

## 使用液相色谱和高分辨率质谱结合数据非依赖型信息学策略筛查喷鼻剂中的萃取物和可浸出物

---

Rachel Sanig, Cristian Cojocariu, Jayne Kirk

Waters Corporation

---

### 摘要

由于医疗器械、制药容器密封系统和生产组件中可能迁移出有害化学物质，因此通过筛查研究检测和鉴别潜在的萃取物和可浸出物(E&L)至关重要。

为确保鼻用药物产品等医疗器械符合安全限值，监管机构已经出台了相关法规和标准，但要开展这些研究来满足法规要求，并非易事。举个例子，只有灵敏度非常高的分析仪器才能检测到低浓度化学物质，满足预期的筛查阈值。此外，设法在同一分析平台上筛查E&L化合物并解析未知物也很重要。

本文介绍了使用超高效液相色谱和四极杆飞行时间高分辨率质谱仪(UHPLC-QToF HRMS)筛查E&L的实验。该实验使用数据非依赖型采集(DIA)策略，采用同一套信息学工作流程解决方案完成了筛查和解析。

### 优势

- ACQUITY™ Premier系统特别采用了MaxPeak™高性能表面(HPS)技术，可改善分析物的分离和检测，尽可能降低漏检分析物的风险
  - waters\_connect™平台上的UNIFI™应用程序提供自定义工作流程，可简化复杂数据集的筛查和结构表征工作
  - Xevo™ G3 QToF采用了新型离子光学元件和检测系统，可大幅提升传输效率，让您对复杂基质中E&L组分的鉴
-

定信心十足

- 数据非依赖型采集MS<sup>E</sup>可在比对谱库进行筛查时提高鉴定结果的可信度，并提供附加信息来协助结构表征

---

## 简介

医疗器械、制药容器密封系统和生产组件含有各种化学物质，包括聚合物和聚合物添加剂（例如抗氧化剂、滑爽剂、着色剂）以及其他化合物。这些化学物质、其杂质和降解产物可能会从材料中迁移出来，成为可带来安全风险的物质。因此，为了保障消费者安全，筛查和鉴定潜在的萃取物和可浸出物(E&L)至关重要。

为了确保鼻用药物产品等医疗器械的安全限值符合要求，监管部门相应地制定了法规、标准和指南。例如，USP（美国药典）第<1663>和<1664>章提出了这类分析的框架，PQRI（美国产品质量研究所）则针对经口吸入制剂和鼻用药物给出了详细的建议<sup>1,2,3</sup>。

为了满足法规要求而开展相关研究时，会遇到许多挑战。关键挑战之一来自开展这些研究要用到的分析仪器，因为只有高灵敏度的仪器才能检出低含量组分，进而满足预期的筛查阈值。此外，设法在同一分析平台上筛查E&L化合物、解析未知物和定量组分浓度也很重要。

为解决这些挑战，本研究介绍了一种使用液相色谱和台式高分辨率四极杆飞行时间质谱仪Xevo G3 QTof（图1）筛查E&L的实验方法。该方法使用数据非依赖型采集(DIA)策略，采用同一套筛查软件工作流程解决方案完成了筛查和解析。Xevo G3 QTof可以在MS<sup>E</sup>模式下采集数据，同时采集低碰撞能量和高碰撞能量谱图。借助该技术，可以获得母离子和碎片离子的准确质量数信息并据此进行结构表征，最终辅助化合物鉴定。

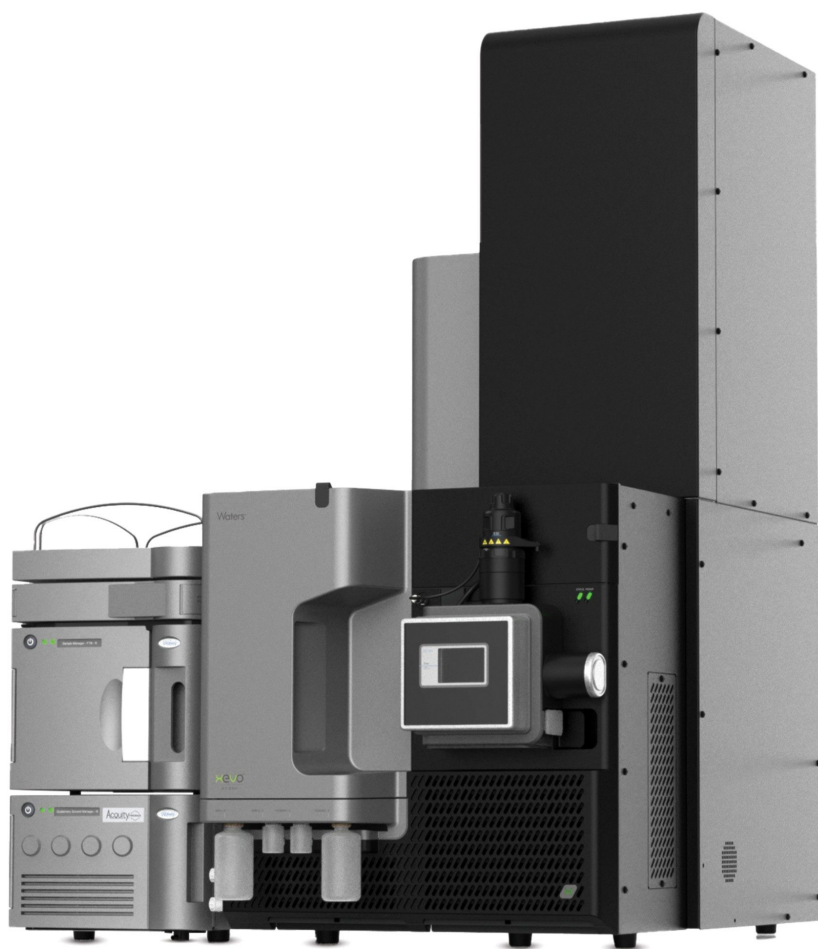


图1. 配备Xevo G3 QToF质谱仪的ACQUITY Premier系统

## 实验

### 样品制备

本实验购买了三款市售喷鼻剂。移出纯溶液（可浸出物）进行分析。接下来，使用异丙醇在40 °C下萃取鼻喷剂容器密闭系统和空白对照72 h（萃取物）。向程序空白、纯样品和萃取样品中加入内标（氰氟虫脞，Merck，德国），并在仪器上重复进样三次。此外，在样品序列采集开始和结束时进样E&L系统适应性测试混标(SST) (P/N: [186008063](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186008063-186008063) <[https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186008063-](https://www.waters.com/nextgen/global/shop/standards--reagents/186008063-186008063)

[extractables--leachables-screening-standard.html](#)> ) 。

## 液相色谱条件

液相色谱系统:	ACQUITY Premier系统
色谱柱:	ACQUITY CORTECS™ C <sub>18</sub> , 90 Å (1.6 μm, 2.1 mm x 100 mm)
柱温:	50 °C
样品温度:	4 °C
进样体积:	1 μL
流速:	0.3 mL/min
流动相A:	水+ 1 mM醋酸铵+ 0.1%甲酸
流动相B:	甲醇

## 梯度表

时间 (min)	%A	%B	曲线
0.0	98	2	初始
0.5	98	2	6
6.0	1	99	6
13.0	1	99	6
13.1	98	2	6
15.0	98	2	6

## 质谱条件

MS系统:	Xevo G3 QTof
参比质量数:	亮氨酸脑啡肽[M+H] <sup>+</sup> , <i>m/z</i> 556.2771; [M-H] <sup>-</sup> , <i>m/z</i> 554.2615
离子源温度:	120 °C
脱溶剂气温度:	600 °C
脱溶剂气流速:	800 L/h
锥孔气流速:	50 L/h
电离模式:	ESI <sup>+</sup> , ESI <sup>-</sup>
采集模式:	MS <sup>E</sup>
采集范围:	<i>m/z</i> 50~1200
采集时间:	0.2 s
毛细管电压:	1 kV
锥孔电压:	40 V
碰撞能量:	ESI <sup>+</sup> 低能量: 6 eV ESI <sup>+</sup> 高能量梯度: 20~40 eV ESI <sup>-</sup> 低能量: 6 eV ESI <sup>-</sup> 高能量梯度: 30~70 eV

## 数据管理

使用waters\_connect平台上的UNIFI应用程序（3.1.0.16版）采集和处理数据。

## 结果与讨论

由于可以使用E&L专用工作流程处理数据（图2A），我们可以使用waters\_connect平台上的UNIFI应用程序进行全面的萃取物分析。此工作流程可根据用户需求进行自定义设置，有助于简化复杂数据集的分析。

### 系统适应性审查

工作流程的第一步是查看E&L SST混标测定结果，将其用作系统基准指标（图2）。E&L SST中含有分子量、极性各不相同的一系列常见聚合物添加剂，这些添加剂在正性离子或负离子模式下电离。

质谱仪的离子光学元件和检测系统做了改进，传输效率大幅提高，实验证明该仪器具有高灵敏度和高重现性，如SST混标分析结果所示（保留时间的RSD为0.01%，图2C）。相较于之前的产品，该仪器灵敏度更高，有助于应对E&L研究中鉴定痕量分析物的挑战。所有检出化合物的质量精度均<3 ppm（图2B）。一致的高质量精度有助于谱库匹配和元素组成计算，为全面表征提供支持。

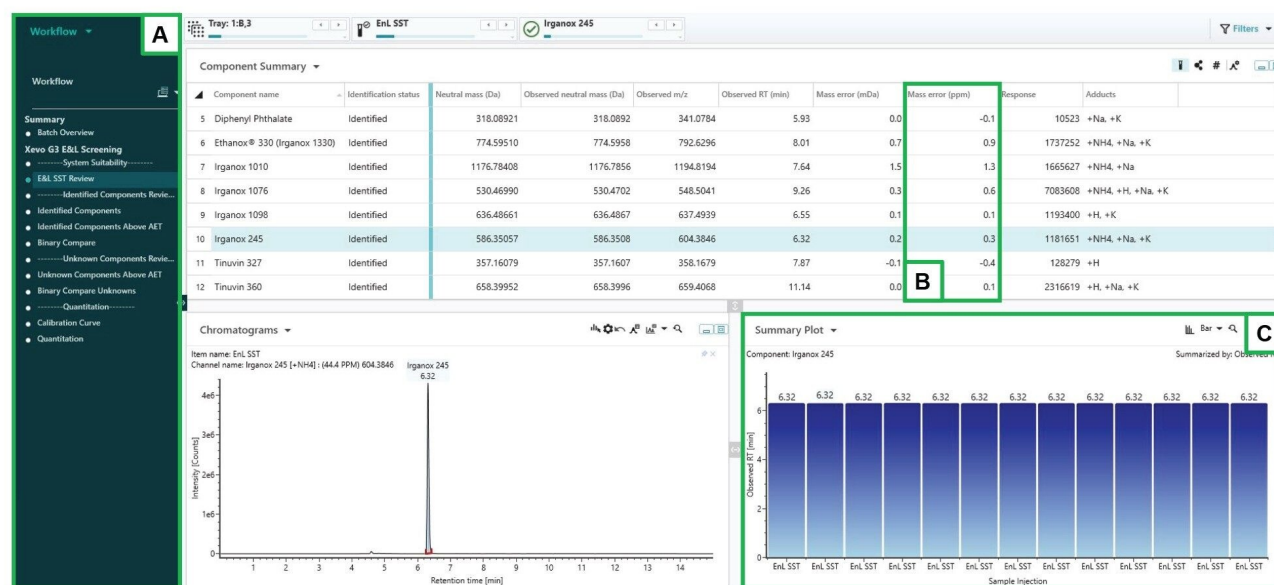


图2.便于进行数据解析的SST结果界面。此处显示了实验结果的组分汇总表（按分析物列出）、Irganox 245的提取离子流色谱图，以及所有进样中该分析物的测定结果的汇总图。[A]可定制的UNIFI工作流程示例。[B]每种分析物的质量精度。[C]每一次SST混标进样得到的Irganox 245保留时间。

由于Xevo G3 QToF在MS<sup>F</sup>模式下运行<sup>4</sup>，高低碰撞能量会交替出现，因此在整个色谱实验中都能同时采集母离子和

碎片离子的准确质量数信息 (图3) <sup>4</sup>。比对谱库鉴定化合物时, 纳入MS/MS谱图可以提高结果可信度。



图3.癸二酸二丁酯的 $MS^E$ 数据示例。[A]母离子 ( $C_{18}H_{34}O_4$ , 精确质量数315.2535, 质量精度:  $-1.0\text{ ppm}$ ) 的低能量谱图。[B]碎片离子的高能量谱图。[C]高能量谱图中的符号表示根据碎片离子和与之相关的质量精度可以指派一个鉴定结果。图中突出显示了电荷保留碎片。

## 比对E&L谱库进行筛查

验证SST混标后, 我们又研究了样品, 具体做法是比对E&L谱库进行筛查, 寻找准确质量数、保留时间和质量数碎片的匹配结果<sup>5</sup>。如果谱库或数据库中的每个化合物条目都提供这些参数, 出现假阳性结果的可能性就会降低, 任何鉴定结果的可信度也会随之提高。使用UNIFI应用程序, 可以将分析评估阈值(AET)水平纳入分析中, 任何低于AET的化合物都可以被筛除, 从而简化数据解析。AET是一个浓度, 低于该浓度则无需对化合物进行鉴定和定量<sup>6</sup>。

下文显示了被鉴定为2,4-二乙基硫杂蒽酮的化合物, 其保留时间为6.91 min (图4), 还显示了准确质量数测定值 (质量精度:  $-0.7\text{ ppm}$ ) 的谱库匹配结果、保留时间以及碎片离子。使用UNIFI趋势图可以看到, 该化合物存在于萃取鼻喷剂样品的特征图中, 但不存在于程序空白样品中 (图4)。



图4. 2,4-二乙基硫杂蒽酮的提取离子流色谱图以及该化合物在各样品中的响应。NC为阴性对照（萃取空白样），E48、E49和E50为萃取喷鼻剂样品的三次重复进样。

## 未知物鉴定

任何高于AET但通过比对数据库筛查无法识别的峰都需要进行解析。UNIFI应用程序的比较功能和结构表征工具包均可用于查找和表征未知组分。Binary Compare（二元比较）工具可比较样品与萃取空白样，寻找样品中特有的组分或样品中相较于空白样含量升高的组分（图5）。

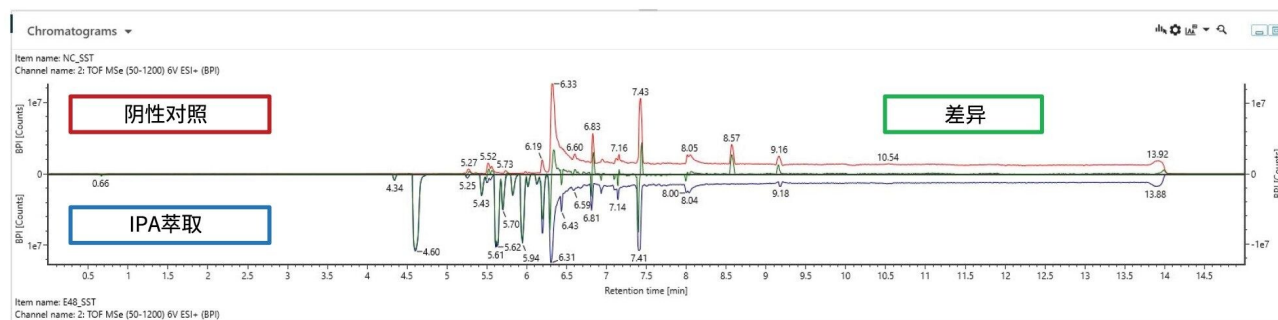


图5.基峰强度色谱图的差异图。红色迹线为阴性对照，蓝色迹线为样品E48，绿色迹线表示差异。

通过二元比较筛查出高于AET的未知物后，可以使用UNIFI应用程序中的Discovery Tool（发现工具）进一步研究<sup>7</sup>。由于数据是在MS<sup>E</sup>模式下采集的，母离子和碎片离子的准确质量数均可用于解析每种未知物。使用结构表征工具包，样品中特有的一种化合物（ $m/z$  368.4253处）被初步鉴定为清洁剂（图6）。



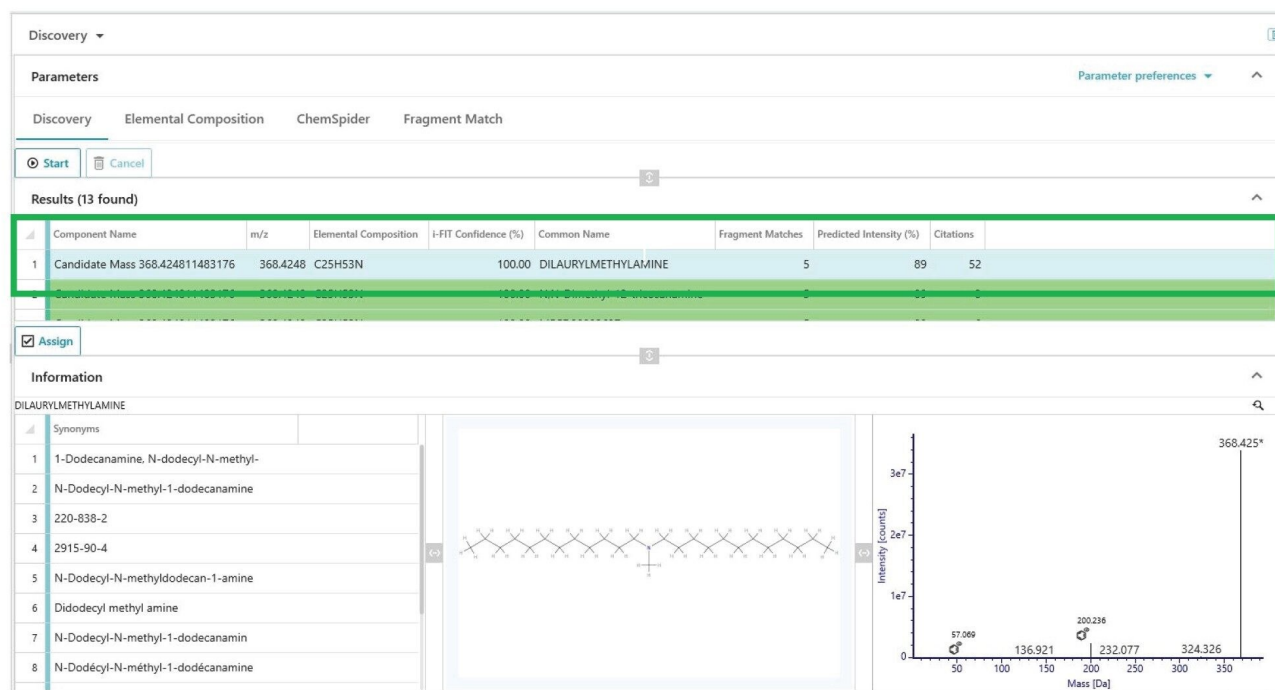


图6.使用UNIFI结构表征工具包，可以根据 $MS^F$ 模式下采集到的准确质量数和碎片离子数据初步鉴定样品中识别出的未知峰。软件将质子化 $m/z$  368.4248的未知物鉴定为清洁剂（质量精度-0.8 ppm）。结果中包含软件预测的这种标志物的元素组成、*i-FIT*置信度（使用同位素分布算法给每个化学式打分）、化合物常用名、碎片离子匹配数以及引用数，还显示了这种化合物的别名、结构和高能谱图。

## 定量分析

在E&L筛查分析中增加定量步骤非常重要。使用一种或多种内标，可将响应因子纳入UNIFI应用程序，用于萃取物数据的半定量分析。响应因子和相对响应因子可用于估算浓度<sup>8</sup>。例如，将E&L SST混标加入萃取样品和萃取空白样，指定Ethanox 330 (Irganox 1330)作为内标，根据它来计算相对响应因子。萃取空白样和萃取样品中癸二酸二丁酯的计算浓度如下表所示（预期浓度为10 ng/mL）（图7）。

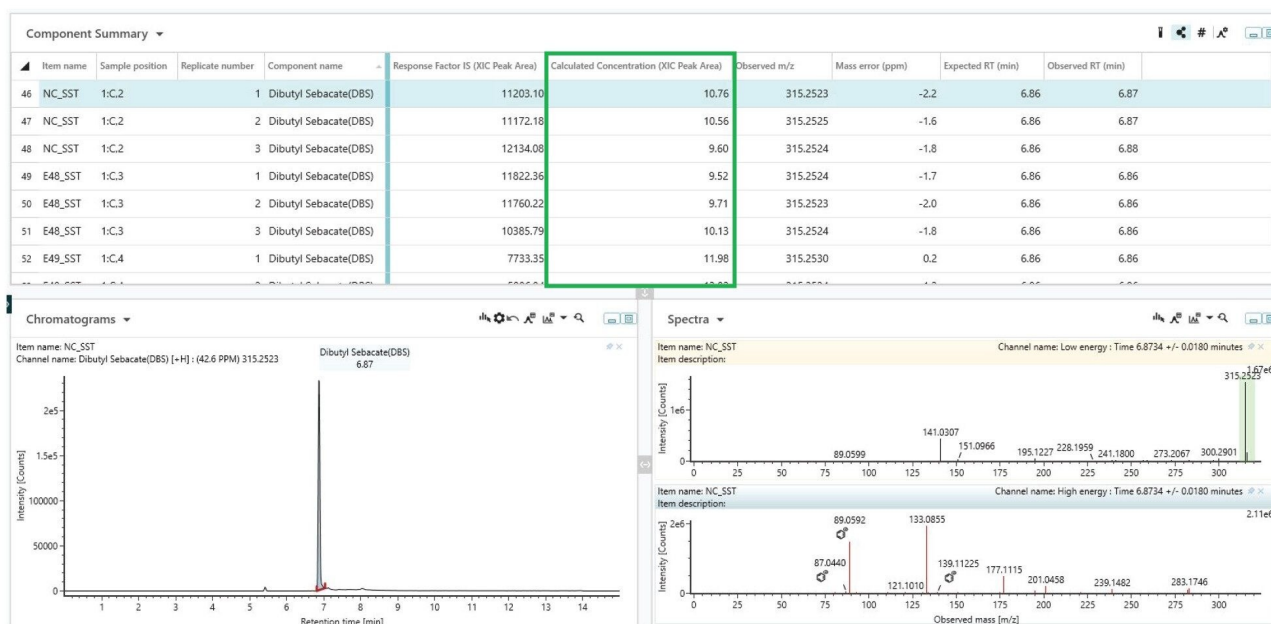


图7.使用响应因子计算出的癸二酸二丁酯浓度

在E&L工作流程中增加定量步骤的另一种方法是使用标准曲线。为评估该平台定量可浸出物和萃取物的性能，我们从喷雾剂装置中移出了纯溶液，并加入100 ng/mL的氟氟虫脲内标，使用5~1000 ng/mL范围内的标准品绘制了标准曲线（图8）。

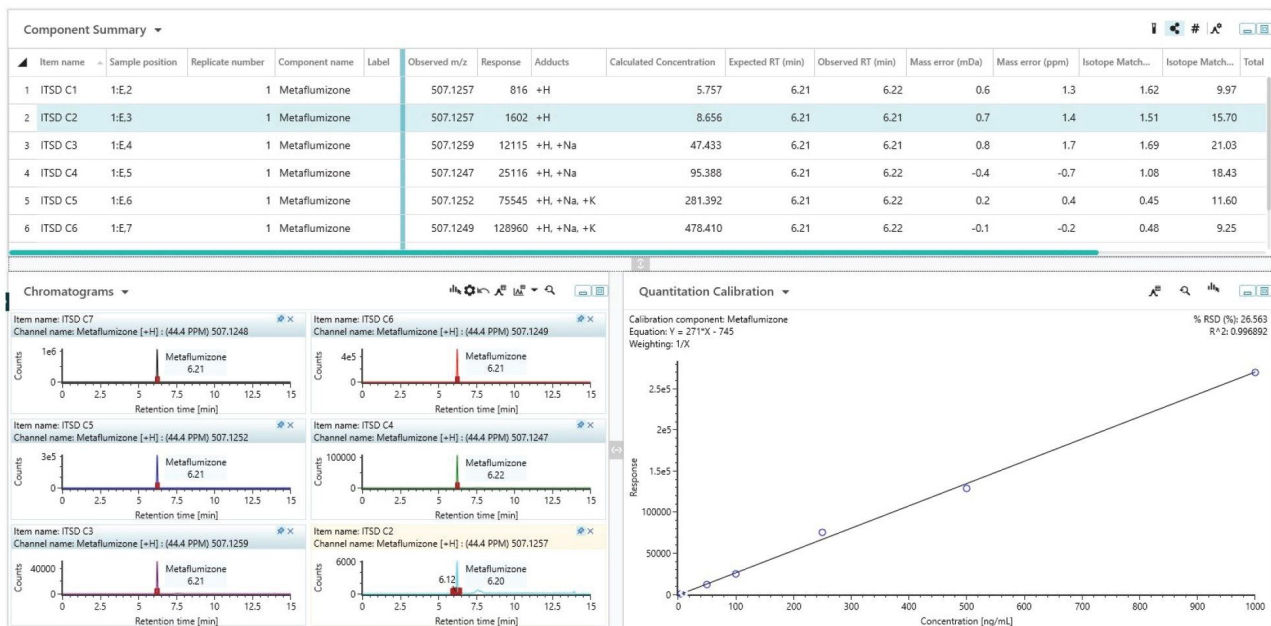


图8. 氟氟虫腈标准曲线， $R^2$ 值为0.999。

利用内标的标准曲线可以计算出加入样品中的内标浓度的偏差在已知值的15%以内（图9）。

Item name	Sample position	Replicate number	Component name	Observed m/z	Calculated Concentration	Response	Expected RT (min)	Observed RT (min)	Mass error (mDa)	Mass error (ppm)	Adducts
91 N48_ITSD	2:8.6	1	Metaflumizone	507.1260	114.610	61113	6.21	6.22	1.0	2.0	+H, +Na
92 N48_ITSD	2:8.6	2	Metaflumizone	507.1251	113.745	60653	6.21	6.23	0.0	0.1	+H, +Na
93 N48_ITSD	2:8.6	3	Metaflumizone	507.1254	112.467	59974	6.21	6.22	0.4	0.7	+H, +Na
94 N49_ITSD	2:8.7	1	Metaflumizone	507.1263	106.514	56811	6.21	6.22	1.2	2.4	+H, +Na
95 N49_ITSD	2:8.7	2	Metaflumizone	507.1266	109.505	58400	6.21	6.22	1.5	3.0	+H, +Na
96 N49_ITSD	2:8.7	3	Metaflumizone	507.1254	106.635	56875	6.21	6.22	0.4	0.8	+H, +Na
97 N50_ITSD	2:8.8	1	Metaflumizone	507.1256	93.053	49658	6.21	6.22	0.6	1.1	+H, +Na
98 N50_ITSD	2:8.8	2	Metaflumizone	507.1266	98.072	52325	6.21	6.22	1.6	3.2	+H, +Na
99 N50_ITSD	2:8.8	3	Metaflumizone	507.1262	93.261	49768	6.21	6.22	1.2	2.3	+H, +Na

图9. 加标内标的计算浓度偏差在已知值的15%范围内

---

## 结论

开展E&L筛查分析时，如果既能筛查低浓度E&L化合物，又能解析未知物，同时还能定量各组分的浓度，对分析会非常有利。本研究介绍了一种数据非依赖型采集(DIA)策略，该策略采用同一套筛查软件工作流程解决方案即可完成筛查和解析。

ACQUITY Premier系统与Xevo G3 QTof质谱仪联用，在分析E&L SST混标时表现出优异的重复性。保留时间的相对标准差(RSD)为0.01%，所有检出化合物的质量精度均低于3 ppm。Xevo G3 QTof采用了新型离子光学元件和检测系统，可大幅提升传输效率，让您对复杂基质中E&L组分的鉴定信心十足。该仪器的灵敏度更高，有助于检测低浓度组分，满足法规筛查阈值的要求。

数据非依赖型采集( $MS^E$ )可在色谱图中提供母离子及其对应碎片离子的准确质量数信息。比对MS/MS谱库进行筛查时，该方法可提高组分鉴定的可信度，同时大幅减少假阳性结果。例如，样品E48最初在谱库中得到了400多个潜在匹配项，但在增加保留时间匹配、质量精度低于3 ppm以及存在至少一种碎片离子等条件后，匹配结果缩减至不到40种化合物。应用分析评估阈值后，匹配项的数量又进一步减少。 $MS^E$ 采集到的准确质量数和相应碎片离子数据还有助于结构表征，进而辅助全面表征。

针对鼻喷剂萃取物分析，waters\_connect平台上的UNIFI应用程序提供了以下功能：SST基准测试、比对谱库进行筛查、绘制汇总图以识别趋势、筛选AET浓度、分离相关未知物的二元比较模式、用于解析未知物的Discovery Tool（发现工具），以及定量方法。

---

## 参考资料

1. USP-NF/PF, <1664> Assessment of Drug Product Leachables Associated with Pharmaceutical Packaging/Delivery Systems.[https://doi.usp.org/USPNF/USPNF\\_M7127\\_03\\_01.html](https://doi.usp.org/USPNF/USPNF_M7127_03_01.html) <  
[https://doi.usp.org/USPNF/USPNF\\_M7127\\_03\\_01.html](https://doi.usp.org/USPNF/USPNF_M7127_03_01.html)>
2. USP-NF/PF, <1663> Assessment of Extractables Associated with Pharmaceutical Packaging/Delivery Systems. [https://doi.usp.org/USPNF/PNF\\_M7126\\_03\\_01.html](https://doi.usp.org/USPNF/PNF_M7126_03_01.html) <  
[https://doi.usp.org/USPNF/PNF\\_M7126\\_03\\_01.html](https://doi.usp.org/USPNF/PNF_M7126_03_01.html)>
3. Norwood D., Paskiet D., Ruberto M., Feinberg T., Schroeder A., Poochikian G., Wang Q., Deng T., Degrazio F., Munos M., Nagao L. Best Practices for Extractables and Leachables in Orally Inhaled and

Nasal Drug Products: An Overview of the PQRI Recommendations. *Pharmaceutical Research*.25.727–39, 2008.

4. Stevens D., Cabovska B., Bailey A. 检测和鉴定来自高分子材料的萃取物.沃特世应用纪要. [720004211ZH](#).2012年1月.
5. McCullagh M., Mortishire-Smith R. J., Goshawk J., Cooper J., Obkircher M., Sprecher H., Koehling R., Nold M., Jacobsen J., Sanig R. 萃取物、可浸出物和接触材料：离子淌度增强质谱库的宝贵优势.沃特世应用纪要.[720007655ZH](#).2022年6月.
6. ISO 10993-18:2020 Biological Evaluation of Medical Devices — Part 18: Chemical Characterization of Medical Device Materials Within a Risk Management Process, <https://www.iso.org/standard/64750.html> <<https://www.iso.org/standard/64750.html>>
7. Cabovska B. 使用UNIFI科学信息系统进行萃取物筛查检测的工作流程.沃特世应用纪要. [720005688ZH](#) 2016年4月.
8. Rome K., McIntyre A. Intelligent Use of Relative Response Factors in Gas Chromatography-Flame Ionisation Detection. *Chromatography Today*.52, 2012.

---

## 特色产品

UNIFI科学信息系统 <<https://www.waters.com/134801648>>

UNIFI筛查平台解决方案 <<https://www.waters.com/134682903>>

720008000ZH, 2023年8月



© 2024 Waters Corporation. All Rights Reserved.

---

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [招聘](#) [危险化学品生产经营许可证](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)  
沪ICP备06003546号-2 京公网安备 31011502007476号