

检测眼用药中的可萃取物与可浸出物

使用高分辨率 LC/MS/MS 进行检测与鉴定

应用简报

制药

作者

Syed Salman Lateef
安捷伦科技公司
印度

摘要

从容器封闭系统中浸出的化合物会对药品的原料药和产品造成污染。为了完善风险评估，有必要鉴定这些化合物并确保药物适合其预期用途。通常来说，这些化合物浓度很低，并且会被药物基质掩盖。因此，需要高度灵敏和高选择性的方法来检测和鉴定这些化合物。四极杆飞行时间 (Q-TOF) 质谱仪具有极高的分辨率和精确质量数测量能力，非常适合检测此类物质。Agilent 1290 Infinity 液相色谱系统联用 Agilent 6540 Q-TOF 系统再加上统计分析软件，可以准确检测和鉴定眼用药中的可萃取和可浸出 (E&L) 杂质。使用 Agilent Mass Profiler 软件 (MP) 进行统计数据分析，以确定与对照品相比，样品中存在的化合物。MP 软件的数据库搜索工具有助于使用自定义的精确质量数据库鉴定 E&L。为了鉴定未知的 E&L，本研究通过 MS/MS 数据和结构预测软件（分子结构关联软件）进行分析。在本研究中，每个 E&L 样品中检测到 50 种化合物。



Agilent Technologies

前言

药品的原料药和产品可能会受到一级和二级包装材料中的化合物的污染。可从容器封闭系统中直接萃取的化合物称为可萃取物，而在制剂中发现的化合物则称为可浸出物，通常属于可萃取物中的子集。这些杂质的存在可能会影响消费者健康，因此美国食品药品监督管理局 (FDA) 发布了人用药品和生物制品包装用容器封闭系统指导原则¹。该指导阐述了保护性、安全性和相容性方面的规定。一般来说，可萃取物和可浸出物 (E&L) 的分析相当复杂，主要是以下几个原因：

- 制造一级和二级容器所用的材料多种多样
- 萃取或浸出的杂质的理化特性差异巨大
- 在不同样品中的浓度范围相差较大（从 pg/mL 到 μg/mL）
- 需要对广阔范围内不同基质中的这些化合物进行检测

为克服这些挑战，需要采用多种分析技术，通常是互补的分析技术，如 LC/MS、GC/MS 和 ICP/MS。最近发表的应用简报已经证明了 GC/MS^{2,3,4} 方法的高效性。此外，Norwood 等人概括了大量用于分析 E&L 的 LC 和 LC/MS 方法⁵。

在筛查杂质的过程中，空白溶剂中也可能含有源自容器的 E&L。如果在数据处理过程中，使用简单的背景扣除法将空白溶剂中的化合物从样品中去除，也会导致样本中原本可能存在的 E&L 被去除了。因此，有必要进行样品间的比较，根据化合物的强度变化来保留目标化合物。Agilent Mass Profiler (MP) 是一种统计程序，能够比较数据集之间的相似和差异。这些数据集可以是两个单独的样品、单个样品的重复测定，或者两个样品组的重复测定。化合物鉴定是非目标性分析的一部分，结合了高分辨率质谱的数据库搜索和分子式生成功能。

在本研究中，使用配有 Agilent 6540 Q-TOF 质谱仪的 Agilent 1290 Infinity UHPLC 系统对 E&L 进行分离、检测和鉴定。Agilent MP 与（用户生成的）自定义 E&L 数据库共同使用。无论是已知还是未知化合物，安捷伦分子结构关联 (MSC) 软件都能将 MS/MS 谱图与理论上的最佳结构进行匹配。

图 1 显示了用于眼用药 (ODP) 中 E&L 的分析方法。该方法能够快速且准确地鉴定可萃取物和可浸出物。



图 1. 本研究使用 Agilent MassHunter 采集软件、Agilent Mass Profiler 软件和 Agilent MassHunter 分子结构关联软件进行的数据分析工作流程

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。本研究中使用了 MS 级甲醇和去离子水 (Milli-Q, Millipore)。

样品前处理

可萃取样品

眼药瓶从印度当地的商店购买。用水洗涤眼药瓶，装满萃取溶剂（1:1 的甲醇:水），然后在烘箱中 55 °C 下温育 72 h。将萃取物直接进样到 LC/MS/MS 系统中。将含有纯的萃取溶剂的第二样品作为空白对照进行分析。

可浸出样品

将眼用药制剂及其容器在 60 °C 下加热 24 h，得到第一可浸出样品，称为处理样品。将加热后的制剂直接进样到 LC/MS/MS 系统中。在推荐条件下储存的眼用药制剂是第二可浸出样品，称为未处理样品，也直接进样到系统中。

所有样品进行三次重复分析。

仪器设置

使用 Agilent 1290 Infinity 二元液相色谱系统和配有双安捷伦喷射流离子源的 Agilent Q-TOF G6540A 系统进行 LC/MS/MS 分析。Agilent 1290 Infinity 二元 UHPLC 系统包括：

- Agilent 1290 Infinity 二元泵（部件号 G4220A）
- Agilent 1290 Infinity ALS 恒温器（部件号 G4226A）
- Agilent 1290 Infinity ALS 恒温器（部件号 G1330B）
- Agilent 1260 Infinity 柱温箱（部件号 G1316A）

表 1. 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	
进样针清洗	1:1 甲醇:水, 10 s	
自动进样器温度	6 °C	
质谱条件		
电离模式	双 AJS-ESI	
干燥气	10 L/min, 150 °C	
雾化器压力	30 psi	
鞘气温度	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	MS 和 自动 MS/MS	
分段和 CE (V)	扫描分段编号	CE (V)
	1	5
	2	15
	3	30
极性	正离子和负离子	
质量数范围	50-1300 <i>m/z</i>	
参比离子	正离子: 121.0507 和 922.0098 负离子: 112.9856 和 1033.9881	

表 1 显示了这些分析所用的 LC 和 MS 条件。离子源条件经过优化，可以实现 E&L 的高灵敏度检测。在正离子化和负离子化模式下进行 LC/MS 分析。

数据分析

使用以下软件进行数据分析：

- Agilent MassHunter PCDL Manager B.07.00
- Agilent MassHunter Mass Profiler B.07.01
- Agilent MassHunter Profinder B.06.00
- Agilent MassHunter 分子结构关联软件 B.07.00
- Agilent MassHunter 数据采集软件 B.06.01
- Agilent MassHunter 定性分析软件 B.07.00

个人化合物数据库和谱库 (PCDL)

使用分子式和分子结构创建用户生成的、包含文献中报道的 E&L 的自定义数据库。该数据库包含 1840 种化合物。

Agilent MassHunter Mass Profiler 软件实验组是经过萃取或浸出处理的样品，而对照组则是空白溶剂或未经过浸出处理的样品。对重复组执行统计分析和倍数变化分析。如果化合物在至少一组中出现频率 $> 50\%$ ，则需要进行倍数变化分析。使用大于 2.0 的倍数变化标准进行双向批次比较，也就是实验组的丰度比对照组的丰度高出一倍。从倍数变化分析获得的差异特征与自定义数据库匹配，且质量精度标准 $< 5 \text{ ppm}$ 。

目标性可浸出物分析

除了非目标性分析之外，对可浸出样品进行目标性分析以鉴定已知的可浸出杂质。MassHunter Profinder 软件通过自定义 E&L 数据库中的分子式进行批次目标特征提取分析。Profinder 软件将从处理的数据中提取的离子色谱

图用颜色分组，还显示峰积分。验证峰的积分，并将结果导出到 MP 中进行统计分析（如上所述）。

MSC 分析

进行 MSC 分析以鉴定未包括在 PCDL 中的未知化合物。在 Agilent MassHunter 定性分析软件中使用分子式查找功能处理自动 MS/MS 数据。通过 Mass Profiler 生成的化合物的差异列表可用作分子式查找算法中的分子式来源，以便从差异列表中的化合物所选前体提取 MS/MS 碎片离子。将自动 MS/MS 碎片离子的结果导出到 MSC 软件。本研究选择 PCDL 数据库作为已知结构确认的结构源，选择在线数据库 ChemSpider 作为未知分析的结构源。

半定量

将邻苯二甲酸二辛酯标准品溶于提取溶剂，制作校准曲线。浓度范围为 $1 \text{ pg}/\mu\text{L}$ 至 $50 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 。校准曲线用于评估含有芳环的可浸出物的浓度近似值。由于未对每种化合物使用真实标准品，因此假设浓度值的误差为 30%。

结果与讨论

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

在正离子模式下分析的空眼药瓶的提取物显示存在 200 种化合物，其中 45 种化合物的丰度显著高于溶剂空白。在可萃取样品和溶剂空白对照中发现了邻苯二甲酸二辛酯和邻苯二甲酸二壬酯，但是它们的强度差异分别为 0.05 倍和 2 倍。如果只是采用简单的空白扣除，那么这两种化合物都会从样品中去除。由于 Mass Profiler 软件使用了倍数差异 > 2.0 的标准，因此可以确认样品中的确存在邻苯二甲酸二壬酯。图 2 显示了在可萃取物研究中发现的化合物的对数丰度图，其中显示了 1、2 和 4 倍变化强度的截取值。

结合正、负离子化分析结果，本次可浸出研究检测出 54 种化合物。负离子化模式贡献了检测到的化合物数目的 30%。

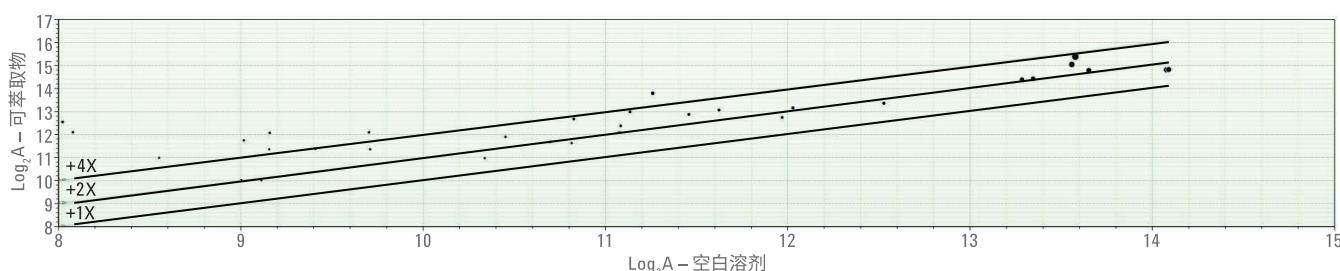


图 2. Agilent Mass Profiler 分析得到的可萃取化合物与溶剂空白的对数丰度图。采用 1、2 和 4 倍丰度线标记实验组化合物浓度高于溶剂空白对照的丰度阈值

MP 软件的鉴定功能通过化合物的精确质量数来进行鉴定。用户可借助 MassHunter 通过现有（文献中的）数据轻松创建自己的 PCDL。图 3 为用户生成的数据库的示例，显示了在空眼药瓶提取物中鉴定的邻苯二甲酸二壬酯的特征、同位素分布和结构。通过用户生成的数据库鉴定出 11 种可萃取化合物。表 2 显示了在正、负离子化模式下鉴定的可萃取和可浸出化合物的列表。

目标性可浸出物分析

非目标性分析有助于鉴定在胁迫条件下形成的未知新生化合物（降解物或反应物）。这类化合物也可能是可浸出化合物（表 2）。然而，也可以通过使用数据库中存储的可萃取信息对可浸出样品进行目标性分析。

图 4 显示了在可浸出物样品中检测到的明显可萃取物的对数丰度图。数据显示，总共 45 个明显可提取物中，在可浸出物样品中发现了 16 个。在经处理和非经处理样品中，所发现的化合物的浓度不变（位于 1x 丰度线上）。丰度图显示，热处理后只有三种化合物的浓度出现显著变化。

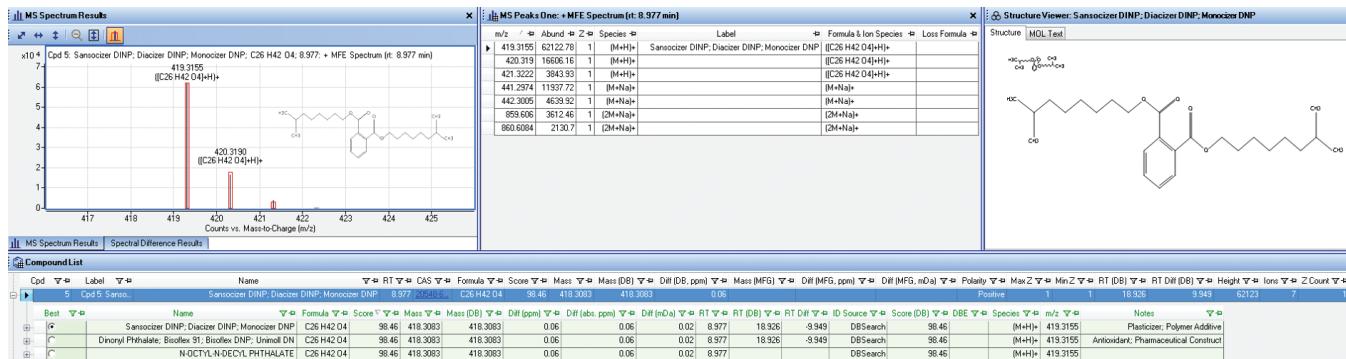


图 3. 鉴定邻苯二甲酸二壬酯的数据库结果。结果还表明异构体邻苯二甲酸二壬酯和邻苯二甲酸正辛基正癸酯也可能是目标物

表 2. 辅助鉴定 E&L 的自定义（用户创建的）精确质量数据库

化合物	质量数误差 (ppm)	CAS 号	样品类型
二甘醇	1.42	111-46-6	可萃取物
蓖麻油酸钠	4.89	5323-95-5	可萃取物
1,3-丙二酮、1,3-联苯 (Rhodiastab 83)	0.39	120-46-7	可萃取物
异丙基-9H-噻吨-9-酮	0.89	75081-21-9	可萃取物
Irgacure 651	1.17	24650-42-8	可萃取物
甲基丙烯酸异辛酯 (A58)	0.37	28675-80-1	可萃取物
1-二十二烯	1.37	1599-67-3	可萃取物
2-乙基己基 4-(二甲基氨基)-苯甲酸甲酯	1.03	21245-02-03	可萃取物
Irgacure 907	0.74	71868-10-5	可萃取物与可浸出物
13-芥酸酰胺, (13Z) (芥酸酰胺)	0.11	112-84-5	可萃取物与可浸出物
邻苯二甲酸二壬酯	0.06	84-76-4	可萃取物与可浸出物
十四烷基二甲基氧化胺	0.33	3332-27-2	可浸出物
乙酸丙酯	1.92	109-60-4	可浸出物

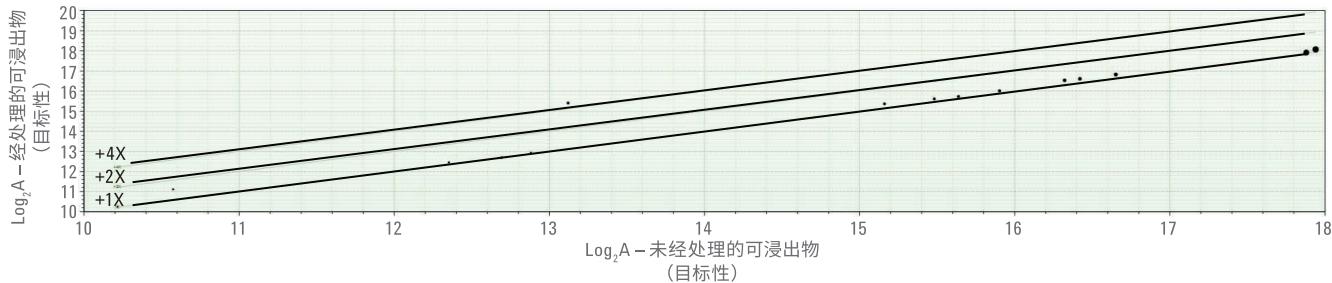


图 4. Agilent Mass Profiler 结果显示了经浸出处理化合物与未经浸出处理目标化合物的对数丰度图。几种化合物位于 1 倍丰度线标记上

非目标化合物鉴定、化合物确认和结构解析

从标准品中获得的 MS/MS 谱图用于结构确认和未知结构解析。然而在 E&L 研究中，不太容易获得参比标样。而软件辅助结构解析功能提供了一种确定未知化合物的化学结构的可行方法。安捷伦 MSC 软件有助于尝试性鉴定没有参比标样的化合物。MSC 软件将实验 MS/MS 碎片离子的

精确质量数/分子式与电脑模拟碎片离子相关联，形成结构数据库，并给出可能的匹配。这些可能的结构来自于用户生成的自定义 PCDL、ChemSpider 或 PubChem 数据库。

PCDL 数据库结构用于化合物确认，而网络数据库则用于确定未知化合物。图 5 显示了邻苯二甲酸二异壬酯 (DINP, 一种潜在的内分泌干扰物) 化合物和相关同分异构体的确认结果。

其他确认的化合物是芥酸酰胺、异丙基-9H-噻吨-9-酮和 Irgacure 907 (用作光聚合的光引发剂)。被确定为 E&L 的一些未知化合物包含：

- (9E)-N-丁基-9-十八碳烯酰胺 (0.1 ppm, MSC 得分: 85)
- 3-氧化-2,3-二苯基丙醛 (0.4 ppm, MSC 得分: 75)
- 吡咯烷羧酸酯的衍生物 (0.2 ppm, MSC 得分: 81)
- 3,4-O-异亚丙基-D-核糖醇的衍生物 (0.3 ppm, MSC 得分: 84)

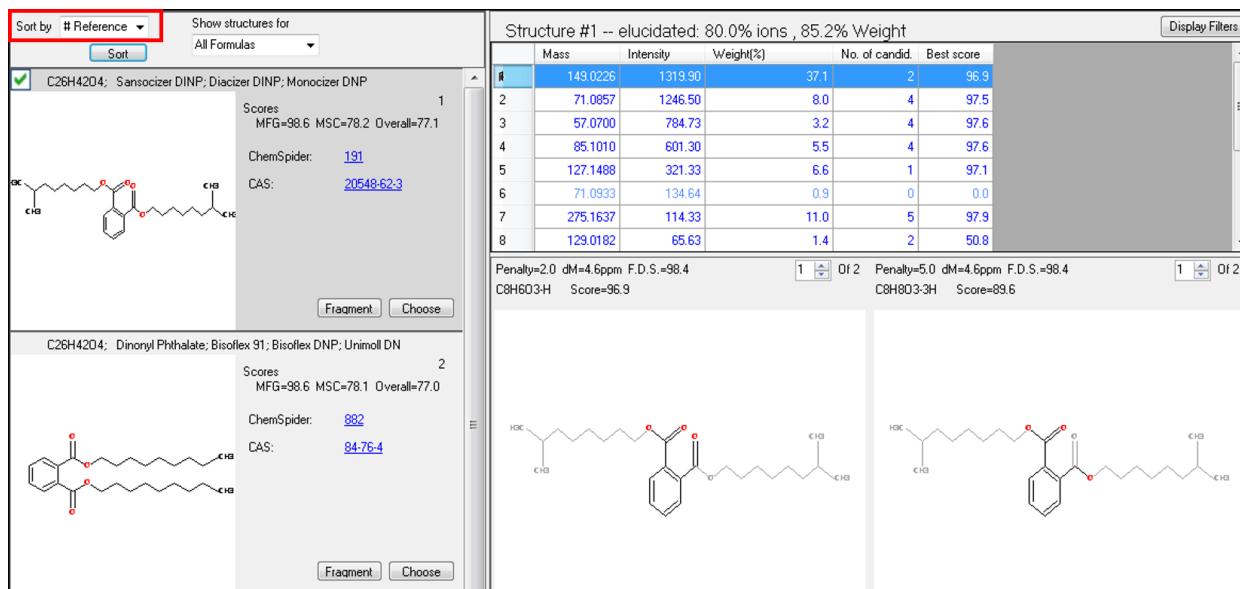


图 5. 用于确认邻苯二甲酸二异壬酯 (DINP) 的安捷伦分子结构关联软件。实验观察到的 MS/MS 碎片离子与理论结构碎片离子进行匹配，然后根据参考引用的最大数目对结果进行排序

半定量

使用邻苯二甲酸酯外标进行半定量分析, 得到经浸出处理样品中可浸出物浓度的大致估计值。倘若该估计值高于分析评价阈值 (AET), 则分析人员要报告需进行毒理学风险评估。根据最新的 PQRI 工作组报告⁶, ODP 的 AET 用浓度表示 (ppm)。如果可浸出物超过 1 ppm, 则应报告给监管机构, 大于 10 ppm 需要进行确认, 而高于 20 ppm 则需要进行风险评估。表 3 中显示了经浸出处理样品的半定量结果。结果表明, 可萃取物和可浸出物研究中三种可浸出物: 邻苯二甲酸二异壬酯、邻苯二甲酸二辛酯和芥酸酰胺的浓度超过 1 ppm, 需对其进行报告。

结论

本应用简报表明, Agilent 1290 Infinity UHPLC 系统与 Agilent 6540 Q-TOF 联用可用于分析眼用药及其容器中的 E&L 化合物。采用包含两个步骤的工作流程可对数据进行严谨的分析。第一步是使用 Agilent Mass Profiler 软件进行统计对比以区分 E&L 化合物与对照样品。使用精确质量数 PCDL 数据库鉴定样品间存在显著差异的化合物。在第二步中, 使用 MSC 软件对已知化合物和未知化合物进行分析。这样可以有效确认已知化合物, 还有利于未知化合物的结构解析。研究发现每个 E&L 样品中大约存在 50 种化合物。这项研究结果鉴定了可能构成潜在健康风险的多种化合物。可浸出物研究的半定量结果显示了三种化合物: 邻苯二甲酸二异壬酯、邻苯二甲酸二辛酯和芥酸酰胺, 它们可在胁迫处理样本中可浸出到药品中, 并且浓度超过 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 因此应向监管机构报告。

表 3. 经处理眼科溶液中可浸出物的半定量估计值

可浸出物	ppm \pm 30% ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
邻苯二甲酸二异壬酯 (DINP)	1.4 \pm 0.4
邻苯二甲酸正二辛酯 (DOP、DEHP)	2.5 \pm 0.7
邻苯二甲酸酐	0.14 \pm 0.04
2-苯甲酰基苯甲酸甲酯	0.11 \pm 0.03
Irgacure 907	0.02 \pm 0.005
己胺	0.04 \pm 0.01
Ionox 100	0.03 \pm 0.01
芥酸酰胺	1.68 \pm 0.50
甘油二月桂酸酯	0.08 \pm 0.02
1,2-苯二甲酸、1,2-双(8-甲基壬基)酯	0.16 \pm 0.05
十四烷基二甲基氧化胺	0.0009 \pm 0.0003
乙酸丙酯	0.10 \pm 0.03

参考文献

1. 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*
2. 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
3. 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
4. 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
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, 1768–1827
6. Houston, C. T. The PQRI PODP Approach: Understanding Threshold Concepts and Their Application To Different Routes of Administration. *Talk present at E&L Europe 2015, November 2015*

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

仅限研究使用。不可用于诊断目的。

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, 2016
2016 年 5 月 1 日, 中国出版
5991-6828CHCN



Agilent Technologies