基于GC Orbitrap/MS技术的高效基因毒性杂质筛查分析

王喜智 邢江涛 赛默飞世尔科技(中国)有限公司

关键词:
GC Orbitrap/MS; HRF; 基因毒性杂质

摘要

利用超高分辨气质联用GC Orbitrap/MS技术的高灵敏度特点，结合基因毒性物质专属谱库建立了药物中微量基因毒性物质的非靶向筛查方法。方法高效，高分辨过滤技术（HRF）能够快速锁定可疑物质；同时方法准确，通过EI及CI数据可锁定分子离子峰，结合小于1ppm的质量精度，可实现准确定性。通过该方法对某原料药进行筛查，最终在324个峰里快速筛查出N,N-二甲基苯胺、抗氧剂264以及邻苯二甲酸二烯丙酯三种基因毒性杂质。

前言

基因毒性，是指污染物能直接或间接损伤细胞DNA，产生致突变和致癌作用的程度。西药往往因工艺、包材等原因可能在新药合成、原料纯化及储存运输过程中产生或迁移基因毒性物质，例如甲磺酸奈非那非事件及亚硝胺事件。

药物中基因毒性物质的检测，是药品质量的重要指标之一。因其危害之大，含量及限量之低，加之种类繁多，需要跨技术平台进行高灵敏度的综合分析。对于气质联用技术而言，中国药典及美国FDA出台了HS-GCMS及GCMSMS方法检测药物中亚硝胺的方法标准。新加坡政府更是推出二甲双胍中NDMA的GC Orbitrap/MS方法标准《Determination of N-nitrosodimethylamine(NDMA)in Metformin Products by HRAM-GCMS》。其中，低分辨气质联用检测微量基因毒性物质为靶向分析，需要特征离子/离子对信息，开展大规模基毒的筛查需要不断扩充数据库，且无法进行数据库之外的溯源分析。GC Orbitrap/MS低至fg级别的灵敏度，结合全扫描的无偏向性分析无疑是同时定性与定量完美解决方案。除此之外，赛默飞在美国国立卫生院(NIH)提出的共计1547种具有直接或潜在基因毒性的物质基础上，开发了适合气相分析的927种基毒5841张谱图的谱库，增强了检索的专一性和指向性，能够更好地锁定化合物。而非通过NIST、Wiely等谱库的“海底捞针”式检索。

本文利用赛默飞超高分辨质谱GC Orbitrap/MS结合基因毒性物质的专有谱库，对某原料药进行了基因毒性物质的筛查和鉴定，为药物中基因毒性物质的检测提供了又一有力、可靠的方法。

1. 实验部分

1.1 仪器

质谱仪：Exactive GC

气相色谱仪：Trace 1310 GC

自动进样器：Triplus RSH

色谱柱：TG-1MS(30 m×0.32mm×0.25μm)

1.2 分析条件

GC 条件

进样口：SSL进样口

恒流模式：1.5mL/min

进样体积：1μL

升温程序：40℃(6min)_22℃/min_200℃(5min)_25℃/min_310℃(5min)

MS条件

传输线温度：250℃

离子源温度：280℃

采集方式：分辨率R=60000(FWHM，m/z 200)

Full Scan全扫描：50-500m/z

1.3 样品处理

精密称取某原料药0.5g，加DCM (二氯甲烷) 5ml，涡旋1min，超声15min，4000rpm离心5min，取上清液适量，过0.45μ¬m滤膜后直接进样分析。

Thermo Fisher SCIENTIFIC

2.结果讨论

2.1筛查流程

依据1.2建立的方法，分别采用EI及PCI采集样品（TIC图见图1），EI源采集的原始数据经Deconvolution plugin软件进行基于质谱优先的解卷积，而后进行谱库搜索。HRF技术可将实际采集的碎片离子与检索出化合物的理论碎片离子进行比较。如果实测图谱里面可以被解释的离子越多，高分辨质谱图过滤检索值（HRF）值越高，即此化合物可能性越大（HRF计算公式如下）。PCI源采集的数据则用于辅助确认。

$$\text{HRF Score} = \frac{\sum (m/z * \text{Intensity})_{explained}}{\sum (m/z * \text{Intensity})_{observed}} \times 100\%$$

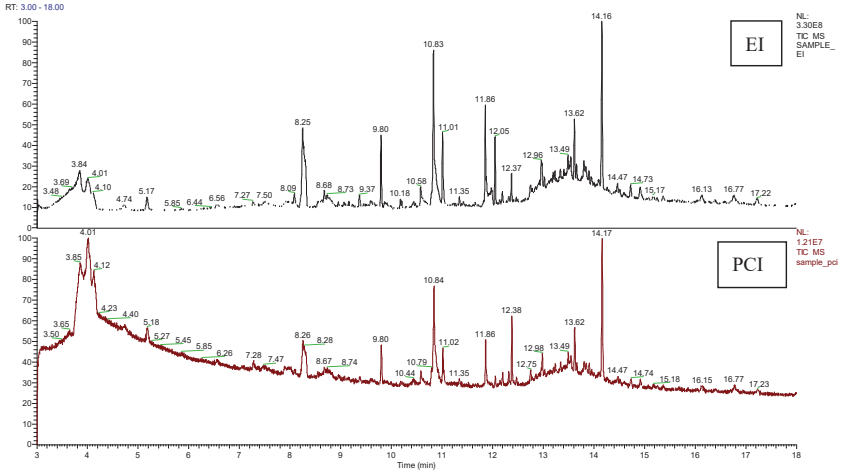

图1 EI及PCI下的全扫描色谱图

由图1可看出，样品基质相对复杂，经过解卷积、NIST谱库检索后获得324个峰，即便以SI>700、HRF>90对结果进行过滤，仍有72个峰，基毒筛查工作量巨大。而以基因毒性物质专属谱库进行检索，并以同样过滤条件筛选峰，仅有3个结果，如图2。

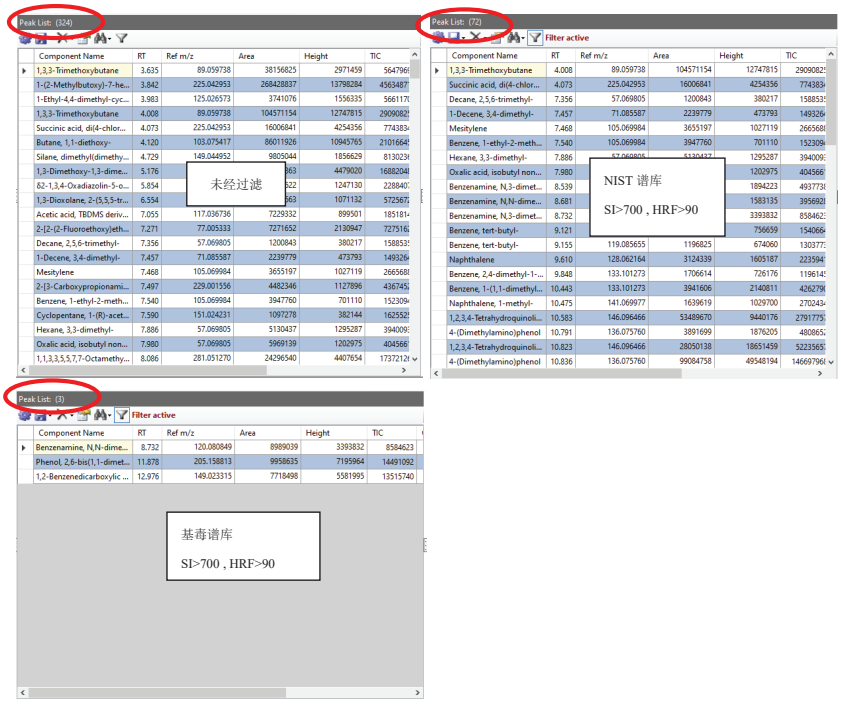

图2 检索结果对比

2.2结果讨论

Peak@RT8.732的定性

基于基毒谱库的首个检索结果为N,N-二甲基苯胺（CAS#：121-69-7），而该化合物在以NIST谱库检索时，并非最高匹配度。通过对比其EI及PCI质谱图信息，可确认M^+为121.08865，并且其与$C_8H_{11}N$理论分子离子峰质量偏差仅为0.36787ppm，M^+与同位素M+2的比值也与软件计算的理论值相似。

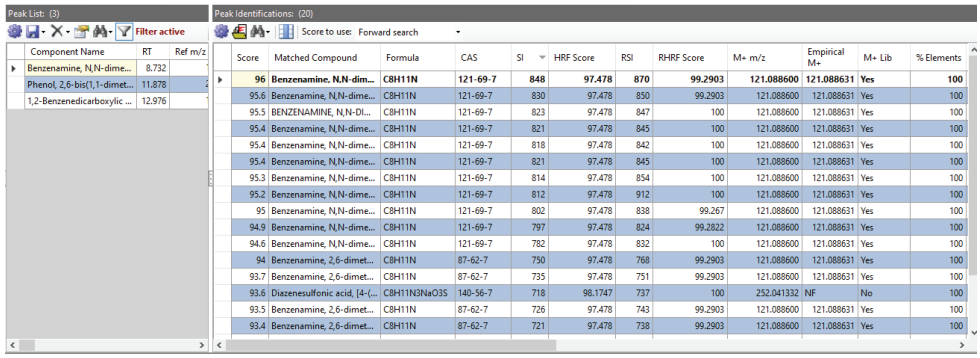

图3 peak@RT8.732基毒谱库检索结果

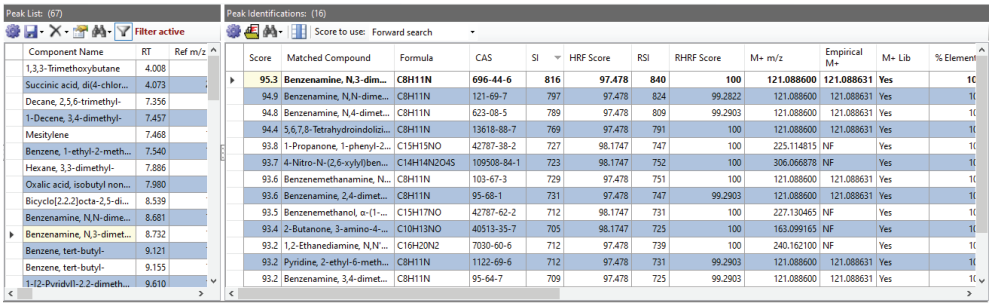

图4 peak@RT8.732 NIST谱库检索结果

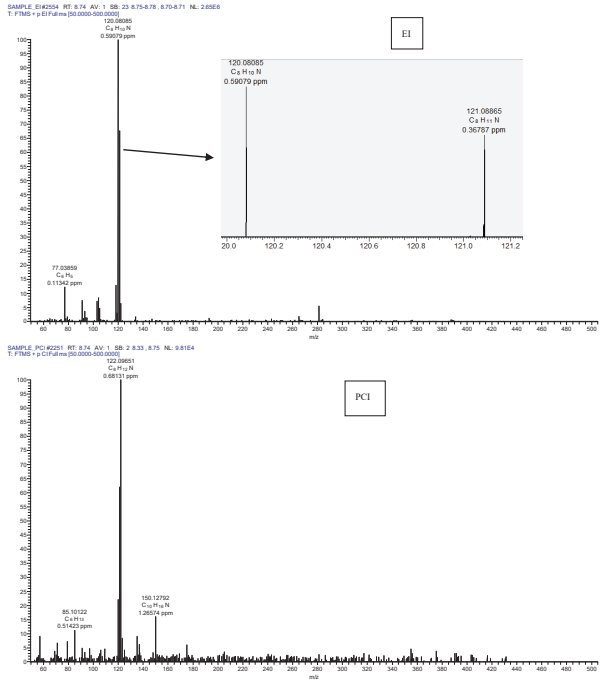

图5 EI及PCI质谱图对比

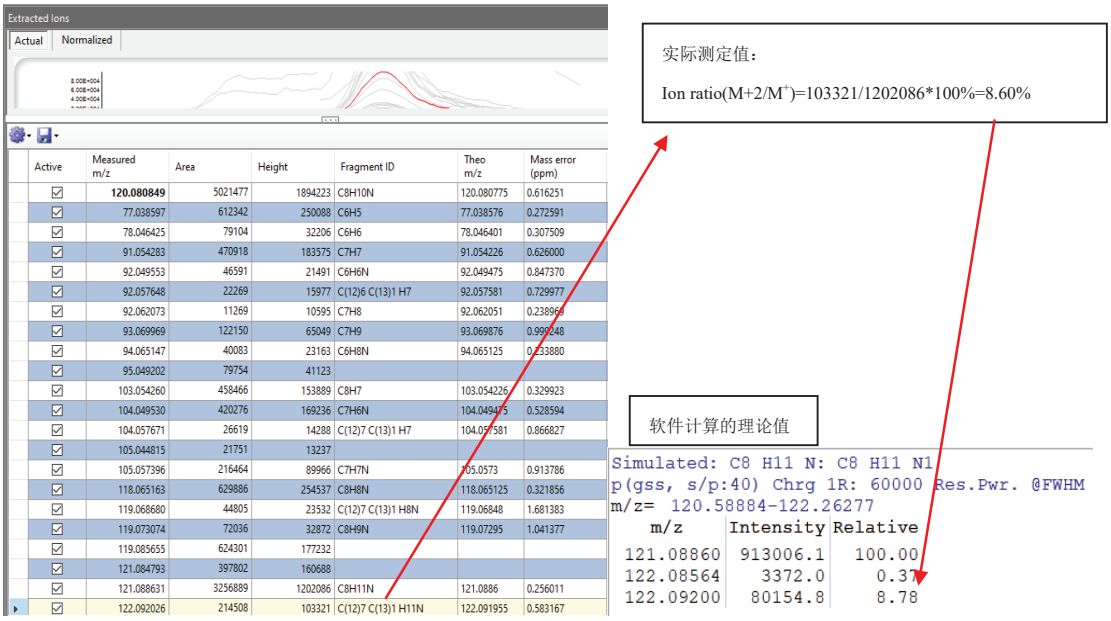

图6 同位素峰丰度比对比

Peak@RT11.878的定性

基于基毒谱库的首个检索结果为抗氧剂264（CAS#：128-37-0），而该化合物在以NIST谱库检索时，排名第四。通过对比其EI及PCI质谱图信息，可确认M^+为220.18235，并且其与$C_{15}H_{24}O$理论分子离子峰质量偏差仅为0.84629ppm，M^+与同位素M+1比值也与软件计算的理论值相似。

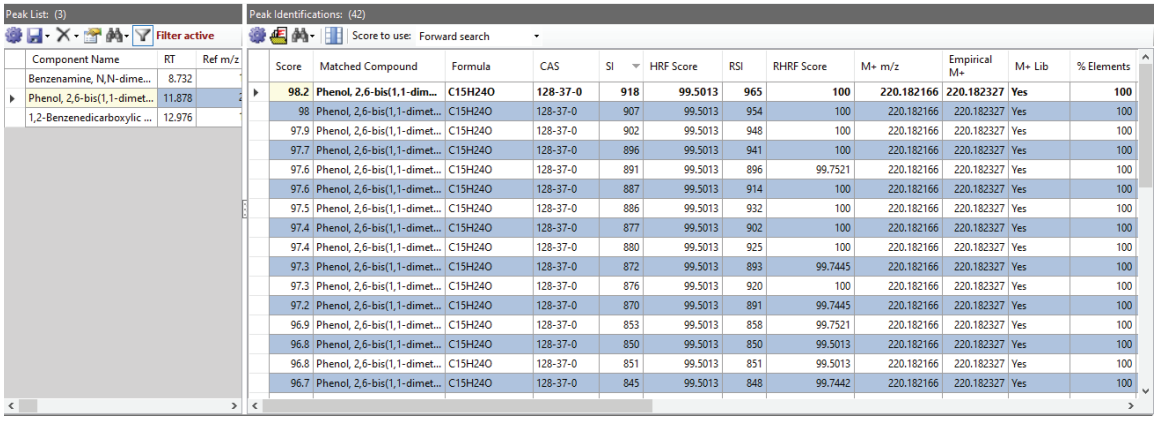

图7 peak@RT11.878基毒的谱库检索结果

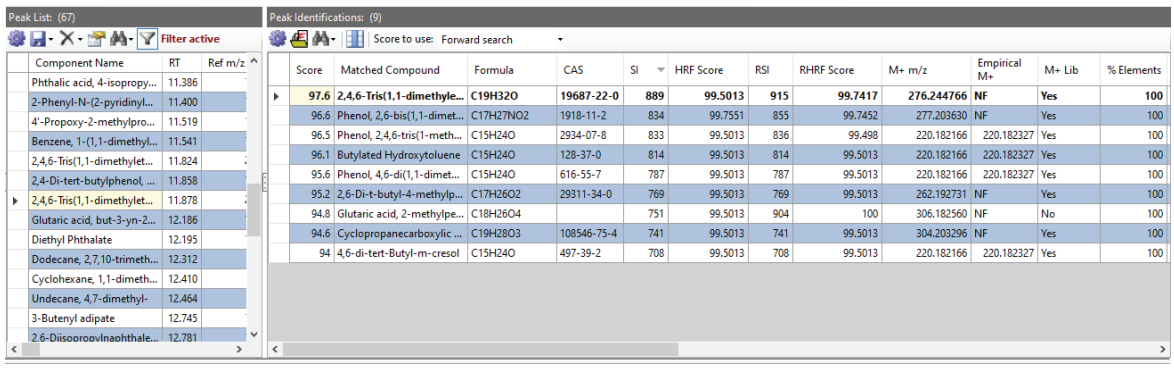

图8 peak@RT11.878 的NIST谱库检索结果

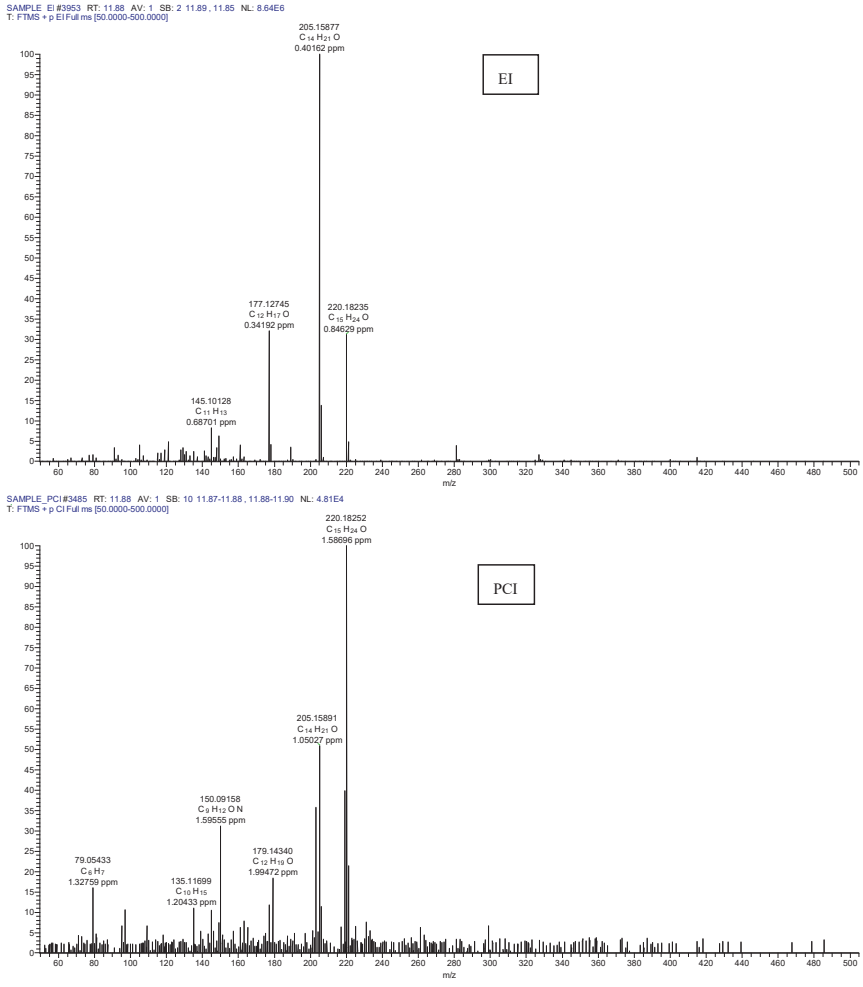

图9 peak@RT11.878的EI及PCI质谱图对比图

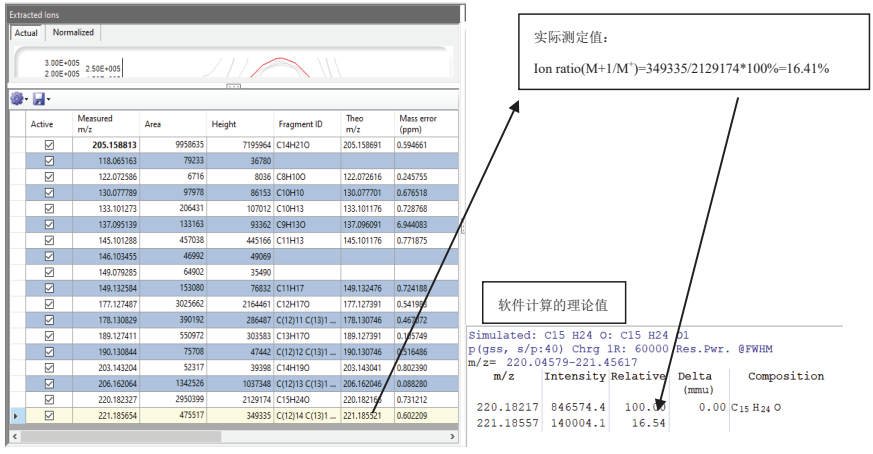

图10同位素峰丰度比对比

Peak@RT12.976的定性

该峰检索结果为邻苯二甲酸二烯丙酯（CAS#: 131-17-9）。方法与前述类似，本文不再赘述其定性过程。

3 结论

药物中微量基因毒性物质的非靶向筛查分析具有基质干扰大、化合物种类多，含量低等分析难点。而GC Orbitrap/MS技术在全扫描分析下，能够同时实现高分辨率、高质量精度以及最低低至fg级别的灵敏度等特点。结合基毒专属谱库可同时实现上百种具有直接或潜在基因毒性物质的无偏向性筛查分析，非常适合相关行业进行药物或包材中基毒的筛查分析工作。

赛默飞
官方微信

热线 800 810 5118
电话 400 650 5118
www.thermofisher.com