



药物容器封闭系统中可萃取物的鉴定和比较

先进的数据挖掘处理工具充分利用了 Agilent 7200 GC/Q-TOF 系统的电子轰击电离、化学电离、碰撞诱导解离和精确质量信息等各项功能

应用简报

制药行业

作者

Syed Salman Lateef
安捷伦科技公司

摘要

监管机构和工作组制定了评估药物容器的指南，以确保药品的安全性和有效性。容器认证指南建议在进行萃取研究时采用风险评估法。该方法对来自于药物容器封闭系统各部分或整个体系的萃取物中发现的非挥发性化合物、半挥发性化合物和元素污染物的毒理学相关性进行鉴定和分类。在本研究中，我们研究了不同制造商生产的四种药物容器，得到了半挥发性可萃取化合物的图谱。使用 Agilent 7200 GC/Q-TOF，在电子轰击电离 (EI) 和化学电离 (CI) 模式下采集数据，以确保对萃取的化合物进行全面鉴定。采集 EI 数据，并使用 NIST 谱库鉴定化合物。使用 Agilent MassHunter Mass Profiler Professional 软件，根据化学计量方法即可看到不同样品中的化合物分布情况。在 EI 模式下只得到初步鉴定的化合物随后在 CI 模式下使用生成的母离子质量数数据进行确证。每个容器中鉴定出大约 170 种化合物。结果表明，EI 和 CI 数据的组合使鉴定出的可萃取化合物的数量增多，从而能够对容器系统进行全面评估。



Agilent Technologies

前言

药物容器可萃取物的研究提供了有价值的信息，可确保药物的安全性和有效性。在生产过程的早期阶段对药物容器封闭系统中可萃取物的研究非常有利于早期材料评估和选择过程¹。使用不同供应商的容器时，生产工艺的变化会改变可萃取物的图谱。使用食品药品监督管理局 (FDA) 列出的风险评估法对药物容器封闭系统中可萃取化合物的毒性进行评估^{2,3}。该方法考虑到患者人群、给药途径、制剂与容器系统之间可能发生的相互作用等多种因素。对于眼部用药 (ODP) 而言，需要重点关注给药途径以及液体制剂和包装材料之间可能发生的相互作用。

毒性评价方法主要来自涉及化合物的吸收、分布、代谢和消除 (ADME) 的现有文献中介绍的内容。如果此类信息缺失，则必须使用 Cramer 分类法，根据化合物的结构进行分类。Cramer 分类法将化合物分为不同的类别：

- 第 I 类 – 低毒性
- 第 II 类 – 中等毒性
- 第 III 类 – 剧毒性

第 III 类已知的活性官能团包括脂肪族仲氨基、氰基、N-亚硝基、重氮基、三氮烯基、季氮、应变-环内酯、环氧化物、醌和 α,β -不饱和酮⁴。最近，Jenke³ 开发并验证了一种半定量风险评估矩阵，用于确定容器是否适合其预期用途所需的量和测试。

与所有非目标性研究一样，可萃取物研究是尝试对未知的样品成分进行鉴定。在电子轰击电离 (EI) 模式下显示出较强碎裂的化合物将使检测到的未知物的数量增加。然而，通过应用正交软电离技术，例如化学电离 (CI)，可以更轻松地鉴定出适用于软电离环境的高度不稳定的化合物。使用精确质量数仪器进行分析，同时借助自定义精确质量数据库，能够使鉴定出的化合物数量增加。精确质量数仪器还有助于通过分子峰及其碎片离子得到的分子式来鉴定未知物。

在本应用简报中，使用高分辨率 Agilent 7200 GC/Q-TOF 系统对四个不同药物容器系统中的可萃取物进行了研究。样品前处理的仅针对分析半挥发性化合物。在 EI 和 CI 模式下采集色谱图。使用 Agilent MassHunter 未知物分析软件，EI 谱图可自动解卷积并且与 NIST 14 谱库匹配。使用文氏图来显示从四个不同容器的萃取物中采集到的数据，文氏图是 Agilent Mass Profiler Professional (MPP) 软件的一项特色功能。将 EI 谱库匹配得分低的初步鉴定出的化合物转化为自定义数据库。这些低 EI 谱库匹配得分的自定义数据库用于挖掘 CI 精确质量数数据，以便进一步确认某些化合物。图 1 显示了本研究采用的工作流程。

工作流程

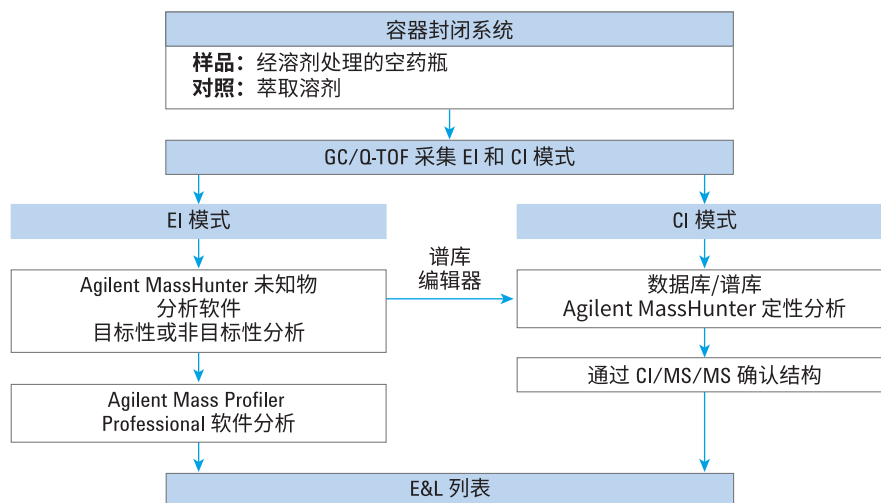


图 1. 使用精确质量数 GC/Q-TOF 系统分析可萃取物和可浸出物中半挥发性化合物的工作流程

实验部分

HPLC 级正己烷，纯度 99%，购自 RCI Labscan（泰国）。

样品前处理

四个空的制剂瓶购自当地。其中两个由低密度聚乙烯制成（容器 1 和 2），另外两个由聚乙烯制成（容器 3 和 4）。向其中各加入 5 mL 正己烷，并超声处理 1.5 h。超声处理后，分析溶剂。萃取溶剂正己烷用作空白溶剂。

数据采集和处理

本研究采用下列安捷伦软件进行数据采集和处理：

- Agilent MassHunter 采集软件 (B.07.02)
- Agilent MassHunter 定性分析软件，带有 PCDL Manager 单机工具 (B.07.00)
- Agilent MassHunter 定量分析软件，带有谱库编辑器和未知物分析单机工具 (B.07.01)
- Agilent Mass Profiler Professional 软件 (13.1 版)

仪器参数

表 1 显示了本分析中所用的仪器参数。

数据分析

EI 离子源数据分析

使用 MassHunter 未知物分析软件处理数据文件，以便进行解卷积，并与 NIST 14 谱库进行匹配。设置匹配得分 > 80 以选择所鉴定的化合物。

表 1. 本实验中使用的 GC/Q-TOF 仪器参数

气相色谱条件	
GC	Agilent 7890A
进样口	多模式进样口 (MMI)
模式	不分流
隔垫吹扫流速	3 mL/min
进样口升温程序	70 °C (保持 0.2 min)，然后以 600 °C/min 升至 325 °C (保持 7 min)
衬管	超高惰性不分流单锥衬管，带玻璃毛 (部件号 5192-3163)
载气	氦气
流速	1.3 mL/min (恒流)
分流出口吹扫流速	60 mL/min (2.73 min 时)
载气节省模式	20 mL/min (3 min 时)
柱温箱升温程序	50 °C (保持 3 min)，然后以 6 °C/min 升至 320 °C (保持 7 min)
平衡时间	1 min
运行时间	55 min
色谱柱	Agilent DB-5ms, 30 m × 250 µm, 0.25 µm (部件号: 122-5532)
进样量	2 µL
质谱条件	
质谱	Agilent 7200
调谐	自动调谐
传输线	280 °C
MS 离子源 (EI 和 CI)	300 °C
MS 四极杆	175 °C
质量数范围	55-700 amu
采集速率	5.00 质谱图/秒
电子轰击电离	
EI 发射电流	35 µA
EI 电子轰击能量	70 eV
化学电离	
CI 发射电流	240 µA
CI 气体流速	20% EPC
CI 电子轰击能量	115 eV
模式	正离子
CI 试剂气体	甲烷
碰撞池 EPC	氮气, 1.5 mL/min

创建 EI 精确质量谱库

将得分为 50 至 79 的 EI 结果导出到谱库编辑器软件中，得到低分 EI 谱库。导出得分 ≥ 80 的 EI 结果得到高分 EI 谱库。谱库 (.xml 格式) 中包含诸如名称、分子式、保留时间 (RT) 及谱图等化合物信息。

MPP 分析

EI 数据经未知物分析工具重新处理，使用精确质量数、高分 EI 谱库进行解卷积，再进行谱图和 RT 匹配。该步骤有助于过滤要导出到 MPP 软件中的结果。

安捷伦个人化合物数据库 (PCD)

创建一个基于文献报道的可萃取物和可浸出物的自定义数据库。数据库条目由化学式、精确质量数和 CAS ID 组成。

CI 数据分析

使用 MassHunter 定性分析软件，依据“分子式查找”算法与可能的加合物 $[M+H]^+$ 、 $[M+C_2H_5]^+$ 和 $[M+C_3H_5]^+$ 处理 CI 数据。低分 EI 谱库用作分子式数据库。此外，还使用了用户创建的可萃取物定制谱库检索 CI 数据中的其他可萃取物。

使用 CI/MS/MS 进行结构解析

采用 MassHunter 定性分析软件中的 Find by Targeted MS/MS 功能处理 CI/MS/MS 数据文件。使用 ACD 软件 (ACD Labs, 多伦多) 确认和绘制碎片离子结构。

毒理学评价

使用 Toxtree 2.6.13 版对 Cramer 分类方法进行计算机预测⁵

结果与讨论

EI 模式分析

使用未知物分析工具处理在 EI 模式下采集的数据，以便进行色谱解卷积和谱库匹配。未知物分析软件还可基于高度筛选化合物，但在本研究中我们未使用此项筛选功能。1-乙基十一烷基苯也称为 2-苯基十三烷，它是容器 2 在 27.3 min (图 2) 处所鉴定出的可萃取化合物。该解卷积组分的提取离子色谱图 (EIC) 存在共洗脱现象，并具有相同的峰形 (图 2C)，而其 EI 谱图的单位质量 (NIST) 谱库匹配得分为 85.3。

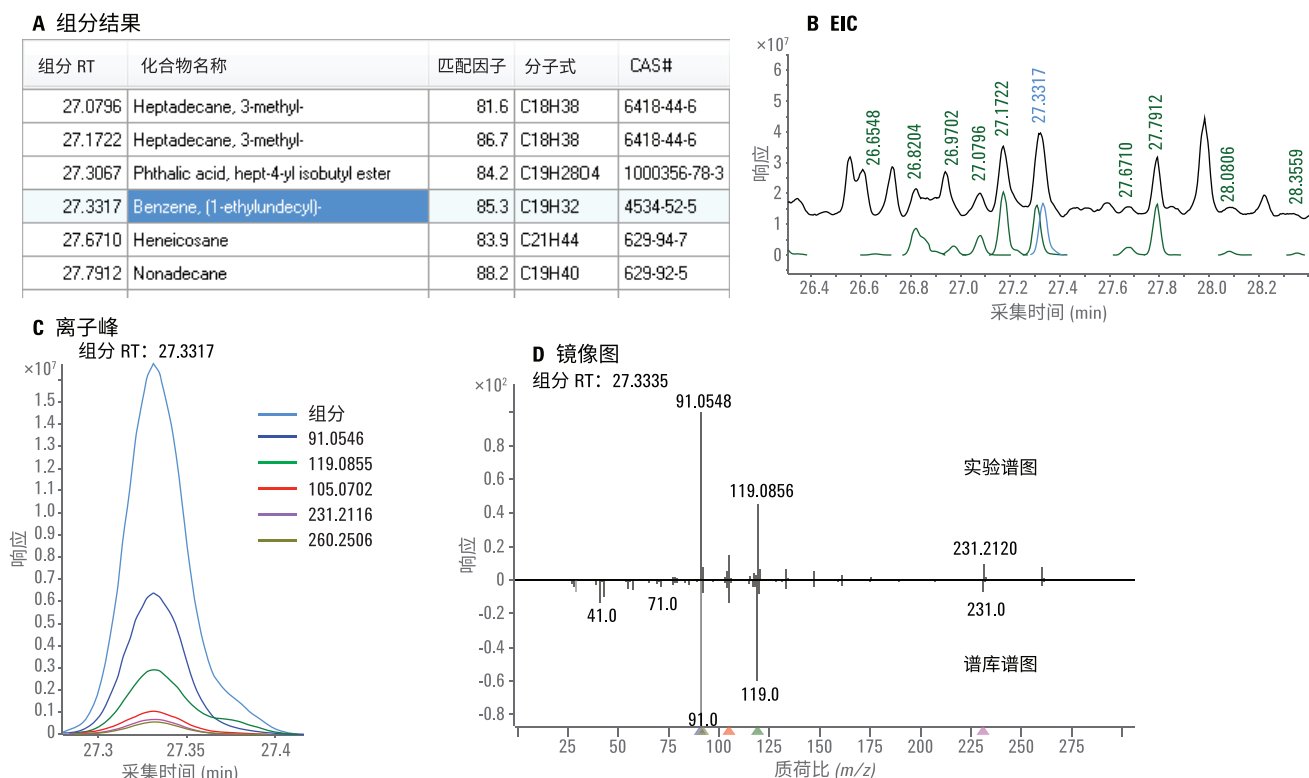


图 2. Agilent MassHunter 未知物分析软件通过解卷积和 NIST 谱库检索鉴定 1-乙基十一烷基苯。图中显示了组分结果 (A)、解卷积组分的 EIC 的叠加图 (C)，以及解卷积组分谱图和谱库匹配的镜像图 (D)

将谱库匹配得分 > 80 的化合物导出到 MPP 软件中，用于数据解析。在 MPP 软件中使用文氏图显示整个样品中的化合物分布。图 3 显示了来自四个不同容器系统的已鉴定可萃取物分布的文氏图。此文氏图表明有 22 种化合物（已鉴定的）在不同制造商提供的四种容器中都存在。可萃取物分布的对比结果显示，在容器 3 和 4 中存在 200 多种化合物。从容器 1 和 2 中萃取出大约 150 种化合物，其中容器 2 中的化合物数量最少。研究表明，与容器 1 和 2 相比，容器 3 和 4 不太适合作为容器系统。表 2 列出了容器 2 中鉴定出的可萃取物的部分列表，以及所有容器共同存在的化合物。

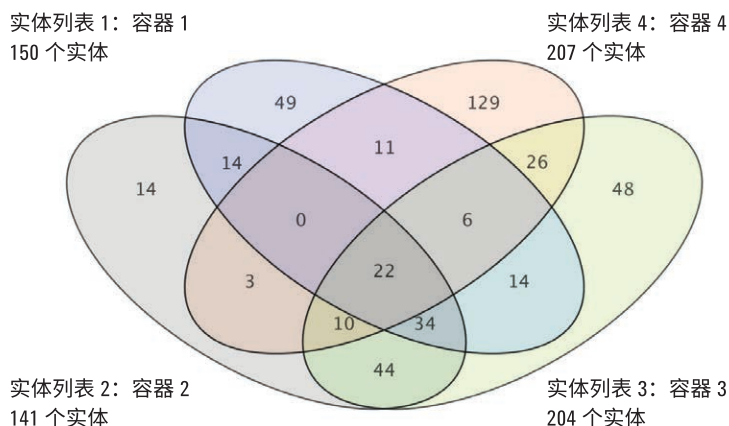


图 3. Agilent Mass Profiler Professional 文氏图显示了四个容器中 EI 鉴定所得化合物的分布情况

表 2. 在容器 2 的萃取物中所鉴定化合物的选择列表（来自图 3 中文氏图的 14 个化合物）和所有样品之间共有的化合物

仅在容器 2 中发现的可萃取物化合物列表

十八烷
1-甲基十一烷基苯
2,6,10,14-四甲基十五烷
3-甲基十七烷
1-乙基十一烷基苯
2-甲基二十烷
1,2-苯二甲酸二(2-甲基丙基)酯
二十一烷
十九烷
十四烷
二十五烷

在所有容器中共有的可萃取物

十五烷
1,1,1,5,5,5-六甲基-3-[(三甲基甲硅烷基)氧基]三硅氧烷
3-甲基十七烷
2,6,10-三甲基十五烷
4,5-二甲基壬烷
11-癸基二十四烷
8-己基十五烷
(E)-己基-3-烯基 (E)-2-甲基丁基-2-烯酸酯
十二烷
3-乙基-3-甲基十九烷
十二甲基环己硅氧烷
2,6,10-三甲基十二烷
3,5-二甲基辛烷
十三烷
5-(1-甲基丙基)壬烷
6-甲基十三烷
2-乙基己基异己基亚硫酸酯
十四甲基环庚硅氧烷
6,6-二乙基十八烷

CI 模式分析

CI 数据采集模式增加了能鉴定出的化合物数量, 这些化合物由于谱库匹配得分较低而未在 EI 数据采集后鉴定出。为了确认低分 EI 结果的存在, 我们使用谱库编辑器软件从 EI 数据分析中得到了低分匹配的谱库。例如, 由于 4-乙氧基苯甲酸乙酯被隐藏在化学噪音中, 因此它的 EI 匹配得分为 67 分 (满分 100 分)。使用 CI 模式确定化

合物, 其中丰度最高的分子离子质量数误差为 0.58 ppm (表 3A) 此外, 可以创建 EI 高分结果的数据库来挖掘 CI 数据以确认 EI 结果。为了鉴定更多的化合物, 我们编写了内部构建的数据库, 其中包含文献中报道的可萃取物。精确质量数信息有助于通过分子式来鉴定化合物。表 3B 显示了使用基于文献的自定义数据库, 通过数据挖掘功能分析 CI 文件所鉴定出的污染

物的列表。精确质量数 CI 数据可用于区分 CI 模式单位分辨率单四极杆数据无法确定的化合物。例如, m/z 为 194.094 和 194.0577 的两个响应已经被鉴定为两种不同的化合物: 分别为 4-乙氧基苯甲酸乙酯和 1,3-苯二甲酸-1,3-二甲酯。对这些具有相同标称 m/z 的化合物的鉴定需要高分辨率的精确质量数据。

表 3. 容器 2 中, 根据低分 EI 结果检索得到的 CI-MS 数据 (A) 和使用内部数据库检测到的更多化合物 (B)。质量数误差是指丰度最高的分子离子

A) 通过低分 EI 数据库所得的可萃取物			B) 通过基于文献的自定义数据库得到的可萃取物		
ID	质量数	质量数误差 (ppm)	ID	质量数	质量数误差 (ppm)
(-)-马兜铃烯	204.1880	1.4	1,2-(1,8-萘二基)苯	202.0784	-0.6
(2S,6R,7S,8E)-(+)-2,7-环氧-4,8-巨链二烯	192.1510	-3.3	1,3-苯二甲酸	166.0266	0.1
(3S,4aR,8aR)-1,1,3,6-四甲基-3-乙烯基-3,4,4a,7,8,8a-六氢-1H-异苯并吡喃	220.1830	3.6	1,3-苯二甲酸-1,3-二甲酯	194.0577	0.9
(4aS,8aS)-8-异戊基-4,4,7,8a-四甲基-1,2,3,4,4a,5,6,8a-八氢萘	262.2660	4.9	1-十七醇-1-乙酸酯	298.2865	2.4
1,1'-双环辛基	222.2350	1.6	1-庚烯	98.1094	1.1
1,2-二甲氧基-4-(金刚烷基-1)苯	272.1780	-2.5	1-辛烯	112.1252	-0.1
1,3-二异丙基萘	212.1570	3.8	1,2,3,4,4a,9,10,10a-八氢-1,4a-二甲基-7-(1-甲基乙基)-1-菲甲酸甲酯	314.2233	4.1
1,3-二甲基-5-正-癸基环己烷	252.2820	2.6	2,5-环己二烯-1,4-二酮	108.0207	3.7
1,4,5,8-四甲基萘	184.1250	0.5	3,5,5-三甲基-2-环己烯-1-酮	138.1043	1.1
10,18-二甲阿松香-5,7,9(10),11,13-五烯	238.1720	1.9	2-甲基-2-环戊烯基-1-酮	96.0572	3.1
13,15-二十八二炔	386.3910	3.2	2-己酮	100.0884	4.6
1,2,3,4,4a,7,8,8a-八氢-1,6-二甲基-4-(1-甲基乙基)-1-萘酚	222.1980	1.5	2-萘酚	144.0569	4.4
1-十九碳烯	266.2970	1.6	2-戊基-2-壬烯醛	210.1978	2.6
1R,2c,3t,4t-四甲基-环己烷	140.1570	3.4	1-乙氧基-2-丙醇	104.0840	-2.6
9-甲基-1-十一碳烯	168.1880	0.8	5-(1,2-二羟基乙基)-3(2H)-咪喃酮	144.0424	-0.9
2,2,3-三乙基环氧乙烷	128.1200	1.6	3-辛酮	128.1198	2.5
2,2'-二甲基联苯	182.1100	3.9	3a,4,7,7a-四氢-4,7-亚甲基-1H-茚	132.0939	-0.2
3,4-二氢-2-甲基-4-氧代-2H-1-苯并吡喃-5-羧酸	206.0580	0.3	4-甲基二苯甲酮	196.0884	1.9
2-甲基-6-亚甲基辛-7-烯-4-酮	152.1200	0.7	4-辛基苯酚; 对-辛基苯酚	206.1675	-1.9
4-乙酰氧基-苯甲酸乙酯	194.0940	-0.6	4-乙酰氧基-苯甲酸乙酯	194.0941	0.9

通过 CI/MS/MS 进行确认

使用精确质量数 CI/MS/MS 确认在 EI 中检测到的是邻苯二甲酸二乙酯的结构。邻苯二甲酸酯通常具有缺失的分子峰，在 m/z 149 处有一个主要碎片离子峰。因此，要准确鉴定邻苯二甲酸酯并不简单。GC/Q-TOF 不仅为分子和碎片离子提供了精确质量数，而且还为 MS/MS 碎片提供了精确质量数，因而有助于生成产物离子的分子式。图 4A 和 4B 显示了邻苯二甲酸二乙酯的 CI 和 CI/MS/MS 分析结果。使用 ACD 软件 (ACD Labs, 多伦多) 解析 CI/MS/MS 谱图 (图 4C)，并鉴定 m/z 223.0937 处母离子的产物离子。此外，我们还观察到邻苯二甲酸酯在 m/z 149.0239 处的特征碎片离子峰 (图 4B)。碎片离子及其精确质量数有助于确认化合物的归属。

表 4. 来自四个不同容器中浓度超过 20 $\mu\text{g/mL}$ 的化合物的 Cramer 分类结果

化合物	容器	Cramer 分类
5,5-二乙基十五烷	4	第 I 类 (低)
十六烷	1,2,3,4	第 I 类 (低)
3-甲基二十八烷	4	第 I 类 (低)
1-十六醇	4	第 I 类 (低)
二十烷	4	第 I 类 (低)
顺式-11-二十碳烯酰胺	4	第 III 类 (高)
2-己基-1-癸烷	4	第 I 类 (低)
3,3,13,13-四乙基十五烷	4	第 I 类 (低)
1-二十六烷醇	4	第 I 类 (低)
2-甲基二十五烷	4	第 I 类 (低)
环十四烷	4	第 I 类 (低)
3,3-二乙基十五烷	4	第 I 类 (低)
2-甲基二十七烷	4	第 I 类 (低)
十一烷基环戊烷	4	第 I 类 (低)
1-十八醇	4	第 I 类 (低)
3-甲基三十烷	4	第 I 类 (低)
5,5-二乙基十七烷	4	第 I 类 (低)
二十八醇	4	第 I 类 (低)
3-甲基二十六烷	4	第 I 类 (低)
3,3-二乙基十七烷	4	第 I 类 (低)
十七烷	1,2,3	第 I 类 (低)
十二烷	1	第 I 类 (低)
十四烷	1	第 I 类 (低)
2,2,4,4-四甲基辛烷	1	第 I 类 (低)
十八烷	3	第 I 类 (低)

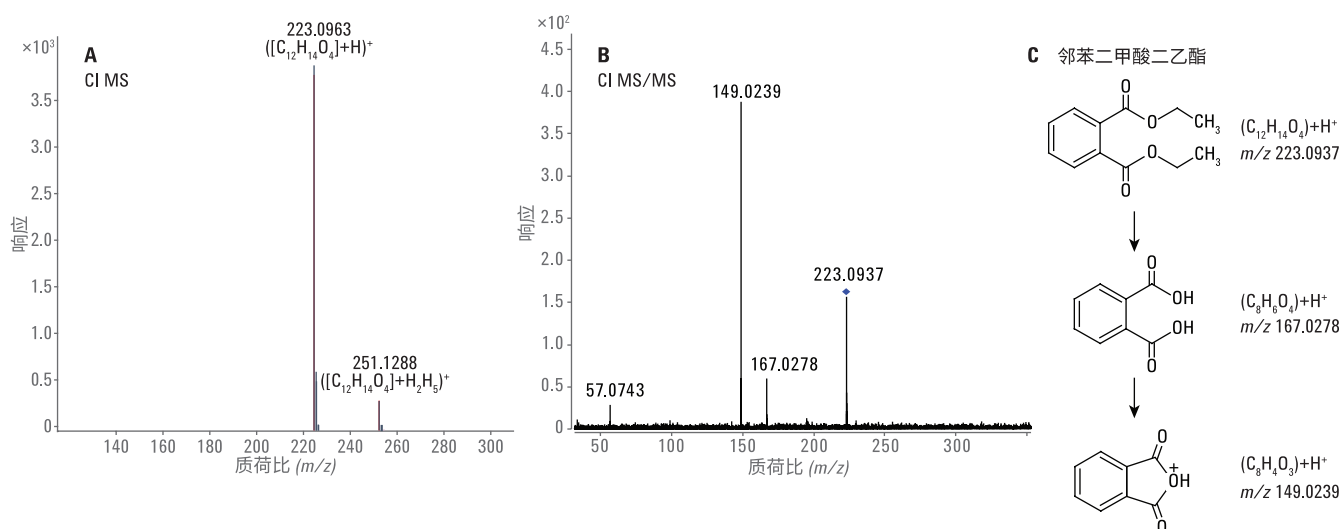


图 4. 邻苯二甲酸二乙酯的结构解析

毒性评估

来自所有容器的化合物均采用 EI 和 CI 模式进行检测，并使用磷酸三苯酯作为内标对其浓度进行半定量测定⁷。在眼部用药容器的评价中，浓度 > 20 µg/mL 的可萃取物则需要进行风险评估。在本研究中，假定容器可用于眼部用药，基于 Cramer 分类方法，对浓度超过 20 µg/mL 的化合物进行分类，以确定其潜在毒性。表 4 列出了分析结果。在容器 4 中发现了一种高风险化合物，此外与其它容器相比，容器 4 含有更多的可萃取物。因此，容器 4 不太适合作制剂包装。

结论

使用 Agilent 7200 GC/Q-TOF 系统进行定性筛查，并从四种不同的容器封闭系统中鉴定可萃取物。通过在 EI 和 CI 模式下采集数据，获得更多的鉴定化合物。Agilent MassHunter Mass Profiler Professional 软件为自动化数据挖掘工作流程提供了一种通用工具。本研究测定了不同样品组中的特有和共有化合物。使用 NIST 14.0 谱库鉴定 EI 谱库数据。谱库匹配得分低的化合物储存在自定义谱库中用于挖掘 CI 数据，这样可使一种样品中鉴定的化合物数

量增加 14%。CI 数据文件还可用于在内部数据库中通过分子式（包含文献中已知的常见可萃取物）进行检索。此外，本研究还进行了 CI/MS/MS 分析，以确认这些化合物的归属。检测到的可萃取物的 Cramer 分类和 MPP 分布图表明，容器 2 的可萃取物最少，并且不存在大量的 Cramer III 类化合物。

参考文献

1. Mire-Sluis, A.; *et al.* Extractables and Leachables. Challenges and Strategies in Biopharmaceutical Development. *BioProcess International* Feb **2011**
2. Guidance for Industry, Container Closure Systems for Packaging Human Drugs and Biologics. U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration: Rockville, MD, May **1999**
3. Jenke, D. Development and Justification of a Risk Evaluation Matrix to Guide Chemical Testing Necessary To Select and Qualify Plastic Components Used in Production Systems for Pharmaceutical Products. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology* **2015**, *69*, 677–712
4. Li, K.; *et al.* Creating a Holistic Extractables and Leachables (E&L) Program for Biotechnology Products. *PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology* **2015**, 69590–619
5. IdeaConsult Ltd. Toxtree (Estimation of Toxic Hazard—A Decision Tree Approach) v.2.6.13. <http://toxtree.sourceforge.net/>
6. Lateef, S. S.; *et al.* Differential Analysis in Screening Assays for an Extractables and Leachables Study Using an Agilent 7200 GC/Q-TOF System Combined with Data Mining Software (可萃取和可浸出化合物筛选分析中的差异分析，将 Agilent 7200 GC/Q-TOF 系统与数据挖掘软件结合使用)，安捷伦科技公司，应用简报，部件号 5991-6688EN，**2016**
7. Jenke, D.; *et al.* Utilization of Internal Standard Response Factors to Estimate the Concentration of Organic Compounds Leached from Pharmaceutical Packaging Systems and Application of Such Estimated Concentrations to Safety Assessment. *Journal of Chromatographic Science* **2012**, 50206–212

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
5991-6901CHCN



Agilent Technologies