

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

Peng Chen, Bonnie A. Alden, Matthew A. Lauber

Waters Corporation

摘要

本研究开发出一种使用表面带电苯基固定相的UPLC方法用于分离伊马替尼及其相关杂质，使用基于10 mM甲酸铵和0.1%甲酸改性剂的MS兼容流动相实现了高效、高选择性分离。伊马替尼及其9种相关杂质在6 min内得到分离，并可轻松获得杂质的母离子和碎片离子MS谱图进行峰确认。

优势

- 伊马替尼及其9种相关杂质在6 min内得到分离
- UPLC系统和CSH苯己基柱使组分获得高效的基线分离
- MS兼容流动相适用于高灵敏度MS和MS/MS分析

简介

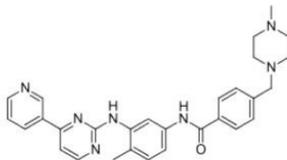
过去几十年来，小分子药理学已扩展到多个激动人心的领域。特别是出现了新型抗癌候选药物系列，其中许多药物将激酶抑制剂作为药用靶点。这些分子基于模拟肽的骨架，因此用杂原子和共轭取代基构建，类似于激酶抑制剂天然发生作用的氨基酸残基。该制药领域候选药物的化学结构非常独特，并且始终存在高分离度杂质分析需求。伊马替尼是FDA于2001年批准的第一种激酶抑制剂¹⁻³。欧洲药典(EP)已发布有关伊马替尼及其一组相关杂质分析的专论HPLC方法。该EP方法使用三种不同的HPLC条件和两种不同的HPLC色谱柱将伊马替尼与其七种杂质A、B、C、D、F、H和J分离。另外，EP方法需要使用非挥发性离子对试剂（辛烷磺酸钠）来促进分离，而这会妨碍

在观察到伪峰时需要进行质量调查的情况下应用质谱法。

本应用纪要证明，利用表面带电杂化苯基柱和MS兼容流动相可显著提高伊马替尼及其九种相关杂质的分离效率和选择性（其中七种收载于EP专论中）。此外，由于该方法很容易与质谱联用，因此可以应用MS和MS/MS分析来支持组分鉴定和结构分析。总之，本文所述方法经证实可适用于其他激酶抑制剂分析（其中许多化合物具有类似的含N杂环基团）。

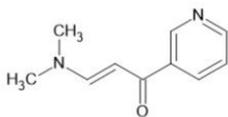
实验

化学品和材料



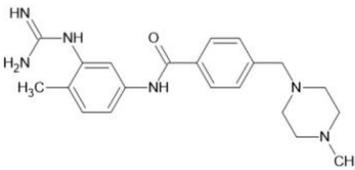
伊马替尼 (CAS 152459-95-5)

游离碱 $C_{29}H_{31}N_7O$
 精确质量数 493.25901
 $(M+H)^+$ 494.26629



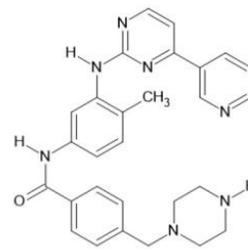
杂质A (CAS 123367-26-0)

$C_{10}H_{12}N_2O$
 精确质量数 176.09496
 $(M+H)^+$ 177.10224



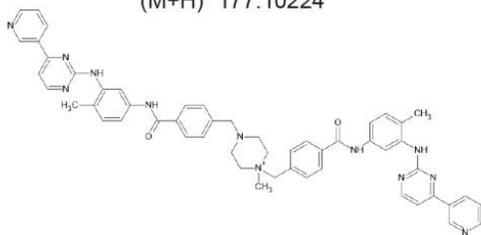
杂质B (CAS 581076-67-7)

$C_{21}H_{28}N_6O$
 精确质量数 380.23245
 $(M+H)^+$ 381.23974



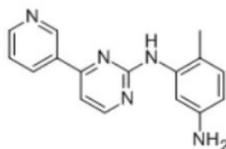
杂质C (CAS 404844-02-6)

$C_{28}H_{29}N_7O$
 精确质量数 479.24336
 $(M+H)^+$ 480.25064



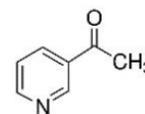
杂质D (CAS 1821122-73-9)

阳离子 $C_{53}H_{51}N_{12}O_2^+$
 精确质量数 M^+ 887.42525



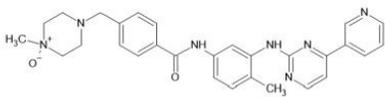
杂质F (CAS 152460-10-1)

$C_{16}H_{15}N_5$
 精确质量数 277.13275
 $(M+H)^+$ 278.14002



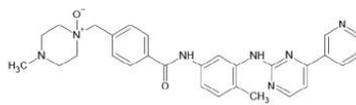
杂质H (CAS 350-03-8)

C_7H_7NO
 精确质量数 121.05276
 $(M+H)^+$ 122.06004



杂质J (CAS 571186-91-9)

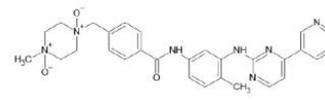
$C_{29}H_{31}N_7O_2$
 精确质量数 509.25392
 $(M+H)^+$ 510.26120



伊马替尼 (哌啶) -1-氧化物

(CAS 938082-57-6)

$C_{29}H_{31}N_7O_2$
 精确质量数 509.25392
 $(M+H)^+$ 510.26120



伊马替尼 (哌啶) -N,N-二氧化物

(CAS 571186-93-1)

$C_{29}H_{31}N_7O_3$
 精确质量数 525.24884
 $(M+H)^+$ 526.25611

伊马替尼和杂质F购自Sigma。伊马替尼杂质A、B、D和H购自Toronto Research Chemicals。伊马替尼杂质C和J以及伊马替尼(哌啶)-1-氧化物(简称氧化物)和伊马替尼(哌啶)-N,N-二氧化物(简称二氧化物)购自

BocSciences。

样品前处理

将上文所述的各种标准化学品用甲醇和乙腈(1:1)的混合溶剂制成浓度为1.5 mg/mL的标准储备液。取100 μ L各标准储备液混合，将混合液用甲醇(1:5)进一步稀释用于UPLC分析。将各标准储备液用甲醇(1:50)稀释，用于UPLC分析和保留时间确认。

UPLC方法条件

UPLC系统:	ACQUITY UPLC I-Class
检测条件:	UV检测, 波长227 nm、254 nm和267 nm
样品瓶:	全回收12 \times 32 mm玻璃螺口瓶 (部件号: 186000384C)
色谱柱1:	图1和图2: ACQUITY UPLC HSS C ₁₈ 1.8 μ m色谱柱, 100 \AA , 2.1 mm \times 100 mm (部件号: 186003533)
色谱柱2:	图3: ACQUITY Premier UPLC CSH 1.7 μ m苯己基柱, 130 \AA , 2.1 mm \times 100 mm (部件号: 186009475)
柱温:	图1为35 $^{\circ}\text{C}$, 图2和图3为40 $^{\circ}\text{C}$
样品温度:	10 $^{\circ}\text{C}$
进样体积:	0.5 μ L (样品)
流速:	图1为0.50 mL/min, 图2和图3为0.40 mL/min
流动相A:	图1: 2.3 g辛烷磺酸钠一水合物和1.2 mL磷酸, 溶于700 mL水和300 mL乙腈中 图2和图3: 0.1% (v/v)甲酸和10 mM甲酸铵的水溶液

流动相B: 图1: 2.3 g辛烷磺酸钠一水合物和1.2 mL磷酸, 溶于100 mL水和900 mL乙腈中
图2和图3: 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+, 分辨率

采集范围: 50-1000 m/z

毛细管电压: 2.0 kV

采样锥孔电压: 80 V

HD-MS^E碰撞能量: 6 eV (低能量) 和10~40 eV梯度 (高能量)

HS-MSMS碰撞能量: 在50 m/z 下, 10~40 eV梯度; 在1000 m/z 下, 20~50 eV梯度

离子源温度: 110 °C

脱溶剂气温度: 400 °C

脱溶剂气流速: 800 L/h

数据管理

UPLC和质谱软件: 用于数据采集和分析的UNIFI v1.8

结果与讨论

我们的伊马替尼液相色谱方法开发以EP专论方法为起点。对于杂质的光学检测，EP专论要求使用填充有5 μm 硅胶 C_{18} 的4.6 mm \times 250 mm (长) 色谱柱，并使用包含离子对的流动相，还规定使用相对较高的流速2.3 mL/min。在开始实验之前，将该方法缩放至UPLC条件。选择ACQUITY UPLC HSS C_{18} , 1.8 μm , 2.1 \times 100 mm 色谱柱以匹配L/dp, 并应用0.5 mL/min的流速以更好地配合质谱检测 (即使其对应的线速度慢于EP专论中所述的速度)。在这些条件下，伊马替尼杂质A和H在约0.64 min处共流出，杂质J和氧化物也在5.87 min处共流出，如图1所示。

使用相同的 C_{18} 色谱柱，选择采用MS兼容流动相的全新UPLC梯度以缩短分析时间并开始获得母离子和碎片离子质谱图，进行组分鉴定和结构分析。但是，氧化物/二氧化物的峰对无法分离，并且发现峰A/B/H和C/伊马替尼/J部分共流出，如图2所示。

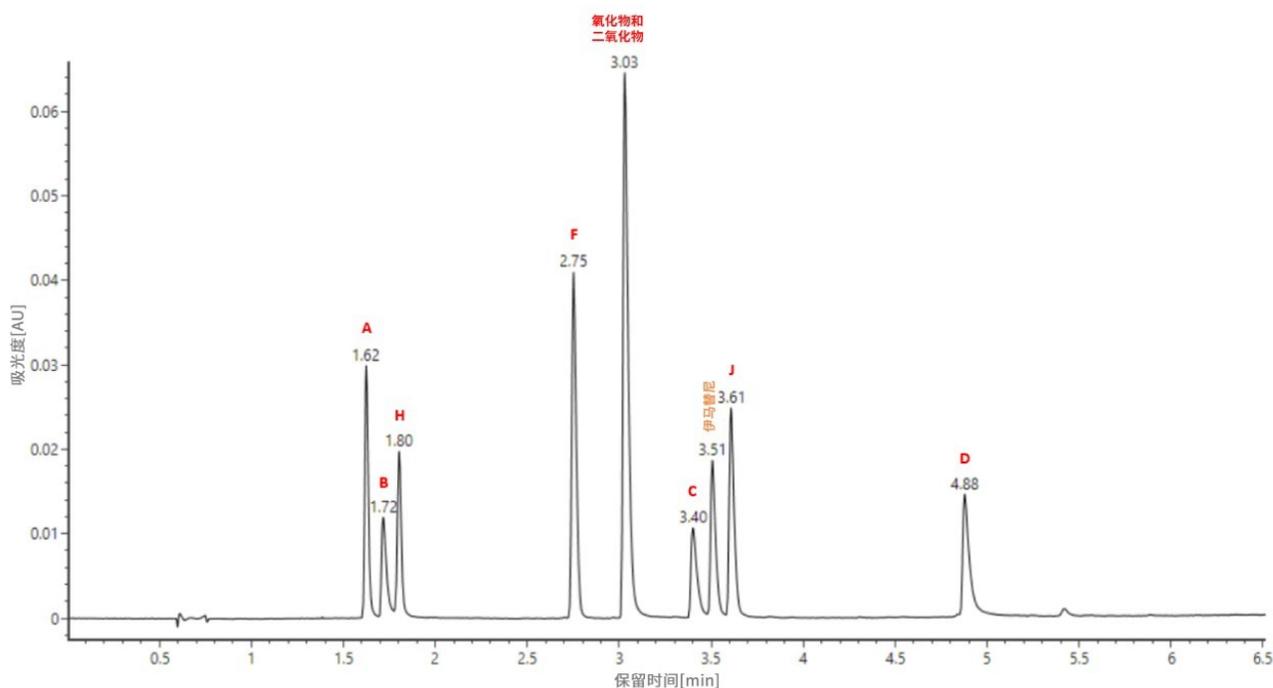


图2.使用MS兼容流动相和ACQUITY HSS C_{18} 色谱柱(2.1 mm \times 100 mm, C_{18} , 1.8 μm , 100 \AA)分离伊马替尼和九种相关杂质。检测波长: 267 nm。流速: 0.4 mL/min。梯度: 流动相B在10 min内以线性梯度从5%增加至100%。为提高该方法对伊马替尼杂质分子中含N杂环结构的选择性，接下来使用ACQUITY Premier CSH 130 \AA 苯己基柱。CSH苯己基填料是一种独特的固定相，经修饰后携带苯己基键合相，在酸性pH条件下带有正表面电位。因此，与更传统的 C_{18} RP-LC固定相相比，该固定相表现出独特的选择性。CSH苯己基柱使伊马替尼杂质A/H和J/C获得充分分离，峰洗脱顺序也因该吸附剂的独特特性发生变化，如图3所示。

在该分离过程中采集质谱图以验证峰鉴定结果并基于单个进样确认峰归属。绘制各分析物的质子化分子/母离子($M+H$)⁺或天然阳离子 M ⁺的提取离子色谱图(XIC)并叠加于图3的下图中。

除保留特性和选择性以外，CSH苯己基填料还具有相对的抗去湿性。因此，可以优化该方法的初始条件，以更好地保留分析物。采用初始条件（0.5%流动相B）作为更有效地保留杂质B的方法。为进一步优化该分子的保留性，将10 mM甲酸铵加入流动相A中以减弱CSH填料的正表面电位所赋予的一部分电荷排斥效应。

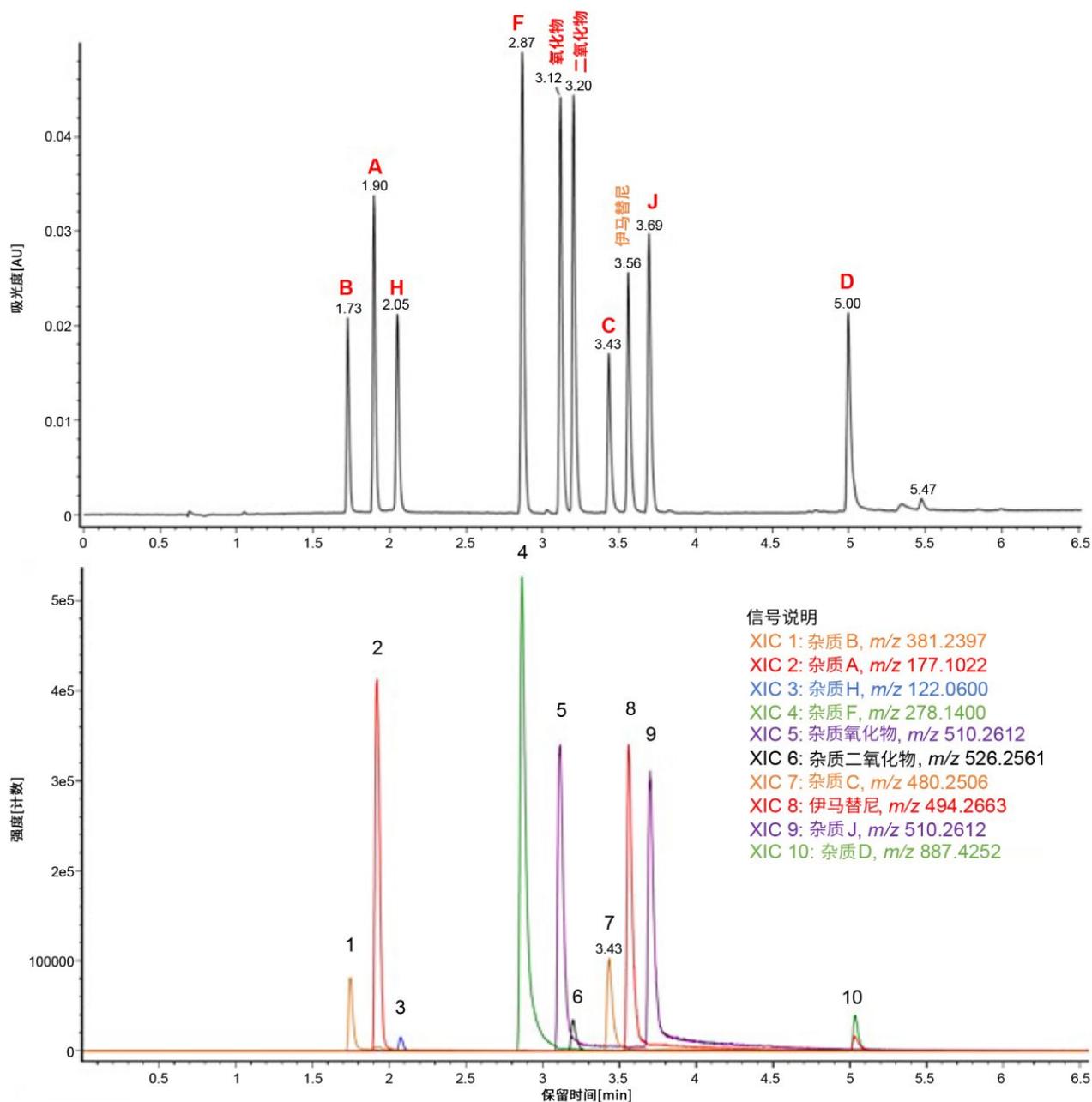


图3.使用MS兼容流动相和ACQUITY Premier CSH苯己基柱(2.1 mm × 100 mm, C₁₈, 1.7 μm, 130 Å)分离伊马替尼和九种相关杂质的结果以及得到的MS XIC。检测波长：267 nm。流速：0.4 mL/min。梯度：流动相B在10 min内以线性梯度从0.5%增加至100%。

在峰实现基线分离的情况下，进行了额外的MS分析。图4提供了伊马替尼的碎片离子谱图，突出显示了这种现代化UPLC方法如何与质谱联用以获取信息，从而进一步分析已知峰和未知峰的结构。UNIFI解析工具包可根据分子离子和同位素离子的精确质量数以及同位素丰度和同位素间距，帮助确认或推测已知或未知MS信号的分子式。该工具包随后可分析MS/MS碎片离子谱图，并分配或推测碎片离子的结构，如图4所示。更多研究正在进行中，旨在

考察伊马替尼的微量杂质。

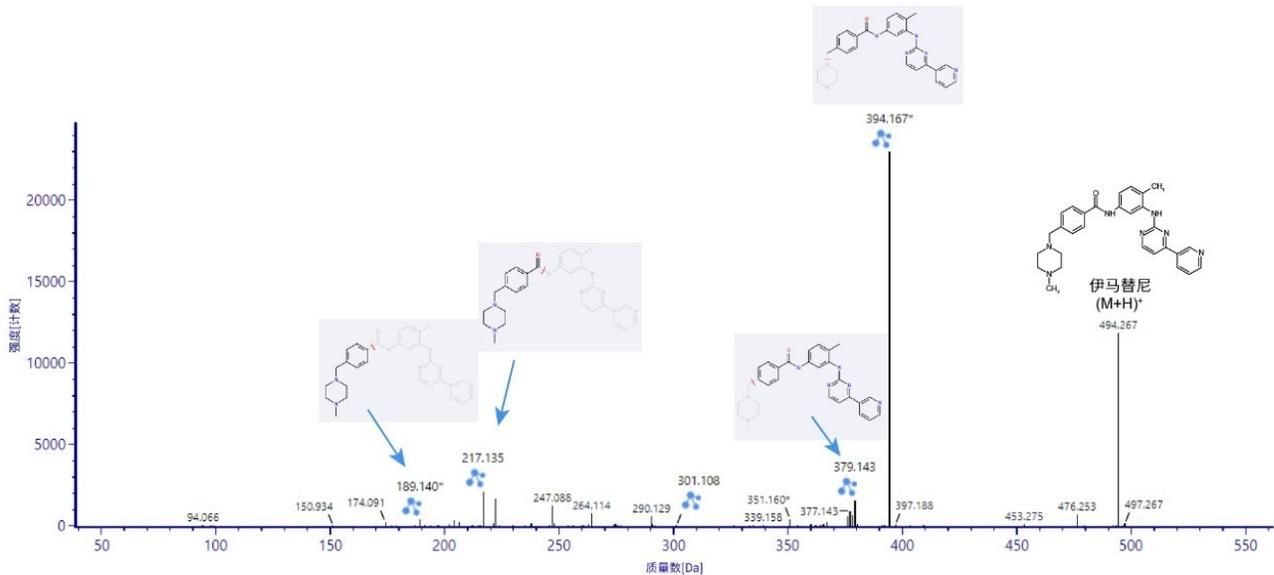


图4.通过高分辨率MS^E模式分析获得的伊马替尼的MS碎片离子谱图

结论

利用UPLC与ACQUITY Premier CSH苯己基柱促进了EP方法的现代化，适用于分析伊马替尼及其杂质。考虑到L/dp和MS兼容性，开发出一种分离方法，使伊马替尼及其九种杂质获得优异的峰形和分离度。同时采用光学检测和精确质量数飞行时间质谱分析，使敏感杂质的分析成为可能。希望像这样的新分析方法有助于加快用于肿瘤适应症和其他适应症的激酶抑制剂的开发和QC测试。

参考资料

1. Cohen, P., Cross, D. & Jänne, P.A. Kinase Drug Discovery 20 years after Imatinib: Progress and Future Directions. *Nat Rev Drug Discov* 20, 551–569 (2021).
2. Bhullar, K. S. *et al.* Kinase-Targeted Cancer Therapies: Progress, Challenges and Future Directions. *Molecular Cancer* 17:48 (2018).
3. Roskoski, R. Jr. Properties of FDA-Approved Small Molecule Protein Kinase Inhibitors: A 2021 Update.

Pharmacological Research 165,105463 (2021).

特色产品

- [ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <https://www.waters.com/134613317>](https://www.waters.com/134613317)
- [Vion IMS QToF离子淌度四极杆飞行时间质谱仪 <https://www.waters.com/134845751>](https://www.waters.com/134845751)
- [UNIFI科学信息系统 <https://www.waters.com/134801648>](https://www.waters.com/134801648)

720007340ZH, 2021年8月



© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.