

使用ACQUITY RDa检测器和UNIFI软件工作流程对格列吡嗪强制降解产物进行靶向和非靶向鉴定和表征

Chris Henry, Paul D. Rainville

Waters Corporation

摘要

本应用纪要展示了ACQUITY RDa检测器在常规获取高分辨率质谱(HRMS)数据以表征格列吡嗪强制降解产物方面的应用。

格列吡嗪样品在酸性、碱性和氧化条件下发生化学降解。在ACQUITY UPLC I-Class PLUS二元系统上分离该药物及其降解产物。使用与ACQUITY PDA（光电二极管阵列）检测器联用的台式TOF质量分析器ACQUITY RDa检测器分析降解样品。

工作流程分为两个阶段，分别代表靶向和非靶向方法（图1）。第一阶段展示了筛选由文献¹获得的已知降解物（标记为杂质I-V）的过程。在第二阶段，活性药物成分(API)的结构发生了可能的降解。

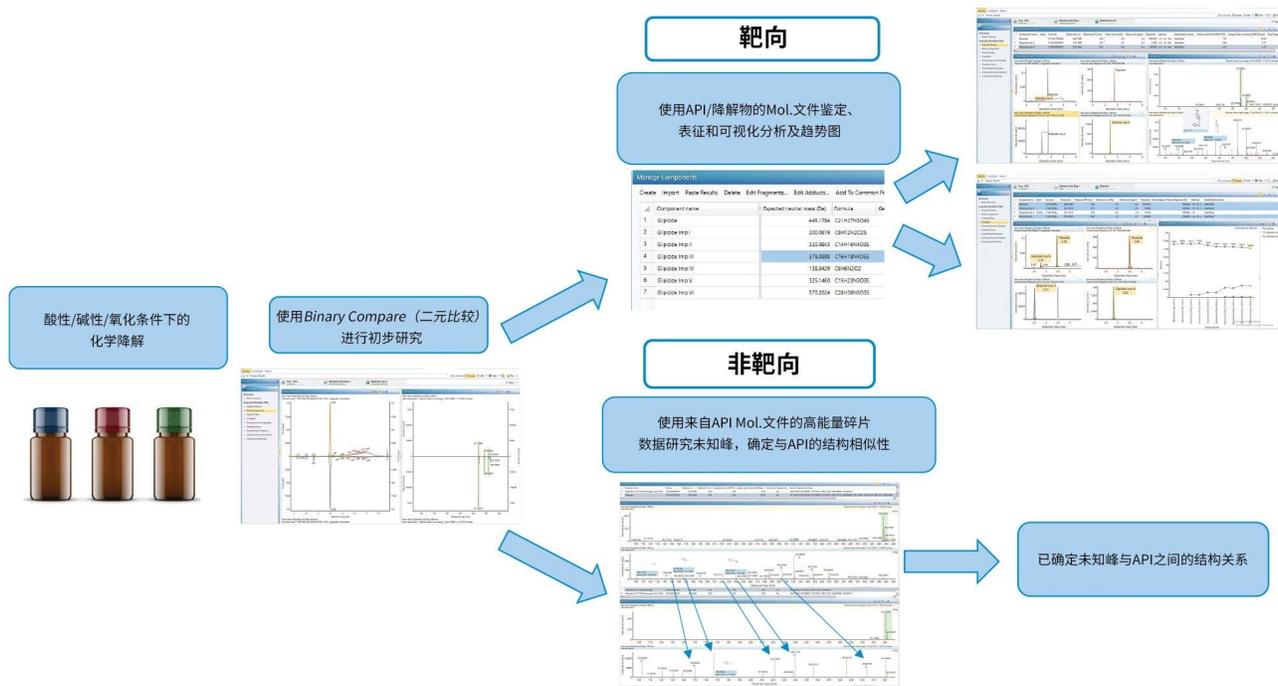


图1.使用UNIFI作为部分waters_connect平台进行强制降解的靶向/非靶向工作流程示意图

在靶向工作流程阶段，我们发现格列吡嗪在酸性和氧化条件下会产生杂质II和III，氧化条件下还会产生在 m/z 478.1746处检测到的氧化产物，被UNIFI暂时指定为 $[M + O_2]^+$ 。杂质V仅在碱性条件下产生。使用处理方法中的谱库自动鉴定和表征主要化合物、已知杂质和产生的相关碎片。

在非靶向工作流程中，我们通过碎片确认了未知氧化产物的鉴定结果。通过比较格列吡嗪的高能量碎片，基于结构文件(.mol)和氧化降解样品中鉴定出的杂质产生的高能量碎片离子，获得可疑降解物的结构信息。碎片谱库是使用API的高能量数据创建的，已导入到处理方法中。针对包含母体化合物和潜在转化的方法筛选获得的数据，从而鉴定和查看任何相关结构。通过这种方法，软件能够可靠地将 m/z 478.1746处的未知杂质指定为 $[M + O_2]^+$ 。

本研究展示了一个常规、简化的强制降解研究靶向和非靶向表征工作流程。常规获取精确质量数数据的能力使我们无需HRMS专业知识即可实现化合物表征，并且无需将样品提交给专门的HRMS实验室即可鉴定未知峰。

优势

- 常规获取精确质量数测量结果，用于针对一系列MS专业知识的靶向和非靶向强制降解研究
- 自动鉴定和查看降解物和碎片离子，无需人工解析

- 查看潜在结构碎片离子检测结果，辅助降解途径分析研究
- UNIFI内的精简工作流程能够逐步调查数据，以便快速评估产生的降解物，并详细分析降解物随时间的变化
- waters_connect平台允许用户创建完全符合21 CFR Part 11的端对端工作流程，用于强制降级的常规分析

简介

人们认为强制降解研究是药物开发计划的一个重要分析方面。

了解药物的降解途径，并通过使用HRMS等表征手段深入了解任何降解产物，对于理解分子的内在稳定性至关重要。

根据国际协调会议(ICH)指南(Q1A)，需要进行稳定性研究确定新原料药和/或药品的保质期。保质期研究是美国食品药品监督管理局(FDA)许多法规审批的一部分^{2,3}。

充分了解分子稳定性有助于选择适当的配方和包装，并设置适当的储存条件和保质期，这对于监管文件十分重要。强制降解是指药品和原料药在比加速条件更严苛的条件下进行降解，产生降解产物的过程，可以通过研究这些产物来确定分子的稳定性⁴。

分析程序评估破坏性试验效果的能力是确保药品在保质期内符合适当的特性、强度、质量和纯度标准的基础能力。本应用纪要详细介绍了一种第二代抗糖尿病磺酰脲类药物格列吡嗪在酸性、碱性和氧化条件下的强制降解研究，并展示了靶向和非靶向工作流程方法的结果。

实验

样品描述

用80:20甲醇:水制备浓度为1 mg/mL的格列吡嗪标样 (Sigma, Poole, 英国多塞特郡)。接下来，取900 μ L该溶液的等分试样添加到琥珀色样品瓶中，分别用100 μ L 99%甲酸、50% NaOH和30%过氧化氢进行化学降解（每种降解条件下六个制剂）。每个样品瓶置于80 °C下温育，时间为t=0、30、60、120、180和240 min。在每个时间点取一份各条件下处于加热状态的样品，冷却。每个降解样品取100 μ L等分试样，用80:20甲醇:水按1:10稀释，然

后提交以供分析。

液相色谱条件

液相色谱系统:	ACQUITY UPLC I-Class PLUS
检测器:	ACQUITY PDA (光电二极管阵列), 254 nm
样品瓶:	TruView最大回收样品瓶 (部件号: 186005668CV)
色谱柱:	ACQUITY UPLC BEH C ₁₈ 100 × 2.1mm, 1.7μm (部件号: 186002352)
柱温:	45 °C
样品温度:	8 °C
进样体积:	1 μL
流速:	0.4 mL/min

梯度表

时间(min)	流速(mL/min)	%A	%B	曲线
0.0	0.4	95	5	6
0.5	0.4	95	5	6
5.0	0.4	0	100	6
5.1	0.4	95	5	6
8.0	0.4	95	5	6

质谱条件

质谱系统： ACQUITY RDa检测器

电离模式： 正

采集范围： 50–2000 *m/z*

毛细管电压： 1.5 kV (缺省值)

碎裂锥孔电压： 60 V-150 V

锥孔电压： 30 V

数据管理

质谱软件： UNIFI 1.9.13.9

信息学软件： waters_connect

结果与讨论

ACQUITY RDa检测器可以自动设置，包括检测器设置、自动调谐和质量数校准。按照此常规设置，在1.5 kV的毛细管电压和30 V的锥孔电压下采集全扫描MS精确质量数数据。使用包括碎片的全扫描功能，在锥孔电压递增条件下同时采集高能量和低能量谱图。自动分配包含碎片离子信息的高能量数据功能，进一步提高母体药物化合物鉴定和降解途径分析的可信度。

在靶向阶段，我们发现格列吡嗪在酸性和氧化条件下会产生杂质II和III，氧化条件下还会在 m/z 478.1746处产生可疑的氧化产物，这在之前的格列吡嗪分解研究文献中没有提及。杂质V仅在碱性条件下产生。

非靶向分析的结构基于母体药物的结构生成，处理方法中包括预测/潜在转化。选择“裂解工具”选项后，UNIFI将能够自动鉴定通过键裂产生的碎片离子。这可能是由于该软件使用了化学智能算法进行模拟裂解，获得母体分子的结构知识。为进一步确认母体药物和降解产物之间的结构关系，将API产生的碎片添加到处理方法中，并作为“预期片段”进行筛选。

靶向分析

在UNIFI应用程序中，使用基于已知降解物结构的谱库创建了一个靶向工作流程，并使用该结构信息来筛选收集的数据，查找在温育过程中形成的任何降解物。本研究的筛选库由五种已知杂质组成（图2）。UNIFI直接在检测到的成分表上使用这个谱库来搜索已知的降解物。

二元比较

对温育样品使用二元比较功能进行初步评估，此时需要一个参比样品，本例中为 $t=0$ min的碱性降解样品；还需要一个未知样品，我们选择了 $t=60$ min的碱性降解样品（图3）。仅在降解样品中可见2.41 min的峰，选择该峰可以得到 m/z 326.1534的光谱峰，UNIFI将其识别为格列吡嗪杂质V。此外，也可以用结构文件(.mol)中包含的信息查看结构。

碱性降解60分钟

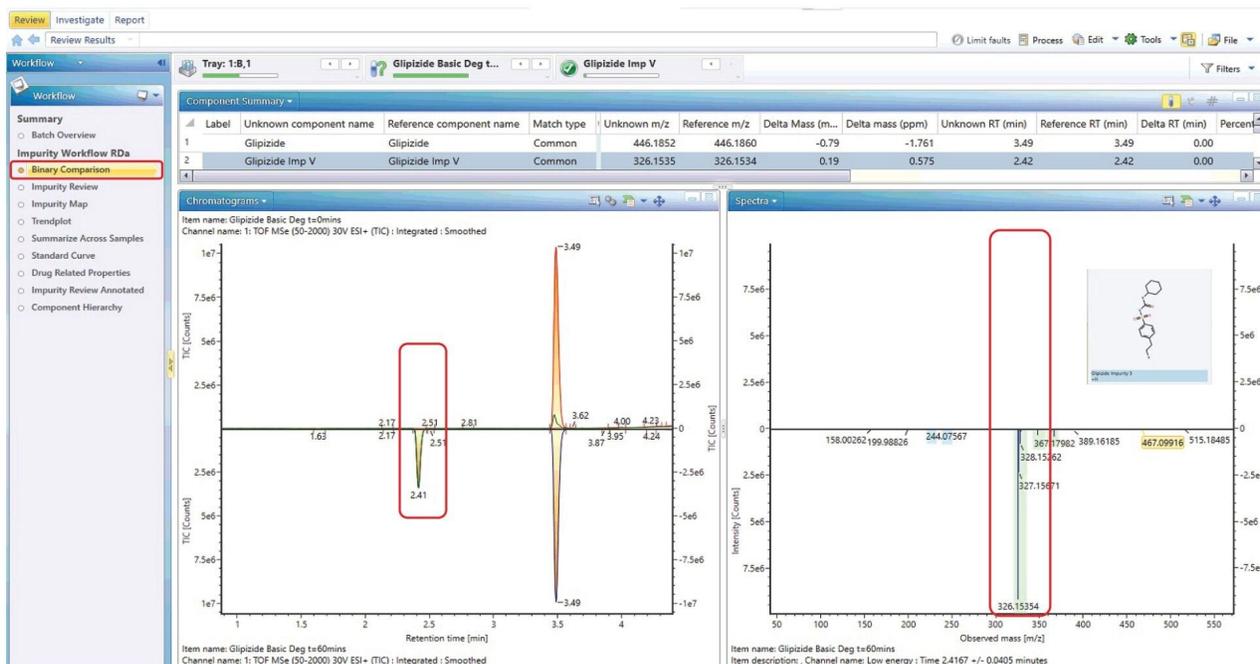


图3.UNIFI中的二元比较功能提供了碱性降解在 $t=0 \text{ min}$ 和 $t=60 \text{ min}$ 时的直观对比图。

杂质分析

通过比较使用包括碎片的全扫描功能生成的高能量和低能量通道，我们进一步解析了所有条件下的数据。

例如， $t=120 \text{ min}$ 的酸性降解样品会产生杂质II和III - 两者都在文献中引用过 - 由软件根据结构文件(.mol)信息自动识别。

如图4所示，在低能量通道，选择的子离子（杂质III）已自动分配并可视化，而高能量通道显示了杂质的碎裂分布。在 m/z 167.0151和 m/z 286.0629处检测到多个碎片离子，并突出显示电荷保留部分。

趋势图

以氧化温育为例（图5），折线图显示格列吡嗪的响应值降低，杂质II和III以及 m/z 478.1751处的氧化产物随之增加。格列吡嗪在 240 min 扫描时的响应轻微增加，这是由于高百分比的有机溶剂在高温下蒸发导致的。

所有降解条件下的趋势图

修改趋势图的工作流程步骤，以显示杂质生成在所有测试时间点的扩散，从而表明格列吡嗪在所有降解条件下的相对稳定性（图6）。从这些图中可以清楚看出，杂质II和III主要在酸性和氧化条件下生成，杂质V仅在碱性条件下生成，非靶向分析部分中描述的 m/z 478.1746处的氧化产物只在氧化条件下生成。

非靶向分析

二元比较

再次使用二元比较功能对未知峰进行初步评估。在图7中，我们将 $t=0$ min的氧化降解作为参比样品，将 $t=180$ min的氧化降解作为未知样品（图7）。在研究中的“靶向”阶段突出显示的峰仅在保留时间为3.14分钟的降解样品中存在。 m/z 478.1746处的峰暂时指定为格列吡嗪+ O_2

氧化降解180分钟

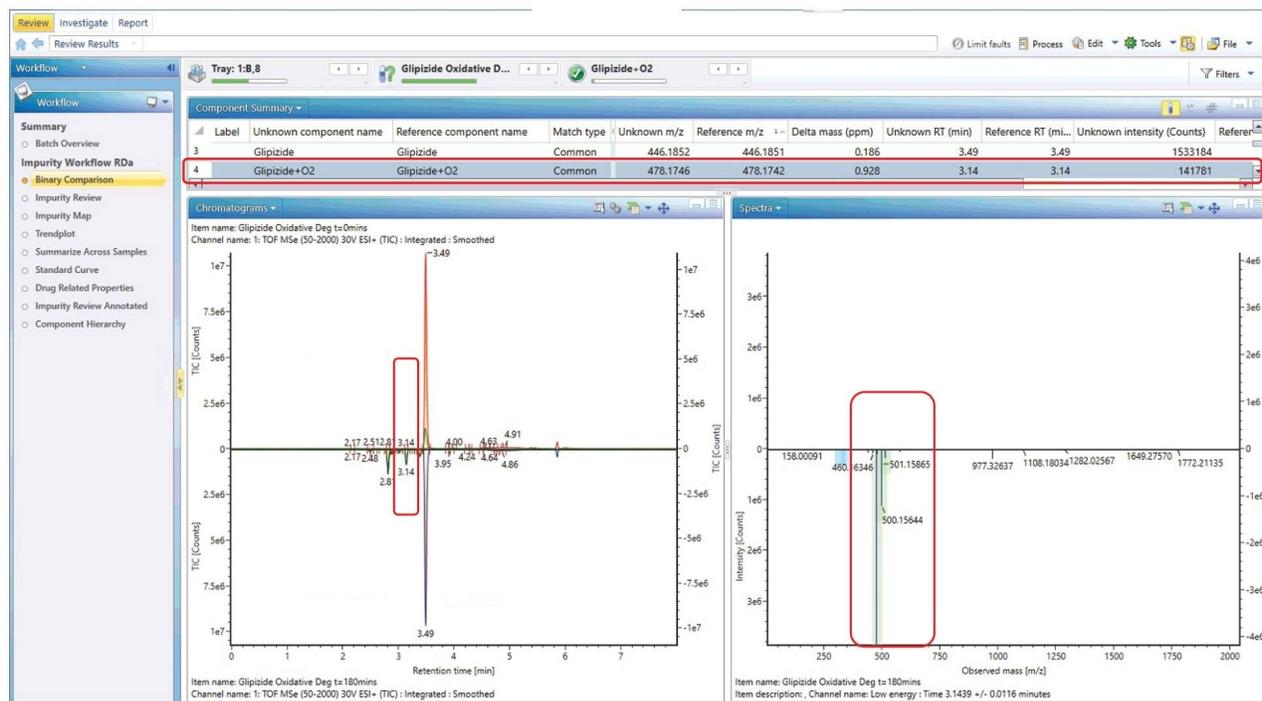


图7.UNIFI中的二元比较功能提供了氧化降解在 $t=0\text{ min}$ 和 $t=180\text{ min}$ 时的直观对比图。

药物相关杂质

进一步研究这种可疑降解物，评估它的结构是否与API相关。为此，将母体药物的子离子作为检测结果添加到API的谱库条目中，然后导入到处理方法中。

针对包含母体化合物和基于降解条件的潜在转化的方法筛选获得的数据，从而鉴定和查看任何相关结构（图8）。

UNIFI根据API的结构自动分配的六个碎片离子也在可疑降解物的高能量数据中检测到并被可视化。突出显示电荷保留部分。

API和可疑降解物共有的六个碎片离子有力证明了该峰的结构与格列吡嗪有关。

氧化降解180分钟

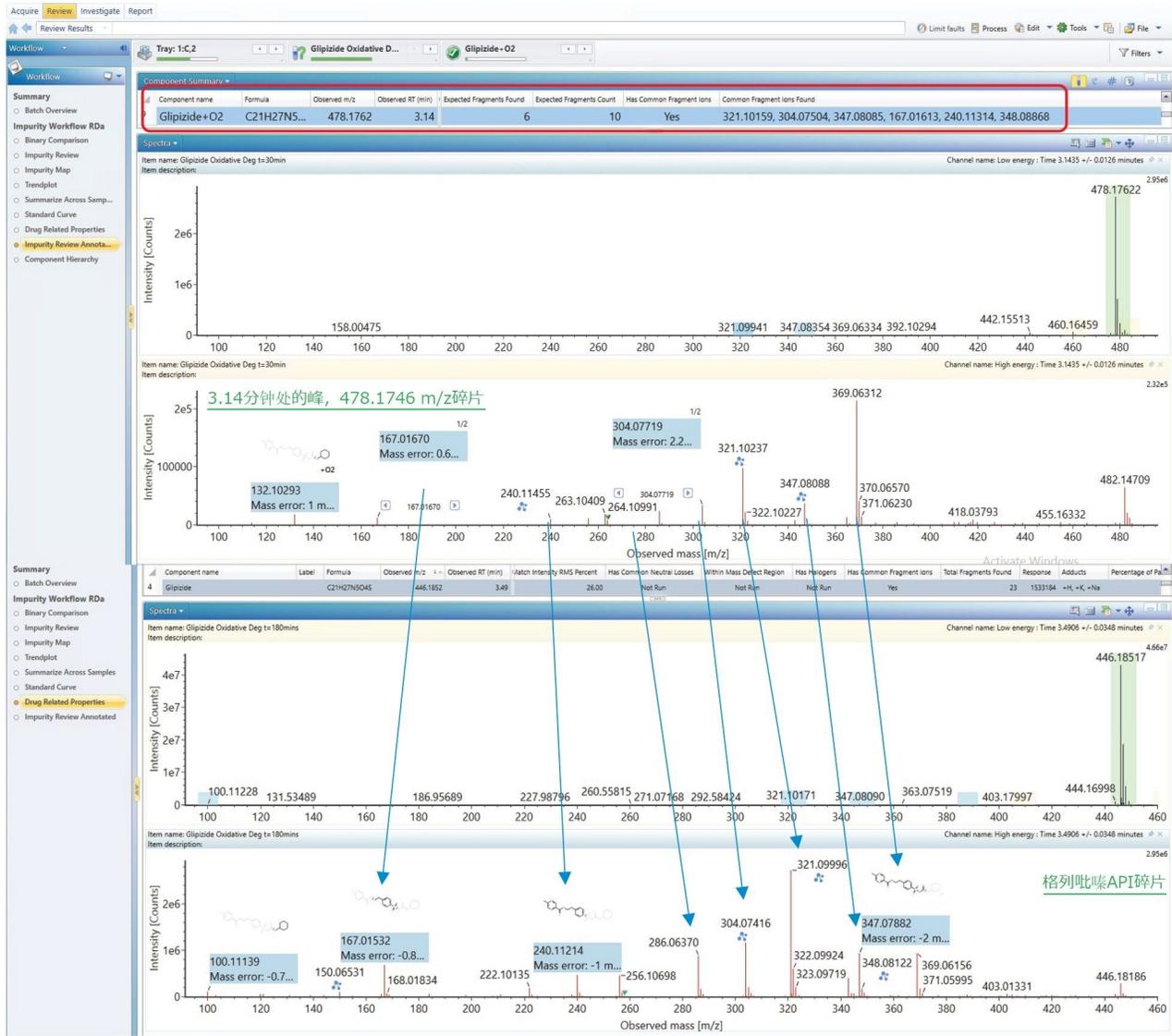


图8.3.14分钟处可疑降解物（上）与API（下）的碎片离子谱图

结论

与ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统和PDA检测器联用的ACQUITY RDa检测器展现出了为强制降解研究提供靶向和非靶向解决方案的能力。

使用包含UNIFI应用程序的waters_connect软件平台成功地表征了格列吡嗪的强制降解产物。UNIFI中的工作流程可以自动鉴定格列吡嗪及相应的降解产物，结果可信度较高。同时采集高能量数据，生成碎片离子，提供额外的结构信息，辅助降解途径分析研究。所有化合物和碎片离子均表现出优异的质量精度（小于5 ppm）。一般而言，这种水平的化合物表征需要精通HRMS的专家级用户才能操作仪器并解释获得的结果。未知样品的鉴定通常需要外包，使用外包评估潜在毒性和/或药物功效的负面影响可能既昂贵又耗时。

waters_connect软件平台纳入专用的端对端工作流程，结合ACQUITY RDa检测器的自动设置功能，使用常规工作流程即可实现精确质量数测定。

参考资料

1. Bansal, G, Singh, M, Jindal, KC, Singh, S. LC and LC-MS Study on Establishment of Degradation Pathway of Glipizide under Forced Decomposition Conditions. *Journal of Chromatographic Science* .46:510–517; 2008.
2. ICH guidelines, Q1A (R2): Stability Testing of New Drug Substances and Products (revision 2), International Conference on Harmonization. 参考网站：〈<http://www.fda.gov/downloads/RegulatoryInformation/Guidances/ucm128204.pdf>〉, 2003.
3. FDA Guidance for Industry, INDs for Phase II and III Studies — Chemistry, Manufacturing, and Controls Information, Food and Drug Administration. 参考网站：〈<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm070567.pdf>〉, 2003.
4. Blessy, M, Ruchi D. Patel, Prajesh N Prajapati, Y.K. Agrawal. Development of Forced Degradation and Stability Indicating Studies of Drugs — A Review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 2014;4(3):159–165.

特色产品

[ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <https://www.waters.com/134613317>](https://www.waters.com/134613317)

[ACQUITY UPLC PDA检测器 <https://www.waters.com/514225>](https://www.waters.com/514225)

[ACQUITY RDa检测器 <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077027>](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135077027)

[UNIFI科学信息系统 <https://www.waters.com/134801648>](https://www.waters.com/134801648)

[waters_connect <https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135040165>](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135040165)

720007510ZH, 2022年2月

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie](#) [设置](#)

沪 ICP 备06003546号-2

京公网安备 31011502007476号