

# 应用气相色谱-静电场轨道阱（Orbitrap）质谱联用对制药包装材料中的可浸出杂质的结构确证分析

Dominic Roberts,<sup>1</sup> Andrew Feilden,<sup>2</sup> Richard Barlow,<sup>2</sup> Kyle D' Silva,<sup>1</sup> and Paul Silcock<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Thermo Fisher Scientific, Runcorn, UK

<sup>2</sup>Smithers Rapra, Shawbury, UK

## 关键词

可萃取物和可浸出物、QExactive GC、静电场轨道阱（Orbitrap）

质谱仪、差异分析、未知物鉴定、容器密闭系统、制药。

## 前言

塑料、聚合物及其它制药产品专用包装材料可析出具有潜在毒性的化学杂质，针对此类物质的检测研究不仅是制药行业的关注热点，同时也是对相关分析人员的严峻挑战。通常来说，可萃取物和可浸出物（E/L）研究的主要目的在于对任何可能由包装材料迁移至最终产品、药物中的污染物进行定性确认、定量检测，并尽可能降低其含量。“可萃取物”是指容器密闭系统中可在实验室加速条件下进入溶剂中从而被提取出的化学物质。其中，实验室加速条件包括升温 and 强烈溶剂，而加速目的是在避免材料降解、异变的前提下实现最大提取量。“可浸出物”则被定义为在产品保质期内可由包装迁移至药物产品中的化学物质。

对于产品使用者所产生的潜在与实际影响概括如下：

- 可萃取物 = 可能产生影响
- 可浸出物 = 实际产生影响

两类杂质的检测样本主体：

- 可萃取物 = 容器材料
- 可浸出物 = 最终产品



可萃取物研究主要通过快速鉴定潜在的毒性可浸出物和选择不同的包装材料来降低使用风险。通常对于绝大多数药物剂型来说，任何与药物有效成分（API）存在直接接触的材料都应进行可萃取物和可浸出物分析；在某些情况下，药物二级包装或三级包装（比如标签）同样需要进行相关分析。药物容器密闭系统及生产全过程均可引入可浸出物。此外，药物还可与包装材料发生反应产生可浸出物杂质，此反应可在药品储存过程中持续发生。1 实验人员通过将包装材料暴露于极端溶剂、pH 以及温度条件下，以观察产品在恶劣环境中的变化，从而完成可萃取物对比实验。目前，要对所有化合物进行检测、鉴定是一项相当艰巨的任务，分析人员需要应用各种分析技术来保证物质确证的准确性和全面性。

气相色谱-质谱联用 (GC-MS) 广泛应用于可萃取物研究, 其应用优势主要体现于良好的色谱分辨率、重现性、峰容量以及最重要的一点: 可用于鉴定匹配的丰富商业谱图库。同时, 包装产品中含有大量挥发性、半挥发性组分也是该技术适用于此类分析的主要原因。本次测试应用具备超高分辨率和质量精度质谱系统的新一代 GC-MS 系统, 对包装密闭系统和密封产品所使用的聚合物垫圈 (环型密封圈) 中的化合物进行检测和鉴定。本实验旨在展示针对环型密封圈中的化学成分进行定性分析的完整工作流程。本流程重点在于通过一级高分辨质谱全扫描对样品进行无目标监测, 借助超高分辨率的优势获得化合物的精确质量数。质谱分辨能力对于准确推测化合物元素组成、分析结构、区别共流出物和同量异位素化合物具有重要作用。快速的扫描速度、高灵敏度和宽线性范围则利于对高低丰度化合物进行同时检测。这些仪器特性结合可进行自动解卷积算法和样本比较的独特软件系统, 组成了一个针对复杂化合物结构分析的有力解决平台。

## 实验条件

### 样品与前处理

本次可浸出杂质研究共检测了四种环型密封圈样本; A - 红色密封圈, B - 棕色密封圈, C - 白色密封圈, D - 黑色密封圈。实验人员按照 BioPhorum Operation Group (BPOG) 规范要求求进行加速溶出实验。样本剪成 20 mm 小段, 并分别浸入含 10 mL 100% 乙醇、50% 乙醇、注射用水 (WFI) 以及 5M 氯化钠 (NaCl) 的密封螺纹盖小瓶中, 在 40°C 条件下放置 30 天。使用相同的方法处理用于色谱比较的相应空白溶剂样本。各样本提取物分别取等份体积置于 GC 样品瓶中用于分析。在进入 GC 分析前, 所有液体样本需经二氯甲烷进行液液萃取处理。

## 仪器参数和方法设置

所有实验采用 Thermo Scientific™ Q Exactive™ GC Orbitrap™ GC-MS/MS 系统进行测试。进样步骤采用 Thermo Scientific™ TriPlus™ RSH 自动进样器, 并通过 Thermo Scientific™ TRACE™ 1310 气相色谱仪和 配备 10 m 预柱的 Thermo Scientific™ TraceGOLD™ TG-5SiIMS 色谱柱 (30 m × 0.25 mm I.D. × 0.25 μm, P/N 26096-1425) 实现色谱分离。其它仪器参数见下表。

### 仪器条件

TRACE 1310 GC 参数	
进样体积 (μL):	1
衬管:	Single gooseneck
进样口温度 (°C):	280
载气, 流速 (mL/min):	氦气, 1.2
柱温箱升温程序	
温度 1 (°C):	40
保持时间 (min):	1
温度 2 (°C):	320
升温速率 (°C/min):	15
保持时间 (min):	10
Q Exactive GC 质谱参数	
传输线温度 (°C):	280
离子化类型:	EI/PCI
离子源温度 (°C):	230
电离能量 (eV):	70
数据采集模式:	一级全扫描
质量范围 (Da):	50-650
分辨率 (FWHM):	60,000 @ $m/z$ 200
Lockmass, 柱流失 ( $m/z$ ):	207.03235

Q Exactive GC系统采用 EI 一级全扫描模式, 质量分辨率设定为 60,000 (FWHM,  $m/z$  200)。此外, 还采用甲烷作为反应气体进行正化学电离 (PCI) 分析, 以获取鉴定未知组分所需要的分子离子信息。

### 数据处理

应用 Thermo Scientific™ TraceFinder™ 软件进行数据采集。该软件包为单平台控制, 可实现仪器控制, 仪器方法建立、优化, 并以定性、定量分析为导向进行数据处理的整体工作流程。TraceFinder 软件还同时具备对高分辨质谱图进行解卷积和谱图比对的功能。

## 结果与讨论

本次测试的主要目的是采用无目标、一级质谱全扫描数据采集模式分析环型密封圈中的溶剂可浸出物。通过与对照样本（空白乙醇）进行两两比较，从而找出环型密封圈提取物中特有的色谱峰并进行鉴定分析。此外，实验人员期望能够利用样本化合物的精确质量数和谱图匹配信息对化合物实现快速鉴定。为了完成上述目标，我们设计并实施了一个完整的工作流程。本工作流程细节概括详见图 1。

## 分离独特化学组分

对所有样本进行一级质谱全扫描分析，总离子流色谱图（TICs）见图 2。Q Exactive GC 系统可在宽动态范围内完成精确质荷比检测，这样无论化合物浓度高低，均可在不牺牲质量精度的前提下被无差别检测到。这项能力可有力提高鉴定复杂样品中未知化合物的确信度。数据分析的第一步是通过与空白样本比较，找出各样本中独特的或者含量有显著提高的色谱峰。虽然可由 TICs 中看到各个色谱峰，但为了全面表征测试样品中的化合物、不遗漏任何潜在的毒性化合物，我们仍有必要对数据中的所有色谱峰进行提取分析。

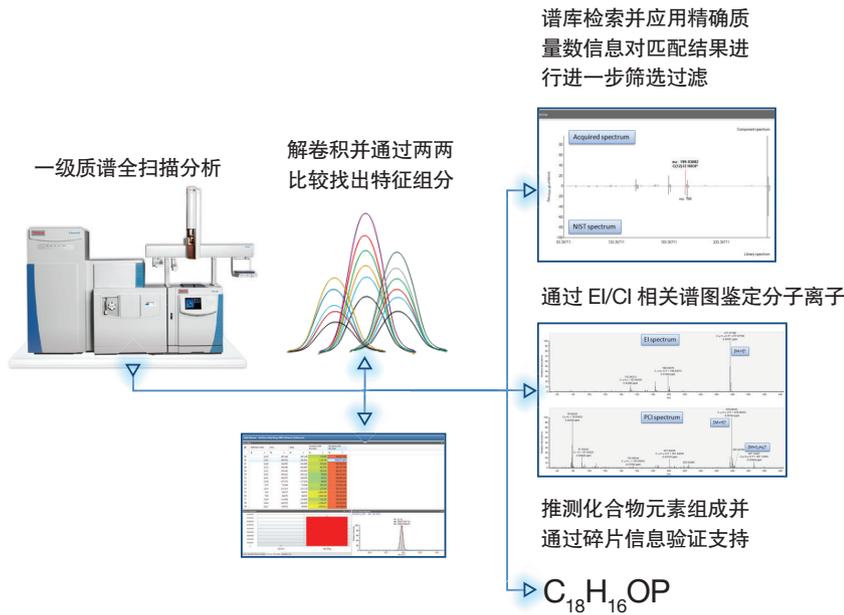


图 1. Q Exactive GC 系统对未知色谱峰进行化学表征和鉴定的工作流程。

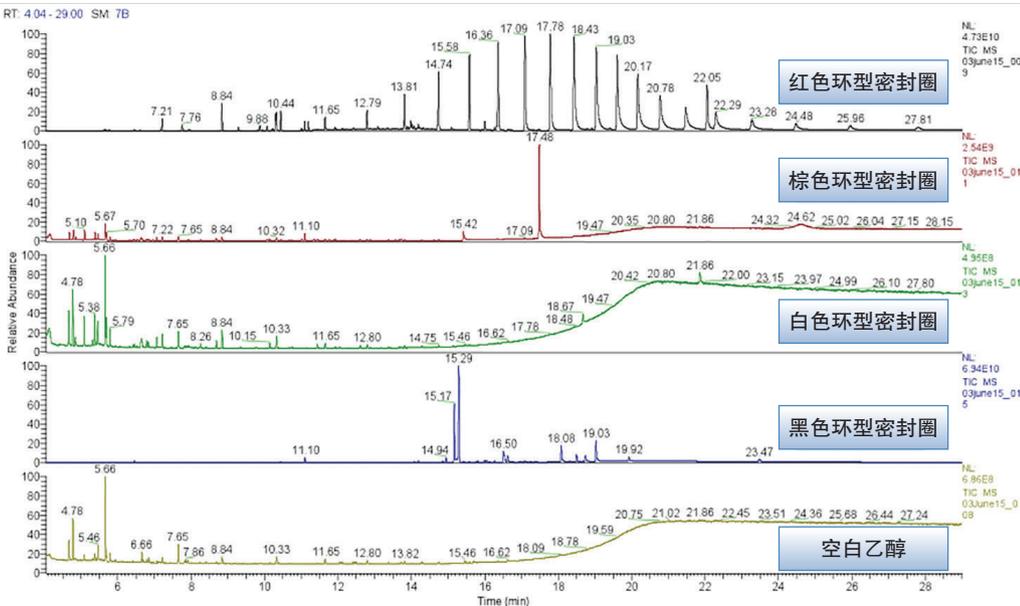


图 2. 四种环型密封圈及空白溶剂（对照样本）的 100% 乙醇浸出物的 GC-MS 总离子流色谱图。

应用 TraceFinder 软件进行测试样本和空白样本间的两两比较完成数据表征。软件首先进行精确质量数解卷积分析，找出所有信噪比高于 30:1 的离子峰，并尽可能清除相同保留时间的质谱图中的杂峰，使化合物离子峰最大化以进行标准谱库匹配。图 3 以辛酸乙酯为例，展示其解卷积峰以及整个色谱峰中的扫描点、各基峰的精确质量偏差 ( $m/z$  129.0910)。将提取出的峰列表与空白样本比较，分类出测试样品中特有的峰组分。TraceFinder 软件还可通过热图的形式快速发现测试样品中含量升高的组分 (图 4)。例如，保留时间为 17.49 min、基峰为  $m/z$  277.07800 的色谱峰在棕色环型密封圈中含量显著升高。

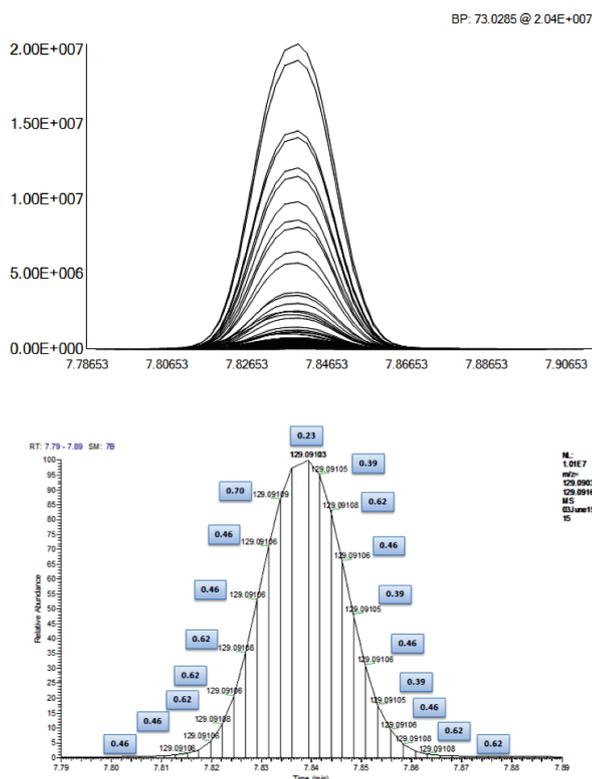


图 3. 黑色环型密封圈 (D) 提取物样品中被鉴定为辛酸乙酯的解卷积峰簇 (上图)。同样样品中辛酸乙酯的提取离子流色谱图 (下图)，提取离子为  $m/z$  129.0910 (质量窗口  $\pm 5$  ppm)，一个离子流色谱峰中含有 18 个扫描点。图中展示了每个扫描点出众的精确质量稳定性 (质量偏差单位为 ppm)。



图 4. TraceFinder 中未知物筛查界面，其中展示了部分棕色环型密封圈样品 (B) 与空白样品 (对照) 比较的峰列表。热图 (窗口上半部分) 区别展示测试样品中含量显著提高的峰。分组平均化窗口 (窗口下半部分右侧) 展示了两个样品中保留时间为 17.49 min、基峰为  $m/z$  277.078 的提取离子流色谱峰。

### 通过谱库匹配鉴定化合物

找出特异性的色谱峰之后，我们需要对该化合物进行鉴定。应用 TraceFinder 软件可自动完成鉴定步骤 (图 5)。首先，将化合物的解卷积质谱图在现有的商业标准谱图库 (例如，NIST 2014) 中进行检索匹配，所有检索结果将结合检索正相关 (SI) 得分和高分辨率过滤 (HRF) 值进行综合评分排序。其中，HRF 值代表了质谱图中碎片峰的精确质荷比与标准谱库中相应碎片元素组成相符的百分比。

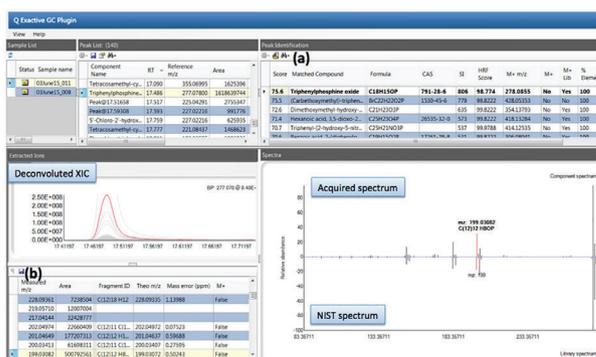


图 5. 保留时间为 17.49 min 的色谱峰被鉴定为三苯基氧化膦。本图为 TraceFinder 软件中解卷积数据与谱库匹配的界面截屏。(a) 按照评分 (SI 与 HRF 综合) 排序的谱库匹配结果。(b) 质谱图中的碎片离子列表以及相应的最佳元素组成结果。

结合精确质量数匹配结果以及对谱图中碎片离子元素组成的解释分析可实现对未知化合物的快速结构确证。对于保留时间为 17.49 min 的离子流峰来说, 谱库匹配度最高的结果为三苯基氧化膦, 谱图中离子精确质量数的相符比例达 98.8%。碎片离子的精确质量数与标准谱图中相应碎片的元素组成质量偏差小于 1 ppm, 这样极大地提高了鉴定结果确信度。样品谱图中的基峰  $m/z$  277.07790 对应标准谱图中的  $[M-H]^+$  离子, 由其元素组成  $C_{18}H_{14}OP$  计算该离子的精确质量数为  $m/z$  277.07768, 与实测谱图偏差为 0.8 ppm。如果仅通过传统的检索索引来对检索结果进行分类排序, 可检索出许多均有同样良好匹配度的化合物结果 (>700)。而由于离子精确质量数与实测谱图不符, 这些结果在本次分析中被自动过滤。

此外, 我们还可通过评价相应的 PCI 谱图, 进一步确证三苯基氧化膦的结构鉴定准确性 (图 6)。在 PCI 数据中可寻找常见的加合离子如  $[M+H]^+$  或  $[M+C_2H_5]^+$  来推测母离子的元素组成, 从而评价相应的精确质量数偏差是否在理想偏差之内 (<1 ppm)。在三苯基氧化膦的 PCI 谱图中, 我们分别找到了具备超高质量准确度的相关加合离子  $[M+H]^+$  (质量偏差 0 ppm)、 $[M+C_2H_5]^+$  (0.2 ppm) 和  $[M+C_3H_5]^+$  (0.4 ppm)。

### 鉴定无谱库匹配结果的化合物结构

在 EI 谱图无法在标准谱库中检索出确定结果的情况下, 我们可以通过 PCI 谱图中的精确质量数信息推测母离子的元素组成。良好的质量精度可有效减少元素组成推测结果数量, 这对于提高化合物的结构鉴定准确性尤为必要。在黑色环型密封圈样品中有一个保留时间为 15.17 min 的离子流峰并未在 NIST 谱库中检索到理想的匹配结果。所有的相关检索结果均因精确质量数数据不符而被排除。通过 PCI 数据中的加合离子信息推测准分子离子 (图 7)。该图谱显示离子  $m/z$  325.14344 为  $[M+H]^+$  (0 ppm),  $m/z$  353.17483 为  $[M+C_2H_5]^+$  (0.3 ppm)。以上离子表明 EI 谱图中的  $m/z$  324.13541 应为分子离子峰。通过分子离子可推测出母离子的元素组成。这一步分析是化合物结构鉴定的关键步骤。此时, 良好的质量精度可减少可能的元素组成数量。例如, 若设置质量精度容许窗口为 10 ppm, 在碳原子 (1-30)、氢原子 (1-60)、氮原子 (1-5)、氧原子 (1-5)、磷原子 (1-5) 及硫原子 (1-2) 的范围内有 16 种可能的元素组成。相较之下, 若将质量精度容许窗口设为 1 ppm, 则只有一个可能的元素组成:  $C_{20}H_{20}O_4$ 。只有将质量精度控制在较小的范围内, 才能够有效减少需要进一步检查的元

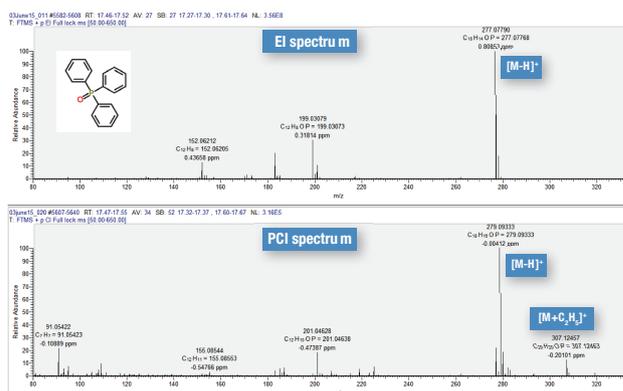
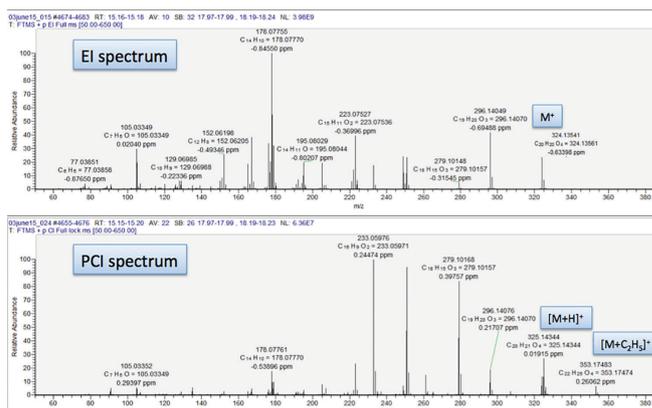


图 6. 棕色环型密封圈样品中保留时间为 17.86 min 的三苯基氧化膦 ( $C_{18}H_{15}OP$ ) 的 EI 和 PCI 图谱。由 PCI 数据鉴定出的准分子离子质量偏差为亚 ppm 级。



素组成数量, 提高分析结果可信度。上述元素组成推测结果在 PCI 谱图中的  $[M+H]^+$  和  $[M+C_2H_5]^+$  加合离子的精确质量数信息得到印证。除了这个保留时间为 15.17 min 的离子流峰外, 在保留时间为 15.29 min 的离子流峰有着特征相似的 EI 和 PCI 谱图, 推测为相同化合物的同分异构体。

原文的元素组成设定范围写错了, 应为“碳原子 (1-30)、氢原子 (1-60)、氮原子 (0-5)、氧原子 (0-5)、磷原子 (0-5) 及硫原子 (0-2)”。

图 7. 黑色环型密封圈样品 (D) 中保留时间为 15.17 min 的未知化合物的 EI 和 PCI 图谱。由 PCI 图谱中的准分子离子峰及相关加合离子推测其元素组成为  $C_{20}H_{20}O_4$ 。

确证化合物元素组成和结构信息的最后一步需要参考碎片离子的精确质量数。为了完成这一步骤，我们可以直接分析 EI 谱图中的碎片离子或者单独采集相应的 MS/MS 数据以确认碎片离子来源于该母离子。通过四级杆分离出离子  $m/z$  325.14，将其引入 HCD 碰撞池内分解碎裂。图 8 为  $m/z$  325.14 的 MS/MS 图谱。所有碎片离子的精确质量数在推测母离子元素容许范围内偏差均小于 1 ppm。这样，即使我们没有办法对该化合物进行准确鉴定，仍然可以提取到有关该化合物结构的准确细节信息。

所有四种环型密封圈样本均经由相同的解析流程进行分析。结果总结见表 1。我们分析了每个样本中含量最高的组分。鉴定结果均基于标准谱库匹配以及 EI 和 PCI 谱图中分子离子或加合离子的精确质量数推测得出。黑色和棕色的环型密封圈的乙醇提取物中化合物含量最高，白色环型密封圈则含量最低。从 TIC 中可明显看出，红色环型密封圈样品被环硅氧烷类化合物污染。污染物未列于最终结果列表中。

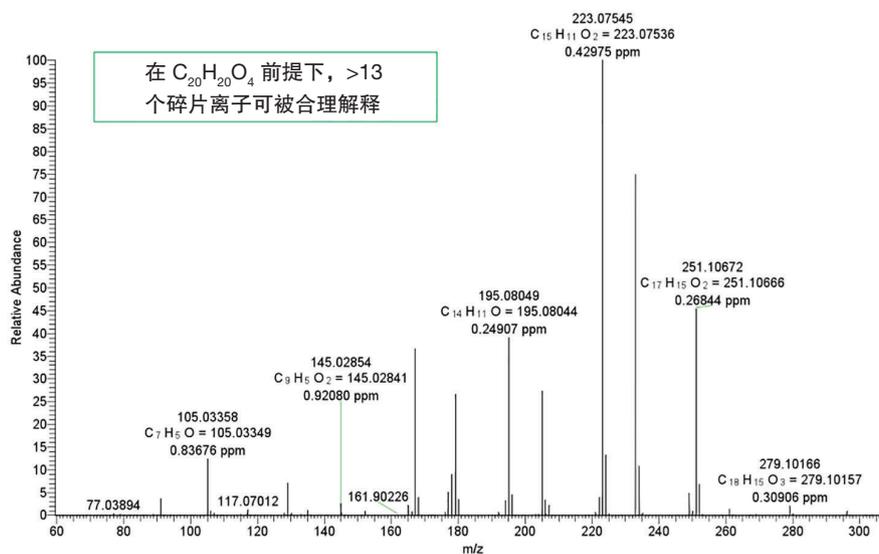


图 8.  $m/z$  325.14 的 MS/MS 图谱，其中列出了所有可与推测母离子化学式相印证的碎片离子及其元素组成。

表 1. 四种环型密封圈样品中主要组分及其推测鉴定结果。基峰和分子离子的超低质量偏差增加了推测结果的可信度。

样品	RT (min)	基峰 (m/z)	检索索引	化合物名称	化学式	基峰质量偏差 (ppm)	分子离子峰质量偏差 (ppm)
黑色环型密封圈	15.17	178.07754	无匹配	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	0.88	0.66
	15.29	178.07754	无匹配	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>4</sub>	0.11	0.22
	18.08	171.13806	673	双四甘醇 / 2-己酸乙酯 ( Tetraethylene glycol bis / 2-ethylhexanoate )	C <sub>24</sub> H <sub>46</sub> O <sub>7</sub>	0.64	-
	23.47	219.17435	777	抗氧化剂 1076 ( Irganox 1076 )	C <sub>35</sub> H <sub>62</sub> O <sub>3</sub>	0.03	1.02
	14.94	280.10939	536	乙基 1-羟基-2,3-双苯环丙基-2-烯-1-羧酸 ( ethyl 1-hydroxy-2,3-diphenylcycloprop-2-ene-1-carboxylate )	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	0.39	0.39
	16.50	126.09145	652	9-十八碳烯酰胺 ( 9-Octadecenamide )	C <sub>18</sub> H <sub>35</sub> NO	0.87	0.63
棕色环型密封圈	17.48	277.07790	806	三苯基氧化膦 ( Triphenylphosphine oxide )	C <sub>18</sub> H <sub>15</sub> OP	0.85	0.06
	15.42	183.03595	831	三苯基膦 ( Triphenylphosphine )	C <sub>18</sub> H <sub>15</sub> P	0.68	0.91
	11.10	219.1743	796	4-叔丁基-2,6-二异丙基 苯酚 ( 4-tert-butyl-2,6-diisopropylphenol )	C <sub>16</sub> H <sub>26</sub> O	0.18	0.21
	11.35	149.02341	831	邻苯二甲酸二乙酯 ( Diethyl phthalate )	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	0.60	0.9
	13.57	185.04198	813	苯硫醚 ( Diphenyl sulfide )	C <sub>12</sub> H <sub>10</sub> S	0.21	0.05
白色环型密封圈	11.93	263.20074	711	1,4-双氢苯乙酸, 3,5-双-叔丁基, 乙酯 ( 1,4 Dihydrophenacetic acid, 3,5-di-tbutyl, ethyl ester )	C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	0.72	0.43
	7.65	101.02344	781	丁二酸二乙酯 ( Butanedioic acid, diethyl ester )	C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	0.54	-
红色环型密封圈	10.44	163.07549	775	1-[4-(2-羟基异丙酯)苯]乙酮 ( Ethanone, 1-[4-(1-hydroxy-1-methylethyl)phenyl ] )	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	0.85	0.38
	15.09	87.044	740	硬脂酸甲酯 ( Methyl stearate )	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	1.26	0.06
	16.00	155.07025	690	双(2-丁氧基乙酯)己二酸 ( di(butoxyethyl)adipate )	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>6</sub>	0.13	1.02

## 结论

本次测试结果表明 Q Exactive GC 组合型四极杆-静电场轨道阱质谱仪与 TraceFinder 软件联合应用, 可对快速表征复杂样品并完成未知组分结构鉴定。静电场轨道阱质谱可提供一个样品中所有组分的偏差极小的质量信息, 因此无论组分含量高低, 我们均可参考相关信息对其进行快速、可信的定性分析。

- 稳定、耐用的色谱分离配合快速的数据扫描速度使得 Q Exactive GC 系统成为表征复杂样品化学组成的理想平台。
- 亚 ppm 级质量偏差以及出色的灵敏度使可靠鉴定样品中所有化学组分成为可能。常规测试采用的质量分辨率为 60,000 FWHM, 结合宽动态范围特点, 可有效消除同质异位素干扰, 提高复杂基质中化合物鉴定的可信度。
- TraceFinder 软件对环型密封圈样品进行可快速、深入的表征, 并对单个组分实现分离以及可靠鉴定。
- EI 和 PCI 数据相结合并与商业标准谱图库比较从而推测化合物结构。若标准谱库中没有匹配结果, 可通过具备超高质量精度的精确质量数信息可信地推测化合物的元素组成。在精确质量数的基础上, 推测鉴定结果可迅速被确认或排除。

## 参考文献

1. Norwood, D.L. Understanding the challenges of extractables and leachables for the pharmaceutical industry—safety and regulatory environment for pharmaceuticals. *Am. Pharm. Rev.*, 2007, 10(2), 32–39.
2. Ding, W.; Madsen, G.; Mahajan, E; O' Connor, S; Wong, K. Standardized Extractables Testing Protocol for Single-Use Systems in Biomanufacturing. *Pharmaceutical Engineering*, 2014, 34(6).



Orbitrap 组  
学俱乐部



赛默飞小分子质  
谱应用技术群

赛默飞世尔科技(中国)有限公司

[www.thermofisher.com](http://www.thermofisher.com)

**全国服务热线: 800 810 5118**  
**400 650 5118 (支持手机用户)**

Application Note 10488\_201603Y

**Thermo**  
SCIENTIFIC

A Thermo Fisher Scientific Brand