



顶空 GC-MS 技术在挥发性可萃取物和可浸出物分析中的解决方案

作者

Xiaoteng Gong¹, Dujuan Lu¹, Danny Hower¹, Julian Gulbinski¹, Daniela Cavagnino², and Cristian Cojocariu³

¹SGS, Fairfield, NJ, USA

²Thermo Fisher Scientific, Milan, IT

³Thermo Fisher Scientific, Runcorn, UK

关键词

可萃取物和可浸出物, E&L, Orbitrap GC-MS, HRAM, 阀和定量环, 静态顶空, 气相色谱GC, 气相色谱-质谱GC-MS, 火焰离子化检测器FID

目标

本文介绍了基于顶空 GC-MS 技术分析挥发性可萃取物和可浸出物 (E&L) 的方法优化过程。本文重点研究了不同基质中常见挥发性有机物 (OVIs) 的分配系数、分配率、孵化温度, 本研究将为OVIs的孵化温度、盐添加量和样品/样品瓶体积比的选择提供理论依据。尤其关注基质中常见有机挥发性杂质 (OVI) 的分配系数、相比和平衡时间, 为孵育温度、盐的使用以及样品/样品瓶体积比提供理论基础。此外, 比较并优化了顶空样品不同平衡相态对GCMS分析包装材料OVIs的方法。本实验重点介绍了静态顶空方法设置和优化的简便性, 非常有助于轻松进行聚合物材料中挥发性物质的研究。此外, 顶空进样方式与HRAM GCMS的联用提供了更进一步的检测与识别能力, 更有利于分析和表征聚合物材料中的挥发性杂质。

前言

医药产品从生产线到达终端病人手中的流程中，会接触大量的聚合物材料。在产品生产周期的几乎每个阶段都会与塑料和橡胶制品接触，在生产过程中使用的一次性过滤器和管道等，在药品运输过程中使用的包装材料，以及在用于对患者实施治疗的注射器、笔和吸入器等输送装置。尽管这些材料对于确保药品在生产和存储过程中的无菌性和质量至关重要，但材料中的有害物质也可能迁移至药品中而对人体健康构成严重威胁，并存在影响稳定性甚至恶化产品药理活性的风险。这些物质即可萃取物和可浸出物，为确保药品安全，需要对该类物质做严格的管控。

由于单个设备、包装装置或存储容器中可能存在的材料的种类很多，因此，确定浸出物来源于哪种材料至关重要。塑料制品包含来自添加剂和存储辅料（例如抗氧化剂、增塑剂、乳化剂和着色剂）的多种可萃取物和可浸出物。鉴于各类材料中的可萃取物和可浸出物的挥发性和极性范围很广泛，因此将采用不同色谱技术对其进行全面研究。通常采用顶空自动进样器与气相色谱质谱联用仪（HS-GCMS）的方案，分析具有挥发性的可萃取物和可浸出物成分。在可萃取物和可浸出物研究中，由于未知分析物多样性和药品基质复杂性的特点，因此灵敏度与选择性是实现该类物质分析的重要挑战。为了应对 OVIs 顶空 GC-MS 分析带来的挑战，基于气体相平衡理论对顶空的方法参数进行了方法开发研究，以优化顶空进样参数。本方案将全新的 Thermo Scientific™ TriPlus 500 顶空自动进样器与 Thermo Scientific™ 的高分辨质谱仪（HRAM）GC-MS/FID 联机，为痕量的非靶向有害可挥发性有机物的定性定量分析提供了一个强有力的表征手段。

实验

仪器配置：TriPlus 500 顶空自动进样器、Thermo Scientific TRACE™ 1310 GC-FID、Thermo Scientific™ Q Exactive™ GC Orbitrap™ GC-MS/MS 联用系统（图 1）。

在使用 HRAM GC-MS 系统进行数据采集之前，首先使用 GC-FID 配置对顶空进样方法进行了优化。顶空自动进样器和 GC-FID 实验条件见表 1。



图 1. TriPlus 500 顶空自动进样器的 TRACE 1310 GC、Q Exactive GC Orbitrap GC-MS/MS 联用仪

表 1A. TriPlus 500 顶空自动进样器参数条件

TriPlus 500 顶空自动进样器运行参数	300 °C
孵化温度 (°C) :	80
孵化时间 (min) :	30
振摇模式:	快速
加压模式:	压力
样品瓶压力 (kPa) :	100
压力平衡时间 (min) :	0.2
定量环体积 (mL) :	1
样品环温度 (°C) :	150
定量环压力 (kPa) :	40
冲压平衡时间 (min) :	1
进样针吹扫流速:	2
进样时间 (min) :	1.5
进样模式:	标准
样品瓶体积 (mL) :	20

表 1B. Trace 1310 GC-FID 运行参数

TRACE 1310 GC运行作参数		
载气:	氦气	
载气流速 (mL/min):	1	
柱温箱升温程序:		
升温速率 (°C/min)	温度 (°C)	保持时间 (min)
-	40.0	1.0
7.0	200.0	7.0
火焰离子化检测器 (FID)		
空气流速 (mL/min):	350	
氢气 (mL/min):	35	
氮气 (mL/min):	40	
Thermo Scientific™		
TraceGOLD™ TG-624		
色谱柱:	30 m × 0.32 mm ID 1.8 μm	
	P/N 26085-3390	

本实验使用预填充注射器的柱塞作为样品，分析其可能存在的可萃取化合物。该柱塞为橡胶制品，在装入一次性注射器使用时将会与液体药品接触，从而对药品造成污染。HS 方法优化后，使用GC-Orbitrap高分辨质谱的全扫描模式采集数据，对未知物组分进行定性分析。表 2 列出了 Q Exactive GC Orbitrap 质谱仪的参数。

Thermo Scientific™ TraceFinder™ 软件用于 FID 和 HRMS 数据采集，并用于控制整个 HS-GC-MS 系统。

表 2. Q Exactive GC Orbitrap 质谱仪参数

Q Exactive GC Orbitrap GC-MS/MS 运行参数	
IMS 采集模式:	全扫描 (Full MS) 或选择离子监测 (SIM)
电离模式:	EI
极性:	正离子
分辨率:	60,000 (m/z 200)
AGC 数目:	10E6
扫描范围:	35 至 500 m/z
MS 传输线温度 (°C):	250
离子源温度 (°C):	200
锁定质量数离子 (m/z):	73.04680, 133.01356, 07.03235, 281.05114, 55.06990

样品前处理

使用橡胶塞样品，对比了不同前处理方法对目标物提取效率的影响。(图2)。



图 2. 制备的橡胶柱塞样品，用于萃取物研究

步骤 A

将柱塞样品（2个柱塞/瓶）置于20ml顶空瓶，按照表1提供的顶空条件（孵化温度除外）对样品进行孵化，孵化温度为160°C。

步骤 B

将三十个柱塞浸入装有 30 mL LC-MS 级水（萃取溶剂）的溶剂瓶中。在 50°C 下孵化 24 小时。然后，移取 2 mL 萃取液至 20 mL HS 样品瓶中。该萃取浓度相当于两个塞子/瓶的样品量。仪器方法见表 1。

步骤 C

将柱塞（两个塞子/瓶）置于装有 2 mL LC-MS 级水（萃取溶剂）的 20 mL HS 样品瓶中。仪器方法见表 1。

步骤 D

将三十个柱塞浸入装有 30 mL LC-MS 级水（萃取溶剂）的溶剂瓶中。在 50°C 下孵化 24 小时。将 500 mg 氯化钠（NaCl）置于 10 mL HS 样品瓶中。移取 2 mL 萃取物至含盐的 10 mL HS 样品瓶中。萃取液浓度相当于两个塞子/瓶。除 HS 样品瓶体积外，仪器方法与表 1 方法相同。此处使用的是 10 mL HS 样品瓶。

萃取空白样品

- 1、移取 2 mL LC-MS 级水（萃取溶剂）至 20 mL HS 样品瓶中作为空白1。
- 2、将 2 mL LC-MS 级水加入 10 mL HS 瓶中，加入500 mg NaCl 作为样品 D 的空白对照，仪器方法同表 1。

结果与讨论

近年来，随着一次性药包材广泛使用及以及材料新配方的发展，药包材中未知物质迁移的风险也有所增加。

在本项研究中，通过降低基质效应和降低相比，可以尽可能提高灵敏度。对于水溶液类型的样品，一般常用的方法是通过添加无机盐来改变挥发性组分的相比，使挥发性组分更容易挥发至气相空间。在该实验中，添加氯化钠可明显改善灵敏度。同样，也可通过使用 10 mL 顶空瓶代替 20 mL 顶空瓶来降低相比。图 4 比较了样品制备步骤 B（标准方法）和 D（优化方法）获得的 FID 色谱图。

将样品制备步骤 D 获得的样品色谱图与空白溶液进行比较，研究发现某些峰可能源于盐或水中的杂质，因此不被视为萃取物（图 5）。

前处理方法 C 是本研究中样品水萃取效率最低的方案。

可以采用顶空进样技术，通过简单的样品制备，轻松实现药品接触材料的E&L挥发性成分的分析，顶空进样方式将可挥发性成分从不可挥发的基质中提取出来，并且避免了不挥发性组分对分析仪器的污染。

这类样品分析的主要挑战是：基质复杂性、可萃取物和可浸出物多样性以及方法灵敏度。顶空萃取技术仅允许挥发性组分进样，摒除非挥发性基质，有助于降低分析的复杂性。通过优化萃取步骤并结合高分辨的精确质量数，提高了方法的选择性，从而提供了一种橡胶材料（如预填充注射器柱塞）的已知和未知挥发性有机物的有效分析方法。

样品萃取优化

顶空进样技术是基于密闭样品瓶中的液相（样品）及其上方气相（顶部空间）之间建立的两相平衡（图 3）。平衡时，挥发性化合物通过分配系数（K）来表示样品中被分析物的浓度与气相中被分析物的浓度之比。例如样品瓶温度和样品基质是影响K值的关键因素，这些因素将有利于气相的平衡，以提高目标物在气相中的浓度，增加萃取效率，提高方法灵敏度。

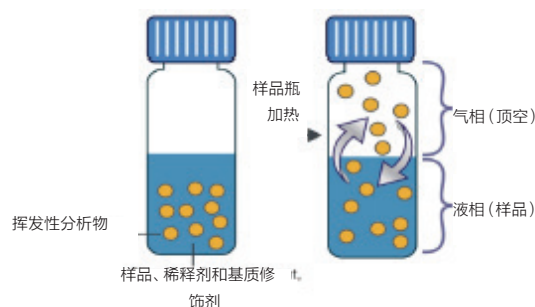


图 3. 静态顶空采样技术原理

未知物鉴定

商业谱库中不存在的化合物结构确认曾经是一项复杂的挑战，需要大量的时间和分析检测工作。结合Orbitrap GC-MS的精确质量数测量功能可以准确确定分析物及其质谱碎片的精确质量数，确定其化学组成，从而可靠地解析未知化合物的结构。对测量与理论同位素模式进行评估对于明确确定未知元素组成来说也是至关重要的。

通过优化顶空方法的参数，提高了质谱方法的灵敏度，鉴定出更多的提取目标物，如图 6 所示。

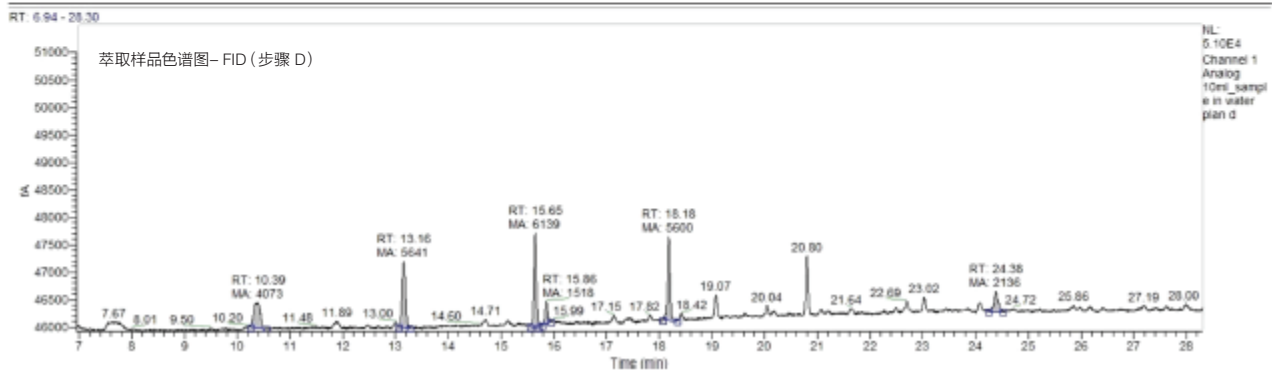
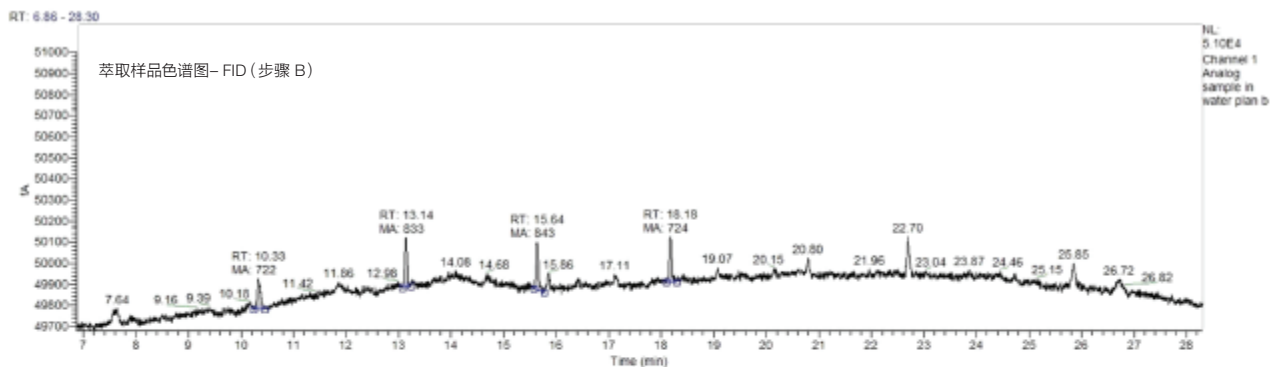


图 4. 步骤 B (上图) 和步骤 D (下图) 制备样品的 HS-GC-FID 色谱图

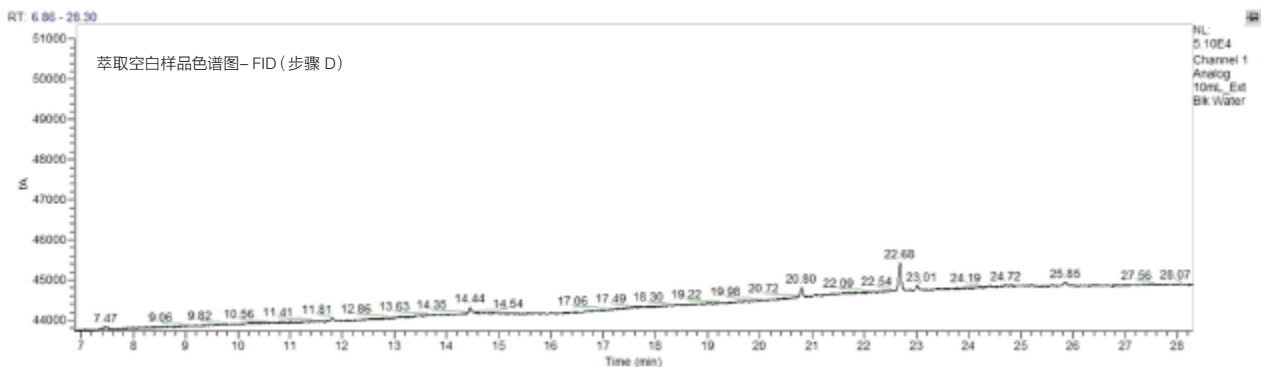


图 5. 保留时间 20.8、22.68、23.02 和 25.86 处的峰不视为空白溶液中的可萃取物。

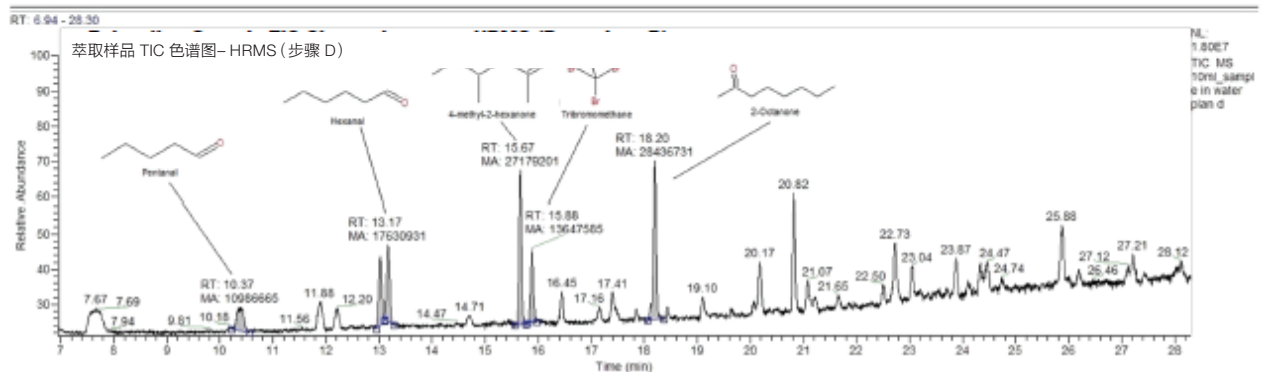
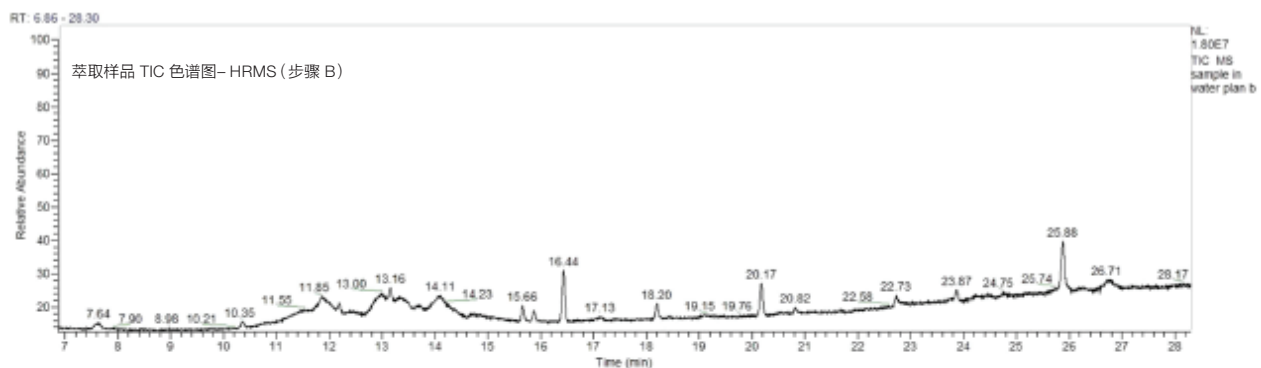


图 6. 步骤 B (上图) 和步骤 D (下图) 制备样品的 HS-HRAM GC-MS 色谱图 (TIC, EI 全扫描)

通过使用更为苛刻的萃取条件可以获得更多的未知化合物信息。另一种萃取方式则不添加水进行提取，则可将孵化温度提高至160℃对柱塞样品进行平衡，在该条件下，可获得更多的挥发性未知化合物信息，从而更深入地了解样品的可挥发组分的特性。水提取和固体直接顶空的质谱-色谱图对比见图 7。值得关注的是，在干燥固体样品的顶空色谱图中可

以清晰地观察到异戊二烯与异丁烯2、1-异丙烯基-2,2,4,4-四甲基环己烷 (C₁₃H₂₄) 共聚形成的典型低聚物。受其疏水结构的影响，未在柱塞水提取物中检测到该类化合物。根据质谱图中分子离子和碎片离子的精确质量数，则可给出化合物的可靠解析。(图 8)。

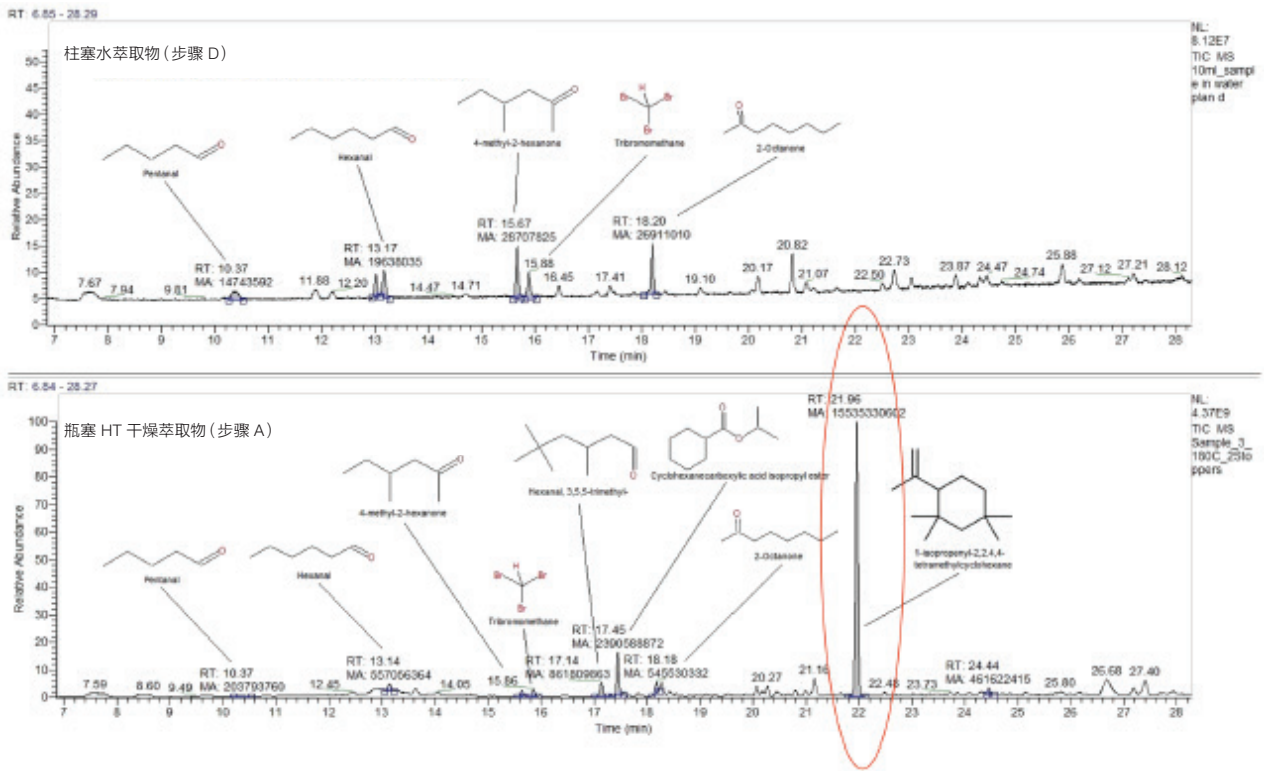


图 7. 步骤 D (上图) 和步骤 A (下图) 制备样品的 HS-HRAM GC-MS 色谱图

突出显示的峰表示干燥固体样品顶空分析中可见的低聚物。

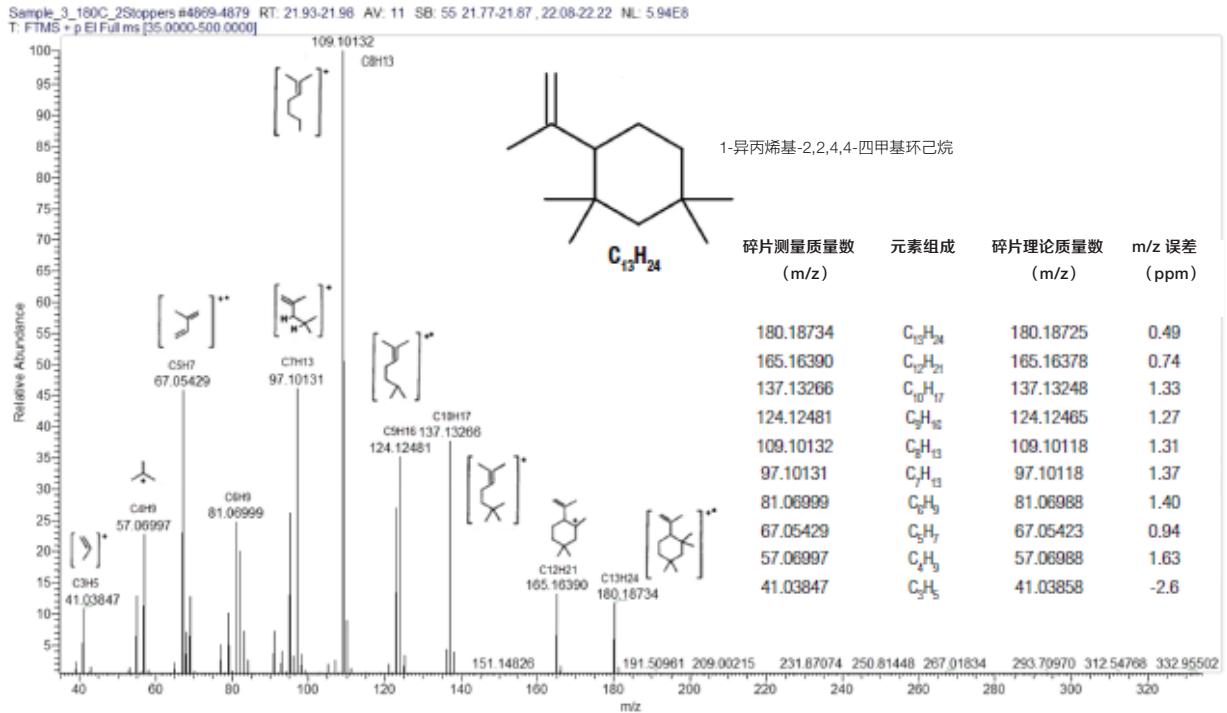


图 8. 低聚物 1-异丙烯基 2,2,4,4-四甲基环己烷 (C₁₃H₂₄) 的 HRAM 谱图。表中报告了所有碎片的准确质量数以及元素组成和质量精度 (ppm)。

未知物定性可以基于库检索、高分辨质谱的碎片离子注释和保留指数进行判断。更进一步的工作还可以通过CI源实验获得更多的化合物信息确认。

几乎所有已识别化合物的质量精确度都在 1 ppm 左右，如表 3 所示。

结论

研究结果表明，TriPlus 500 顶空自动进样器与 Q Exactive GC Orbitrap 质谱仪和 TraceFinder 软件的配合使用是一个复杂样品萃取、分析和未知物定性的强大解决方案。

- 对一种有效且强大的静态顶空进样方法进行了优化，检测到大量色谱峰用于化合物鉴定。对孵化温度、基质组成和相比等关键参数进行了对比。
- 使用 FID 检测器对顶空方法进行优化，通过添加 NaCl 并结合使用较小的样品瓶体积，显著提高了灵敏度。

而研究发现水萃取是效率最低的提取方案，将柱塞样品干燥加热至 160°C 进行孵化增加了未知化合物峰数量。

- 强大的色谱分离能力结合高分辨质谱 60000 分辨率，使 Q Exactive GC 系统成为复杂样品分析的理想平台。小于 ppm 的质量精确度与优异的灵敏度相结合有利于实现样品中所有成分的可靠识别。通过 NIST 谱库搜索的 EI 谱图和保留指数评分，快速可靠地识别了注射器柱塞样品中的某些化合物。

参考文献

1. Kolb, B.; Ettre, L.S. Static Headspace-Gas Chromatography: Theory and Practice. Wiley-VCH, Hoboken, NY, 1997.
2. Kuntz, I.; Powers, K. W.; Hsu, C. S.; Rose, K. D. Cyclic oligomer formation in the copolymerization of isoprene with isobutylene. Makromol. Chem., Macromol. Symp. 13/14, 337-362 (1988).

表 3. 橡胶柱塞顶空干燥萃取物的 HRAM MS 化合物识别

已识别化合物	分子式	保留时间 (min)	观察到的基峰或分子离子	质量精度 Δm (mDa)	质量精度 (ppm)
戊醛	$C_5H_{10}O$	10.37	58.04135	-0.03	0.58
己醛	$C_6H_{12}O$	13.14	82.07763	0.07	-0.88
4-甲基-2-己酮	$C_7H_{14}O$	15.64	114.10399	-0.07	0.64
三溴甲烷	$CHBr_3$	15.86	172.84187	0.04	-0.20
3,5,5-三甲基己醛	$C_9H_{18}O$	17.14	142.13538	-0.16	1.15
环己烷甲酸异丙酯	$C_{10}H_{18}O_2$	17.45	129.09096	0.05	-0.36
2-辛酮	$C_8H_{16}O$	18.18	128.11970	-0.13	1.04
1-异丙烯基 2,2,4,4-四甲基环己烷	$C_{13}H_{24}$	21.96	180.18732	-0.07	0.38

有关更多详情，请访问 thermofisher.com/TriPlus500



赛默飞
官方微信

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

ThermoFisher
SCIENTIFIC