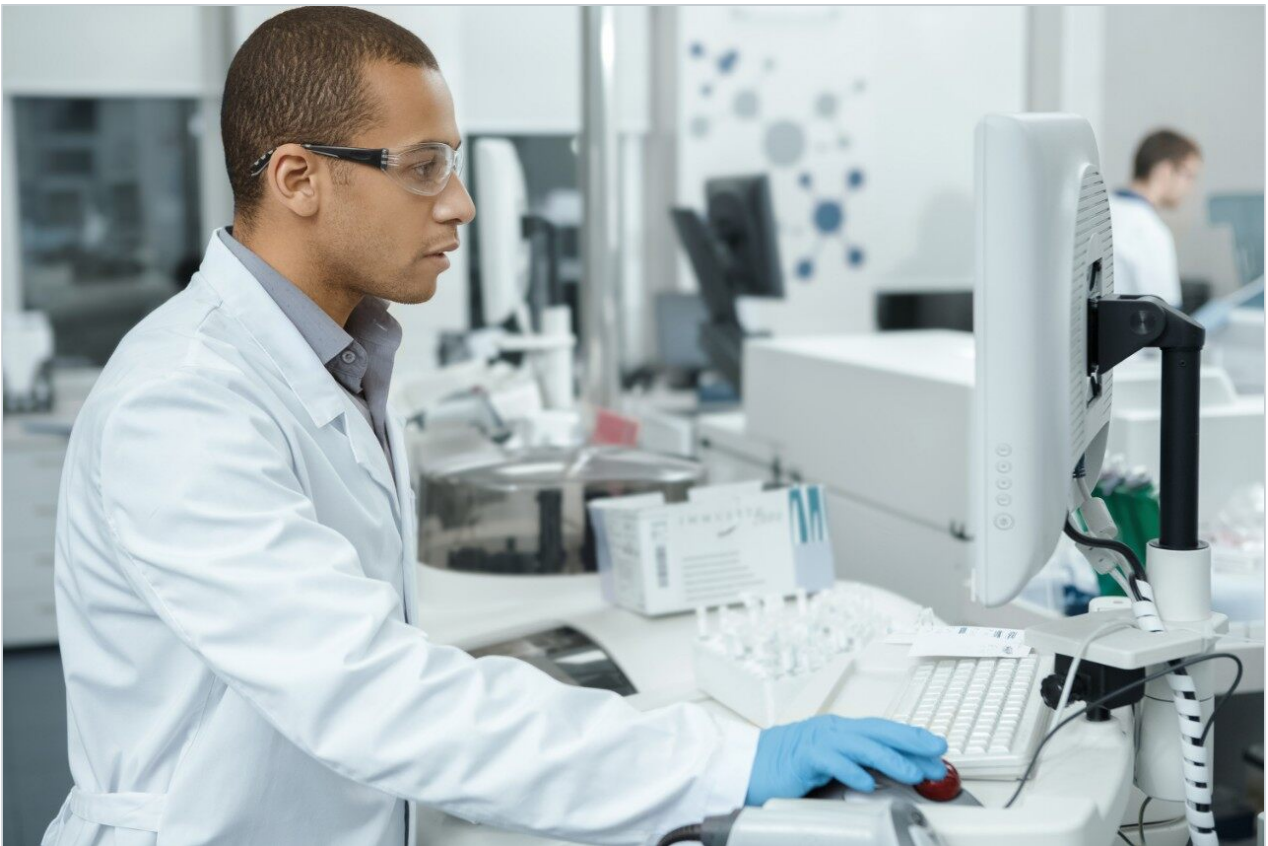


应用纪要

Waters ACQUITY RDa检测器为强制降解研究中的常规精确质量数测定提供一种简便易用的解决方案

Chris Henry, Paul D. Rainville

Waters Corporation



摘要

强制降解研究是制药公司开发稳定性指示方法的一项关键分析，需要提交FDA进行法规审批¹。高分辨率质谱(HRMS)技术常用于可靠地鉴定复杂混合物中的化学组分，但需要由经验丰富的用户进行操作和数据解析。沃特世近期推出了ACQUITY RDa检测器，旨在加快部署精确质量数测定技术，该系统融合了常规工作流程，用户无需具备HRMS专业知识即可操作。

本文介绍了辛伐他汀在酸性、碱性和氧化条件下的强制降解研究²。Waters ACQUITY UPLC I-Class PLUS成功将API（活性药物成分）与降解物分离。

自动鉴定所有主要降解物，并显示降解曲线随时间的变化，质量数误差小于3 ppm。同时以低能量和高能量功能进行全扫描，逐渐升高碎裂锥孔电压，生成碎片离子信息，以获得更多的结构信息。

优势

- 在药物降解研究中常规采集精确质量数
- SmartMS工作流程提供自动化数据采集、处理和结果报告功能
- 直观的系统健康状态检查和设置 - 无需手动调谐或校准
- 支持全面审计追踪的合规系统，有利于实现稳定可靠的数据完整性

简介

如FDA和ICH指导原则^{3,4}所述，药品和原料药的强制降解研究是药物分析开发的重要组成部分，需要表征已知及未知杂质。虽然紫外(UV)检测可用于降解物的常规监测，但需要采用高分辨率质谱(HRMS)等技术初步表征化合物。该技术通常要求分析人员具备专业知识才能操作仪器并解释生成的数据。

ACQUITY RDa检测器具有自动设置和校准功能，使拥有不同程度分析经验的科学家都可以实现精确质量数测定。非专家水平的用户也可以使用HRMS，让科学家能够获得更深入的分析信息。

此外，waters_connect软件平台使用专用的端对端SmartMS工作流程，在合规框架内自动采集、处理数据并报告结果。该功能使科学家可以在受法规监管的环境中轻松、可靠地使用该平台。本文以辛伐他汀分别在酸性、碱性和氧化条件下的强制降解研究为例，介绍了ACQUITY RDa检测器在此工作流程中的运用。证明UNIFI软件可自动鉴定辛伐他汀API及其产生的降解物并直观显示结果。使用具有碎裂功能的全扫描同时采集高能量谱

图和低能量谱图，获取碎片离子信息，从而提高化合物鉴定的可信度。

实验

辛伐他汀标准品购自Sigma（多塞特郡普尔）。用甲醇制备储备液，分别在三种条件下降解：即0.5 M盐酸、5 mM氢氧化钠和10%过氧化氢。

在60 °C下进行酸性降解和氧化降解，在室温下进行碱性降解。

样品随时间推移发生降解，在不同时间点采集等份试样进行分析，以剖析降解过程。

用流动相制备辛伐他汀对照溶液用于比较。

液相色谱条件

液相色谱系统：	ACQUITY UPLC I-Class PLUS
检测器：	TUV，检测波长238 nm
样品瓶：	TruView最大回收样品瓶（部件号：186005668 CV）
色谱柱：	ACQUITY BEH C ₁₈ , 2.1 mm × 50 mm, 1.7 μm（部件号：186003554）
柱温：	45 °C
样品温度：	6 °C
进样体积：	1 μL
流速：	0.6 mL/min
流动相A：	水 + 0.1%甲酸

流动相B:	乙腈 + 0.1 %甲酸
梯度:	流动相B在8 min内从25%升至90%

质谱条件

质谱系统:	ACQUITY RDa检测器
电离模式:	ESI+
采集范围:	100-2000 Da
毛细管电压:	1.5 kV (缺省值)
锥孔电压:	20 V
碎裂锥孔电压梯度:	120-170V
扫描速率:	10 Hz
脱溶剂气温度:	550 °C

数据管理

MS软件:	waters_connect基本软件包, 包含 waters_connect平台、UNIFI 1.9.12
-------	--

结果与讨论

ACQUITY RDa检测器配备全自动设置功能, 包括检测器设置、自动调谐和质量数校准。按照该常规设置, 当毛细管电压设为1.5 kV, 锥孔电压设为20 V时, 系统会采集MS全扫描精确质量数。

具有碎裂功能的全扫描模式允许锥孔电压递增，以便同时采集高能量谱图和低能量谱图。自动分配的碎片离子信息使化合物鉴定结果更加可信。

此外，还使用Waters ACQUITY TUV在238 nm下采集LC/UV色谱图用于比较。

利用低能量通道和高能量通道分别采集辛伐他汀对照样品的母离子和碎片离子信息（分别见图1和图2）。软件自动分配母离子和碎片离子，并直接在质谱图上标注。

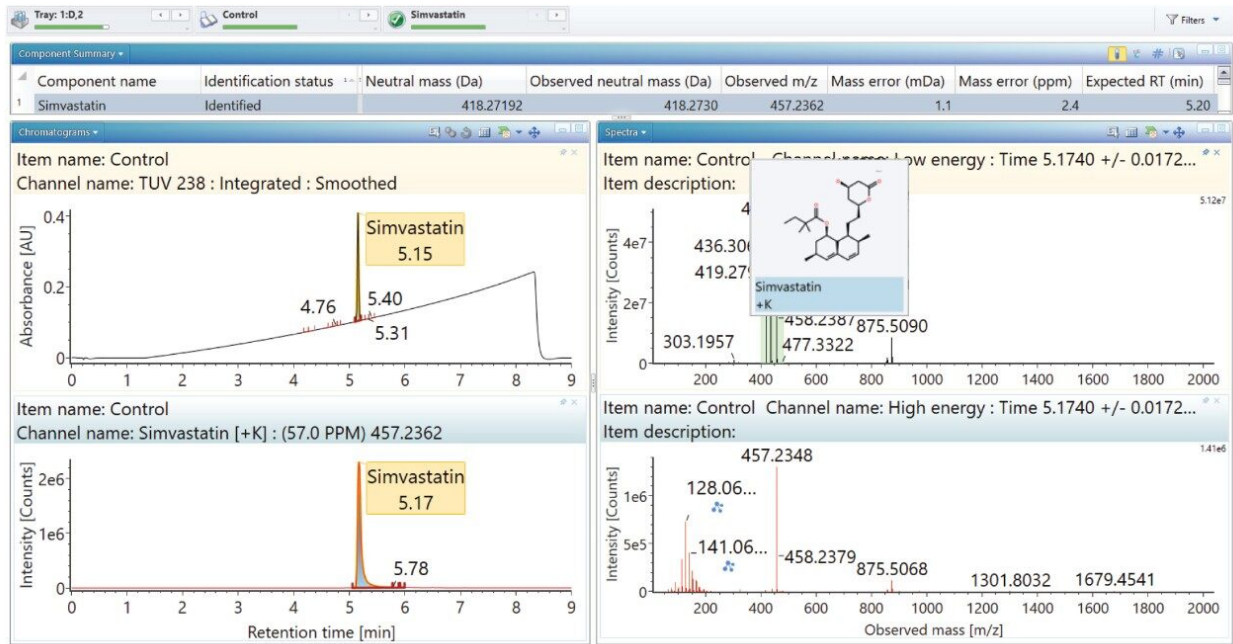


图1.母体化合物辛伐他汀的UV/XIC，图中显示了辛伐他汀基于.mol文件的结构

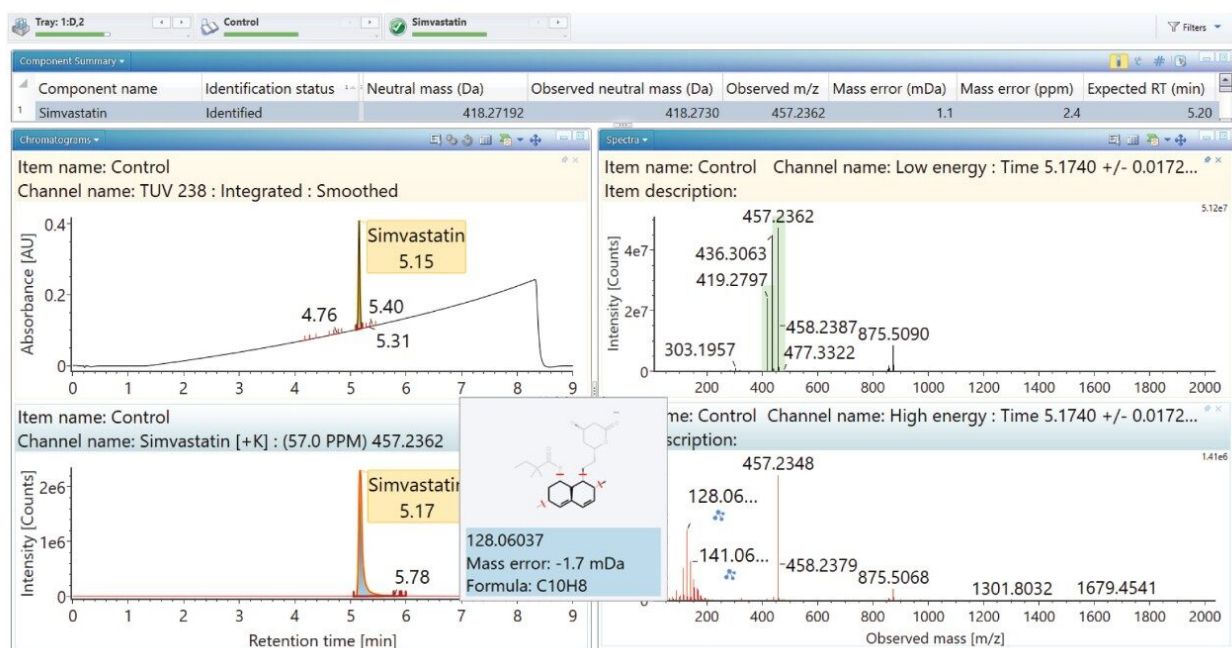


图2.根据辛伐他汀高能采集结果分配的碎片离子

辛伐他汀及其降解物容易形成钾加合离子；因此，该处理方法纳入了 $[M + K]^+$ 以及 $[M + H]^+$ 以自动分配检测到的加合离子。为成功鉴定与API相关的降解物，处理方法还包括在UNIFI中选择由降解引起的潜在转化^{5,6}。

选择“裂解工具”选项后，UNIFI将能够自动鉴定通过环裂解产生的碎片离子。这可能是由于该软件使用了化学智能算法对母体分子进行模拟裂解，并鉴定出可能的官能团，获得母体分子的结构知识。

辛伐他汀在本研究所述酸性和碱性条件下降解后产生的主要降解物是辛伐他汀酸（图3、4），是由四氢-4-羟基-2H-吡喃-2-酮环裂解后与二氢二醇(H₂O₂)基团键合形成的。在氧化条件下观察到的主要降解物是形成的二氢二醇物质（图5）。图中所示的所有降解物结构均基于API的.mol文件。

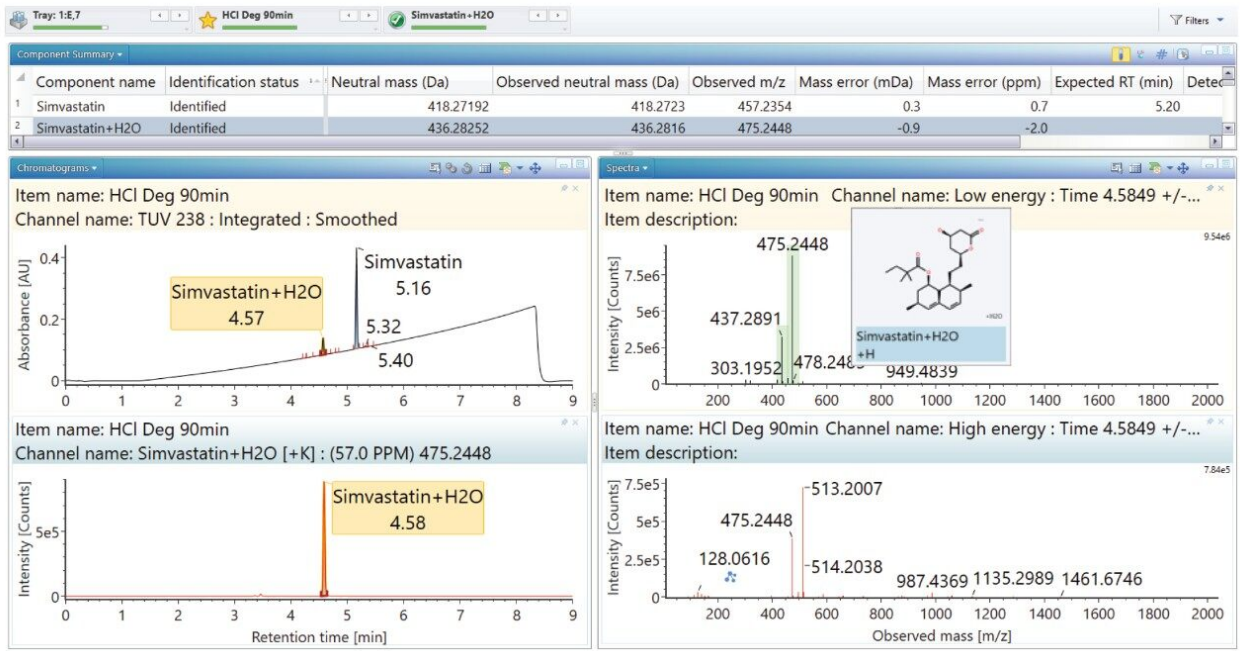


图3.辛伐他汀HCl降解物的UV/XIC，包括高能谱图和低能量谱图

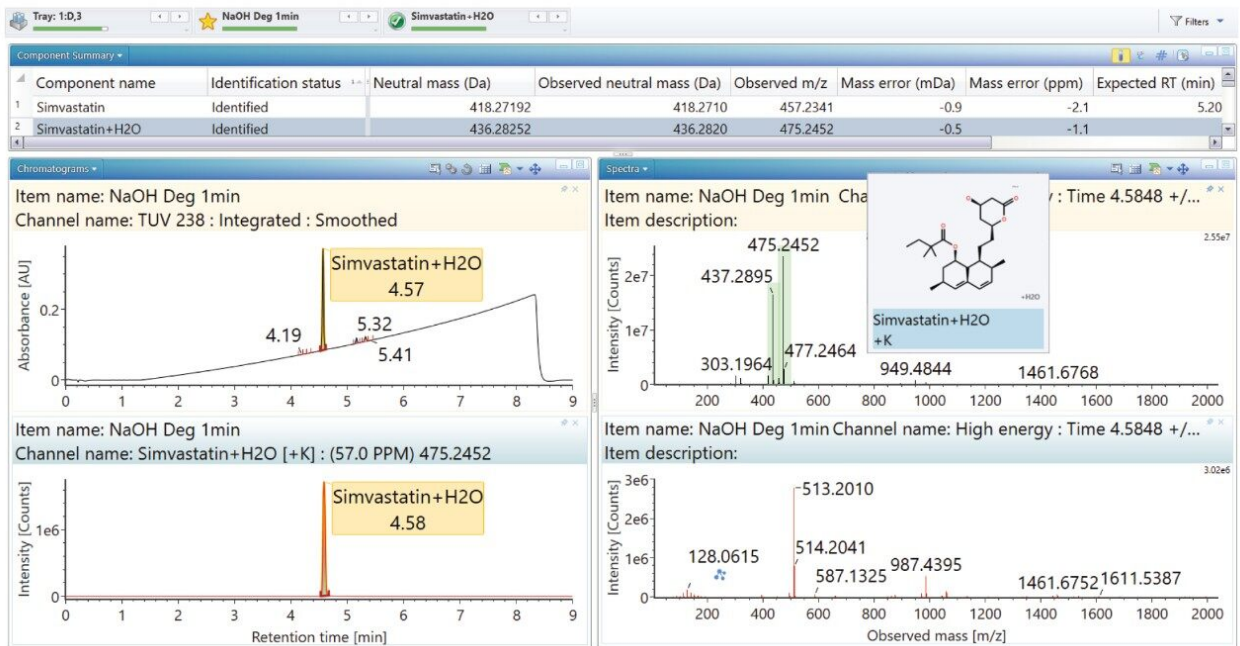


图4.辛伐他汀NaOH降解物的UV/XIC，包括高能谱图和低能量谱图

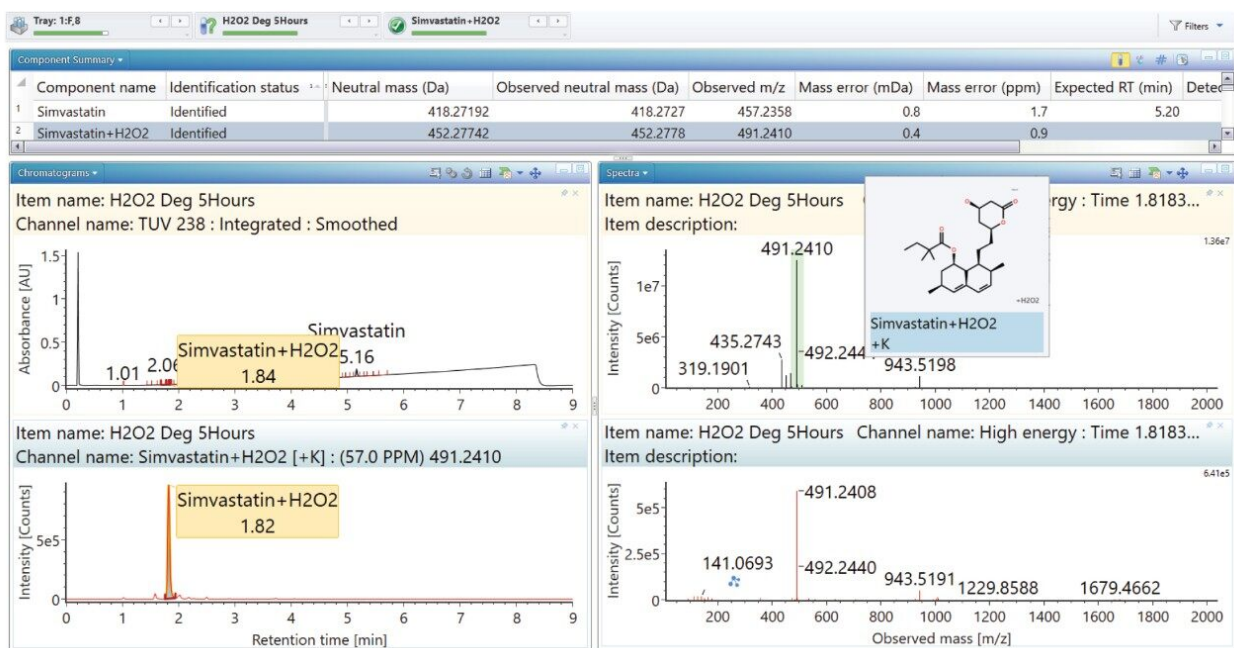


图5.辛伐他汀过氧化物降解物的UV/XIC，包括高能量谱图和低能量谱图

同时采集锥孔电压递增条件下得到的高能量谱图（图6、7和8），其中直观显示了建议的母体化合物碎裂位点

。

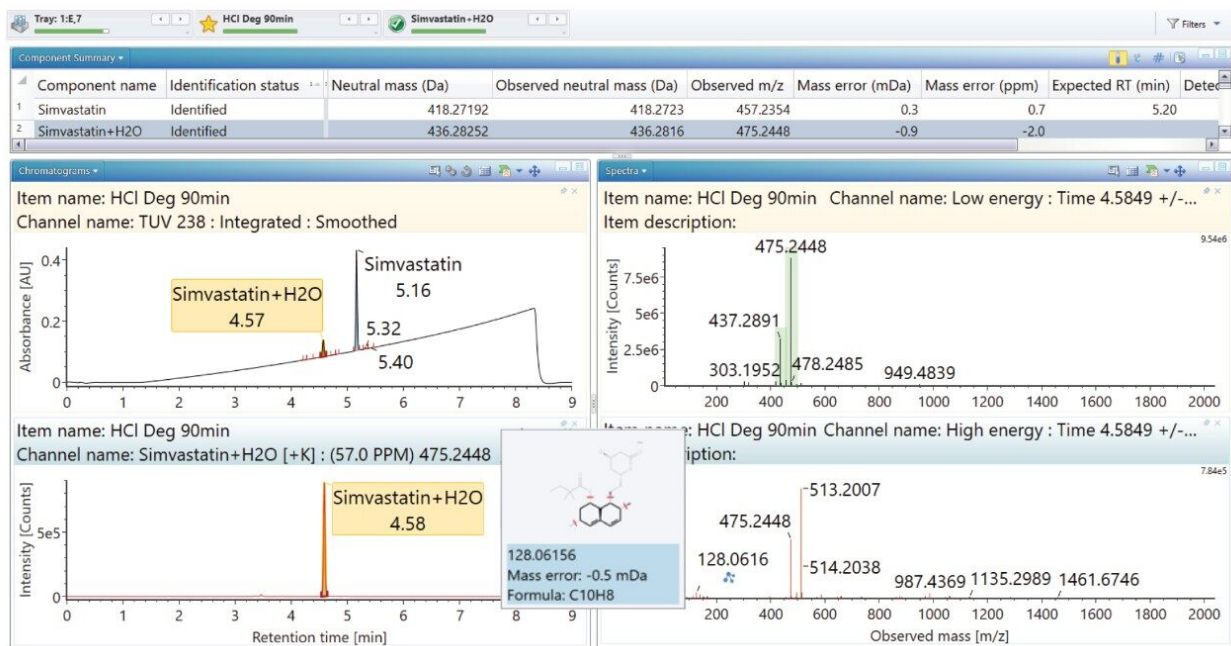


图6.辛伐他汀HCl降解物的UV/XIC，突出显示高能碎片离子

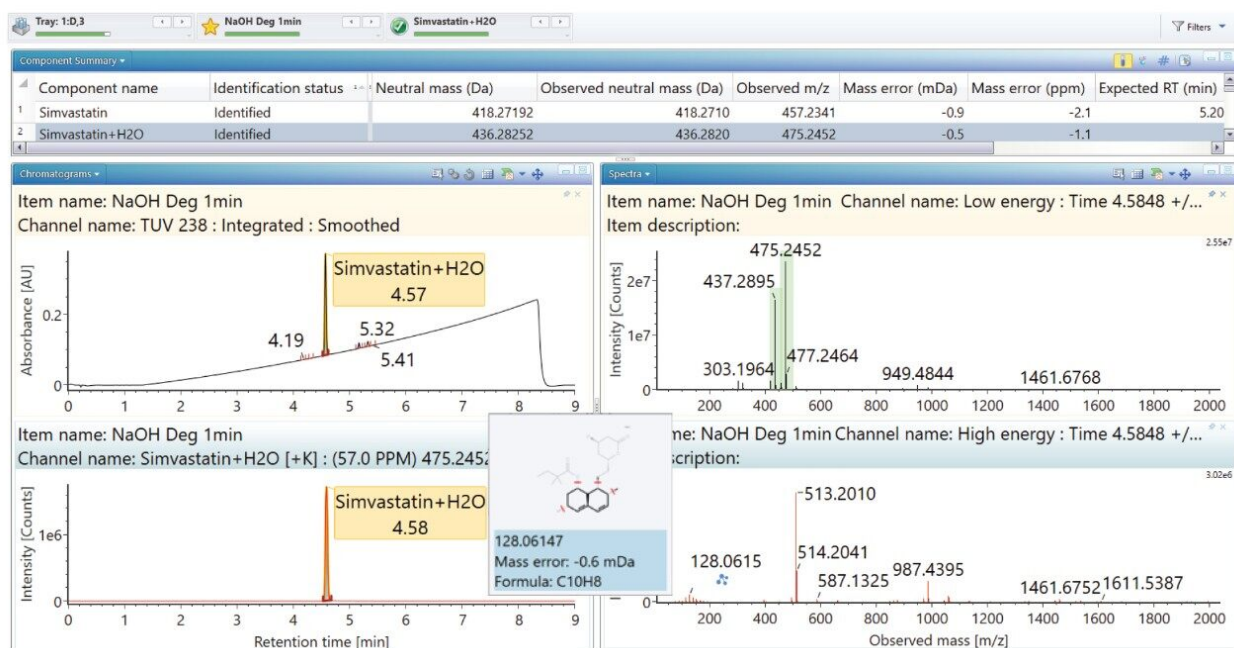


图7.辛伐他汀NaOH降解物的UV/XIC，突出显示高能碎片离子

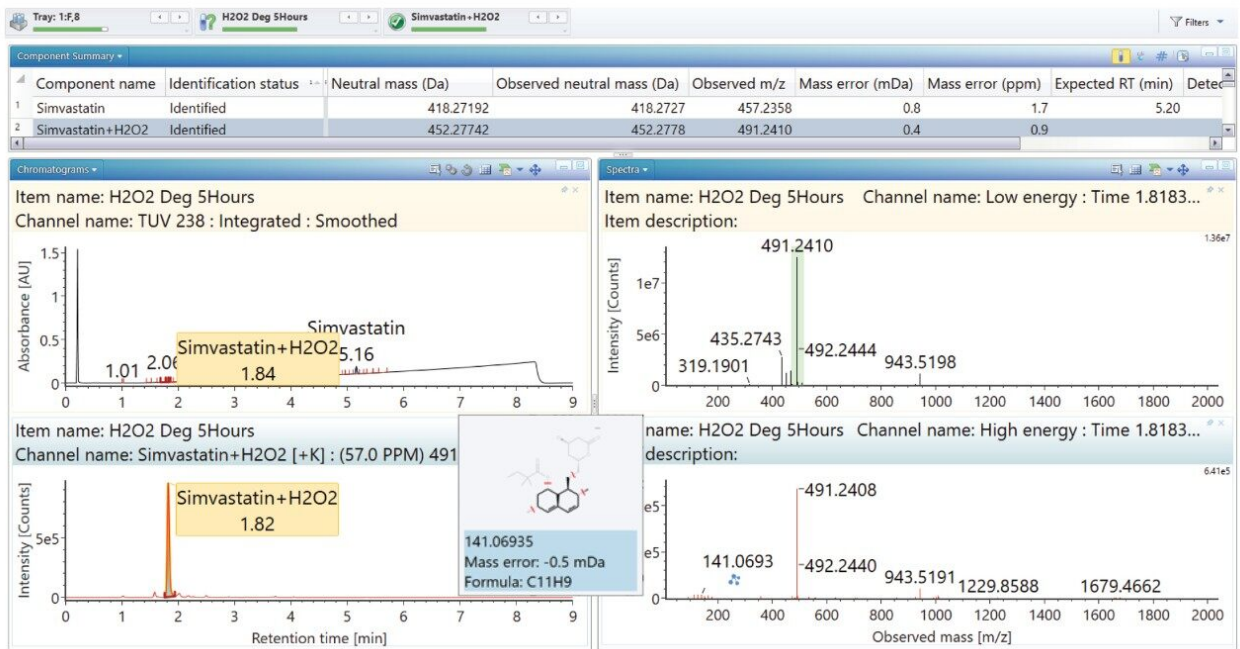


图8.辛伐他汀过氧化物降解物的UV/XIC，突出显示高能碎片离子

“汇总图”功能（图9、10和11）可以柱状图显示目标降解物随时间增加的情况。

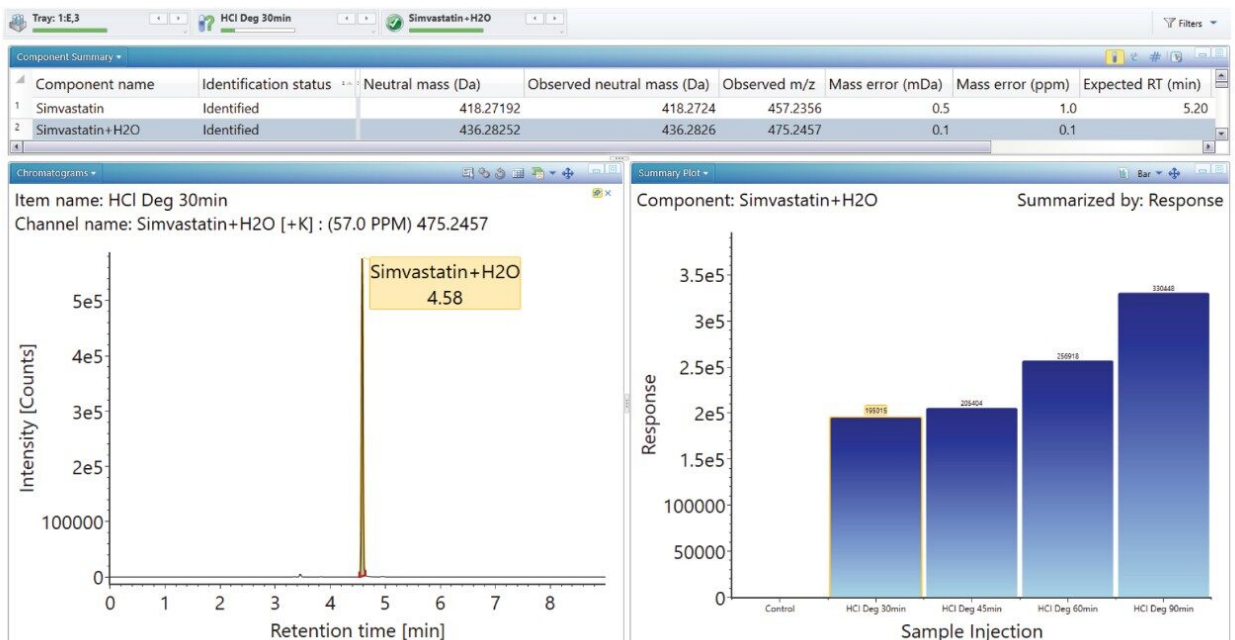


图9.辛伐他汀HCl降解物的UV/XIC以及辛伐他汀酸随时间变化的汇总图

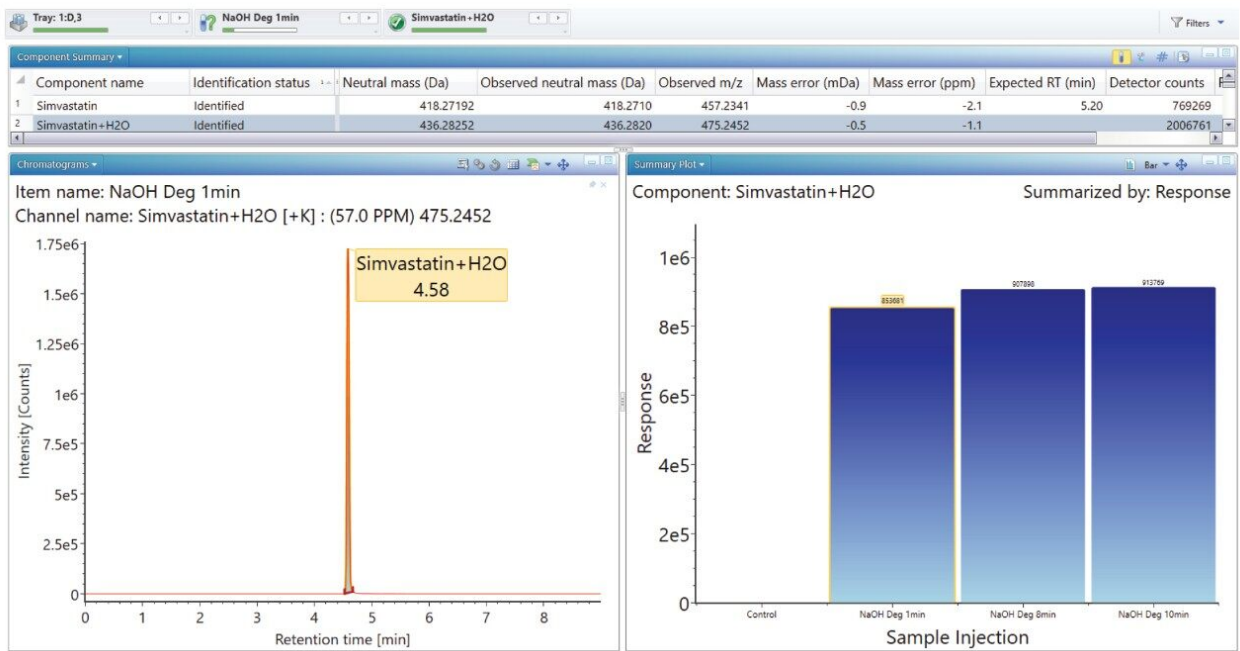


图10.辛伐他汀NaOH降解物的UV/XIC以及辛伐他汀酸随时间变化的汇总图

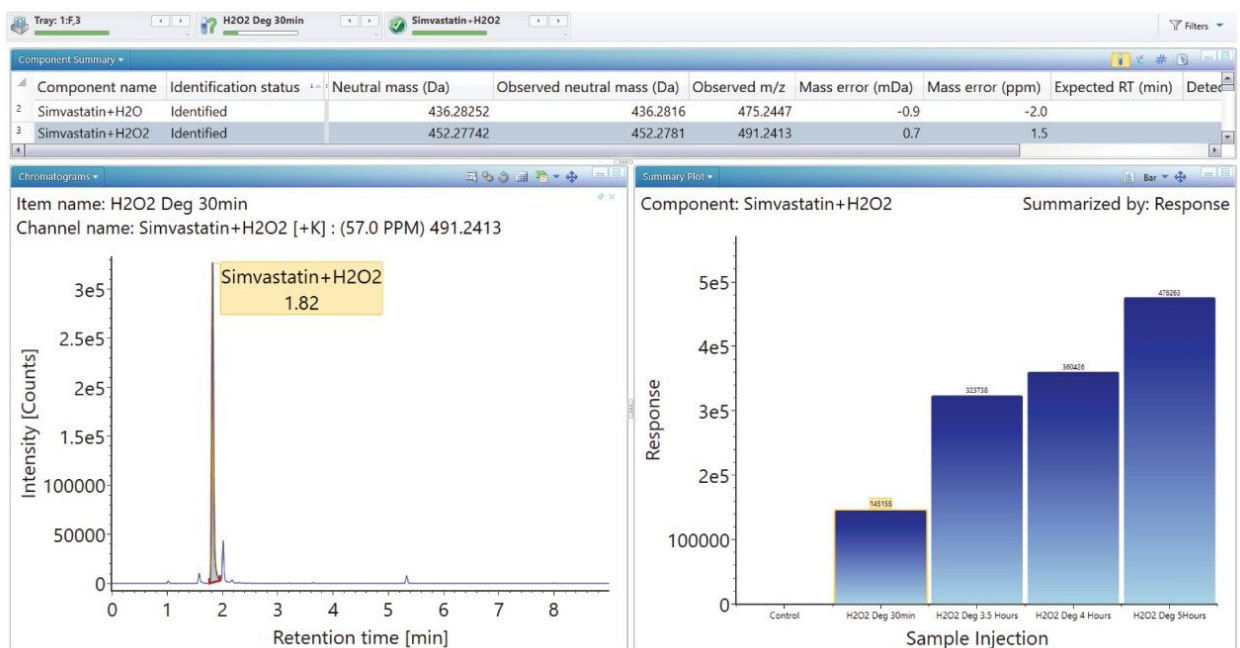


图11.辛伐他汀过氧化物降解物的UV/XIC以及二氢二醇降解物随时间变化的汇总图

从“汇总图”可以看出，辛伐他汀在碱性条件下的降解速度非常快，它在室温下不到1 min就几乎完全转化为

辛伐他汀酸。辛伐他汀在酸性和氧化条件下的降解速度较慢，分别在90 min和5 h采集降解等份试样，得到10~20% API降解率。

API、降解物以及碎片离子的质量数准确度在-1.9~2.4 ppm范围内。

结论

将ACQUITY RDa检测器与ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统和TUV联用，成功对辛伐他汀的强制降解进行了表征。利用包含UNIFI应用程序的waters_connect软件平台自动鉴定辛伐他汀及相应的降解产物，结果可信度较高。同时采集高能量数据，生成碎片离子，提供更高的化合物鉴定性能。所有化合物和碎片离子均表现出优异的质量精度（小于3 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。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。这种采集技术可为化学家提供丰富信息，让他们无需具备HRMS专业知识即可制定有关药物稳定性的明智决策。

参考资料

1. Patolia VN. An Introduction To Forced Degradation Studies For Drug Substance & Drug Product. *Pharmaceutical Online* Jan 9, 2020.
2. Alden P, Jones MD, Lefebvre P, and Plumb R. Utilizing UPLC-MS for Conducting Forced Degradation Studies.
3. ICH Guidelines, Q1A(R2): Stability Testing of New Drug Substances and Products (Revision2), International Conference on Harmonization.
4. FDA Guidance for Industry, INDs for Phase II and III Studies ~ Chemistry, Manufacturing, and Controls Information, Food and Drug Administration.
5. Laurent L, Mortishire-Smith RJ, Huisman M, Cuyckens F, Hartshorn MJ, Hill, A. IsoCore: Automated localization of Biotransformations by Mass Spectrometry using Product Ion Scoring of Virtual

Regioisomers. *Rapid Communication in Mass Spectrometry*, Pages 39-50, Dec 3, 2008

<https://doi.org/10.1002/rcm.3854> <<https://doi.org/10.1002/rcm.3854>> .

6. Kirk J, Mortishire-Smith R, Wrona M.: A Novel Approach Using UPLC-ToF MS^E and the UNIFI Scientific Information System to Facilitate Impurity Profiling of Pharmaceuticals, Ref: 720005604EN <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2016/impurity-profiling-of-pharmaceuticals-using-uplc-tof-mse-and-UNIFI.html>> Feb 2016.

特色产品

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

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

基于UNIFI的筛查平台解决方案 <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=134682903>>

720007124ZH, 2021年1月