

样品瓶对分析物稳定性的影响：缓解药物在LC分析过程中的瓶内降解

Kenneth D. Berthelette, Yuehong Xu, ZhiLin Zhang, Markus Wanninger, Clarice Stumpf

Waters Corporation

摘要

质量控制过程(QC)是药物生产中不可或缺的一环。从小分子药物到大生物分子，所有药物都必须经过严格的测试，以验证不存在可能对消费者有害的杂质水平。成功的药物测试离不开几个因素的作用，选择样品瓶就是其中之一。按照先前的文献报道，某些类型的样品瓶会导致药物发生非特异性吸附或降解¹⁻⁵。本文的数据比较了在两种小分子药物（屈螺酮和洛伐他汀）分析中使用的三种类型的样品瓶。这些活性药物成分的溶液存储在聚乙烯样品瓶和TruView™ pH控制液相色谱-质谱(LCMS)认证样品瓶中时，未发现因酯水解而形成的降解物，由此证明该溶液稳定。相反，在相同的测试条件下，相同的化合物存储在标准玻璃样品瓶中时形成了不同水平的降解物。这些结果模拟了QA/QC工作流程，并显示了样品瓶选择对药物测定的重要性。

优势

- 与标准样品瓶相比，使用经过特殊处理的玻璃样品瓶（TruView pH控制LCMS认证样品瓶）时形成的降解物最少，减少了杂质的错误不合格结果
- 样品瓶重复和批次的一致结果确保了可靠的LC测定结果
- 经过特殊处理的玻璃样品瓶显示出与聚乙烯瓶相当的结果

简介

药物QC工作流程受到严格控制，以确保只有质量合格的产品才能流入消费者手中。在这些工作流程中，对某些杂质水平的限值进行了规定。对于已知杂质，可以指定峰面积的上限，但对于未知杂质，可能很难确定这些限值。使用稳定性方法的LC分析通常会检测活性药物成分(API)在生产过程中产生的杂质。虽然检出的杂质大部分都是由该过程产生的，但也必须考虑由玻璃样品瓶引起降解物形成的可能性。按照先前的文献报道，某些类型的玻璃样品瓶会导致API在瓶内发生化学变化¹⁻⁵。Wallace指出，即使样品瓶表面只有少量颗粒物也会对数据质量产生影响，包括但不限于结果不可重现或因吸附造成样品损失²。Arvary和Mangion报告了两种化合物因在玻璃样品瓶中产生碱性样品溶液而引起的磷假旋转或水解³。Jin及其同事表明，玻璃样品瓶会引起药物依折麦布的碱催化降解⁴。Huang等人在其他检查中报告了玻璃样品瓶对样品稳定性的影响并提出了缓解策略⁵。这些研究表明，使用不合适的样品瓶会引起分析物吸附或降解，从而可能导致不合格(OOS)结果。

在本研究中，我们展示了所选玻璃样品瓶的类型如何影响样品稳定性，并针对含内酯的分析物进行了论证。内酯会发生酯基水解，从而形成羟基羧酸盐⁶。这种降解物可能会出现在QC测试中，尤其是在使用含有高浓度可浸出钠的样品瓶时。钠浸出会引起样品稀释剂的pH变化，产生可催化内酯水解的碱性溶液。钠含量水平和溶液pH可能因样品瓶而异，因此难以确定降解原因，同时还会导致结果不可重现。沃特世新的TruView pH控制LCMS认证样品瓶中可浸出钠以及其他会引起pH变化的化合物含量水平非常低，尽可能减少溶液pH变化，从而降低因碱催化反应导致样品降解的可能性。在分析两种含内酯化合物期间使用TruView pH控制LCMS认证样品瓶，这两种化合物储存在标准玻璃样品瓶中时显示出高降解物水平。

实验

样品描述

使用70:30 v/v水:乙腈稀释剂制备浓度为1.0 mg/mL的储备液，这些溶液用于样品瓶稳定性研究。对于强制降解研究，将100 µL储备液与10 µL 0.1 N NaOH水溶液混合。测试前样品可在室温下放置不超过24小时。

液相色谱条件

液相色谱系统：	ACQUITY™ UPLC™ H-Class PLUS，配备四元溶剂管理器(QSM)、样品管理器 - 流通针式(SM-FTN)、
---------	--

	色谱柱管理器(CM)、PDA检测器和QDa™质谱检测器
检测:	UV @254 nm API和降解物的SIR (见表1)
色谱柱:	ACQUITY Premier HSS T3, 1.8 µm, 2.1 × 50 mm (P/N: 186009467)
样品瓶:	聚丙烯样品瓶, 300 µL (P/N: 186002626) 标准玻璃样品瓶, 2 mL TruView pH控制LCMS认证样品瓶
柱温:	30 °C
样品温度:	10 °C
进样体积:	1.0 µL
流速:	0.5 mL/min
流动相A:	0.1%甲酸的Milli-Q水溶液
流动相B:	0.1%甲酸的乙腈溶液
梯度曲线:	流动相B在5分钟内从5%线性增加到95%，95%流动相B保持1.0分钟。流动相B在0.1分钟内恢复到5%，并重新平衡2.5分钟。总运行时间为8.5分钟。

质谱条件

质谱系统:	ACQUITY QDa
-------	-------------

电离模式：	ESI+, ESI-
采集范围：	SIR见表1
毛细管电压：	1.5 kV ESI+和0.8 kV ESI-
锥孔电压：	15 V
全扫描范围：	50-500 Da
采样速率：	5点/秒

化合物	单同位素质量数 (Da)	预期M+H质荷比 (m/z)	预期M-H质荷比 (m/z)
屈螺酮	366.50	367.51	365.49
屈螺酮杂质 (内酯水解)	384.51	385.52	383.50
洛伐他汀	404.50	405.51	403.49
洛伐他汀杂质 (内酯水解)	422.51	423.52	421.50

表1.监测的分析物、中性质量数和预期的M+H或M-H离子

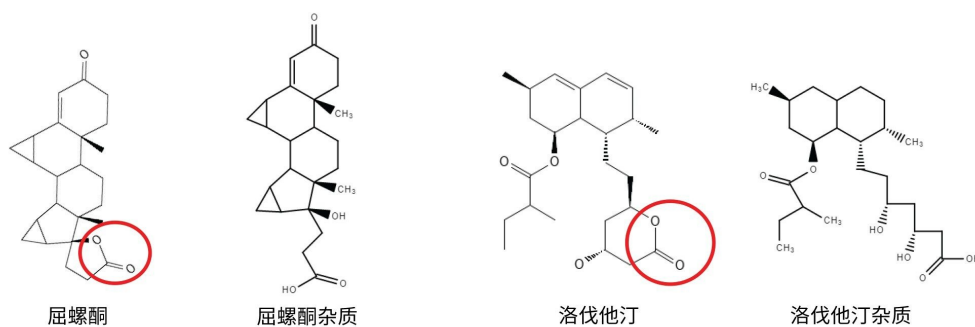


图1.屈螺酮、洛伐他汀和预期降解物的化学结构，圈出了母药的酯水解活性位点。

数据管理

色谱软件：

Empower™ 3 FR4

结果与讨论

玻璃样品瓶的生产过程导致其通常含有低水平的可浸出碱金属。玻璃样品瓶中最常见的碱金属之一是钠，它可以浸入水溶液中，导致溶液pH升高¹。之前的研究发现，使用不同类型的样品瓶储存溶液时，溶液pH会发生不同程度的变化。不过，即使是可浸出钠水平非常低的样品瓶类型，不同生产商的产品也有所不同，甚至同一生产商的不同样品瓶或不同样品瓶批次之间都有所不同。我们开发出一种测试方法来测量这些pH变化。图2显示了从TruView pH控制LCMS认证样品瓶（以下称为“处理过的”）、标准和竞品玻璃样品瓶测量的平均pH与平均钠浓度的关系图，以证明上述影响。通过ICP-OES确定钠含量水平并使用专有技术测量pH。

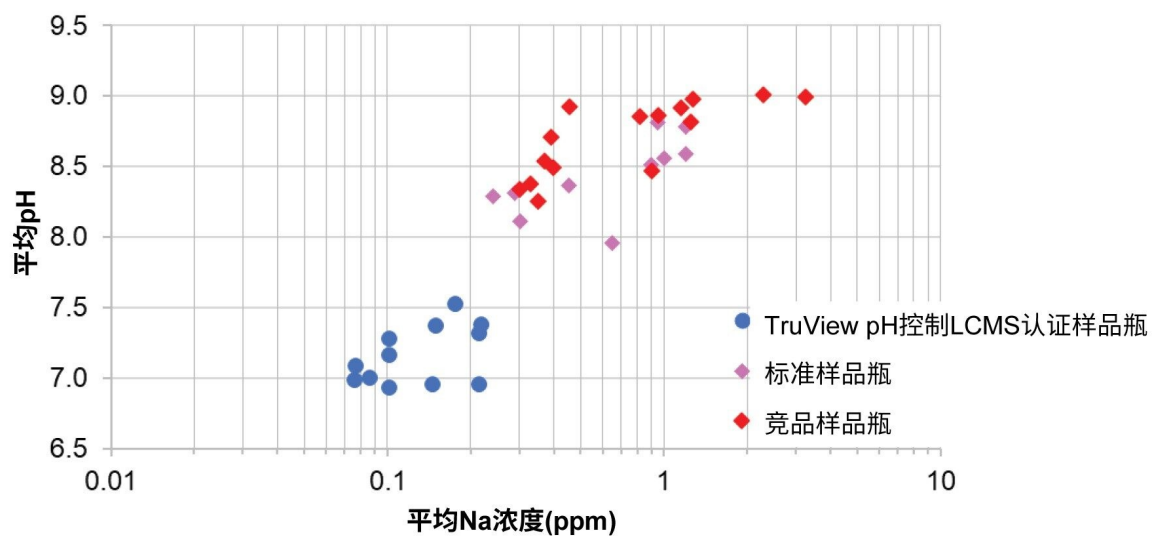


图2.从处理过的、标准和竞品玻璃样品瓶中测得的平均pH与平均钠浓度的关系图

在处理过的玻璃样品瓶中，水溶液含有的钠浓度低，溶液pH为中性或接近中性。如图3所示，处理过的玻璃样品瓶中所有溶液的pH值均低于8.0。相比之下，标准样品瓶和竞品样品瓶中溶液的平均钠浓度和平均pH普遍较高（图2），不同批次的最大pH均在8.0以上，部分竞品批次甚至超过9.0（图3）。

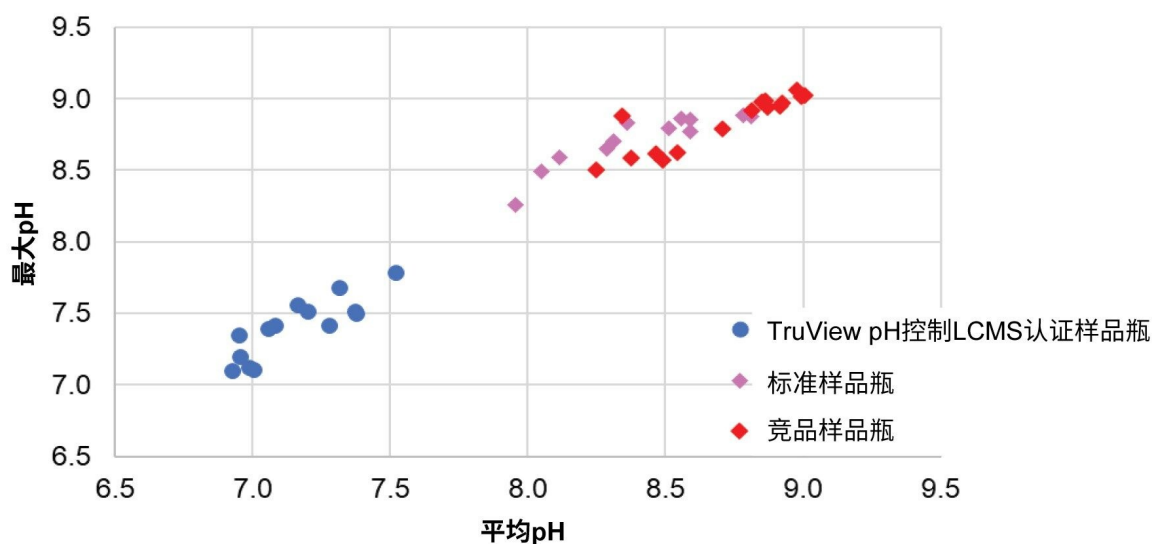


图3.处理过的、标准和竞品玻璃样品瓶中最大pH与平均pH的关系图

此外，不同样品瓶的溶液pH可能有很大差异，标准样品瓶中的溶液pH从接近中性到9（参见图4）。处理过的样品瓶则没有这个问题。某些分析物在较高的pH下可能会发生化学反应，从而形成降解物。这种瓶内降解会引起活性药物成分(API)在杂质峰面积百分比（峰面积百分比）的测定中产生不合格(OOS)结果，从而导致批次失败。此类化学反应的示例包括磷假旋转³和某些官能团（如酰胺或酯）的碱催化水解⁴⁻⁵。OOS结果将引发调查，以确定FDA所列结果的原因⁷。

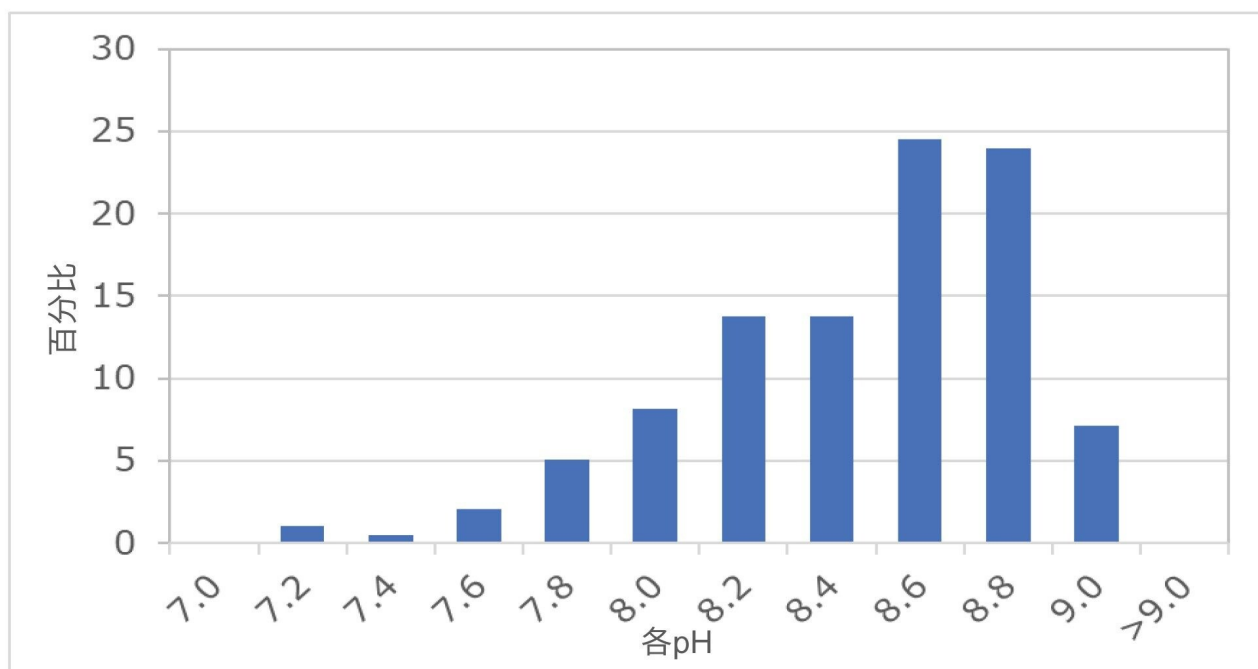


图4.按百分比显示约200个标准样品瓶的样品瓶重复中溶液pH的变化。

本研究通过将pH变化敏感的化合物引入样品瓶，然后将该化合物与形成的任何降解物分离，来考察样品瓶中pH变化的影响。选择了两种化合物（屈螺酮和洛伐他汀）进行测试。如图1所示，这两种化合物都含有内酯基或环酯基。屈螺酮的 γ -内酯和洛伐他汀的 δ -内酯都容易发生不可逆的碱催化水解，形成羟基羧酸盐⁷。从样品瓶中浸出的钠含量水平较高时，溶液pH升高（图2），使化合物加速降解为羟基羧酸盐（图1）。进行样品瓶稳定性测试之前，使用0.1 N NaOH进行了模拟强制降解研究，以收集降解物的保留时间和质谱信息。LC方法开发是离线进行的，旨在确保降解物不会与API同时洗脱，并使用QDa检测器优化选择离子监测(SIR)条件。图5和图6分别显示了API和杂质的示例色谱图以及屈螺酮和洛伐他汀降解物的质谱图，这些谱图来自强制降解研究。

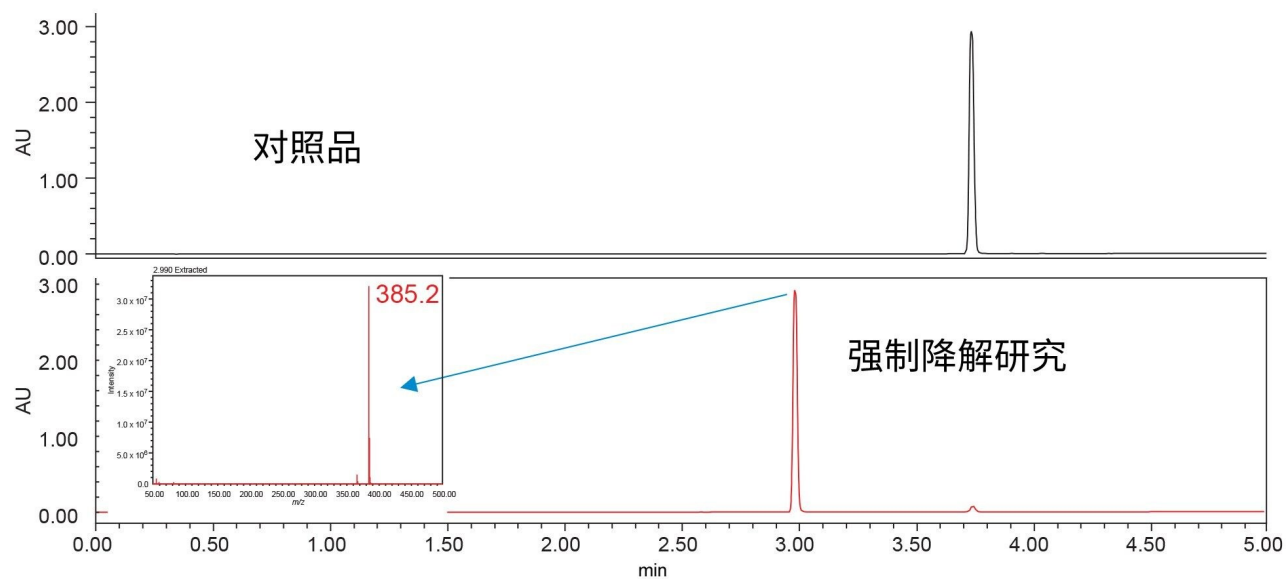


图5.屈螺酮强制降解研究（下图）和对照样品（上图）的色谱图，显示了API和预期降解物的洗脱，以及降解物的质谱图。

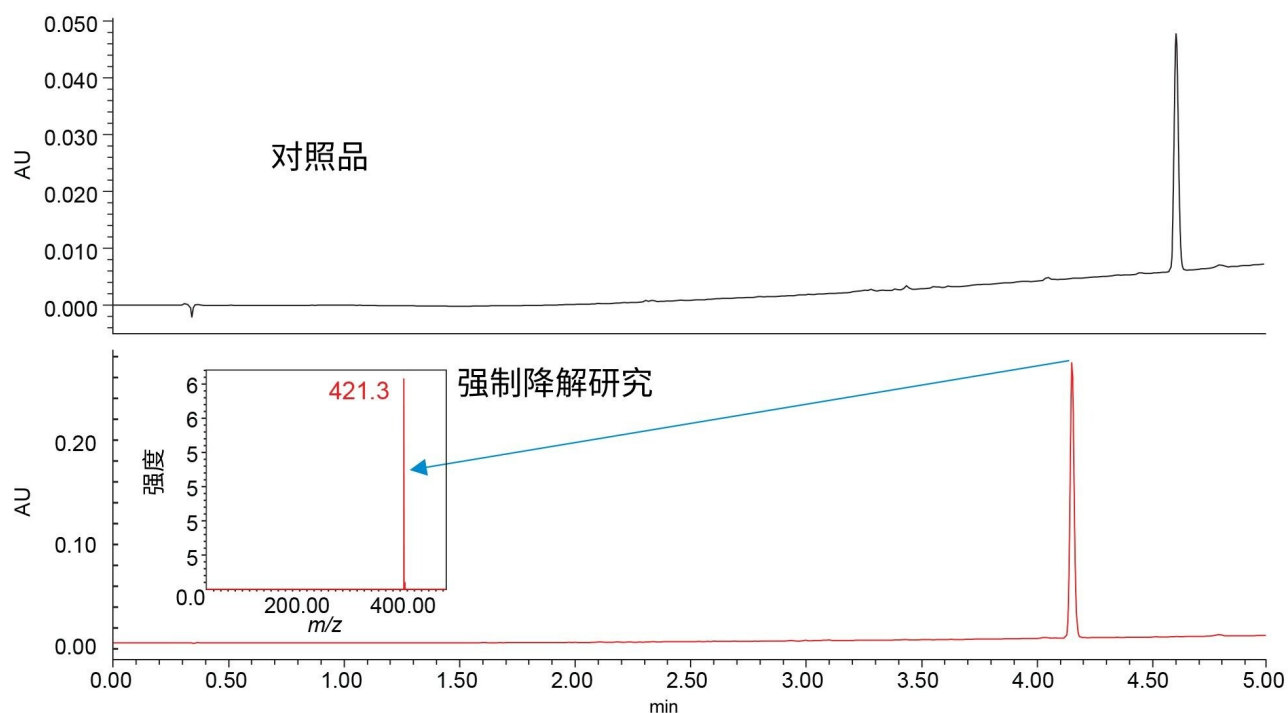


图6.洛伐他汀强制降解研究（下图）和对照样品（上图）的色谱图，显示了API和预期降解物的洗脱，以及降解物的质谱图

值得注意的是，洛伐他汀只有内酯官能团发生水解，分子中的非环状酯基未发生水解。没有检测到与非环状酯基水解产物相匹配的降解物。鉴定出降解物并开发出将其与API分离的方法后，则可开发并执行使用不同样品瓶的稳定性研究。

本研究评估了三种不同类型的样品瓶以确定它们对屈螺酮和洛伐他汀溶液稳定性的影响：聚丙烯样品瓶、TruView pH控制LCMS认证样品瓶和标准玻璃样品瓶。考察每种样品瓶类型和测试化合物时，均将1 mg/mL储备液添加到五个重复的样品瓶中。立即测试每种标准品的一个样品瓶，重复三次进样，以获得降解物形成的基线。测试完成后，将样品瓶移到工作台上，让它们在室温下放置大约16个小时。然后对每个样品瓶重复进样三次以分析样品瓶内容物。图7和图8分别显示了不同样品瓶类型中屈螺酮和洛伐他汀降解物的峰面积。

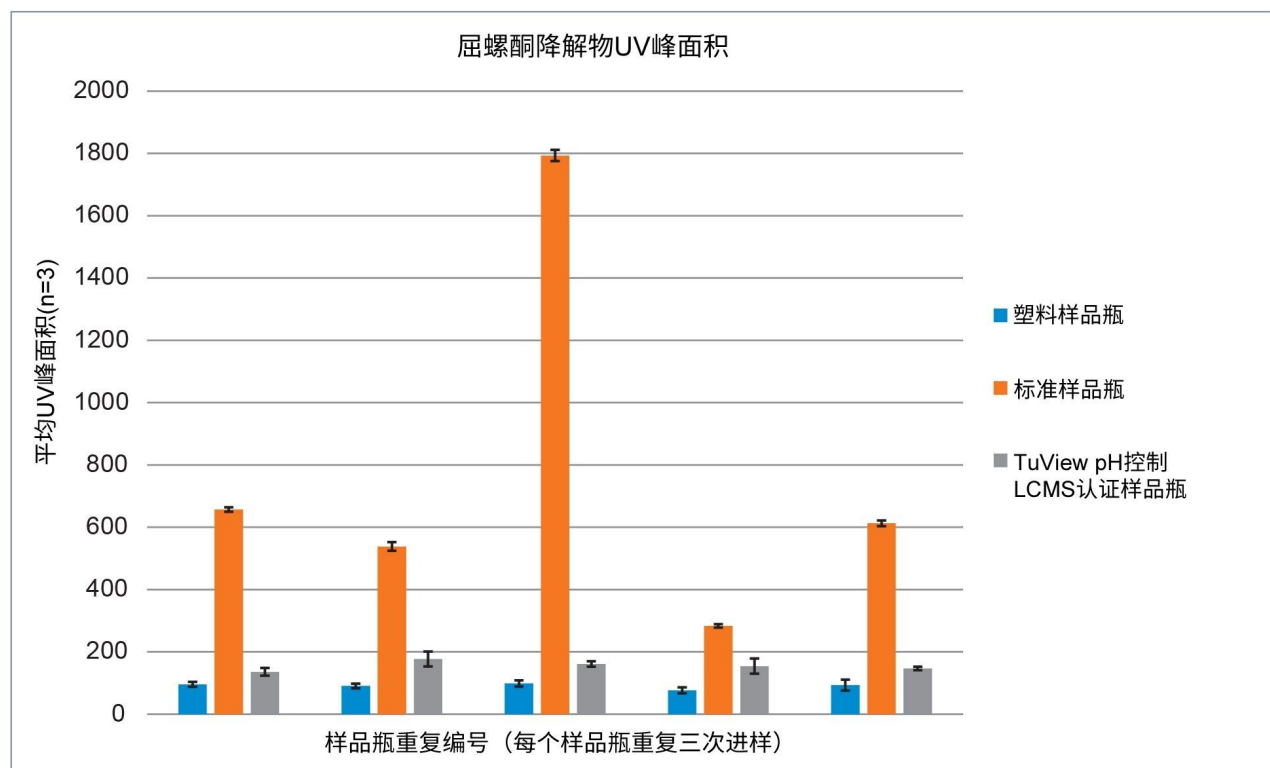


图7.使用重复的样品瓶和不同样品瓶类型得到的屈螺酮降解物的UV峰面积。误差条柱表示重复进样峰面积结果的标准偏差。

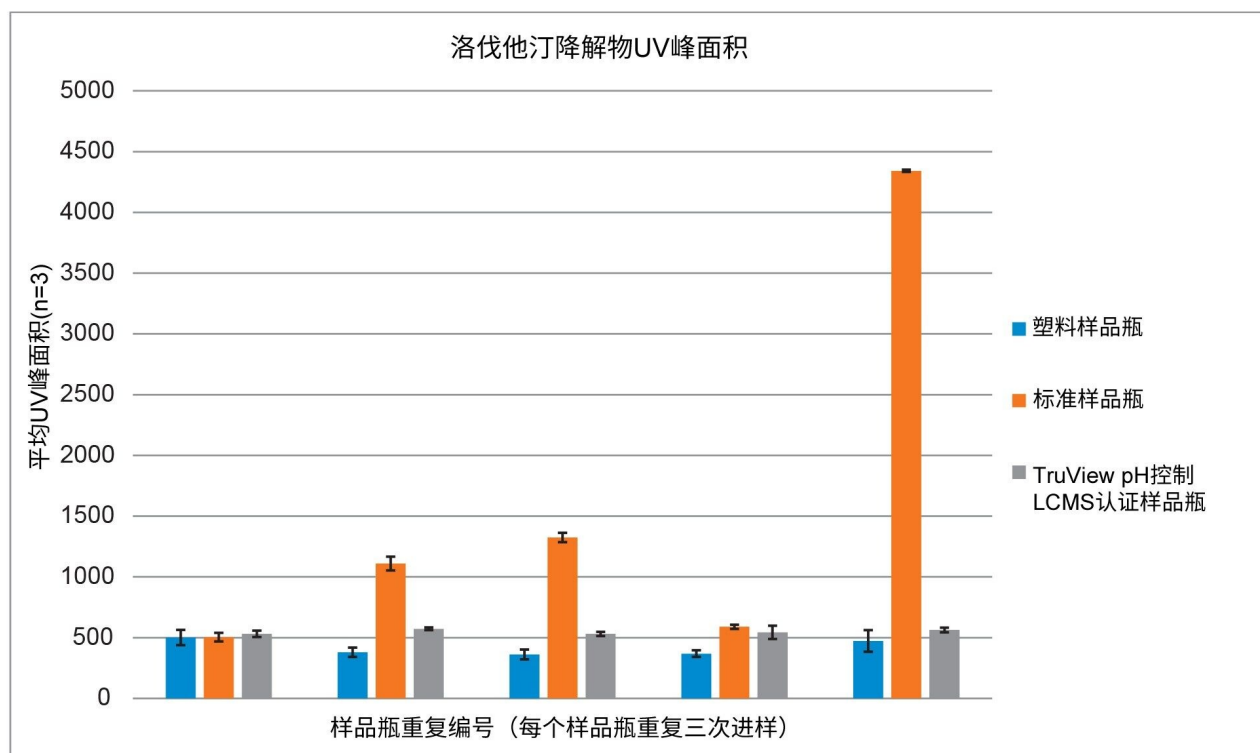


图8.使用重复的样品瓶和不同样品瓶类型得到的洛伐他汀降解物的UV峰面积。误差条柱表示重复进样峰面积的标准偏差。

使用Waters TruView pH控制LCMS认证样品瓶和聚丙烯样品瓶时，屈螺酮和洛伐他汀的降解物峰面积非常低。使用这两种类型的样品瓶时，降解物峰面积与零时数据相匹配，表明样品在这些样品瓶中约16个小时内几乎没有形成降解物。但使用标准样品瓶时观察到形成了相当多的降解物。更令人担忧的是，有些标准样品瓶显示出良好的结果，即降解物峰面积与使用聚丙烯样品瓶时的降解物峰面积相当，而其他标准样品瓶的UV峰面积高达八倍。标准样品瓶的不可重现性可能导致难以对OOS结果进行故障排除。聚丙烯样品瓶和TruView pH控制LCMS认证样品瓶在重复的样品瓶中均显示出可重现的结果。使用新的TruView pH控制LCMS认证样品瓶可以尽可能减少OOS结果，同时对样品实现准确分析，并且不会因溶液pH的改变导致降解。

结论

使用三种不同类型的样品瓶分析两种容易发生碱催化酯水解的药物（屈螺酮和洛伐他汀）。标准玻璃样品瓶在24小时内形成了大量降解物，五个不同的样品瓶中形成了不同水平的降解物。相反，TruView pH控制LCMS认证样品瓶在整个测试过程中几乎没有形成降解物。使用标准样品瓶进行测定可能会导致随机OOS结果，引发成本高昂的原因调查，并且导致实际合格的产品延迟发货。TruView pH控制LCMS认证样品瓶由优质玻璃制成，并经过严格控制可浸出钠含量水平的工艺步骤。它们适用于LC和LC-MS测定，可以尽可能减少OOS事件。通过选择专为尽可能减少钠浸出而设计的样品瓶，如Waters TruView pH控制LCMS证样品瓶，能够可靠地执行关键测定，并确保样品瓶不会影响生成的结果。

参考资料

1. Does an Autosampler Glass Vial Influence the PH of Your Valuable Sample? Thermo Scientific Technical Note.TN21921-EN 0619S (2019).
2. Wallace A. How Glass Vial Quality Affects Data Accuracy.Sample Preparation and Processing Spotlight Feature.LabMate Online.(2020) Accessed 29-June-2022 <https://www.labmate-online.com/article/laboratory-products/3/thermo-fisher-scientific-uk-ltd/how-glass-vial-quality-affects-data-accuracy/2770> <<https://www.labmate-online.com/article/laboratory-products/3/thermo-fisher-scientific-uk-ltd/how-glass-vial-quality-affects-data-accuracy/2770>> .
3. Arvary R, Mangion I. The Importance of Vial Composition in HPLC Analysis: An Unusual Case of Phosphorous Pseudorotation.*J. Pharm.Biomed.Anal.* 134 (2017) 237–242.
4. Jin J, Wang Z, Lin J, Zhu W, Gu C, Li M. “Ghost peaks” of Ezetimibe: Solution Degradation Products of Ezetimibe in Acetonitrile Induced by Alkaline Impurities From Glass HPLC Vials.*J. Pharm.Biomed.Anal.* 140 (2017) 281-286.
5. Huang Y, *et al.* Circumventing Glass Vial and Diluent Effects on Solution Stability of Small Molecule Analytes During Analytical Method Development and Validation.*J. Pharm.Biomed.Anal.* 213 (2022) 114676.
6. Gomez-Bombarelli R, Calle E, Casado J. Mechanisms of Lactone Hydrolysis in Neutral and Alkaline Conditions.*J. Org. Chem.* 78 (14) (2013) 6868–6879.
7. Durivage M. FDA Updates Guidance for Investigating OOS Test Results for Pharma Production <

沪ICP备06003546号-2 京公网安备 31011502007476号