



快速鉴定 · 准确定量

Q Exactive Focus 高分辨液质

药物杂质分析解决方案

禹重科技® ÜZONGLAB
成分分析仪器 | 表面测试仪器 | 样品前处理仪器

Thermo
SCIENTIFIC

目录

序言	3
杂质分析工作流程	4
Orbitrap 静电场轨道阱高分辨质谱技术介绍	5
Q Exactive Focus 四极杆静电场轨道阱台式高分辨质谱	5
高质量精度获得准确的杂质鉴定结果	6
超高分辨率解锁杂质同位素信息	7
高灵敏度带来卓越的杂质定量能力	7
质量轴优越的稳定性	8
数据分析	9
专业的杂质分析软件	9
Q Exactive Focus 在药物杂质分析中的应用	11
UHPLC 和高分辨率台式质谱仪联用分析霉酚酸酯的降解产物	11
奥美拉唑药物杂质快速鉴定	14
Q Exactive Series 应用于药物分析的部分客户文章列表	17
附录	18
药物杂质研究相关官方网站	19

序言

药物杂质因其可能对药品质量、安全性和有效性产生影响，目前成为国内外药品监管机构的重点关注内容之一。随着我国医药产品出口规模的扩大，了解国外法规市场的药物杂质控制要求、加强对药物杂质的分析与控制已成为国内药品生产企业共同关注的话题。

任何影响药物纯度的物质统称为杂质，人用药物注册技术要求国际协调会（简称 ICH）对杂质的定义为药物中存在的，化学结构与该药物不一致的任何成分。药物中含有杂质会降低疗效，影响药物的稳定性，有的甚至对人体健康有害或产生其他毒副作用。因此，检测有关物质，控制纯度对确保用药安全有效，保证药物质量是非常重要的。

杂质谱分析是指研究药物中存在的已知和未知杂质的分布情况，分析药物中杂质的来源和去向，通过杂质谱的研究，可以全面评估药物的安全性。对于药物生产阶段，杂质谱研究可以在工艺过程中建立完整可靠的杂质分析方法，对工艺的关键步骤监控

杂质的变化情况，验证杂质分析方法并转移到 QA/QC，对于药物研发阶段，需要对工艺研发过程中的杂质进行鉴定和表征并进一步确认杂质的来源，研发人员根据分析结果可以评价药物的安全性和与原研药的一致性，并根据杂质来源进一步优化工艺，降低或消除杂质的产生。

有机杂质主要起源于起始原料及其本身所含杂质、生产过程中带入的合成中间体与副反应产物、成品在储存过程中产生的降解产物，辅料带入的杂质或辅料相互作用降解产生的杂质，及药物与包材相互作用产生的杂质。随着高分辨质谱仪近年来的不断发展，已成为实验室常用设备。借助超高的分辨率，高分辨质谱可以准确地测得杂质的精确质荷比，进而计算出杂质的元素组成，并能区分复杂背景中质量数接近的杂质及共流出组分，具备复杂基质中痕量杂质的分析能力。采用的高分辨全扫描方式也不会遗漏未知杂质的信息，是一种可以针对目标或非目标药杂质研究的有力工具，在药物质量研究领域得到越来越多的应用。

杂质分析工作流程

药物中的杂质往往含量很小，在大量的母药存在下，检测到微量的杂质是对质谱技术的一大挑战，采集到杂质的质谱信息后，对这些工艺杂质或降解产物的结构进行有效的解析是另一大挑战。赛默飞的静电场轨道阱质谱技术有效的解决了以上杂质研究难题，其高灵敏度和宽广的动态范围能够采集到微量杂质的有效质谱信息，超高的分辨率可以有效区分杂质与干扰物质，无需花费大量时间用于色谱条件的优化，就可以凭借高分辨能力区分所有共流出组分。HCD 高能碰撞池提供丰富的碎片，结合一级和二级的的高质量精度可以获得有效的元素组成与结构信息。结合色谱高效的分离能力和专业的结构解析软件，赛默飞建立了专门针对杂质分析的解决方案。

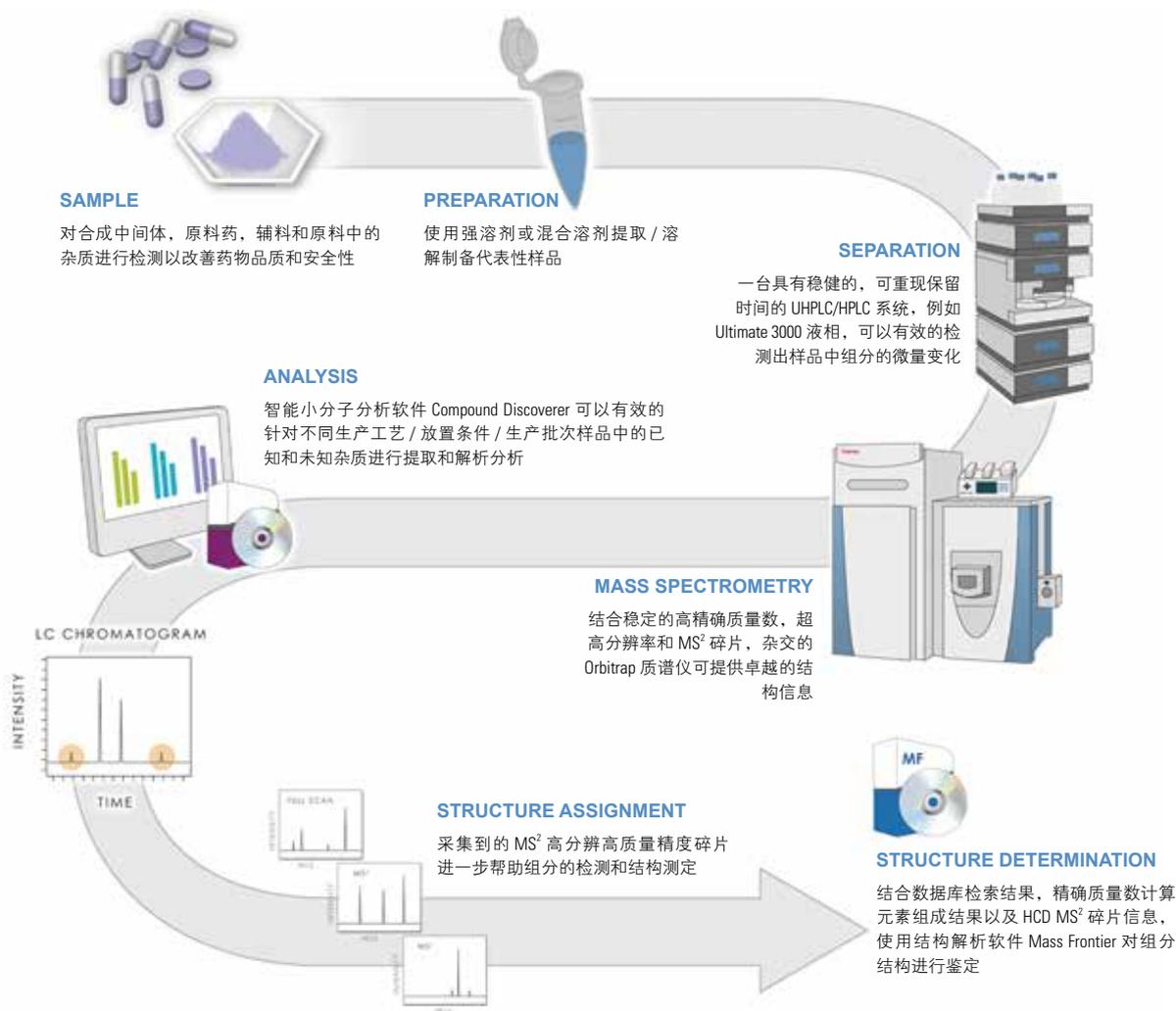


图1. 基于Q Exactive Focus的杂质解析流程

Orbitrap 静电场轨道阱高分辨质谱技术介绍

- 静电场轨道阱质谱是近年来新兴的一种高分辨质谱质量分析器，它是 2000 年俄国科学家 Makarov 发明的一种新型的质谱仪，其质量分析器形状如同仿榧体，由仿榧形中心内电极和左右 2 个外仿榧半电极组成。仪器工作时，在中心电极逐渐加上直流高压，在 Orbitrap 内产生特殊几何结构的静电场。当离子进入到 Orbitrap 室内后，受到中心电场的引力，即开始围绕中心电极作圆周轨道运动，同时离子受到垂直方向的离心力和水平方向的推力，而沿中心内电极作水平和垂直方向的震荡。外电极除限制离子的运行轨道范围，同时检测由离子振荡产生的感应电势，其中水平震荡的频率和分子离子的质荷比 (m/z) 的关系可由右侧数学公式来描述。从 Orbitrap 的每个外电极输出的信号经过微分放大器放大后由快速傅叶转换变成频谱，频谱再进而转换为质谱。

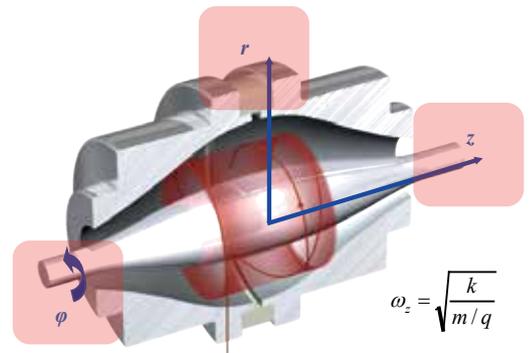


图2. 静电场轨道阱质量分析器

- Orbitrap 的高性能和可靠性，已经被市场所证明，其应用范围涉及药物研发、食品安全、环境监测、司法检验等众多领域，包括 1. 药物发现和开发各阶段，代谢产物鉴定，杂质研究；2. 食品安全化学残留物筛查；3. 环境有害物质监控；4. 体育比赛兴奋剂的确认检测；5. 法医毒品毒物检测等各个领域

Q Exactive Focus 四极杆静电场轨道阱台式高分辨质谱

Q Exactive Focus 是基于 Orbitrap 技术的台式高分辨质谱，将高性能四极杆的母离子选择性与高分辨的准确质量数 (HR/AM) Orbitrap 检测技术相结合，提供优异性能和出色多功能性。Q Exactive Focus 质谱仪能进行高精度的目标杂质筛选或非目标杂质鉴定，高品质的数据可提供更加可靠的杂质定性和定量检测。

- 高性能四极杆具有精确的母离子选择性和高效的离子传输能力，有效地降低噪音
- 高达 70,000 FWHM 的分辨率以及 < 1 ppm 的质量精度实现可靠的鉴定
- 多重检测和先进的信号处理技术能够更好的与 UHPLC 兼容，确保数据采集速度以提高通量
- 在 MS 和 MS/MS 模式下快速有效的正负切换确保在单次运行中检测更多化合物



图3. Q Exactive Focus四极杆静电场轨道阱质谱仪

高质量精度获得准确的杂质鉴定结果

Q Exactive Focus 扫描速度可与 UHPLC 完美兼容，在对甲萘威的检测中，无论是低浓度的数据点还是高浓度的数据点 Q Exactive Focus 都获得了小于 1ppm 的精确分子量。高质量精度贯穿整个采样过程，每个采样点的数据都值得信赖，无需经过谱图的平均，可以生成准确的元素组成。

在生成母离子的元素组成之后，为了进一步对杂质结构进行解析，还需要计算碎片离子的元素组成，二级质谱的质量精度直接影响碎片元素组成的准确性。Q Exactive Focus 对于二级碎片，仍然可以保持高的质量精度，保证元素组成和裂解机理的准确性。

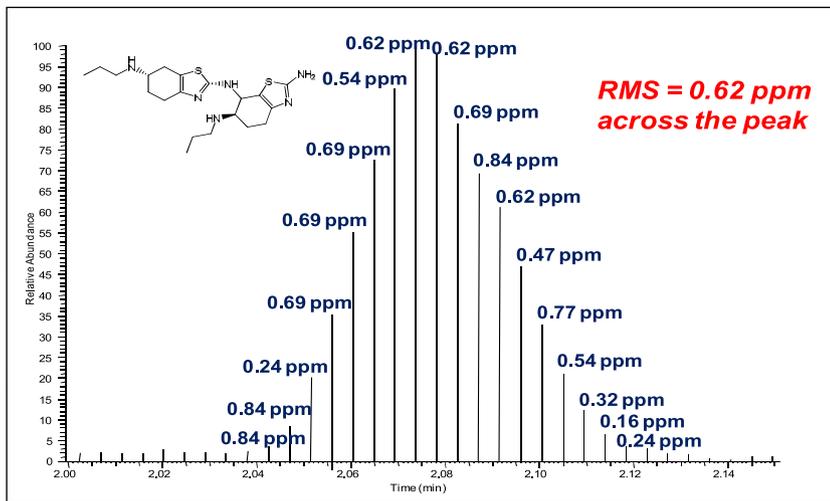


图4. 一个色谱峰内每个扫描点的质量精度

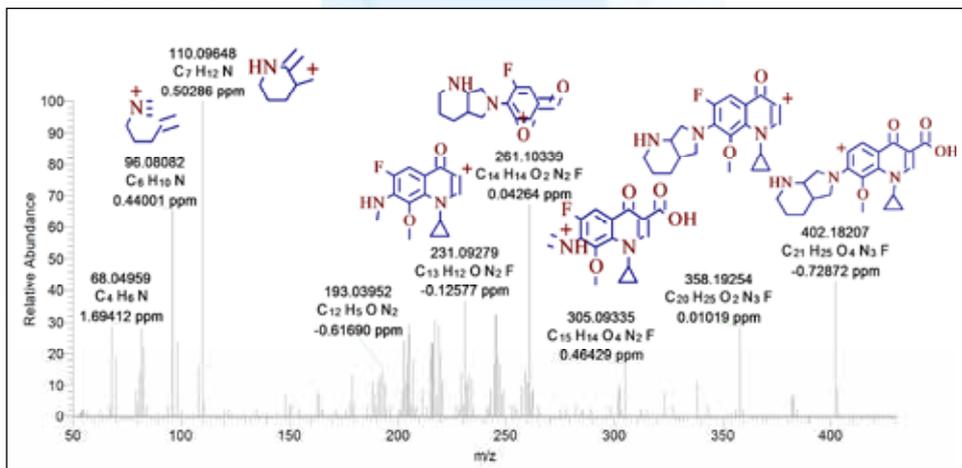


图5. 二级质谱质量精度

超高分辨率解锁杂质同位素信息

高分辨高质量精度 (HRAM) 的一级和二级质谱数据是未知杂质分析的有力工具,但这并非是用来结构解析的唯一依据, Q Exactive Focus 具有比常规高分辨更高的分辨率 (70,000 FWHM), 超高的分辨率可用于进一步解锁同位素信息, 如下图中, 可将 ^{15}N 与 ^{13}C 同位素分离, 由此可判断该化合物中含有元素 C 和 N, 进一步通过两者同位素丰度比, 可判断出化合物中 C 和 N 的元素比例, 获得更准确而唯一的杂质鉴定结果。

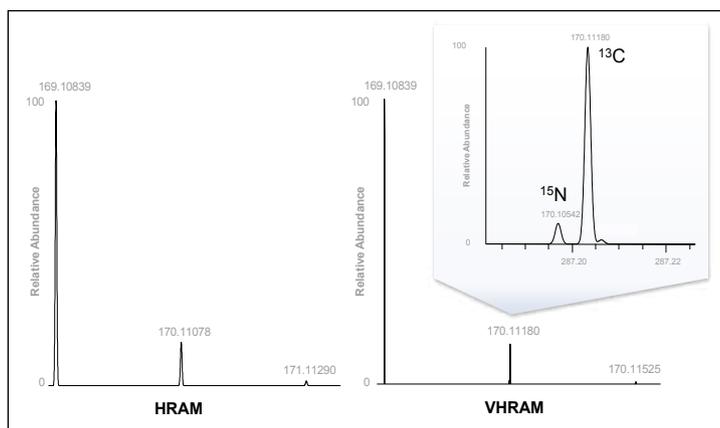


图6. 超高分辨率分离 ^{15}N 与 ^{13}C 同位素

高灵敏度带来卓越的杂质定量能力

在杂质定量研究中, Q Exactive Focus 系统具有和三重四极杆质谱相当的灵敏度和定量能力, 可以对法规要求的低浓度基因毒性杂质进行很好的检出与鉴定。和四极杆质谱常用的选择离子监测 (SIM) 和选择反应监测 (SRM) 扫描方式不同, Q Exactive Focus 不需要事先用标准品建立谱库和方法, 只要有化合物的分子式信息就可进行定量信号的提取。其超高的分辨率可区分背景基体干扰物, 获得和三重四极杆质谱相当的灵敏度和定量能力, 对法规要求的低浓度基因毒性杂质可进行很好的检出与鉴定。采用全扫描的定量方式可记录样品中所有已知和未知杂质的信息, 方便数据的回溯分析。

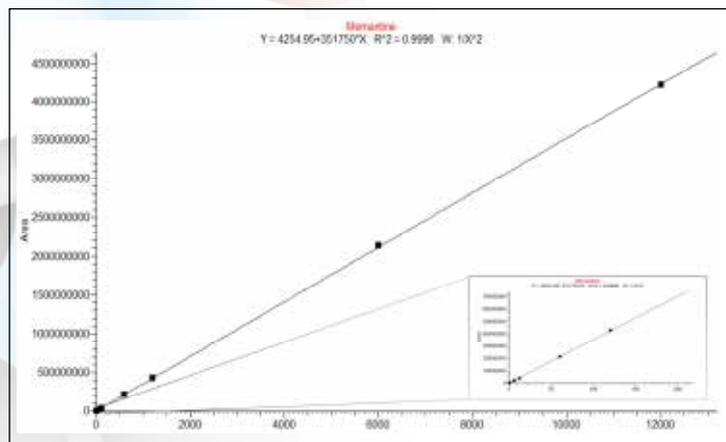


图7. 优越的定量结果 (5.5个数量级的线性范围)

质量轴优越的稳定性

长期质量轴稳定性实验考察结果表明，Q Exactive Focus 对实验室环境有很强的耐受性，仅使用外标校正就能够在温度波动的情况下保持长期稳定的质量准确度。

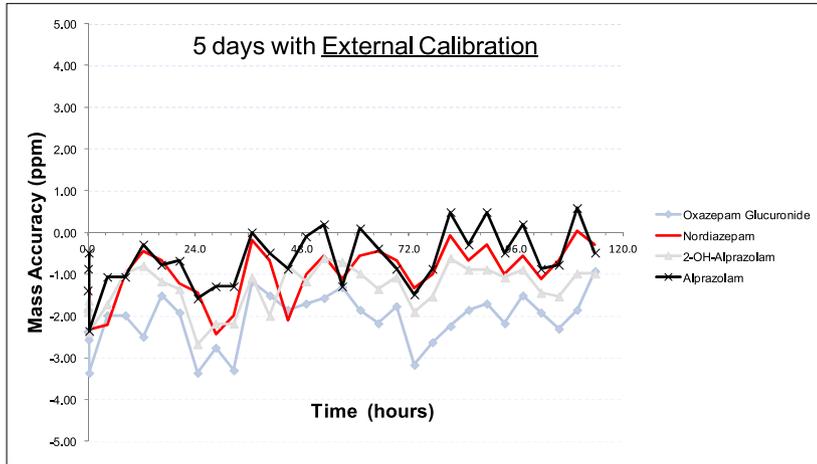


图8. 外标法校正5天质量精度平均偏差<2ppm

药物中的杂质在不同电离极性之间的电离效率可能会有巨大差异。而在 MS 和 MS/MS 模式下扫描间正负极性的快速切换，确保 Q Exactive Focus 系统能够在单次色谱运行中最大限度地检测和鉴定杂质。

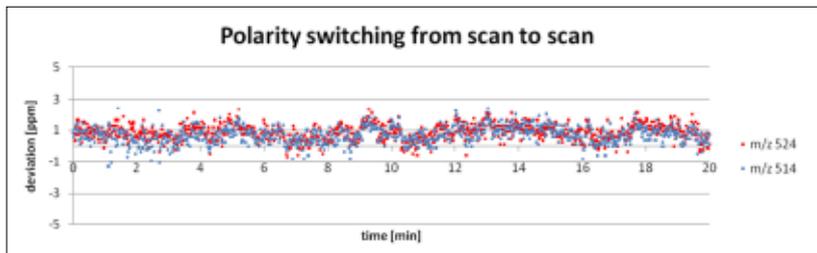


图9. 快速正负切换质量精度平均偏差<2ppm

数据分析

杂质的种类繁多，来源广泛，即使是相同元素组成的化合物，结构也可能完全不同，所以需要专业的分析软件对采集到的数据进行分析，对可能的杂质进行有效的提取和分析，对推测的结构式进行判断。

专业杂质分析软件

Compound Discoverer（化合物发现者）是智能的小分子化合物发现和鉴定软件。研究人员使用该软件，可以方便的实现以下功能：

- 可根据预设的分类对不同条件下的样品进行分组和批量处理；
- 根据研究需要设定自定义的数据处理流程；
- 利用多种先进的处理技术：多重质量亏损过滤（MMDF）、同位素过滤（IPF）、碎片离子检索（FISH Scoring）等功能对预期和未知的有关物质进行提取分析；
- 在结果浏览中直观的获得不同条件下样品差异比对结果。

Mass Frontier 专业的结构解析软件为质谱谱图的管理、评估和解析提供精密的特性。通过调用丰富的碎裂数据，可快速的对母药碎片结构进行了准确推测和归属，通过对杂质与母药的比对分析，可进一步对杂质变化位点进行推测，最终获得全面的杂质鉴定结果。

使用 Mass Frontier 软件，研究人员可以方便的从已采集的数据中获取以下信息：

- 化合物的裂解机理

因为杂质的结构和母药的结构往往类似或者具有渊源，所以了解母药的裂解规律可以帮助判断杂质的碎片结构，进一步推测出杂质的结构。

以前的方法仅仅依靠研究者的个人经验，或者纯理论的计算，使得数据分析的重现性和准确性受到了限制。



图10. 专业的杂质分析软件

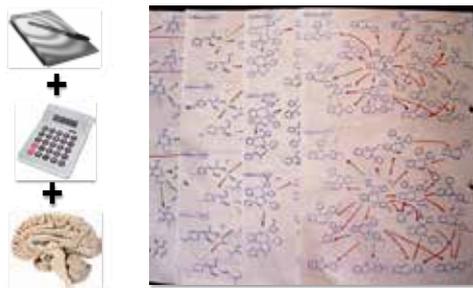


图11. 传统结构解析方法

Mass Frontier 所含有的 Fragmentation Library 碎裂机理谱图库是从现存的所有关于质谱的出版物中收集而来，几乎涵盖了所有已发表的文献。每一种机理，连同其化学结构，都经过人工和自动核对，然后连同标题、作者及信息来源等附带信息一块储存于谱图库中。谱图库所收集的信息，加上通用的电离、碎裂和重组规则，为碎裂机理的预测提供了有力的保障。Mass Frontier 还可以允许用户创建基于客户自定义碎裂机理上的谱图库，并能学会并运用这些机理来智能预测碎片分子。

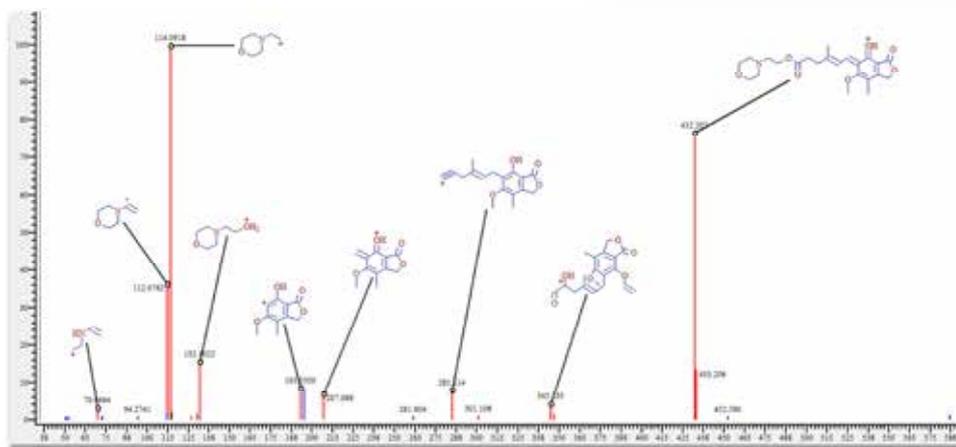


图12. Fragmentation Library根据已发表文献提供霉酚酸酯杂质裂解机理

- 有关物质的检获

一些杂质组分会因为信号响应太低，或者形成的色谱峰不够尖锐，而被研究人员忽略，但是含量很低的毒性杂质严重的影响药物安全性，漏检不仅会极大的影响用药的安全性，也会间接影响到新药申报。

Mass Frontier 的 Fragment Ion Search (FISh) 可通过过滤无论是由理论裂解预测还是由实验 MSⁿ 质谱谱树获得的一组裂解碎片可对结构相似化合物进行快速筛选，通过杂质与母药的碎片比对查找，精确的找出所有有关杂质。

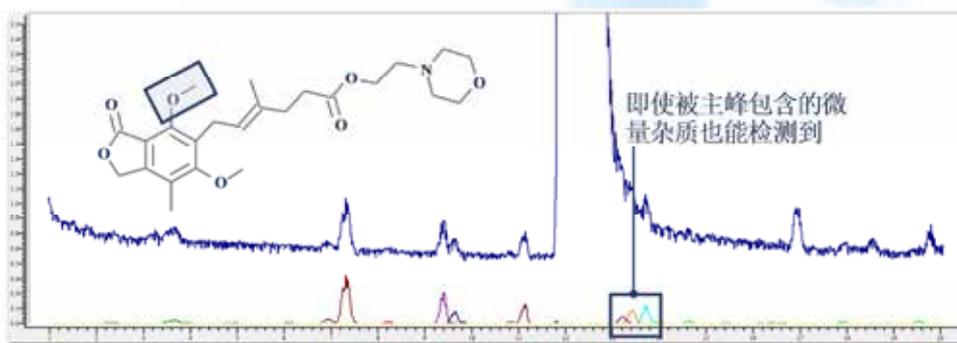


图13. Fragment Ion Search (FISh)检索霉酚酸酯痕量杂质

Q Exactive Focus 在药物杂质分析中的应用

UHPLC 和高分辨率台式质谱仪联用分析霉酚酸酯的降解产物

前言

强制降解实验能揭示各种环境因素对原料药和制剂的影响。它能提供药品安全信息、确定推荐储存条件、保质期和分析方法的特异性。而降解产物的信息能帮助改进化合物或配方的发展。

霉酚酸酯 (MMF) 的商标名称为骁悉 (CellCept)，是一种免疫抑制剂和霉酚酸 (MPA) 的前体药物。MMF 广泛的应用在治疗器官移植排斥反应和自体免疫疾病的移植药物中。本研究选择 MMF 作为模型化合物。

本文开发了一种快速可靠的分析霉酚酸酯降解产物的完整工作流程，使用的仪器是赛默飞世尔科技的 Accela™ UHPLC 系统和台式 Orbitrap Q Exactive Focus™ 质谱仪，数据处理采用 Mass Frontier™ 软件。霉酚酸酯在热和过氧化物催化下的降解研究的 pH 值设定为 2.0、3.5、6.0 和 8.2。采用 HRAM 全扫描和数据依赖 MS/MS 在高分辨率和极性切换模式下实现降解产物的快速鉴定。HRAM MS 和 MS/MS 谱图以及正 / 负离子模式切换，能可靠完成降解产物的定性和结构鉴定。

实验方法

材料与试剂

霉酚酸酯 API CAS# 128794-94-5 购自 2A PharmaChem (Lisle, IL)，纯度 >98%。

霉酚酸酯降解产物标准品

霉酚酸，CAS# 24280-93-1 Sigma-Aldrich。

霉酚酸酯杂质 G，CAS# 224052-51-1，Molcan Corporation，加拿大多伦多

霉酚酸酯杂质 A，CAS# 1322681-36-6，Molcan Corporation，加拿大多伦多

盐酸、乙酸铵、氢氧化钠和过氧化氢购自 Sigma-Aldrich。

样品前处理

- 霉酚酸酯储备液，浓度为 2.5 mg/mL 的乙腈溶液，称取 25 mg 标准品配制在 10 mL 乙腈中。
- 盐酸 (0.01 N, pH 2)，乙酸铵 (5 mM, pH 6)，氢氧化钠 (0.01 N, pH 8) 和过氧化氢 (3%, pH 8.2)。购买的 30% 过氧化氢用水稀释 10 倍后用于酸、碱和氧化研究。用氢氧化铵或乙酸调节强制降解溶液 pH 值。
- 用如上 pH 2、pH 6、pH 8 的溶液和过氧化氢 (3%, pH 8.2) 将浓度为 2.5 mg/mL 的霉酚酸酯储备液稀释 10 倍配制浓度为 0.25 mg/mL 的强制降解溶液。强制降解溶液放置于 60°C 烘箱中。在放置的第 1、20、48 和 72 小时分别取样，直接进样到 LC/MS 中进行分析。

HPLC 方法

HPLC 系统: Thermo Scientific Accela 1250 pump, Open Accela Autosampler and Accela PDA

色谱柱: Thermo Scientific Dionex Acclaim 2.1 × 150 柱, 2.2 μm

柱温箱温度: 35°C

流动相: A - 0.1% 甲酸水溶液

B - 含 0.1% 甲酸的乙腈

C - 100 mM 甲酸铵的水溶液 (pH 5)

梯度洗脱：0-0.5 min 保持 20% B，然后在 15 min 内线性增加到 40%B

流速：500 $\mu\text{L}/\text{min}$

进样体积：1 μL

质谱方法

质谱仪：Thermo Scientific Q Exactive Focus 台式高分辨质谱仪，配备 HESI-II 离子源

离子化模式：ESI 正 / 负离子切换

全扫描采集：m/z 120-1000 amu，分辨率为 70,000
(FMHW@m/z 200)

MS/MS 采集：35,000 分辨率下响应强度数据依赖采集

HCD 碰撞能量：35%，25% 阶梯变化



结果与讨论

I. UHPLC- 高分辨率 MS 快速测定降解产物

采用 UHPLC- 高分辨率 MS 快速分析降解产物。高质量的 HRMS 全扫描图谱为测定降解产物的元素组成提供了重要信息，并从随后的数据依赖 MS/MS 获得分子离子的裂解信息。

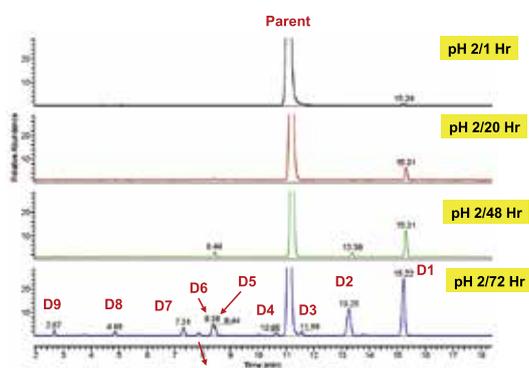


图1. MMF在pH 2.0和60°C条件下反应1、20、48和72小时的总离子流色谱图

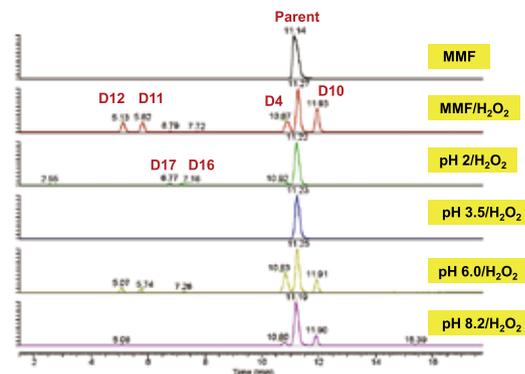


图2. MMF在pH 2.0、3.5、6.0和8.2条件下，在3%过氧化氢中反应一小时的总离子流色谱图

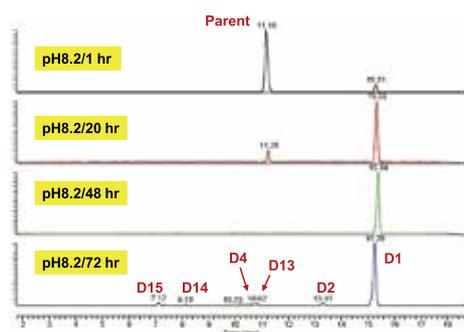


图3. MMF在pH 8.2和60°C条件下反应1、20、48和72小时的色谱图

II. 高分辨率 MS/MS 鉴定降解产物的结构

具备阶梯式碰撞能量的高分辨高能碰撞解离功能产生了信息量丰富的碎片，能更轻松地完成降解产物的结构鉴定。

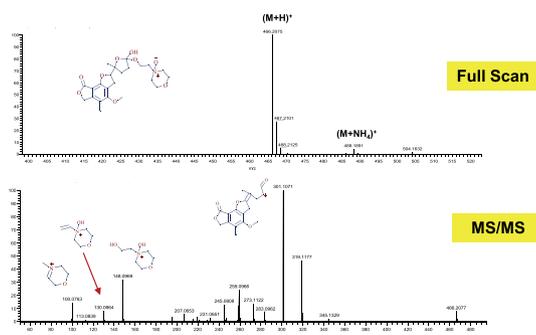


图4. 降解产物D11的全扫描和数据依赖MS/MS图谱

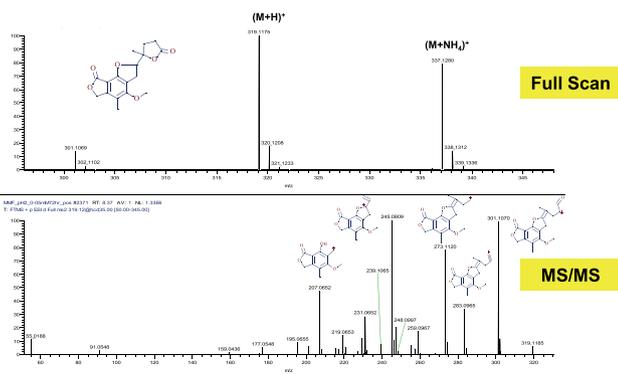


图5. 降解产物D5的全扫描和数据依赖MS2图谱

表1. 采用HRAM全扫描和数据依赖MS/MS鉴定pH 2.0的溶液和过氧化氢中的降解产物

化合物	峰识别号	分子式	(M+H) ⁺ 计算值	(M+H) ⁺ 测量值	误差 (ppm)
母离子	母离子	C ₂₃ H ₃₁ NO ₇	434.2173	434.2178	1.0
MF 酸	D1	C ₁₇ H ₂₀ O ₆	321.1333	321.1331	-0.4
内酯	D2	C ₁₇ H ₂₀ O ₆	321.1333	321.1331	-0.4
酯	D3	C ₁₇ H ₂₀ O ₆	321.1333	321.1331	-0.4
	D4	C ₁₇ H ₁₈ O ₆	319.1176	319.1175	-0.47
**	D5&D15	C ₁₇ H ₁₈ O ₆	319.1176	319.1175	-0.47
顺式 MMF	D6	C ₂₃ H ₃₁ NO ₇	434.2173	434.2175	0.40
	D7	C ₁₇ H ₁₇ O ₆	349.0918	349.0915	-0.79
醛	D8	C ₁₁ H ₁₀ O ₅	223.0601	223.0602	0.14
	D9	C ₂₃ H ₃₁ NO ₈	450.2122	450.2123	0.8
杂质 G	*D10	C ₂₃ H ₃₁ NO ₈	450.2122	450.2123	0.8
** 杂质 G	*D12	C ₂₃ H ₃₁ NO ₈	450.2122	450.2123	0.8
	*D11	C ₂₃ H ₃₁ NO ₉	466.2072	466.2074	0.52
	*D13	C ₁₄ H ₁₂ O ₅	261.0758	261.0757	-0.4
**	D14	C ₁₇ H ₁₈ O ₆	319.1176	319.1175	-0.47
**	D16	C ₂₃ H ₃₂ NO ₈ Cl	486.1889	486.1896	1.47
** 杂质 G	D17	C ₂₃ H ₃₁ NO ₈	450.2122	450.2126	0.83

* 仅出现在过氧化氢中。 ** 需要 NMR 进一步确认结构。

III. 极性切换功能全面鉴定降解产物

快速正 / 负离子切换实验采用在正离子模式下完成一次全扫描, 然后进行数据依赖 MS² HCD 裂解。随后转换到负离子模式下进行全扫描和数据依赖 MS² HCD 裂解。自动极性切换提供了不同但是互为补充的降解产物的裂解信息。这些独特极性的碎片能帮助确认结构鉴定结果 (图 6)。

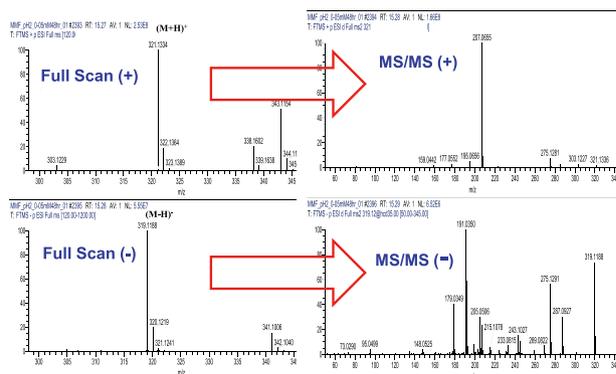


图6. 降解产物D3的HRAM全扫描和MS/MS图谱

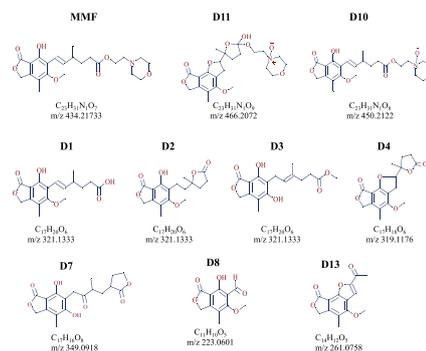


图7. UHPLC-HRAM鉴定出的降解产物的可能结构

结论

本文研究了霉酚酸酯 API 在 pH 2.0、3.5、6.0 和 8.2 条件下的热和过氧化氢降解。采用台式高分辨率质谱仪 Q Exactive Focus 与 UHPLC 系统联用快速准确地分析了降解产物, 见图 1、2 和 3。

- 高分辨率准确质量数测定 (HRAM) 的全扫描图谱实现了快速的鉴定 - 获得降解产物元素组成的关键信息。
- 信息量丰富的高能量碰撞解离 (HCD) MS/MS 图谱有利于准确鉴定降解产物。
- 全扫描和 MS/MS 模式下的正 / 负离子切换模式能全面鉴定降解产物, 如图 4 和 5 所示。
- 数据分析软件 Mass Frontier 极大的提高了降解产物结构解析的速度和可靠性。

Q Exactive Focus 台式 Orbitrap MS 具有强大的功能, 在一体化 UHPLC/HR-MS/MS 平台上快速高效地完成降解产物分析, 从而显著提高了药物研发过程中降解产物的鉴定通量。

参考文献

1. M. Brandl, Degradation Products of Mycophenolate Mofetile in Aqueous Solution Drug Development and Industrial Pharmacy, 25 (3), 361-365 (1999)
2. FDA Guidance for Industry. Analytical Procedures and Methods Validation (draft guidance), August 2000.
3. ICH guidelines Q1A (R2). Stability Testing of New Drug Substances and Products (revision 2), November 2003.

奥美拉唑药物杂质高分辨质谱快速鉴定

前言

杂质分析对于药物的研发至关重要¹。在研究过程中，杂质谱信息能帮助药物化学家优化合成路线和避免潜在的有毒杂质。在开发过程中，当大量母体化合物存在时，鉴定和表征痕量杂质至关重要，从而促进了高分辨率、高灵敏度和高扫描速度的 HR-MS 仪器和智能化结构鉴定软件的发展。

为了展示 HR-MS 在杂质分析和结构鉴定方面的能力，本文选用了市售药物奥美拉唑。本研究采用了赛默飞世尔科技的 Q Exactive Focus 台式 Orbitrap 质谱仪和数据处理软件 Mass Frontier 来快速分析和鉴定奥美拉唑中杂质的结构。

方法

材料与试剂

奥美拉唑 (CAS# 73590-58-6) 购自 Sigma-Aldrich, 产品号 O104-100MG。

乙腈和水来自 Fisher Scientific

乙酸铵购自 Sigma-Aldrich, 产品号 73594-25G-F。

甲酸购自 Sigma-Aldrich, 产品号 33015-500ml。

样品前处理

奥美拉唑溶液 (0.5 mg/mL) 配制在 1:1 乙腈 / 水混合溶剂中。

HPLC 方法

色谱分离采用 Thermo Scientific Ultimate3000 UHPLC 系统。

色谱柱: Thermo Scientific Hypersil GOLD 柱, 2.1mm × 150mm, 粒径 3 μm。

柱温: 35 °C, 流速: 0.5 mL/min, 进样体积: 8 μL

流动相: A - 水; B - 乙腈; C - 100 mM 乙酸铵, 用乙酸调节 pH 值到 5

梯度洗脱:

时间 (min)	A%	B%	C%
0	80	20	5
13.0	20	60	5
15.0	20	80	5
16.0	10	80	5
16.1	10	20	5
20.0	80	20	5

质谱方法

质谱分析采用 Thermo Scientific Q Exactive Focus 质谱仪的电喷雾正离子模式。在 70,000 和 35,000 分辨率 FWHM@m/z 200 下分别采集高分辨全扫描一级质谱数据和数据依赖二级质谱数据。

离子源条件:

离子化模式: 正离子 ESI

离子源: HESI-II

鞘气流速: 45 单位 N₂

辅助气流速: 10 单位 N₂

喷雾电压 (KV): +3.5

毛细管柱温度 (°C): 320

S-lens RF 水平: 50.0

加热器温度 (°C): 400

Q Exactive Focus 方法参数:

AGC 目标 (全扫描): 3e6

AGC 目标 (MS/MS): 1e5

碰撞能量: 30, 35% 阶梯变化

扫描范围 (全扫描 MS): 180 到 1200 amu

结果与讨论

I. 高分辨率全扫描-HCD MS/MS 鉴定杂质

采集得到奥美拉唑的高分辨率全扫描和三个最高强度的数据依赖 HCD MS/MS 数据。HRAM 全扫描和 MS/MS 数据提供了分子量和碎片信息。HCD (高能量碰撞解离) 得到了丰富的 MS/MS 碎片和低质量端碎片信息。利用 Mass Frontier 软件与这些信息互相配合, 我们不仅快速检测出奥美拉唑的主要杂质, 而且可靠地测定了相应的元素组成, 如图 1&2 和表 1 所示。

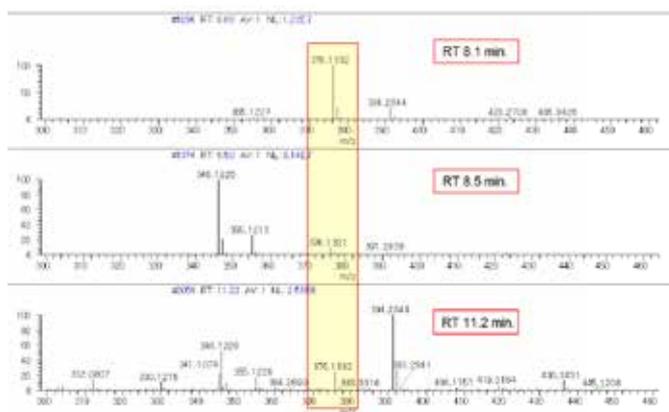


图4. m/z为376.1331的杂质的三个同分异构体

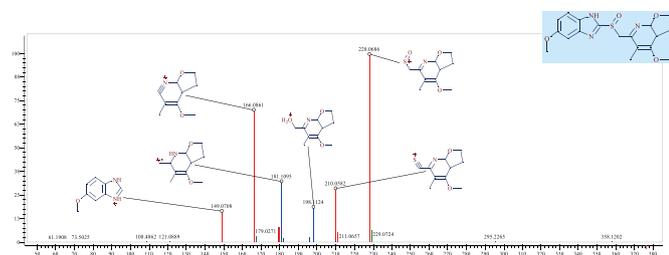


图5-a. RT 8.1 min的m/z为376.1331的杂质的MS/MS谱图

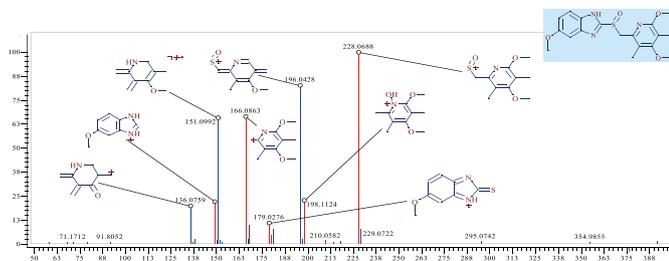


图5-b. RT 8.5 min的m/z为376.1331的杂质的MS/MS谱图

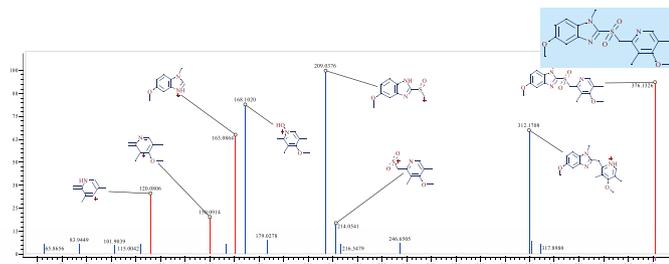
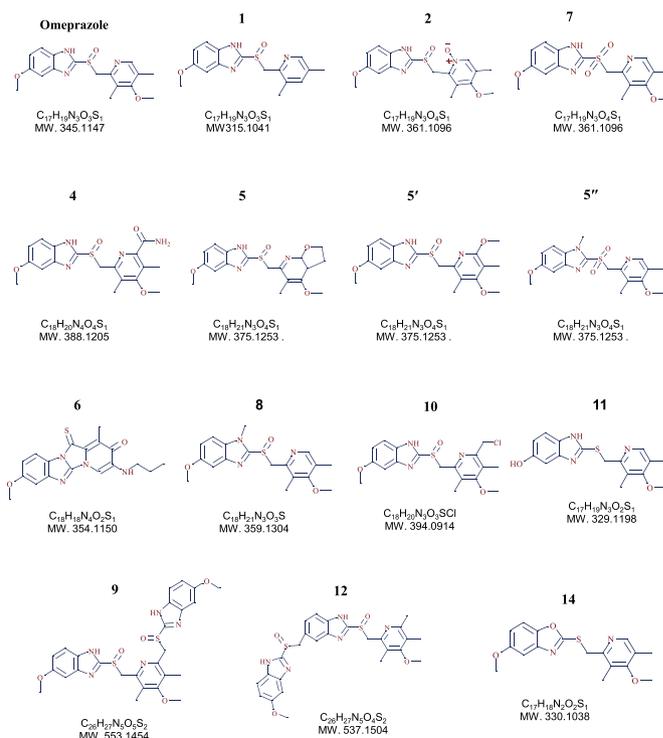


图5-c. RT 11.2 min的m/z为376.1331的杂质的MS/MS谱图



*9' 和10' 是9和10的同分异构体。

图7. 奥美拉唑杂质的推荐结构

结论

Q Exactive Focus 台式 Orbitrap 系统能实现全扫描和 MS/MS 数据的高分辨率准确质量数测定 (HRAM), 为未知杂质的结构鉴定提供至关重要的分子量和结构信息; HRAM 全扫描准确测定元素组成, 而 HRAM MS/MS 能准确测定杂质成分。

Mass Frontier 碎片离子搜索 (FISH) 和 “Fragment and Mechanism” 功能, 通过搜索 HighChem 碎片数据库准确鉴定未知物的结构。

由 Q Exactive Focus HRAM 数据和 Mass Frontier 软件组成的工作流程能帮助研究人员在药物研究的早期高效准确地鉴定每次 API 中的杂质。

参考文献

1. FDD Guidance for Industry, Q3A (R2) Impurities in New Drug Substances

Q Exactive Series 应用于药物分析的部分客户文章列表

Title	Authors	Publications	Publication Year
Structure elucidation and quantification of impurities formed between 6-aminocaproic acid and the excipients citric acid and sorbitol in an oral solution using high-resolution mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy	Schou-Pedersen AMV , Cornett C , Nyberg N, et al	J Pharm Biomed Anal. 107(2015): 333-340.	2015
Separation and structural elucidation of a new tadalafil analogue Diethylaminopretadalafil included as an adulterant in a dietary supplement	Zhang G, Yu Y, Wu X, et al	J. Pharm. Biomed. Anal.	2014
A new derivative detected in accelerated ageing of artesunate-amodiaquine fixed dose combination tablets	Charrier C, Bertho G, Petigny O	J. Pharm. Biomed. Anal. 81-82: 20-26	2013
Analyses of marketplace tacrolimus drug product quality: Bioactivity, NMR and LC-MS	Sommers CD, Pang ES , Ghasriani H et al	J Pharm Biomed Anal. 85: 108-117.	2013
Structural elucidation of degradation products of a benzopyridoxathiazepine under stress conditions using electrospray orbitrap mass spectrometry – Study of degradation kinetic	Lecoeur M, Vérones V, Vaccher C, et al	J. Pharm. Sci. 45(5): 559-569	2012
Isolation and structural characterization of two tadalafil analogs found in dietary supplements	Toomey VM, Litzau JJ, Flurer CL	J. Pharm. Biomed. Anal. 59(5): 50-57	2012
Comparison between a high-resolution single-stage Orbitrap and a triple quadrupole mass spectrometer for quantitative analyses of drugs	Henry H, Sobhi HR, Scheibner O, et al	Rapid Commun. Mass Spectrom. 26(5): 499-509	2012
Characterization of in vitro generated metabolites of the selective androgen receptor modulators S-22 and S-23 and in vivo comparison to post-administration canine urine specimens	Thevis M, Gerace E, Thomas A, et al	Drug. Test . Anal. 2(11-12): 589-598	2010

附录

杂质的分类：ICH 指南将杂质分为有机杂质、无机杂质、残留溶剂三大类。

- 有机杂质：

包括工艺中引入的杂质和降解产物等，它们主要起源于起始原料及其本身所含杂质、生产过程中带入的合成中间体与副反应产物、成品在储存过程中产生的降解产物，辅料中带入的杂质或辅料降解产生的杂质，及药物与包材相互作用产生的杂质。有机杂质的化学结构与活性成分的分子式类似或具渊源，通常称为有关物质。

有机杂质的限度确定：原研药一般已经对杂质的安全性做了全面的研究，故对于仿制药，需要与原研药进行充分的杂质比对和研究，分析杂质的种类和含量，并结合原研药的质量标准，对杂质进行控制，如果因为工艺和处方的不同导致仿制药的杂质与原研药不同，则仿制药中的新杂质需要在表 1-1 和 1-2 的限度以内，如果新杂质超出表中限度，或者仿制药的杂质含量明显高于原研产品，则需要通过优化处方和工艺，使杂质的含量降到规定的质控限度以内，如果无法降到规定限度，则需要对超过限度的杂质进行相应的安全性研究。

表 2. 原料药的杂质限度

最大日剂量	报告限度	鉴定限度	质控限度
≤ 2g	0.05%	0.10% 或 1.0mg	0.15% 或 1.0mg
>2g	0.03%	0.05%	0.05%

表 3. 制剂的杂质限度

报告限度		鉴定限度		质控限度	
最大日剂量	限度	最大日剂量	限度	最大日剂量	限度
≤ 1g	0.10%	<1mg	1.0% 或 5μg	<10mg	1.0% 或 50μg
		1mg-10mg	0.5% 或 20μg	10mg-100mg	0.5% 或 200μg
>1g	0.05%	>10mg-2g	0.2% 或 2mg	>100mg-2g	0.2% 或 3mg
		>2g	0.10%	>2g	0.15%

有机杂质其中一类会直接破坏 DNA 活性，增加病人癌症风险的遗传毒性药物杂质统称为基因毒性杂质，该类杂质包括生产过程产生的杂质或者储存过程产生的降解产物，根据 FDA 和 EMA 规定，基因毒性杂质的质控限度远低于一般有关物质，建议接受阈值参见 FDA 和 EMA 指南文件。

- 无机杂质：

原料药及制剂生产或传递过程中产生的杂质，通常是已知的。来源可能包括生产过程中的试剂，如催化剂，配位体等；其他阶段引入的金属，如反应容器，传递管道，过滤材料等

- 残留溶剂：

原料药及制剂生产过程中使用的有机溶剂，例如原料药最后纯化结晶过程会残留少量有机溶剂，很难彻底去除，此类残留溶剂往往对人或者环境有害，或造成原料药降解。残留溶剂一般具有已知毒性，ICH,USP 和 EP 都规定了残留溶剂的限量。ICH 指南将药物中的残留溶剂分为四类，一类溶剂（苯，四氯化碳等）毒性最大，应避免使用，二类溶剂（乙腈，三氯甲烷，环己烷等）毒性较大，应限制使用，三类溶剂（醋酸，丙酮，甲酸等）应根据药品 GMP 或其他质量要求进行限制，四类溶剂（石油醚，三氟醋酸等）尚无足够的毒理学资料。

- 其他：

外源性污染：微生物，内毒素等

多晶型：晶型杂质

对应异构体：手性杂质

药物杂质研究相关官方网站

人用药物注册技术要求国际协调会 <http://www.ich.org/>

美国食品药品监督管理局 <http://www.fda.gov/>

欧洲药品管理局 <http://www.ema.europa.eu/ema/>

国家食品药品监督管理局 <http://www.sfda.gov.cn/>

国家食品药品监督管理局药品审评中心 <http://www.cde.org.cn/>

美国药典 <http://www.usp.org/>

欧洲药典 <http://www.edqm.eu>

英国药典 <http://www.pharmacopoeia.org.uk/>

国家药典委员会 <http://www.chp.org.cn>

其他药物分析相关网站资源

专业化学数据库：<http://www.chemspider.com/>

有机小分子生物活性数据：<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

化学物质结构性质网站：<http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/>

化学物质物化性质网站：<http://www.chemicalize.org/>

毒理基因组学比较数据库 <http://ctdbase.org/>

编辑：周哲、江峥

校对：江峥

Orbitrap 技术应用资源中心



- PlanetOrbitrap 是全球科学服务的领导者赛默飞世尔科技于 2012 年宣布上线的新一代 Orbitrap 系列产品网站，旨在为全球用户提供关于 Orbitrap 技术的信息分享及交流平台，进一步促进 Orbitrap 技术在全球范围内的发展及应用。
- 应用工作流程页面向用户展示了 Orbitrap 技术的应用工作流程，包括样品制备、质谱及数据分析等细节，有助于促进蛋白质组学、食品安全等行业的质谱分析标准流程；同时，用户还可以从图书馆页面免费获得丰富资源，千余份 Orbitrap 技术相关的论文、样品说明书、产品手册、应用记录将使用户自由徜徉在 Orbitrap 技术的海洋；此外，该网站还将成为 Orbitrap 技术科研工作者、工程人员、用户及厂商的全球化社区。在社区页面，全球用户可以自由分享自己与 Orbitrap 的故事，同时获得最新鲜的资讯和信息。
- 有关 Orbitrap 更多的应用信息可访问
[“http://www.planetorbitrap.com”](http://www.planetorbitrap.com)

赛默飞生命科学质谱资源中心

- Thermo Scientific 品牌下色谱与质谱部，前身为著名的质谱先驱 – 美国菲尼根 (Finnigan) 质谱仪制造商。从 1967 年成立至今的四十多年来，一直以无与伦比的研究成果保持着质谱技术的世界领先地位。为农业、环保、医药卫生、检验检疫、石油化工、制药、公安及生命科学等研究领域的广大分析、研究工作者提供最完善的解决方案，成为了最可信赖的合作伙伴
- 有关 Thermo 质谱的更多信息可访问
[“http://www.thermoscientific.com/en/products/mass-spectrometry.html”](http://www.thermoscientific.com/en/products/mass-spectrometry.html)



禹重科技® UZONGLAB

成分分析仪器 | 表面测试仪器 | 样品前处理仪器

上海市闵行区春申路2525号芭洛商务大楼

电话：021-8039 4499 传真：021-5433 0867

上海|北京|沈阳|太原|长沙|广州|成都|青岛|香港

全国销售和售后服务电话：400-808-4598

邮编：201104, China

邮箱：shanghai@uzong.cn

更多信息请访问：www.uzong.cn

Thermo

SCIENTIFIC

Part of Thermo Fisher Scientific



了解我们



微信公众号