

使用UHPLC和高分辨率质谱对激酶抑制剂伊马替尼中的未知杂质进行结构表征

Peng Chen, Matthew A. Lauber

Waters Corporation

摘要

UHPLC-HRMS方法揭示了激酶抑制剂伊马替尼合成过程中以前未鉴定的杂质。通过结合信息学工具和专家解读，对四种特定杂质进行了结构表征。在一项研究中，未知物在谱库数据系统中没有能够分配的匹配，我们为此进行了额外的查询工作，本文将该过程用做案例研究。分配可能的结构后，合成候选化学品用于结构确认。合成标准品显示出与未知杂质相匹配的光谱和质谱特征。

优势

- HR-MS/MS和离子淌度校准MS^E可提供清晰的碎片离子谱图用于结构表征
- 使用表面带电的苯己基RPLC色谱柱进行UPLC™分离可获得高灵敏度、高分离度色谱结果
- UNIFI™解析工具能够生成化学式、分配碎片离子、模拟谱库搜索和导入自定义结构
- 本文所述工作流程适用于其他药物杂质和降解产物的分析

简介

药物杂质和降解产物的结构表征是药物开发工作的重要组成部分，因为这些不需要的化学实体可能对患者产生不利的药理学或毒理学后果¹⁻²。对于活性药物成分中所含化学杂质和降解产物的结构研究，采用UHPLC和高分辨率质谱已成为一种标准做法³。由于杂质和降解物通常以痕量存在，因此收集和富集色谱馏分以供进一步的混合NMR分析既费时又具有挑战性。因此，有必要使用现有的替代方法来进行结构表征。例如查询新发现的目标化学品，方法如下：结合色谱分析（例如UHPLC）、通过高分辨率质谱生成化学式、MS/MS或MS^F碎片离子匹配（使用谱库谱图或使用模拟碎裂）、候选列表筛选和结构审查，以及利用真实标准品进行最终的结构确认。置信度分数高的推定结构归属在杂质评估中特别有用，但当需要精确的结构确认时，必须获取或合成最佳候选物用于结构确认。

如今，市面上大多数质谱仪都配备了可以应用MS/MS或MS^F碎片离子匹配算法的数据系统，这些系统通常还带有模拟碎裂程序⁴。也可以搜索标准MS/MS谱库，但应该理解的是，这种方法受限于当前可用谱库的大小以及不同采集方法和参数带来的变异性。尽管如此，这些搜索对分析人员依旧有帮助，因为它们提供了一个潜在相似化合物的列表，可以作为另一种算法或人工解读的起点⁵⁻⁶。

在药物的合成、生产和储存过程中产生的药物杂质和降解产物存在于成品中的含量经常不同。有些污染物和降解产物的结构以前可能从未被识别或记录过。这些物质可以分为两类：“已知-未知”是指众所周知但尚未与受检药物相关的化合物，“未知-未知”或“真正-未知”是指以前未鉴定过的新化合物。这两种情况都需要专家协助，以生成候选物化学式、确定碎裂途径、建议最可能的结构并获得合法标准品。

在之前关于UHPLC伊马替尼分析的应用纪要中，我们应用了表面带电杂化苯基柱和MS兼容流动相⁷来实现高效和高选择性分离。在该研究中，我们能够通过兼容LC-MS的分析快速分离伊马替尼及其九种相关杂质。这种现代化的方法使我们能够可视化相当多以前未鉴定的杂质，这些杂质的数量与文献中已经报道的数量相当。在这份报告中，我们结合使用沃特世的解析工具和专家解读，对四种特定杂质进行了结构表征。为这四种新杂质分配推定的结构，并使用其中一种来提供有关杂质鉴定(ID)的详细案例研究。得到的结构是由合同实验室专门合成的，用于后续结构确认。真实合成标准品的色谱保留时间、UV、MS、MS^F和MS/MS谱图与伊马替尼研究批次中未鉴定杂质的谱图非常匹配。

实验

伊马替尼是Sigma（产品货号CDS022173）的产品。4-[[4-[[4-[[4-甲基-3-[(4-3-吡啶基-2-嘧啶基)氨基]苯基]氨基甲酰基]苯基]甲基]-1-哌嗪基]甲基]苯甲酸（简称：伊马替尼苯甲酸）是在Toronto Research Chemicals专门合成的。虽然本报告中研究的伊马替尼批次是由化学品供应商而非制药商合成的，但其合成和纯化程序据称仍可能与

整个制药行业相关。

样品制备

用甲醇制备浓度为1 mg/mL的伊马替尼。

UPLC方法条件

UPLC系统:	ACQUITY™ UPLC I-Class
检测:	UV检测 (波长267 nm)
样品瓶:	全回收12 × 32 mm玻璃螺口瓶 (P/N: 186000384C)
色谱柱:	ACQUITY Premier UPLC CSH苯己基柱, 1.7 μm, 130 Å, 2.1 mm x 100 mm (P/N: 186009475)。
柱温:	35 °C
样品温度:	10 °C
进样体积:	1.0 μL
流速:	0.40 mL/min
流动相A:	0.1% (v/v)甲酸和10 mM甲酸铵的水溶液。
流动相B:	0.1% (v/v)甲酸的乙腈溶液。

质谱条件

质谱系统:	Vion IMS QTof
-------	---------------

电离模式：	ESI+和ESI-，分辨率
采集范围：	50–1000 <i>m/z</i>
毛细管电压：	2.5 kV
采样锥孔电压：	40 V
HDMS ^F 碰撞能量：	6 eV（低能量），20–50 eV梯度（高能量）
离子源温度：	150 °C
脱溶剂气温度：	600 °C
脱溶剂气流速：	1000 L/h

数据管理

UPLC和MS软件	UNIFI 1.9.4，用于数据采集和分析
-----------	-----------------------

结果与讨论

我们之前的应用纪要中使用了ACQUITY Premier CSH 130 Å, 1.7 μm苯己基柱来提高对伊马替尼杂质中含*N*杂环结构的选择性。伊马替尼及其九种相关杂质随后都实现了基线分离。图1显示了在这些改进的UPLC条件下发现的几种新的未知污染物。除了代表1-氧化物（通过与标准品比较）和EP杂质F、C、J和D⁸的多个已知峰外，还发现了四个明显的未知峰（未知物1至4）。使用HDMS^F（经离子淌度校准的High Definition MS^F）采集这些峰的碎片离子谱图。Waters™ UNIFI解析工具为未知物1和2生成了高分候选物，但未知物3和4得分较低，表明未知物3和4的结构可能不包含在谱库数据库中。通过由专家驱动的碎片离子分析提出了推定的结构，并将这些结构导入数据库的自定义科学库中。随后在科学库中搜索化合物3和4的实际High Definition MS^F碎片离子，获得了高置信度匹配分数（*i*-Fit置信度>95%），有力地证实了表征的结构。四个未知物的预计结构均列于表中。

虽然基于匹配分数的方法以及对碎裂途径的逻辑研究可以得出高度准确和可靠的结构归属，但仅靠MS方法无法明确地区分结构相似的异构体。因此，有必要结合其他补充信息（至少包括色谱保留时间和紫外谱图）。如果购买或合成真实的化学标准品来直接比较光谱和色谱结果可能会更好。本报告使用未知物3作为案例研究，展示如何协同使用由信息学驱动和专家驱动的方法，通过UHPLC-HRMS和化学验证对未知结构进行结构表征。具体操作包括但不限于以下内容：

1. 鉴定加合物模式、同位素模式和分子离子，其中正离子模式下常见的加合物包括 $(M+H)^+$ 、 $(M+NH_4)^+$ 、 $(M+Na)^+$ 、 $(M+K)^+$ 和 $(M-H_2O+H)^+$
2. 根据高分辨率MS数据生成化学式
3. 计算不饱和度（双键当量）
4. 主要碎片离子分析和推测逻辑碎裂路径
5. 提出分子结构
6. 将推定的分子结构导入UNIFI解析工具以进行匹配评分和碎片离子分析，高分会增加对推定结构归属的信心
7. 购买（如果有）或定制合成相应的标准品
8. 比较色谱保留时间和UV/MS/MS^E/MS/MS谱图
9. 执行加标实验

图2显示了正离子模式下目标离子(m/z 614.28)的MS^E碎片离子谱图。 $(M+H)^+$ 和 $(M+Na)^+$ 加合物模式的存在表明M可能是该未知分子的确切分子量。负离子模式下的MS^E实验进一步支持了这一观察结果，如图4所示，检测到 $(M-H)^-$ 。

解析工具也利用了该碎片离子在正离子模式和负离子模式下的 m/z 值来生成化学式和计算DBE（双键当量）。图3中394.165的碎片离子信号表明与伊马替尼有关，因为后者也产生了相同的碎片离子 m/z 值。强 $(M-H)^-$ 信号暗示分子中存在羧酸盐基团。根据现有信息，提出了一个假设结构。相应的碎裂途径如图4（正离子模式）和图5（负离子模式）所示。

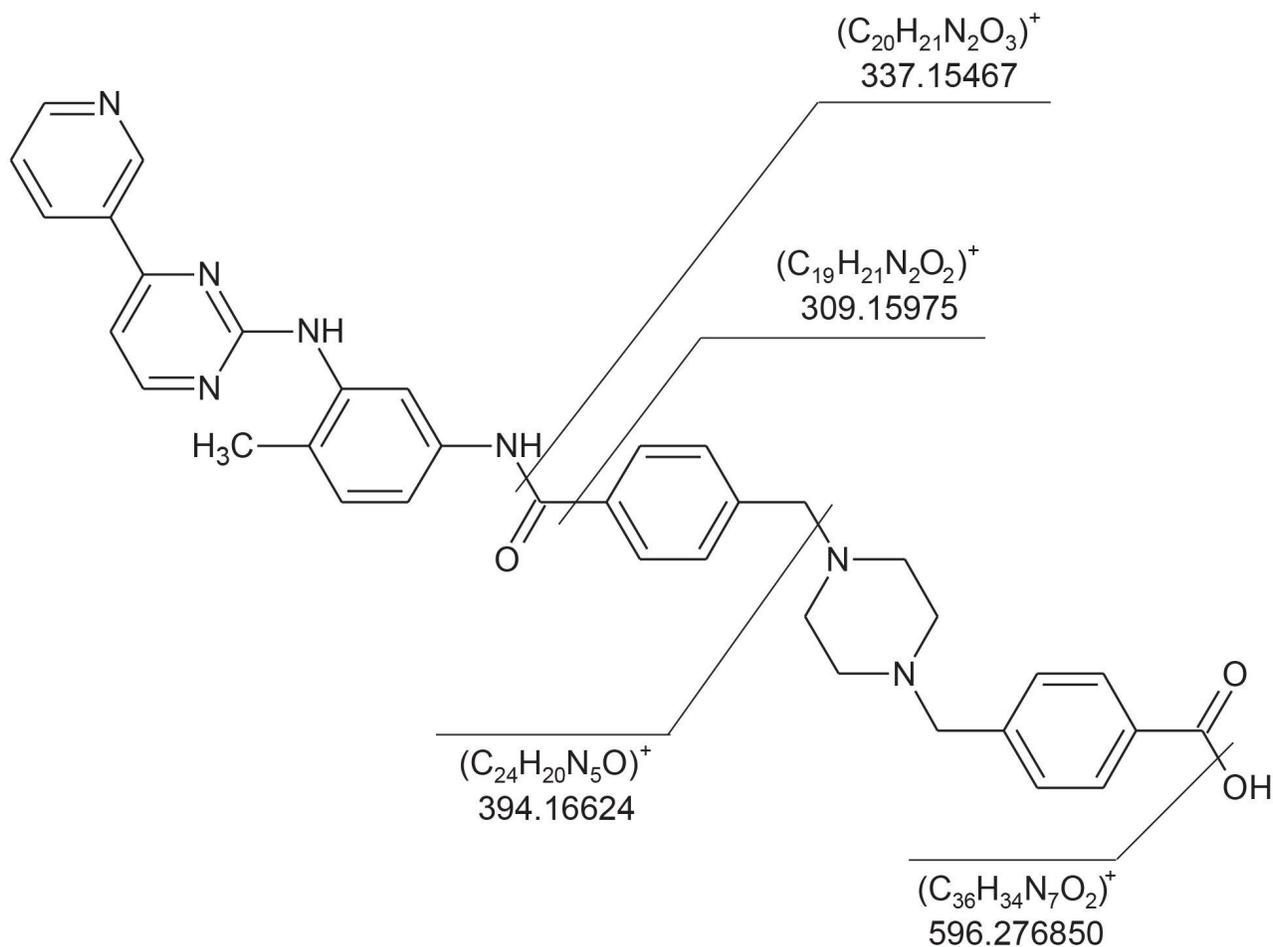


图4.未知物3预计分子的碎裂途径（正离子模式）

将提出的结构导入UNIFI解析工具的科学库中，用于搜索未知物3的 MS^E 谱图，获得出色的i-FiT置信度得分（正离子和负离子模式下分别为99.70%和100.00%）。凭借着对提出的结构建立的高置信度，合同实验室定制合成了候选分子。如图6-10所示，合成候选物的UV、 MS^E 和MS/MS谱图在两种电离模式下均优于未知物3的谱图。此外，加标实验证实存在匹配的RPLC保留时间（图11）。

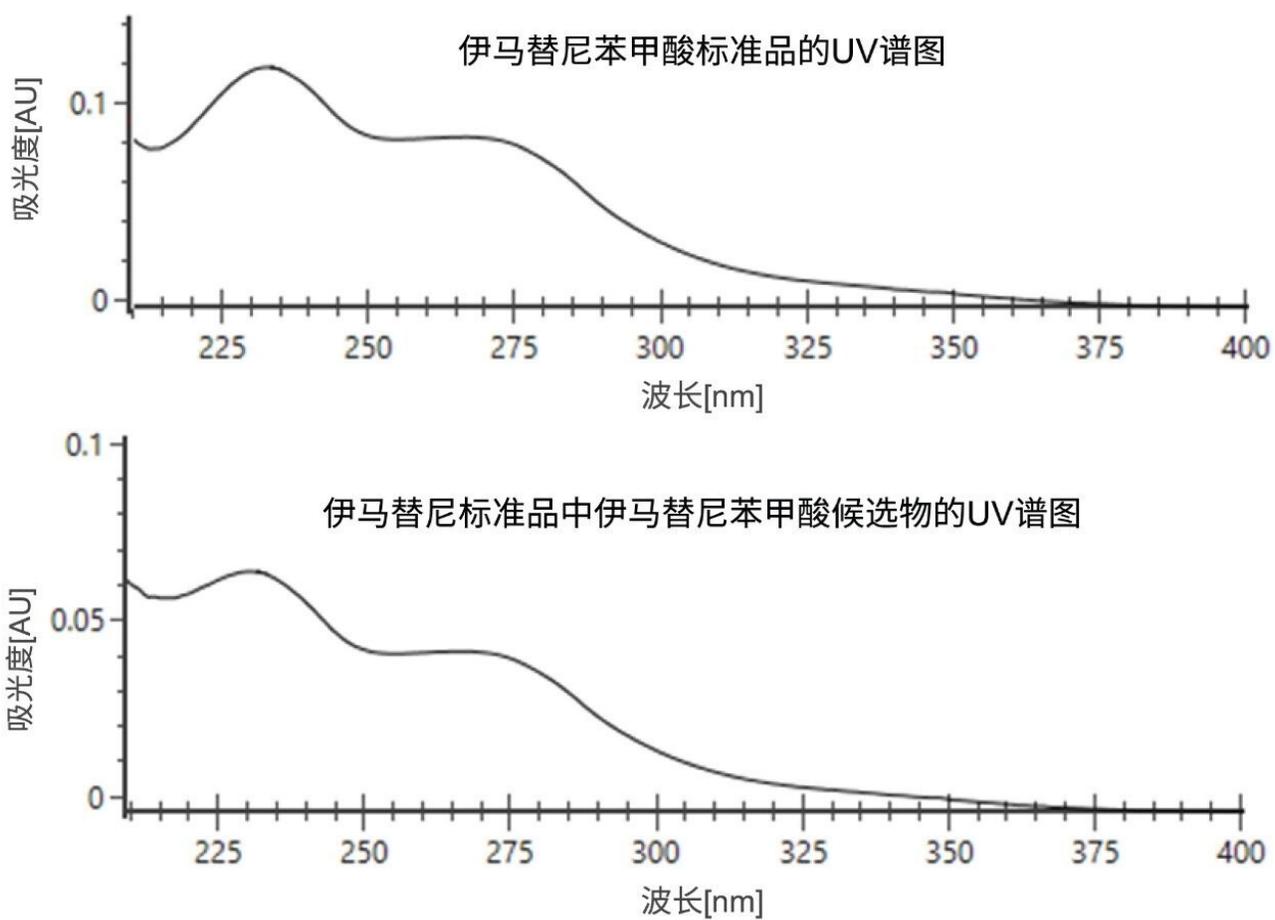


图6.伊马替尼苯甲酸（定制合成标准品）和未知物3的紫外谱图比较

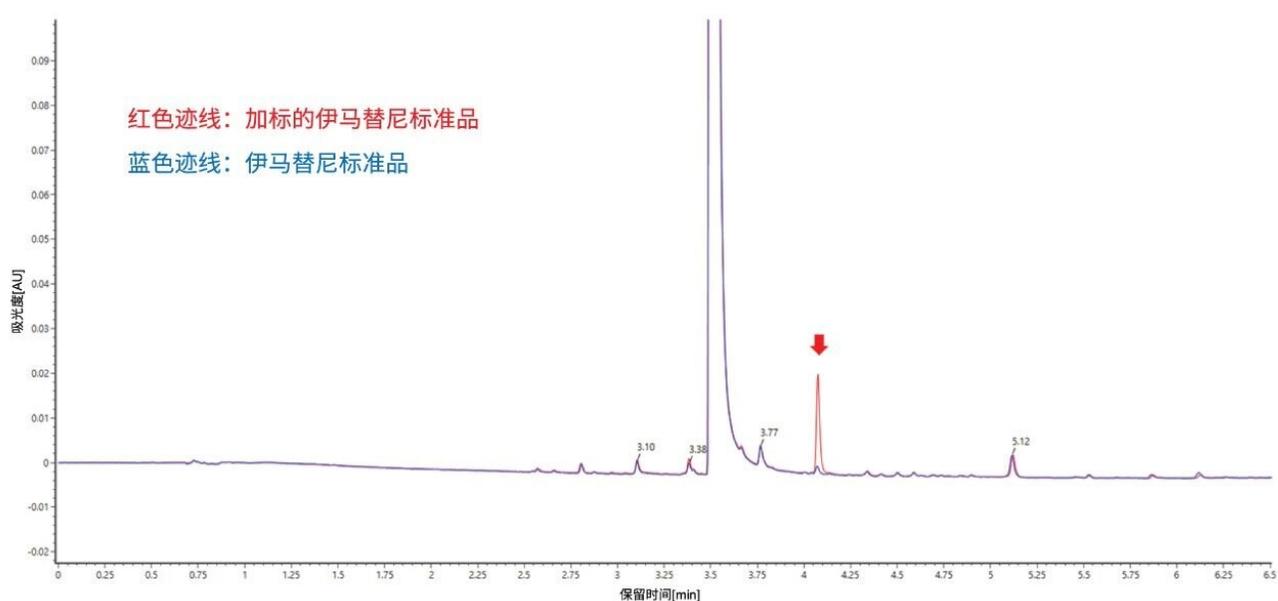


图11.伊马替尼和伊马替尼加标定制合成的4-苯甲酸伊马替尼标准品的UV叠加色谱图

结论

仅靠质谱鉴定未知化学物质仍然是一项具有挑战性的任务。得益于高分辨率High Definition MS^E（经离子淌度漂移时间校准）的发展以及沃特世开发和提供的解析工具包，对已知和未知的色谱峰进行结构表征变得更简单。本研究将高分辨率LC分离与HDMS^E数据采集相结合，提供了大量表征数据。将解析工具应用于这些数据，以揭示伊马替尼制备过程中四种先前未鉴定的杂质的化学结构。通过快速人工解读来扩展解析工具的结果，最终确定推断性鉴定结果。我们通过一项关于伊马替尼苯甲酸的案例研究展示了如何实施加合物模式识别、分子离子测定、碎片离子查询和结构归属。此案例研究还说明了如何将提出的结构导入自定义库以确认匹配得分。本文所述的分析方法预期将成为制药业杂质鉴定的现代LC-MS方法范本。

参考资料

1. Liu, Y. *et al.* Mass spectrometry-based structure elucidation of small molecule impurities and degradation products in pharmaceutical development. *Trends in Analytical Chemistry* 121, 115686 (2019).
2. Pan, C. *et al.* Identification of Pharmaceutical Impurities in Formulated Dosage Forms. *J Pharm Sci* 100, 1228–1259 (2011).
3. Li, M. *et al.* Application of LC–MSⁿ in conjunction with mechanism-based stress studies in the elucidation of drug impurity structure: Rapid identification of a process impurity in betamethasone 17-valerate drug substance. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 48, 1451–1456 (2008).
4. Tian, Z. *et al.* Strategies for structure elucidation of small molecules based on LC–MS/MS data from complex biological samples. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 20, 5085–5097 (2022).
5. Kind, T. *et al.* Advances in structure elucidation of small molecules using mass spectrometry. *Bioanal Rev* 2, 23–60 (2010).
6. Stein, S. Chemical Substructure Identification by Mass Spectral Library Searching. *J Am Soc Mass Spectrometry* 6, 644–655 (1995).
7. Chen, P. *et al.* 利用高分离度液相色谱与MS兼容流动相对激酶抑制剂伊马替尼进行现代化杂质分析. 沃特世应用纪要. [720007340ZH](#) (2021).
8. European Pharmacopoeia 10.0, 2926–2928.

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>>

720007848ZH, 2023年1月

© 2023 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](#)