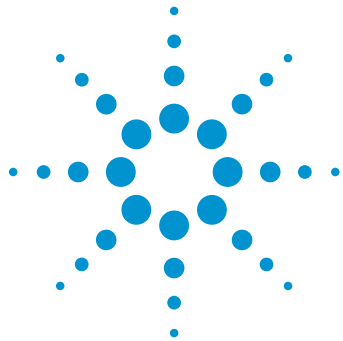




使用高分辨率 LC/MS 液质联用系统与 Mass Profiler 软件检测并鉴定药物容器密封系统中的可萃取化合物

应用简报

作者

Srividya Kailasam 和
Syed Salman Lateef
安捷伦科技公司 (印度)

摘要

Agilent 1290 Infinity 液相色谱与 Agilent 6530 Q-TOF 质谱的联用系统结合数据挖掘软件可用于鉴定眼科药物容器密封系统中的可萃取化合物。药品包装材料中的可萃取物大部分都是有害化合物，这些化合物具有各种差异较大的理化特性。通常需要采用正交分析技术以确保有较宽的检测范围，能够覆盖所有的被分析物。一些应用简报已经证明了 GC/MS 方法的有效性^{1,2,3}。本应用简报举例证明了 LC/MS 用于此类分析的可行性。Agilent 6530 Q-TOF 采用数据非依赖型全离子 MS/MS 采集模式，同时在正离子化和负离子化模式下运行。结合使用 Agilent MassHunter Profinder 与 Agilent Mass Profiler 软件以区分重要的可萃取物与对照溶剂。利用 Mass Profiler 软件的数据库搜索功能，检索针对可萃取/可浸出化合物定制的个人化合物精确质量数据库对可萃取化合物进行鉴定。



Agilent Technologies

前言

药品的原料药和产品会受到一级和二级包装材料转移出的化学制品的污染。由于这些杂质存在影响患者健康的可能，因此 US FDA 已经发布了关于人用药品和生物制品包装用容器密封系统的行业指南⁴。对可能从包装材料中萃取出或已经渗入到原料药或药品中的化合物进行分析是一项复杂的工作，这是因为：

- 制造一级和二级容器需要用到的材料范围广阔
- 萃取或浸出的杂质的理化特性差异巨大
- 样品中的检测浓度范围相差较大，从 ng 级到 µg 级
- 对广阔范围内不同基质中的这些化合物进行检测存在挑战

为克服这些挑战，需要采用多种分析技术，通常是正交分析技术。例如，Norwood 等人列举了大量已开发的 HPLC 和 LC/MS 方法，用于分析可萃取和可浸出化合物⁵。

本研究开发出了一种用于检测一系列分析物的通用方法，这些分析物属于不同的类别，例如增塑剂、光引发剂、稳定剂和抗氧化剂等。利用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统与 Agilent 6530 Q-TOF 质谱仪联用对这些化合物进行分离、检测和鉴定。将 Agilent MassHunter Profinder 和 Agilent Mass Profiler 软件程序与可萃取物和可浸出物的定制数据库结合使用，能够帮助快速分析数据并以较高可信度对检出的化合物进行鉴定。

Agilent MassHunter Profinder 软件能够快速挖掘多个高分辨率 MS 数据文件。在非靶向数据分析中，该软件的批处理递归分子特征提取数据挖掘能力可最大程度减少假阳性和假阴性鉴定结果。由处理后的数据得出的提取离子流色谱图可显示为带颜色标记的组。数据能够以化合物交换格式 (.cef) 文件轻松导出至 Mass Profiler 程序以进行后续的差异分析。这样能够轻松比较不同的样品并确定其差异。如需进行靶向数据分析，可以在 Profinder 软件中选择“分子式查找”算法，对目标可萃取化合物进行监测。然后将数据作为已鉴定列表导出至 Profiler 软件以进行样品间对比。

Mass Profiler 软件是一种统计程序，有助于比较数据集之间的相似和差异性特征，其中数据集可以为：

- 两个单独的样品、
- 样品的重复分析结果或
- 两个样品组的重复分析结果

此外，该软件还可通过 Student t-检验和样品之间的相互关系对样品进行主成分分析 (PCA)。使用内置 ID 浏览器程序中的数据库搜索与分子式生成工具相结合，鉴定用于非靶向分析的特征。

本应用简报遵循图 1 所示的非靶向工作流程，实现快速准确地鉴定可萃取化合物。

实验部分

表 1 列出了用于创建个人化合物数据库的化合物。它们均购自 Sigma-Aldrich。研究中采用 MS 级甲醇、异丙醇 (Fluke) 和去离子水 (Milli-Q, Millipore)。

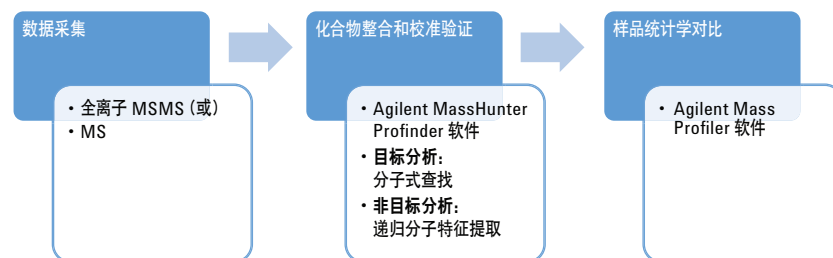


图 1. 使用 Agilent MassHunter 采集、Agilent Profinder 和 Agilent Mass Profiler 软件进行的数据处理工作流程

表 1. 加标样品中所用的目标分析物

编号	分析物	CAS	经验式	单一同位素质量数
1	对羟基苯甲酸乙酯	120-47-8	C ₉ H ₁₀ O ₃	166.063
2	Irgacure 184	947-19-3	C ₁₃ H ₁₆ O ₂	204.115
3	Irgacure 651	24650-2-8	C ₁₆ H ₁₆ O ₃	256.1099
4	邻苯二甲酸二丙酯	131-16-8	C ₁₄ H ₁₈ O ₄	250.1205
5	4-正辛基苯酚	1806-26-4	C ₁₄ H ₂₂ O	206.1671
6	邻苯二甲酸二辛酯	117-81-7	C ₂₄ H ₃₈ O ₄	390.277
7	Irganox 1010	6683-19-8	C ₇₃ H ₁₀₈ O ₁₂	1176.7841
8	Irganox 1076	2028-79-3	C ₃₅ H ₆₂ O ₃	530.4699
9	Iragafos 168	31570-04-4	C ₄₂ H ₆₃ O ₃ P	646.4515

样品前处理

储备液

将标准品溶于异丙醇中，制得每种分析物含有 1000 ppm 的储备液（表 1）。然后用水进一步稀释储备液以配制含有全部九种分析物的混标。

混标溶液

将储备液混合并稀释，得到每种目标分析物浓度约为 1 ppm 的混标溶液。

萃取样品

用水清洗从当地购买的空眼药瓶，并将其中充满 1:1 甲醇:水直至溢出。将其置于烘箱中，在 55 °C 下温育 72 小时。吸取 200 µL 溶液进行分析。

加标样品

为获得约 0.05 ppm 的目标浓度，将 10 µL 混标溶液加入 190 µL 萃取样品中。

仪器

表 2 列出了本实验中所用的详细 LC 和 MS 条件。

- Agilent 1290 Infinity 二元液相色谱系统，包括：
 - Agilent 1290 Infinity 二元泵 (G4220A)
 - Agilent 1290 Infinity 自动进样器 (G4226A)
 - Agilent 1200 系列 ALS 柱温箱 (G1330B)
 - Agilent 1200 系列柱温箱 (G1316A)
 - Agilent 1290 Infinity 二极管阵列检测器 (G4212A)
 - 60 mm 光程的安捷伦最大光强卡套式流通池 (G4212-60007)

- Agilent 1260 二元泵 VL G1312C (G1607-60000)，用于通过 1:100 分流器引入参比质量溶液
- Agilent Q-TOF G6530A 和安捷伦双喷雾喷射流离子源 (G1959A)

表 2. LC 和 MS 方法参数

液相色谱条件		
色谱柱	Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C8, 3.0 × 100 mm, 1.8 μm (部件号 959758-306)	
柱温	50 °C	
流动相 A	100 mg/L 乙酸铵水溶液	
流动相 B	甲醇	
流速	0.5 mL/min	
梯度	时间 (min)	% 甲醇
	0	40
	8	100
	11	100
停止时间	11 min	
后运行时间	1.5 min	
进样量	5 μL	
注射针清洗	1:1 甲醇:水清洗 10 秒	
自动进样器温度	6 °C	
质谱条件		
电离模式	双喷雾 AJS-ESI	
干燥气体	10 L/min, 150 °C	
雾化器压力	30 psi	
鞘气	11 L/min, 200 °C	
毛细管电压	3500 V	
喷嘴电压	300 V	
碎裂电压	145 V	
采集参数		
采集模式	全离子 MS 扫描	
分段和 CE (V)	实验 分段编号	CE (V)
	1	0
	2	15
	3	40
极性	正离子和负离子	
质量范围	50 – 1300 <i>m/z</i>	
MS 扫描速率	7 谱图/秒	
参比离子	正离子: 121.0507 和 922.0098 负离子: 112.9856 和 1033.9881	

软件

- Agilent MassHunter 数据采集软件
B.05.01
- Agilent MassHunter 定性分析软件
B.07.00
- Agilent MassHunter Profinder
B.06.00
- Agilent MassHunter Mass Profiler
B.07.00

结果与讨论

采用化合物的加标混合溶液开发出了一种新的用于检测药物容器中可萃取化合物的高分辨率 LC/MS 方法。加标样品同样可用于进行系统性能测试。测试混标数据分析确保了系统的灵敏度和分离度。萃取溶剂中加入的化合物列于表 1 中，其中涵盖各种极性范围。方法参数经优化后如表 2 所示，对每个空白、加标样品和萃取样品重复进样三次，并同时在正离子化和负离子化模式下采集数据。图 2 显示了在正离子化模式（图 2A）和负离子化模式（图 2B）下获得的提取化合物色谱图。尽管几种分析物在负离子化模式下具有更出色的响应，但许多分析物都能够在正离子化模式下检出，如图 2A 和 2B 所示。

萃取样品的数据分析

LC/MS 方法用于分析从空眼药瓶中获得的萃取物。图 3 显示了在正离子化和负离子化模式下得到的样品的总化合物色谱图 (TCC)。

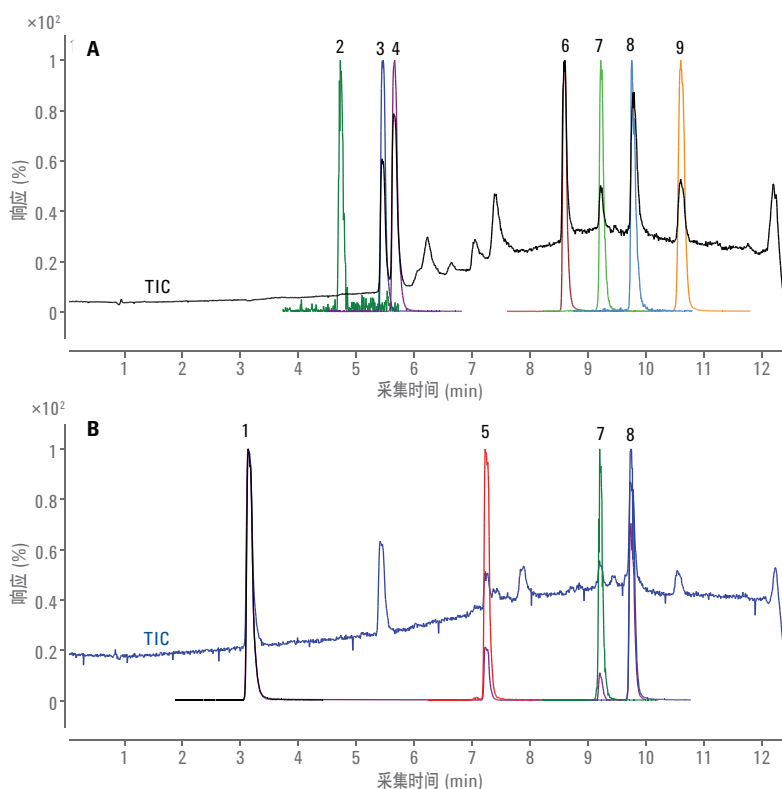


图 2. 正离子化模式 (A) 和负离子化模式 (B) 下获得的加入已知标准品的萃取样品的总离子流色谱图以及目标分析物的提取化合物色谱图

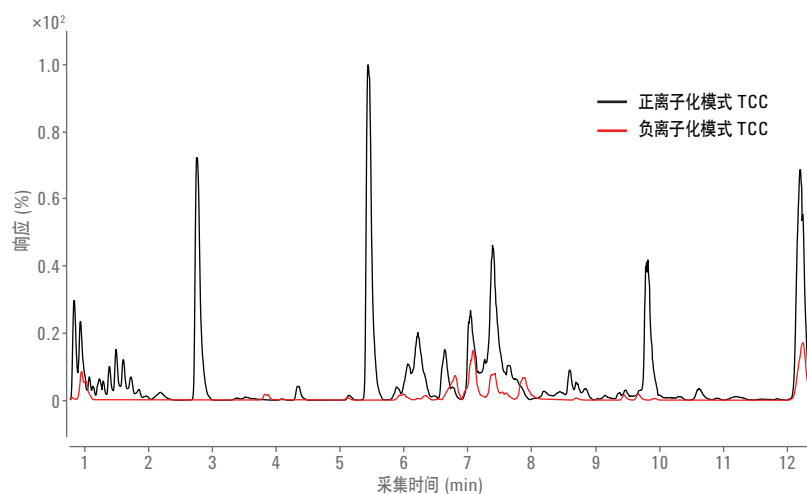


图 3. 空眼药瓶萃取物的正离子化和负离子化模式 TCC

使用 Agilent MassHunter Profinder 软件进行数据对齐

使用 MassHunter Profinder 软件提取、对齐并整合所采集数据中的化学特征。任何未能得到整合的特征都能得到直观检测与整合。在正离子化和负离子化采集模式下从样品中共提取并整合了 175 个特征。

使用 Agilent MassHunter Mass Profiler 软件进行数据对比和鉴定

所提取的特征被导入 Mass Profiler 软件中。Mass Profiler 软件有助于对数据进行统计对比并运行数据库检索，以实现化合物鉴定。图 4 显示了复合特征列表，其中对差异目标化合物进行了初步鉴定，并显示了由 Mass Profiler 分析得到的实验组与对照组重复进样结果的特征丰度对数图。软件采用 4 倍变

化（高度丰度）和 > 3000 的丰度截取筛选设置。分析结果表明，正离子化和负离子化模式下得到的 66 个特征均以显著水平存在于萃取样品中。

ID 浏览器功能与 Mass Profiler 有助于通过数据库搜索和分子式生成确定化合物的特性。图 5 显示了从空眼药瓶萃取物中检出的增塑剂二甘醇二苯甲酸酯的特性、同位素分布和结构。

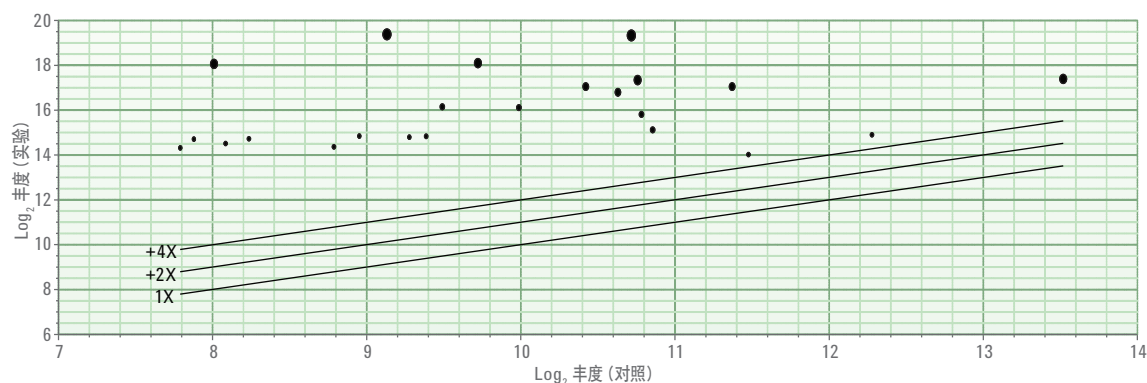


图 4. 显示数据库中鉴定出的化合物（上图）以及样品与空白对照中化合物丰度对数图（下图）的 Agilent Mass Profiler 结果。采用 4 倍丰度线标记实验组化合物处于溶剂空白对照以上的丰度阈值

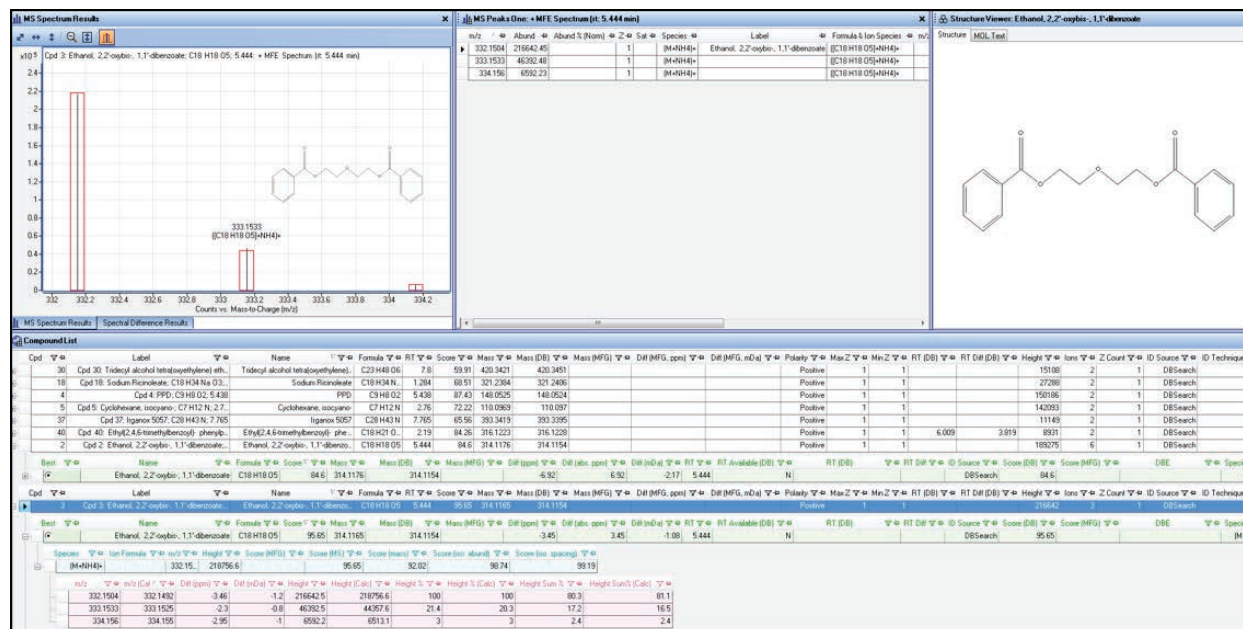


图 5. 通过数据库搜索和分子式生成对化合物进行鉴定，突出显示的化合物为二甘醇二苯甲酸酯

包含 1560 种化合物的定制数据库用于进行数据库检索。在 66 种差异化合物中, 通过精确质量数据库鉴别出的一些化合物包括十三烷醇聚醚、蓖麻酸钠、Irganox 5057、2,4,6-三甲基苯甲酰基苯基膦酸乙酯、异氰基环己烷、Irganox 的降解产物、棕榈酸(十六酸)等, 此外还检测到许多其他化合物。

结论

本应用简报使用 Agilent 1290 Infinity 液相色谱与 Agilent 6530 Q-TOF 的联用系统分析药物容器密封系统中的可萃取物。包含九种增塑剂的混标的分析结果表明, 如需检测多种可萃取化合物需要同时采用正和负电喷雾离子化模式。采用包含两个步骤的工作流程可对数据进行高效分析。第一步涉及使用 Agilent MassHunter Profinder 软件整合和对齐可萃取物及其空白溶剂重复进样之间的验证结果, 第二步涉及使用 Agilent MassHunter Mass Profiler 软件对两组数据进行统计对比。进一步采用 Mass Profiler 的数据库搜索和分子式生成功能对化合物分子式进行推测性的鉴别与确定。本研究结果表明 66 种化合物以显著水平存在于空瓶萃取物中, 这些化合物包括抗氧化剂添加剂(如 Irganox)和皮肤刺激剂(例如蓖麻酸盐)。本研究适用于供应商药物容器密封系统认证或药物成分的可萃取物和可浸出物研究。

参考文献

1. Wong, D. M; Firor, R. L., 使用 GC/MSD 系统分析透皮贴剂中的可提取化合物/可浸出化合物, *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5991-5605CHCN (2015)
2. Wong, D. M; Firor, R. L., 使用 GC/MSD 系统分析袋式塑料静脉输液器中的可萃取/可浸出化合物, *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5991-5616CHCN (2015)
3. Wong, D. M; Firor, R. L., 使用 GC/MSD 系统分析液体仿制药制剂中的可萃取/可浸出化合物, *安捷伦科技公司应用简报*, 出版号 5991-5632CHCN (2015)
4. U.S. Department of Health and Human Services- Food and Drug Administration - Center for Drug Evaluation and Research (CDER) and Center for Biologics Evaluation and Research (CBER), *Container Closure Systems for Packaging Human Drugs and Biologics*; Guidance for Industry; May 1999
5. Norwood, D. L; *et al.* HPLC and LC/MS Analysis of Pharmaceutical Container Closure System Leachables and Extractables, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 2009, 32, pp 1768-1827

查找当地的安捷伦客户中心:

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线:

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们:

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价:

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

本文中的信息、说明和指标如有变更, 恕不另行通知。

© 安捷伦科技(中国)有限公司, 2015
2015 年 11 月 1 日, 中国出版
5991-6244CHCN



Agilent Technologies