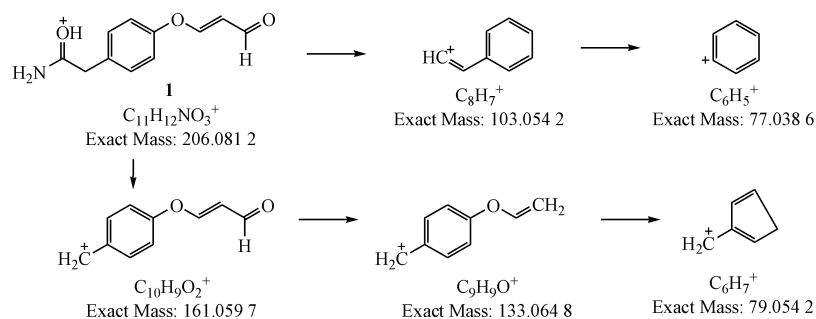


Figure 5 Fragmentation pathways of RS 1 $[M+H]^+$ ion

[3-酰氨基-2-羟基]丙氧基]苯乙酰胺。由于氨基醇单元的丙氨基被氧化水解脱去丙基成酰胺,所以在Fmoc-Cl衍生化条件下,没有形成衍生物,极

性大,色谱保留弱。二级质谱特征碎片离子(图6),均确证了有关物质2为阿替洛尔的氨基醇单元的氧化脱异丙基成酰胺的特征结构。

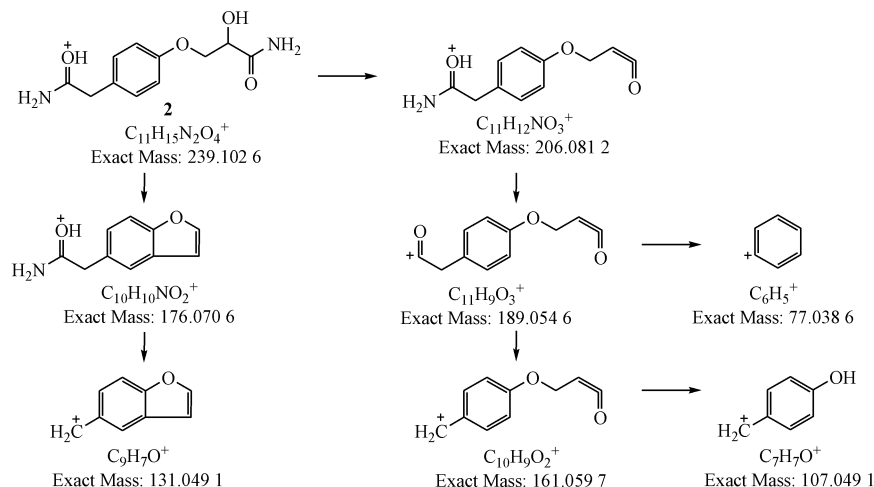


Figure 6 Fragmentation pathways of RS 2 $[M+H]^+$ ion

有关物质3:质谱测得有关物质3 $[M+H]^+$ 的准确质量为255.0976,与离子式 $C_{11}H_{15}N_2O_5^+$ 相应,与有关物质2元素组相比,多1个O原子,故应为有关物质2进一步氧化的产物;在衍生化条件下,该杂质没有与Fmoc反应,所以结构中不含有活泼氢烷基团。二级质谱图(图2)中具有与有关物质2相同的特征碎片离子 m/z 176.0716($C_{10}H_{10}NO_2^+$)、131.0488($C_9H_7O^+$)、107.0486($C_7H_7O^+$)和77.0383($C_6H_5^+$),表明,进一步氧化增多的氧原子不在苯环或乙酰胺的 α -碳上,而在氨基醇侧链上。二级质谱图中的其他主要特征碎片离子: m/z 210.0756($C_{10}H_{12}NO_4^+$)、 m/z 190.0854($C_{11}H_{12}NO_2^+$)、 m/z

176.0716($C_{10}H_{10}NO_2^+$)、 m/z 152.0702($C_8H_{10}NO_2^+$)、 m/z 145.0646($C_{10}H_9O^+$)、 m/z 104.0336($C_3H_6NO_3^+$)和 m/z 91.0536($C_7H_7^+$),分别与 $[M+H]^+$ 离子裂解苯乙酰胺单元脱甲酰胺、2-羟基脱水并氨基醇侧链与苯环合、2-羟基脱水脱羟基酰胺环合、芳基醚裂解成酚、脱甲酰胺并氨基醇侧链与苯环合、氨基醇侧链裂解成羟肟酸离子、及苄基离子相应。所以,推定该杂质是氨基醇的氨基被羟酰胺化的杂质:4-[3-[羟肟酰基-2-羟基]丙氧基]苯乙酰胺。二级质谱特征碎片离子(图7),均确证了有关物质3为阿替洛尔的氨基醇单元在有关物质2基础上,进一步氧化形成羟基酰胺,即羟肟酸的降解杂质。

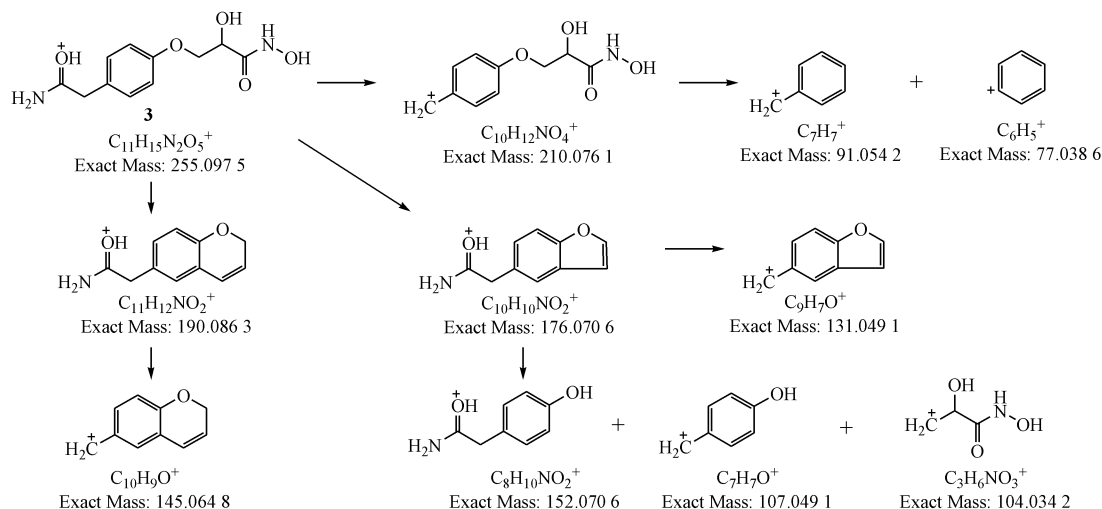


Figure 7 Fragmentation pathways of RS 3 $[M+H]^+$ ion

有关物质 5: LC-Q-TOF/MS 测得有关物质 5 $[M+H]^+$ 的准确质量为 266.137 7, 与离子式 $C_{14}H_{20}NO_4^+$ 相应, 与阿替洛尔的元素组相比缺少 NH_3 , 多 1 个 O 原子; 在衍生化条件下, 该杂质没有与 FMOCl 反应; 所以, 推测该光照降解杂质是阿替洛尔中苯乙酰胺的胺基被降解脱去、而氨基醇单元的氨基被 N-氧化, 而不被 FMOCl 衍生化。二级质谱图 (图 2) 中的特征碎片离子 m/z 248.128 5 ($C_{14}H_{18}NO_3^+$)、 m/z 161.059 7 ($C_{10}H_9O_2^+$)、 m/z

144.101 3 ($C_7H_{14}NO_2^+$)、 m/z 133.063 5 ($C_9H_9O^+$)、 m/z 105.068 3 ($C_8H_9^+$)、 m/z 102.054 1 ($C_4H_8NO_2^+$) 和 m/z 100.074 9 ($C_5H_{10}NO^+$), 分别与 $[M+H]^+$ 芳基醚苯环 RDA 及氨基醇单元的 N-氧化邻位脱酰基、芳基醚裂解和醛基脱水、氨基醇单元骨架裂解形成的 N-氧化碎片离子相应。所以, 与阿替洛尔相比, 有关物质 5 缺失的 NH_3 源于苯乙酰胺, 同时氨基醇单元 2-羟基氧化脱氢形成羰基、氨基被 N-氧化的降解杂质。

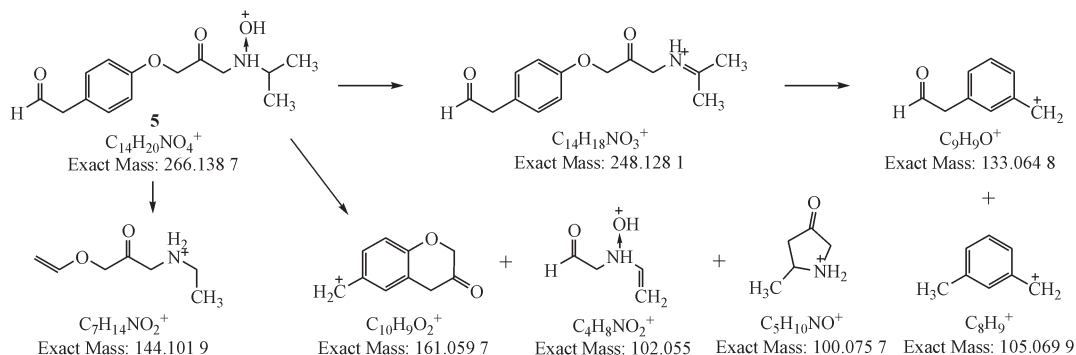


Figure 8 Fragmentation pathways of RS 5 $[M+H]^+$ ion

有关物质 7: LC-Q-TOF/MS 测得有关物质 7 $[M+H]^+$ 的准确质量 356.184 9 和离子式 $C_{21}H_{26}NO_4^+$, 与阿替洛尔衍生物元素组相比少 C_8H_7NO , 与阿替洛尔脱苯乙酰胺结构相应。所以, 有关物质 7 为阿替洛尔结构中芳基醚降解产生的特征氨基醇杂质^[15-16]。MS/MS (图 2) 中的特征碎片离子 m/z 179.084 7 ($C_{14}H_{11}^+$)、 m/z 160.096 2 ($C_7H_{14}NO_3^+$) 和 m/z 134.116 9 ($C_6H_{16}NO_2^+$), 分别与 $[M+H]^+$ 生成 9-芴正离子、邻近羟基频哪醇重排并脱去 9-芴醇、及生成的氨基醇单元离子相应。氨基醇有关物质是在光照条件下阿替洛尔母核中芳基醚键断裂, 丢失苯乙酰胺的特征降解产物, 是 β -受体拮抗剂类药物的共有杂质, 具有极性大、无发色团等特性, 难以被常规反相色谱保留, 峰形很差, 且紫外检测器对浓度较低的氨基醇类有关物质不具有足够的灵敏度, 本研究中衍生化方法增加了 FMOCl 共轭基团, 大大提高了对氨基醇有关物质检测的灵敏度。欧洲药典 10.0 规定美托洛尔的特定杂质之一 (杂质 N) 即为有关物质 7, 另有一特定杂质 M: [1, 3-二 [1-甲基乙基] 氨基] 异丙醇) 同样属于氨基醇类有关物质, 药典的收录充分说明对于此类药物控制氨基醇类有关物质的必要性, 也体现了合理控制

氨基醇类有关物质对此类药品质量控制和安全性的意义。

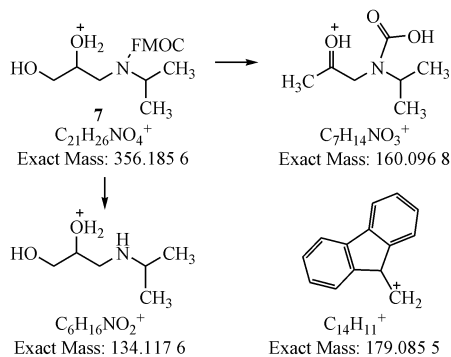


Figure 9 Fragmentation pathways of RS 7 derivative $[M+H]^+$ ion

有关物质 9: LC-Q-TOF/MS 测得有关物质 9 衍生物的 $[M+H]^+$ 的准确质量为 391.164 5, 与离子式 $C_{23}H_{23}N_2O_4^+$ 相应, 与阿替洛尔衍生物元素组相比少 $C_6H_{10}O$, 表明阿替洛尔在氧化条件下, 氨基醇单元降解脱去过程中, 还涉及氨基的转移。MS/MS (图 2) 中的特征碎片离子 m/z 374.137 7 ($C_{23}H_{20}NO_4^+$)、 m/z 196.059 8 ($C_9H_{10}NO_4^+$)、 m/z 179.084 9 ($C_{14}H_{11}^+$)、 m/z 152.070 0 ($C_8H_{10}NO_2^+$) 和 m/z 107.048 5 ($C_7H_7O^+$), 分别与 $[M+H]^+$ 脱去 NH_3 、脱去 9-芴醇、生成 9-芴正离子、脱去 9-芴氧甲酰胺以及脱去甲

酰胺相应。 m/z 152.070 0 ($C_8H_{10}NO_2^+$) 和 m/z 107.048 5 ($C_7H_7O^+$) 特征碎片离子及其与 $[M+H]^+$ 的差异,证明分子结构中仍然保留对羟基苯乙酰胺的基本特征。因此确证该杂质是阿替洛尔在过氧化氢条件下形成的对羟基苯乙酰胺,进一步被 α -氨基解并形成缩胺的杂质:4-(1,2-二氨基-2-羟乙基)苯酚。FMOC 衍生化时, α -氨基被衍生,而缩胺不易被衍生。二级质谱特征碎片离子(图 10),均确证了有关物质 9 存在脱 α -氨基成苯乙酰胺、脱缩胺成醛的特征碎片结构。

有关物质 12:LC-Q-TOF/MS 测得有关物质 12 衍生物的 $[M+H]^+$ 的准确质量为 490.221 1,与离子式 $C_{29}H_{32}NO_6^+$ 相应,与阿替洛尔衍生物元素组成相比,证明该杂质是阿替洛尔中的酰胺基团被水解成羧酸的结构。二级质谱图(图 2)中主要特征碎片离子 m/z 446.231 6 ($C_{28}H_{32}NO_4^+$)、 m/z 294.132 6 ($C_{15}H_{20}NO_5^+$)、 m/z 268.153 5 ($C_{14}H_{22}NO_4^+$)、 m/z 248.127 2 ($C_{14}H_{18}NO_3^+$)、 m/z 226.106 5 ($C_{11}H_{16}NO_4^+$)、 m/z 179.084 8 ($C_{14}H_{11}^+$) 和 m/z 145.064 2 ($C_{10}H_9O^+$) ,

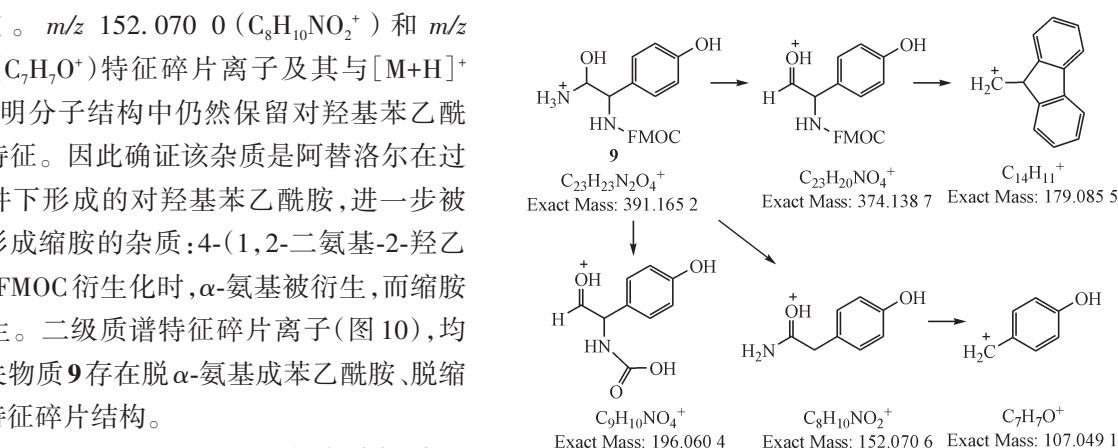


Figure 10 Fragmentation pathways of RS 9 derivative $[M+H]^+$ ion

分别与 $[M+H]^+$ 中氨基甲酸酯单元脱去中性分子 CO_2 、氨基甲酸酯与 γ -羟基的酯交换环合成内酯、脱去 9-苄氧甲酰、成内酯并脱去甲酸、脱去 9-苄氧甲酰及丙烯、生成 9-苄正离子、以及氨基醇脱水脱氨基甲酸酯单元并与苯环成环相应(图 11)。有关物质 12 是阿替洛尔乙酰胺基团水解成羧酸的降解杂质,与 EP9.0 中规定的已知杂质 G 相应。

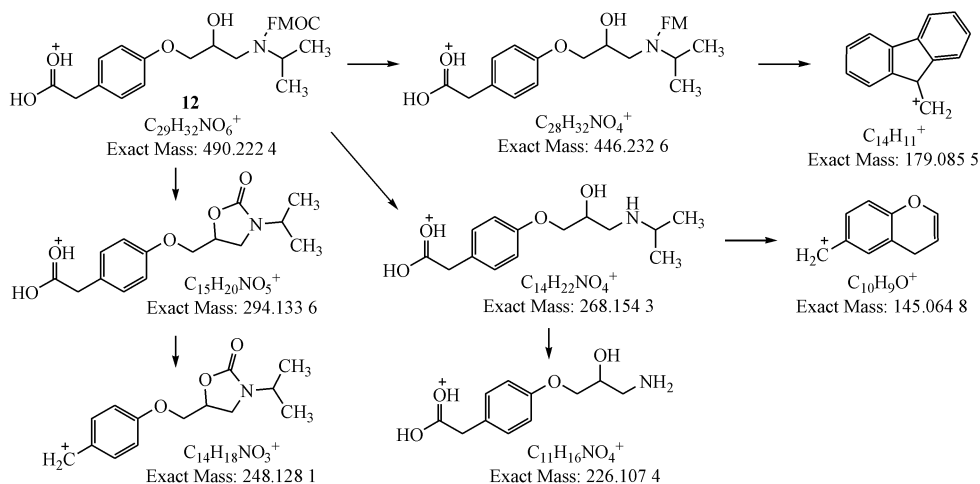


Figure 11 Fragmentation pathways of RS 12 derivative $[M+H]^+$ ion

有关物质 13:LC-Q-TOF/MS 测得有关物质 13 衍生物的 $[M+H]^+$ 的准确质量为 471.226 9,与离子式 $C_{29}H_{31}N_2O_4^+$ 相应,与阿替洛尔衍生物元素组相比少 H_2O 。二级质谱图(图 2)中的特征碎片离子 m/z 427.236 9 ($C_{28}H_{31}N_2O_2^+$)、 m/z 293.148 5 ($C_{15}H_{21}N_2O_4^+$)、 m/z 275.138 0 ($C_{15}H_{19}N_2O_3^+$)、 m/z 249.158 9 ($C_{14}H_{21}N_2O_2^+$)、 m/z 207.112 1 ($C_{11}H_{15}N_2O_2^+$)、 m/z 179.084 8 ($C_{14}H_{11}^+$)、 m/z 172.075 0 ($C_{11}H_{10}NO^+$)、 m/z 145.063 1 ($C_{10}H_9O^+$) 和 m/z 116.068 9 ($C_5H_{10}NO_2^+$) ,

分别与 $[M+H]^+$ 中氨基甲酸酯单元脱去中性分子 CO_2 、脱去 9-苄醇、氨基甲酸酯与丙烯酸环合脱去 9-苄醇、脱去 9-苄氧甲酰、脱 9-苄氧甲酰和丙烯、生成 9-苄正离子、脱氨基甲酸酯单元与苯环合并脱水(m/z 172.075 0 ($C_{11}H_{10}NO^+$))、脱甲酰胺并丙烯酸脱氨基甲酸酯单元与苯环成环以及脱去 9-苄醇并丙烯酸裂解相应(图 12);确证该杂质与阿替洛尔氨基醇单元 2-羟基的 1,2-脱水产物相应。

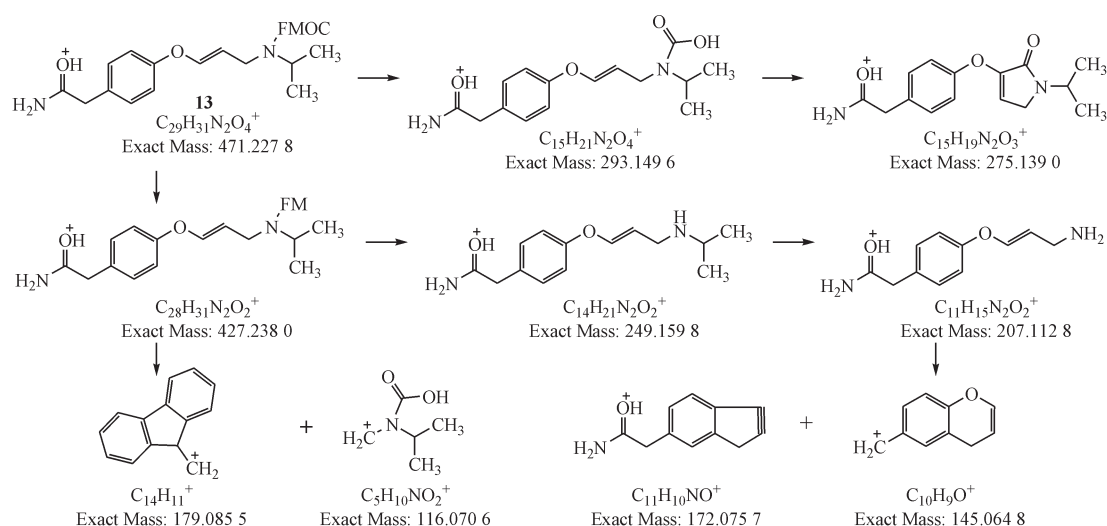


Figure 12 Fragmentation pathways of RS 13 derivative $[M+H]^+$ ion

有关物质 14 LC-Q-TOF/MS测得有关物质 14 衍生物的 $[M+H]^+$ 的准确质量为 504.237 3, 与离子式 $C_{30}H_{34}NO_6^+$ 相应, 与阿替洛尔衍生物元素组相比多 CH_3O 并少 NH_2 , 与有关物质 12 的相比则多 CH_2 。二级质谱图 (图 2) 中主要特征碎片离子中 m/z 460.246 3 ($C_{29}H_{34}NO_4^+$)、 m/z 308.148 2 ($C_{16}H_{22}NO_5^+$) 和 m/z 282.169 0 ($C_{15}H_{24}NO_4^+$), 它们的元素组成成分

别比有关物质 12 的相应碎片离子多 CH_2 ; 其他碎片 m/z 248.127 1 ($C_{14}H_{18}NO_3^+$)、 m/z 179.084 8 ($C_{14}H_{11}^+$) 和 m/z 145.064 2 ($C_{10}H_9O^+$), 则与有关物质 12 的相应碎片离子完全相同。证明有关物质 14 是有关物质 12 的甲酯型杂质。二级质谱特征裂解碎片 (图 13), 均确证了有关物质 14 的甲酯结构。

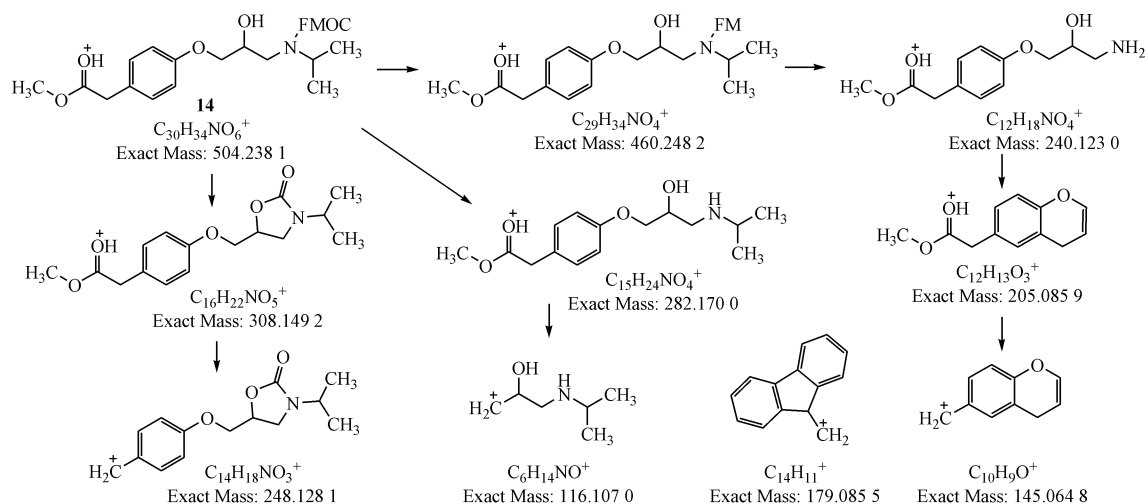


Figure 13 Fragmentation pathways of RS 14 derivative $[M+H]^+$ ion

有关物质 15: LC-Q-TOF/MS测得有关物质 15 衍生物的 $[M+H]^+$ 的准确质量为 728.331 1, 与离子式 $C_{44}H_{46}N_3O_7^+$ 相应, 与阿替洛尔衍生物元素组相比多 $C_{15}H_{13}NO_2$, 说明分子结构中含有两个 FMOC 基团。MS/MS (图 2) 中主要特征碎片离子 m/z 711.304 6 ($C_{44}H_{43}N_2O_7^+$)、 m/z 489.237 0 ($C_{29}H_{33}N_2O_5^+$)、 m/z 471.226 5 ($C_{29}H_{31}N_2O_4^+$)、 m/z 293.148 6

($C_{15}H_{21}N_2O_4^+$)、 m/z 276.122 1 ($C_{15}H_{18}NO_4^+$)、 m/z 248.127 2 ($C_{14}H_{18}NO_3^+$)、 m/z 190.085 5 ($C_{11}H_{12}NO_2^+$) 和 m/z 179.084 7 ($C_{14}H_{11}^+$), 分别与 $[M+H]^+$ 脱去 NH_3 、脱去 9-苄氧甲酰胺、脱去 9-苄氧甲酰胺脱水、氨基甲酸酯与 γ -羟基的酯交换环合、氨基甲酸酯与 γ -羟基的酯交换环合并脱去 NH_3 、脱去甲酰胺、氨基醇与苯环重排以及生成 9-苄正离子相应。有

关物质 **15** 的形成机制与有关物质 **9** 相同, m/z 293. 148 6 ($C_{15}H_{21}N_2O_4^+$) 和 m/z 248. 127 2 ($C_{14}H_{18}NO_3^+$) 等与阿替洛尔衍生物相同的碎片离子, 表明该杂

质是阿替洛尔被 α -氨基解形成缩胺的杂质, 二级质谱特征碎片离子(图 14) 均确证了脱 α -氨基成阿替洛尔和脱缩氨成醛的结构特征。

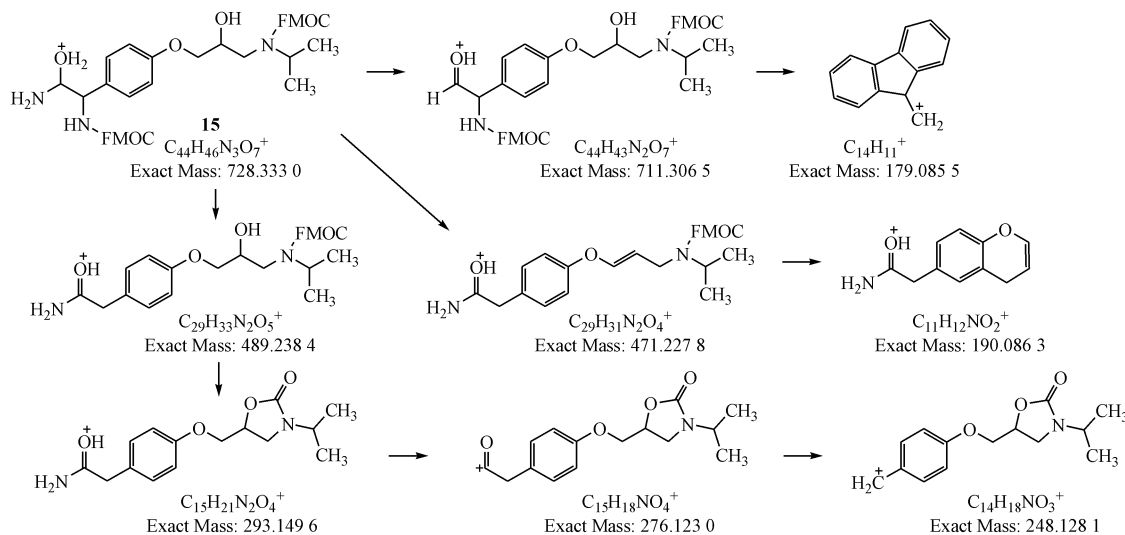


Figure 14 Fragmentation pathways of RS 15 derivative $[M+H]^+$ ion

2.3 衍生化反应副产物

LC-Q-TOF/MS测得副产物 **4** $[M+H]^+$ 的准确质量为 295. 164 5, 与离子式 $C_{15}H_{23}N_2O_4^+$ 相应, 与阿替洛尔元素组相比多 CO。二级质谱图(图 2)中主要特征碎片离子有 m/z 277. 153 8 ($C_{15}H_{21}N_2O_3^+$)、 m/z 267. 169 5 ($C_{14}H_{23}N_2O_3^+$)、 m/z 260. 127 0 ($C_{15}H_{18}NO_3^+$)、 m/z 232. 132 5 ($C_{14}H_{18}NO_2^+$)、 m/z 190. 085 5 ($C_{11}H_{12}NO_2^+$)、 m/z 173. 059 0 ($C_{11}H_9O_2^+$)、 m/z 162. 090 7 ($C_{10}H_{12}NO^+$)、 m/z 144. 101 3 ($C_7H_{14}NO_2^+$)、

m/z 102. 054 2 ($C_4H_8NO_2^+$) 和 m/z 100. 074 9 ($C_5H_{10}NO^+$), 分别与 $[M+H]^+$ 脱水、脱 HCHO、脱水脱去 NH_3 、脱水脱 NH_3 脱去 HCHO、氨基醇与苯环环合、脱去 NH_3 并氨基醇与苯环环合、脱去甲酰胺脱水脱 HCHO 脱丙烯、芳基醚键裂解、脱去丙烯以及脱水并丙烯胺裂解相应(图 15)。确证副产物 **4** 为阿替洛尔在 FMOC 衍生化过程中脱去 9-苄醇形成的甲酰胺副产物。

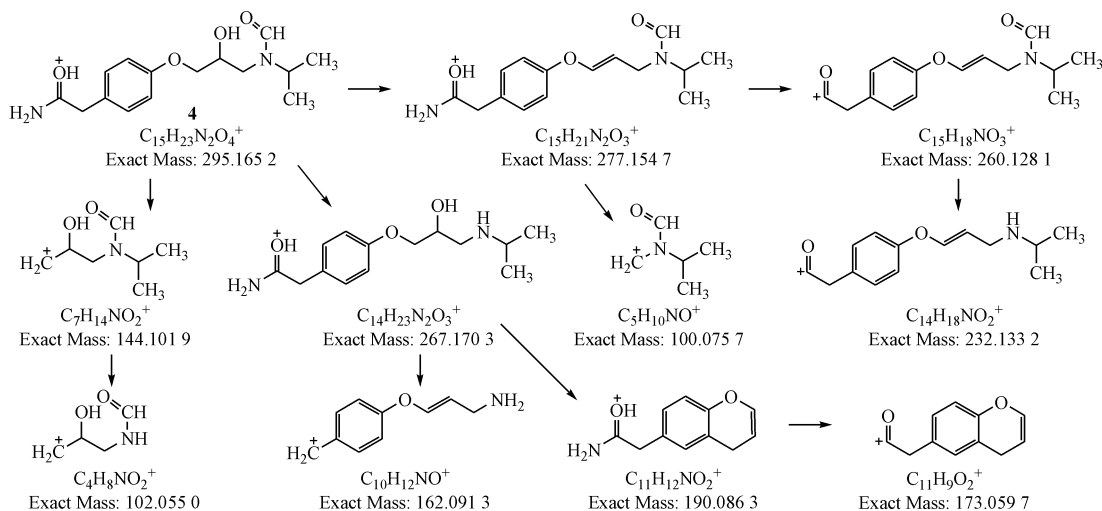


Figure 15 Fragmentation pathways of by-product 4 $[M+H]^+$ ion

阿替洛尔衍生物(m/z 489. 237 2)裂解脱去9-苄醇,断裂处的羧基与 γ -羟基脱水缩合形成噁唑烷酮结构,其中酯键与酰胺键均易断裂,但酰胺键稳定性略大于酯键,因此溶液中应存在两种断裂方式得到的裂解产物,且酯键裂解产物应多于酰胺键裂解产物。因此根据碎片裂解途径分析副产物4为噁唑烷酮结构酯键断裂后的产物。而酰

胺键断裂后暴露异丙氨基,能够与衍生化试剂继续反应得到副产物10(m/z 517. 233 2),其碎片裂解机制基本与副产物4相同(图16)。液相检查结果(图1)表明,每个含有副产物4的样品中都伴随副产物10的存在,且副产物4含量明显大于副产物10,从而佐证了上文对两者形成原因的推测。

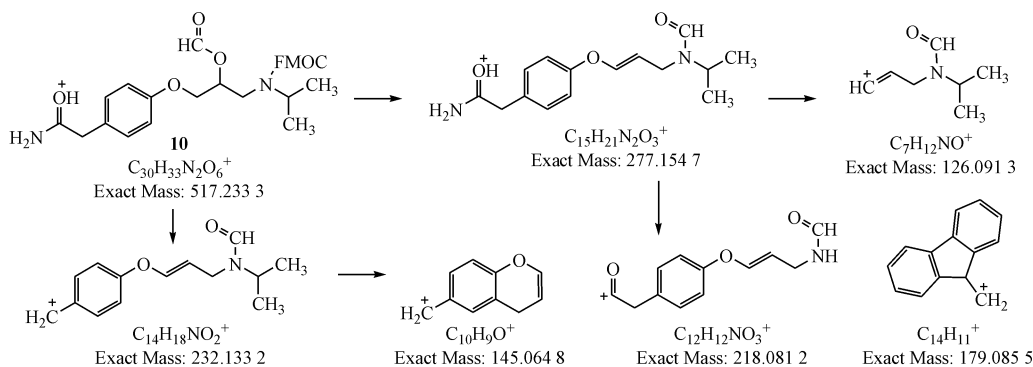


Figure 16 Fragmentation pathways of by-product 10 $[M+H]^+$ ion

3 结论

美国药典和欧洲药典中对于氨基醇类有关物质的检查仍采用TLC方法,该方法灵敏度低、重复性差,已逐渐被仪器分析技术替代。本研究所建立的阿替洛尔氨基醇类有关物质的Fmoc柱前衍生化RP-HPLC方法,克服了氨基醇类有关物质因其无紫外吸收、极性大,不易被紫外检测的问题,显著提高了检测灵敏度,可同时检测氨基醇类有关物质与芳基类有关物质,也可为其他氨基醇类有关物质的检查提供参考。

在阿替洛尔及其降解试验样品中,共检测到12个有关物质和2个衍生化反应副产物(4、10),通过LC-Q-TOF/MS高分辨质谱测得这些杂质的准确质量、分子式和特征碎片离子的组成,对它们进行了解析分析,鉴定了各杂质的结构。研究鉴定的结果,不仅包含了欧洲药典9.0规定的特定杂质G(12)和文献中多次报道的阿替洛尔特征降解杂质(6、7、11)^[17],还确定了全部潜在降解杂质的结构。表明本方法适用于全部工艺杂质与降解杂质的检测,可为阿替洛尔的质量控制和稳定性检查提供技术依据。

阿替洛尔Fmoc衍生物二级质谱裂解中,均生成Fmoc相关的9-苄氧甲酰胺脱CO₂中性分子离

子和9-苄正离子特征碎片,同时具有与阿替洛尔苯乙酰胺脱甲酰的苄基正离子和氨基醇单元脱水或与苯环环合的特征杂质。当降解引起乙酰氨基或氨基醇结构单元变化时,若结构中没有伯或仲氨基时,则不用生成Fmoc衍生物,从而与其他Fmoc衍生物的色谱保留及质谱裂解行为形成明显差异,便于识别。

本研究中的强制降解试验结果表明,阿替洛尔在强酸强碱条件下酰胺基团易发生水解形成羧基(有关物质12);在氧化和光照条件下易发生加氧氧化、丢失基团、 α -氨解等降解反应(有关物质1、2、3、5、6、7、9、11、12);在高温条件下易发生脱水(有关物质13);除氧化条件外其他条件下阿替洛尔酰胺基团易水解与甲醇脱水缩合(有关物质14),易 α -氨解形成缩胺(有关物质15)。阿替洛尔在强酸强碱、氧化和光照条件下较不稳定,所以阿替洛尔需避光密封干燥储存。强制降解试验通过考察药品的内在稳定特性,从而了解其降解途径与降解产物,为药品的储存条件、质量控制提供参考,同时对分析方法进行专属性验证,表明主成分与各降解产物间无干扰。

参考文献

- [1] Hu JY, Jing XP, Zhai L, *et al.* BiOCl facilitated photocatalytic

- degradation of atenolol from water: reaction kinetics, pathways and products[J]. *Chemosphere*, 2019, **220**: 77–85.
- [2] Feng YP, Shen MY, Wang Z, *et al.* Transformation of atenolol by a laccase-mediator system: efficiencies, effect of water constituents, and transformation pathways [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2019, **183**: 109555.
- [3] Quaresma AV, Sousa BA, Silva KTS, *et al.* Oxidative treatments for atenolol removal in water: elucidation by mass spectrometry and toxicity evaluation of degradation products [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2019, **33**(3): 303–313.
- [4] Szultka-Młyńska M, Bajkacz S, Baranowska I, *et al.* Structural characterization of electrochemically and *in vivo* generated potential metabolites of selected cardiovascular drugs by EC-UHPLC/ESI-MS using an experimental design approach [J]. *Talanta*, 2018, **176**: 262–276.
- [5] Toolaram AP, Menz J, Rastogi T, *et al.* Hazard screening of photo-transformation products from pharmaceuticals: application to selective β_1 -blockers atenolol and metoprolol [J]. *Sci Total Environ*, 2017, **579**: 1769–1780.
- [6] Nahim-Granados S, Rivas-Ibáñez G, Antonio Sánchez Pérez J, *et al.* Synthetic fresh-cut wastewater disinfection and decontamination by ozonation at pilot scale [J]. *Water Res*, 2020, **170**: 115304.
- [7] Ekowati Y, Ferrero G, Farré MJ, *et al.* Application of UVOX Redox® for swimming pool water treatment: microbial inactivation, disinfection byproduct formation and micropollutant removal [J]. *Chemosphere*, 2019, **220**: 176–184.
- [8] Khalit WN, Tay KS. Aqueous chlorination of acebutolol: kinetics, transformation by-products, and mechanism [J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2016, **23**(3): 2521–2529.
- [9] Miao D, Peng JB, Zhou XH, *et al.* Oxidative degradation of atenolol by heat-activated persulfate: kinetics, degradation pathways and distribution of transformation intermediates [J]. *Chemosphere*, 2018, **207**: 174–182.
- [10] Xu Q, Tan SN. Quantitative analysis of 3-isopropylamino-1, 2-propanediol as a degradation product of metoprolol in pharmaceutical dosage forms by HILIC-CAD [J]. *J Pharm Anal*, 2019, **9**(6): 431–436.
- [11] Smith LL, Francis KA, Johnson JT, *et al.* Quantitation of fumonisin B₁ and B₂ in feed using FMOc pre-column derivatization with HPLC and fluorescence detection [J]. *Food Chem*, 2017, **234**: 174–179.
- [12] Prior A, Coliva G, de Jong GJ, *et al.* Chiral capillary electrophoresis with UV-excited fluorescence detection for the enantioselective analysis of 9-fluorenylmethoxycarbonyl-derivatized amino acids [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2018, **410**(20): 4979–4990.
- [13] Ramirez CE, Nouzova M, Michalkova V, *et al.* Common structural features facilitate the simultaneous identification and quantification of the five most common juvenile hormones by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2020, **116**: 103287.
- [14] León C, Boix C, Beltrán E, *et al.* Study of cyanotoxin degradation and evaluation of their transformation products in surface waters by LC-QTOF MS [J]. *Chemosphere*, 2019, **229**: 538–548.
- [15] Xu ZZ, Xie ML, Ben Y, *et al.* Efficiency and mechanism of atenolol decomposition in Co-FeOOH catalytic ozonation [J]. *J Hazard Mater*, 2019, **365**: 146–154.
- [16] Azañs A, Mendret J, Cazals G, *et al.* Ozonation as a pretreatment process for nanofiltration brines: monitoring of transformation products and toxicity evaluation [J]. *J Hazard Mater*, 2017, **338**: 381–393.
- [17] Tay KS, Rahman NA, Abas MRB. Characterization of atenolol transformation products in ozonation by using rapid resolution high-performance liquid chromatography/quadrupole-time-of-flight mass spectrometry [J]. *Microchem J*, 2011, **99**(2): 312–326.