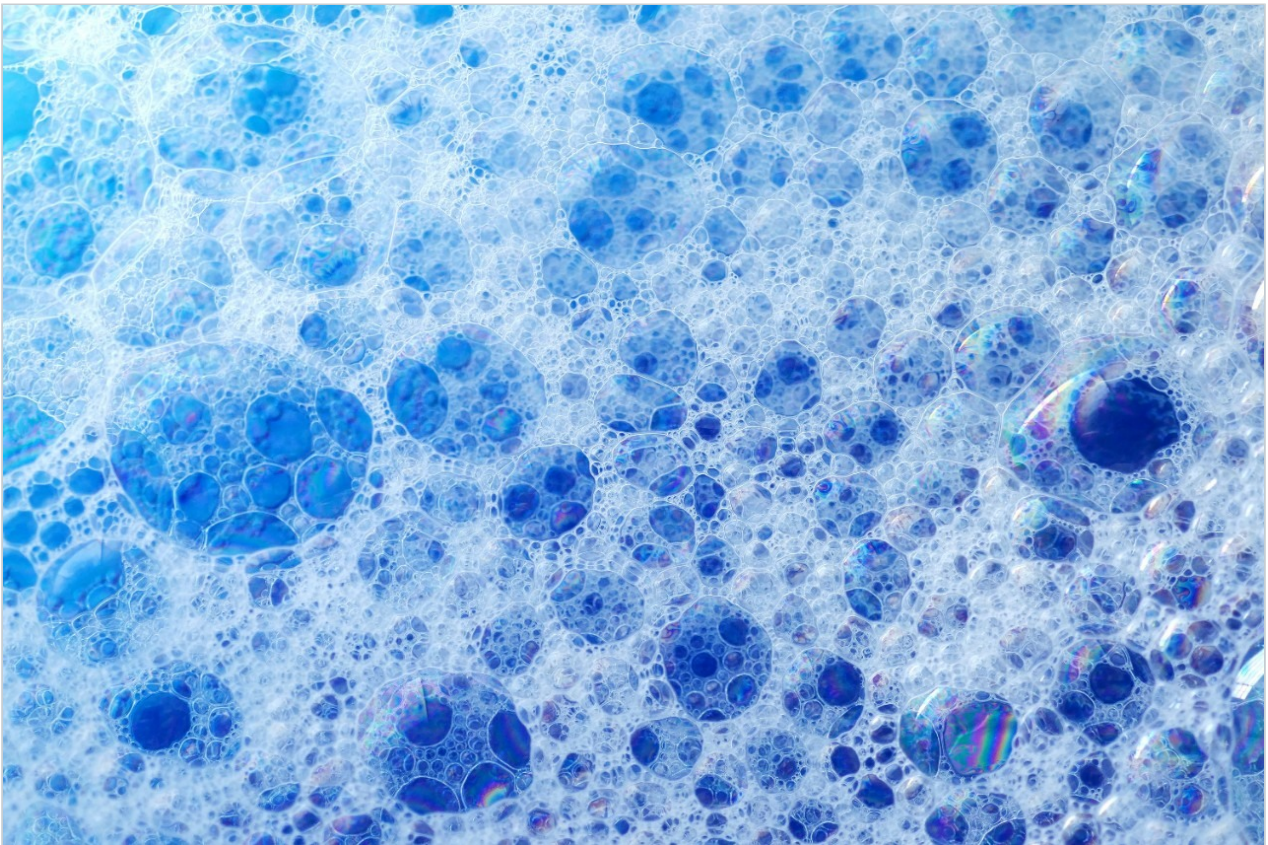


应用纪要

使用基于“一锅法” RPLC-MS的平台方法 定量分析蛋白类生物治疗药物中的聚山梨酯 20/80

Robert E. Birdsall, David Dao, Brooke M. Koshel, Ying Qing Yu, Aude Smeets, Michel Gerodez, Xavier Taillieu

Waters Corporation, GlaxoSmithKline



摘要

我们开发出一种高通量LC-MS平台方法，可以利用现成的材料和试剂定量分析蛋白质溶液中的聚山梨酯20/80，该方法基于失水山梨醇脂肪酸酯水解后游离脂肪酸快速甲基化的原理进行定量。样品前处理采用“一锅法”，便于部署和适应制剂、开发及QC环境。使用配备在线ACQUITY QDa质谱检测器的Waters ACQUITY UPLC H-Class PLUS系统实施高通量反相分离，特异性和灵敏度均有提升，在10 min内即获得脂肪酸甲酯(FAME)分析谱图。本研究证明，分析人员可成功部署基于LC-MS的水解方法，采用单四极杆质谱仪检测亚ppm级的聚山梨酯成分。由于该方法为平台方法，因此能够轻松部署并灵活分析含聚山梨酯20或聚山梨酯80的药品。

优势

- 易于部署、可扩展到各种规模的生物制药产品中聚山梨酯20和聚山梨酯80定量测定方法
- 拥有质谱检测功能，可提高灵敏度和专属性
- 样品前处理操作非常少，可使方法转换简单直接

简介

聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸酯(PS-80)和聚氧乙烯脱水山梨醇单月桂酸酯(PS-20)是生物药物生产和配制中常用的表面活性剂，对于尽量减少蛋白质变性、聚集和表面吸附损失起着至关重要的作用¹。它们也可以用作稳定性辅料，此时必须掌握其组成和稳定性，以确定药品在临床环境中使用的保质期和安全性。由于氧化和/或水解过程引起的聚山梨酯降解会导致含聚山梨酯的药品疗效下降，因此这一点至关重要¹⁻²。研究人员最近确定，脂肪酶/酯酶等残留宿主细胞蛋白所具有的酶活性，是聚山梨酯降解的又一条途径，进一步增加了患者安全性风险³。为此，必须对这类辅料进行表征、鉴定和定量，证明含聚山梨酯的药品在其制剂状态下是安全有效的。

聚山梨酯由极性头部基团和疏水性尾部组成（如图1所示），具有非挥发性，其紫外活性可忽略不计。由于这些特性，分析完整水平的聚山梨酯时需要使用替代检测技术，例如蒸发光散射检测(ELSD)和电雾式检测(CAD)⁴⁻⁵。但是，这些方法部署在HPLC系统上时存在洗脱时间长的问题（超过40 min），并且需要利用危险材料和试剂进行复杂的样品前处理。此外，虽然ELSD和CAD检测器已经证明可用于分析完整聚山梨酯，但它们对于检测聚山梨酯浓度的细微变化通常不够准确，仅局限于ppm级分析物检测。我们最近在文献中常见做法的基础上开发出一种聚山梨酯80分析方法，并证明了该方法非常高效且灵敏⁶。方法工作流程见图2，本研究证明，聚山梨酯80在图1中星号标注的酯键处发生碱水解后，使用UV检测疏水性脂肪酸尾部（油酸）可实现亚

水解工作流程

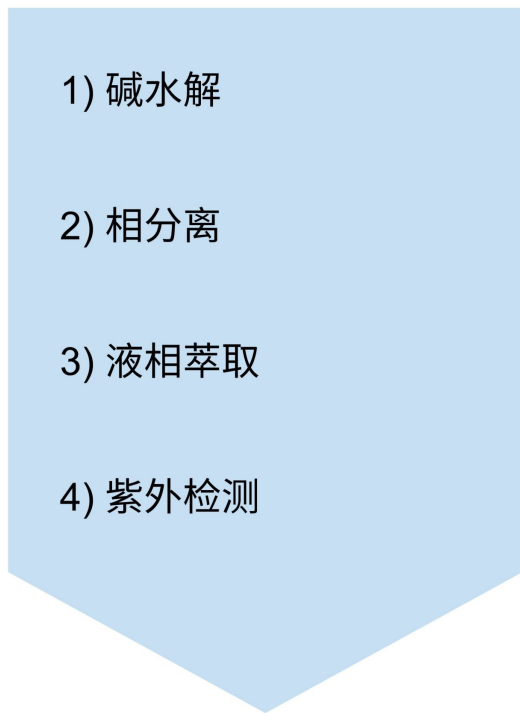


图2.分析工作流程。聚山梨酯80分析中水解工作流程的卡通图示。

脂肪酸 (甲基化)	碳原子数:双键数	MW (g/mol)	百分比 (%)
聚山梨酯20			
己酸甲酯	6:00	130.2	≤1.0
辛酸甲酯	8:00	158.2	≤10.0
癸酸甲酯	10:00	186.3	≤10.0
月桂酸甲酯	12:00	214.1	40.0-60.0
肉豆蔻酸甲酯	14:00	242.4	14.0-25.0
棕榈酸甲酯	16:00	270.5	7.0-15.0
硬脂酸甲酯	18:00	298.5	≤11.0
油酸甲酯	18:01	296.5	≤11.0
亚油酸甲酯	18:02	294.5	≤3.0
聚山梨酯80			
肉豆蔻酸甲酯	14:00	242.4	≤5.0
棕榈酸甲酯	16:00	270.5	≤16.0
棕榈油酸甲酯	17:01	268.4	≤8.0
硬脂酸甲酯	18:00	298.5	≤6.0
油酸甲酯	18:01	296.5	≥58.0
亚油酸甲酯	19:02	294.5	≤18.0
亚麻酸甲酯	19:03	292.5	≤4.0

表1.有关PS-20和PS-80的USP专论指出了聚山梨酯20和聚山梨酯80中脂肪酸组成的监管可接受水平。*改编自美国药典网站(usp.org)。

实验

液相色谱条件

液相色谱系统:

ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio系统

检测条件： 配备5 mm钛合金流通池的ACQUITY UPLC TUV，
吸收波长： 200 nm

样品瓶： Waters TruView

色谱柱： ACQUITY UPLC BEH C₈, 130 Å, 1.7 μm, 2.1 mm × 100 mm

柱温： 30 °C

样品温度： 25 °C

进样体积： 10 μL

流速： 0.2 mL/min

流动相A： 含0.1%甲酸的水溶液

流动相B： 含0.1%甲酸的乙腈溶液

梯度表

时间 (min)	流速 (mL/min)	%A	%B	曲线
初始	0.200	25	75	初始
18.00	0.200	0	100	6

质谱条件

质谱系统： ACQUITY QDa检测器

电离模式： 正
采集范围： 100 m/z-600 m/z
毛细管电压： 1.5 kV
锥孔电压： 15 V

PS-80甲酯 ACQUITY QDa SIR (m/z)

肉豆蔻酸甲酯 243.4
棕榈酸甲酯 271.45
硬脂酸甲酯 299.51
油酸甲酯 297.5
花生酸甲酯 327.6
二十碳烯酸甲酯 325.5
山萘酸甲酯 355.6
木蜡酸甲酯 383.7

PS-20甲酯 ACQUITY QDa SIR (m/z)

己酸甲酯 131.18
辛酸甲酯 159.24
癸酸甲酯 187.29

月桂酸甲酯	215.14
肉豆蔻酸甲酯	243.4
棕榈酸甲酯	271.5
硬脂酸甲酯	299.5
油酸甲酯	297.5
亚油酸甲酯	295.5

数据管理

色谱软件： Empower 3 FR4

结果与讨论

我们以之前研究的方法为起点，开发出一种基于MS平台的新方法，确定对目标分析物兼具灵敏度和专属性的条件；同时该方法还具有可扩展和可部署性质，以便在整个组织中更广泛地应用于PS-20或PS-80的分析和定量⁶。将色谱图、水解效率、检测器灵敏度、分析线性和提取效率视为方法开发的标准，结果讨论如下。

色谱图

色谱分析优化通常是一个迭代过程，需要在各种条件下评价目标分析物峰，确保目标峰与相邻峰实现良好分离，尽量减少共洗脱并提高分析准确度。基于MS的方法由于存在基质效应而变得更为复杂，因为基质效应会通过离子抑制降低分析灵敏度并提高谱图复杂性。我们以这些信息为基础评价了分离条件，判断能否使用单一方法按组成分离每种聚山梨酯的主要脂肪酸（表1），并分离所有共流出峰。使用表1作为指导，在纯溶剂中制备一组市售脂肪酸甲酯，并在梯度条件下优化分析方法，使用ACQUITY QDa质谱检测器的SIR功能进行检测以实施理论论证。在优化条件下得到的结果如图3所示。在优化过程中确定了必须采用C₈色谱柱（部件号：[186002877 <https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/columns/186002877-acquity-uplc-beh-c8-column-130a-17--m-21-mm-x-50-mm-1-pk.html>](https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/columns/186002877-acquity-uplc-beh-c8-column-130a-17--m-21-mm-x-50-mm-1-pk.html)）才能使脂肪酸达到足够高的保留性，同时让后洗脱物质在拖尾方面保持良好的峰形。此外，C₈色谱柱增加的保留性使分离条件在通量方面更高效。本研究确定了

流动相B在18 min内从75%增加至100%的梯度具有足够高的分离能力，并且通量与现有基于HPLC的ELSD或CAD方法相比也略有增加。另外，总运行时间可视需要进一步优化，因为本研究使用的甲基化脂肪酸组仅代表可能需要监测的分析物子集（表1）。更重要的是，如图3所示，当使用优化条件时，每种聚山梨酯相关的主要脂肪酸（蓝色迹线）彼此得到良好分离，并且与相邻峰（橙色迹线）也得到良好分离，同时还为内标的使用提供了足够大的梯度空间（虚线）。鉴于观察到有利结果，因此将该梯度作为平台方法继续优化的基础。

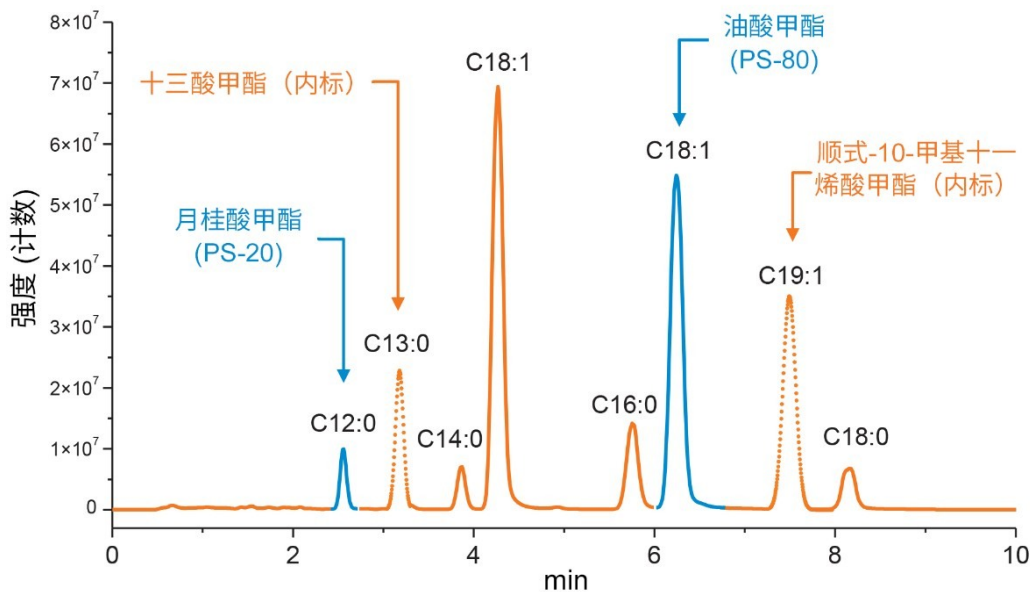


图3.脂肪酸色谱图。使用优化的反相梯度条件结合ACQUITY QDa质谱检测器进行SIR检测分析聚山梨酯中常见甲基化脂肪酸得到的RPLC-MS叠加色谱图。

水解效率

水解技术在聚山梨酯的分析中并不罕见。虽然该技术在GC-MS分析中获取特征组成信息方面更常用，但也可以提供定量信息，例如使用完整蛋白质质量数分析方法评估药品中聚山梨酯的浓度。此外，如果完整水平的样品基质或成分会干扰或增加质谱图复杂性，则可能需要使用水解技术。在本例中，蛋白质基质水解为碱性氨基酸的过程在水解步骤中同时发生，从而降低了其干扰聚山梨酯分析的可能性。为评价水解效率，我们开展了一项为期24 h的时间研究，以确定裂解率高于95%的合适条件以便进行定量分析。简单来讲，就是在Eppendorf 5 mL锥形管中以不断增加的时间间隔在65 °C条件下使包含USP级聚山梨酯（Sigma Aldrich部件号：1547925-2G，CAS：9005-64-5）的储备液单份试样在0.5 M NaOH中发生碱水解。仔细密封样品瓶，尽量减少蒸发损失，否则可能对结果产生不利影响。对溶液进行酸化处理，并使用己烷进行液-液萃取以分离裂解的脂肪酸，然后在RPLC条件下使用优化的梯度进行分离。对目标峰进行积分，并将峰面积作为时间的函数作图。如图4所示，以聚山梨酯20为例，在PS-20（月桂酸）或PS-80（油酸）中裂解95%以上的主要脂肪酸需要至少15 h。这与Hewitt等人报道的研究结果一致，他们在聚山梨酯的强制降解研究中观察到类似的裂解效率行为⁴。

本研究将18 h确定为理想水解时间，此时间容纳了一定程度的差异性，并使脂肪酸水解率高于95%。需要注意的是，可使用更短的水解时间进行样品定性评估或作为诊断工具。

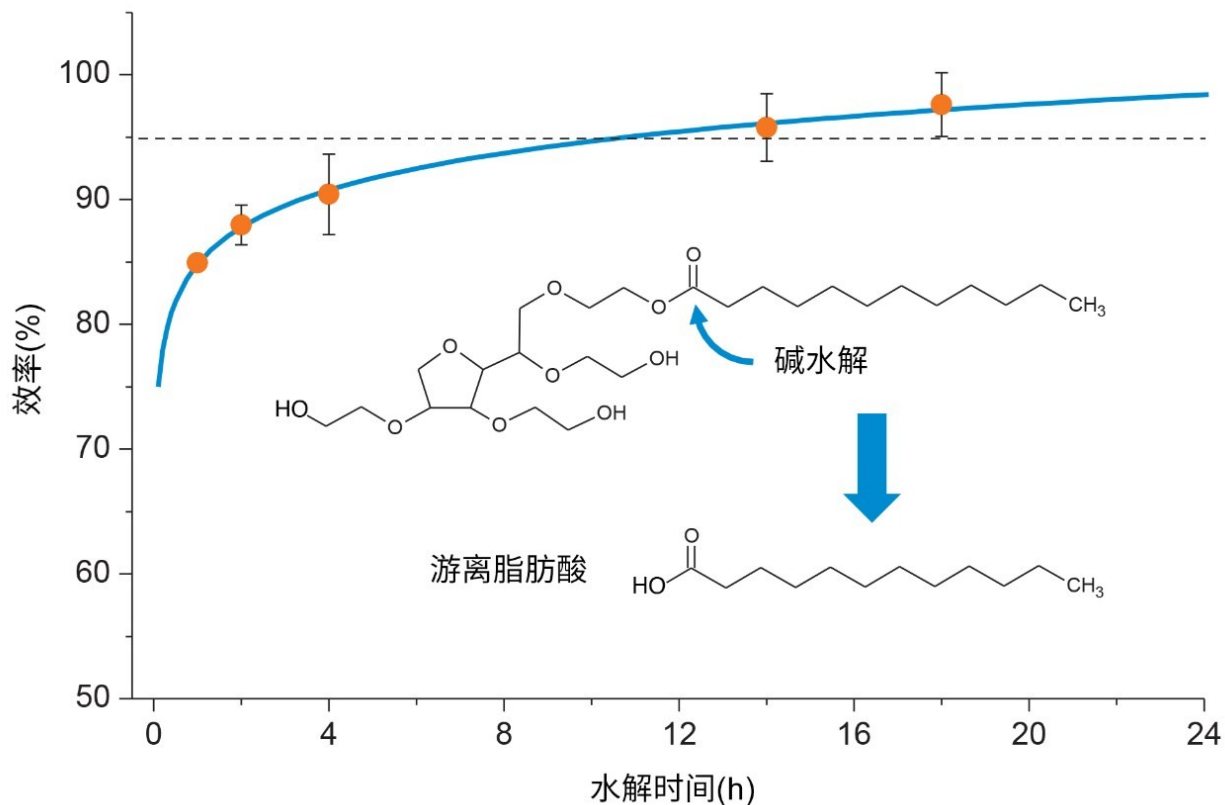


图4.水解效率。聚山梨酯20在60 °C的0.500 M NaOH中发生碱水解的24 h时间研究结果。

MS灵敏度

正如我们之前的研究以及文献所述，游离脂肪酸可以轻松实现电离，以便使用质谱仪作为终点检测器进行检测⁶。但是，如表1所示，聚山梨酯的组成可能因脂肪酸的类型和饱和度而异，由此会影响电离效率。为此，我们在优化过程中评价了每种聚山梨酯的主要脂肪酸（月桂酸与油酸）适用的检测模式（正离子与负离子）以及结构（甲基化与非甲基化）。结果并未完全超出预期，在比较正离子和负离子模式下的谱图强度时，饱和脂肪酸（PS-20中的月桂酸）不像油酸(PS-80)那样容易电离，差异高达一个数量级（数据未显示）。有趣的是，虽然在游离脂肪酸分析中通常首选负离子模式以尽量减少水分损失并改善检测器响应，但在这项特定研究中使用负离子模式时，总体强度特征并未表现出明显改善²。其中部分原因可能是使用了未经优化的方法进行负离子模式采集。我们根据这些观察结果评价了改善MS响应的替代方法。最近，Ichihara等人提出了一种适用的甲醇分解/甲基化过程，该过程只需1 h，有可能成为一种提高MS响应的手段⁷。鉴于反应时间相对于当前方法的水解时间要求较短，我们调整了Ichihara及其同事报道的水解后1 h甲醇分解/甲基化步骤。简单来讲，就是在水解后将甲基化试剂加入样品瓶中（含8% HCl的甲醇溶液），注意尽量减少样品瓶顶部的空间以减小冷

凝效应。从尽量减少源内水分损失和提高正离子MS模式下检测器响应的角度评价结果。如图5所示，当使用正离子模式进行检测时，观察到甲基化脂肪酸（月桂酸甲酯）的MS响应是非甲基化脂肪酸（月桂酸）的10倍。此结果的部分原因在于源内水分损失减少，在甲基化脂肪酸中检测到的水分损失显著下降（甲基化脂肪酸中的水分损失低于5%，而非甲基化脂肪酸中的水分损失 $\geq 50\%$ ），并且羰基相对于气相中的羧酸基团具有更高的质子亲和力。由于在甲基化脂肪酸中观察到灵敏度显著提高并且所需的样品前处理操作非常少，因此优化方法在水解步骤之后添加了使用甲醇的1 h甲基化步骤。

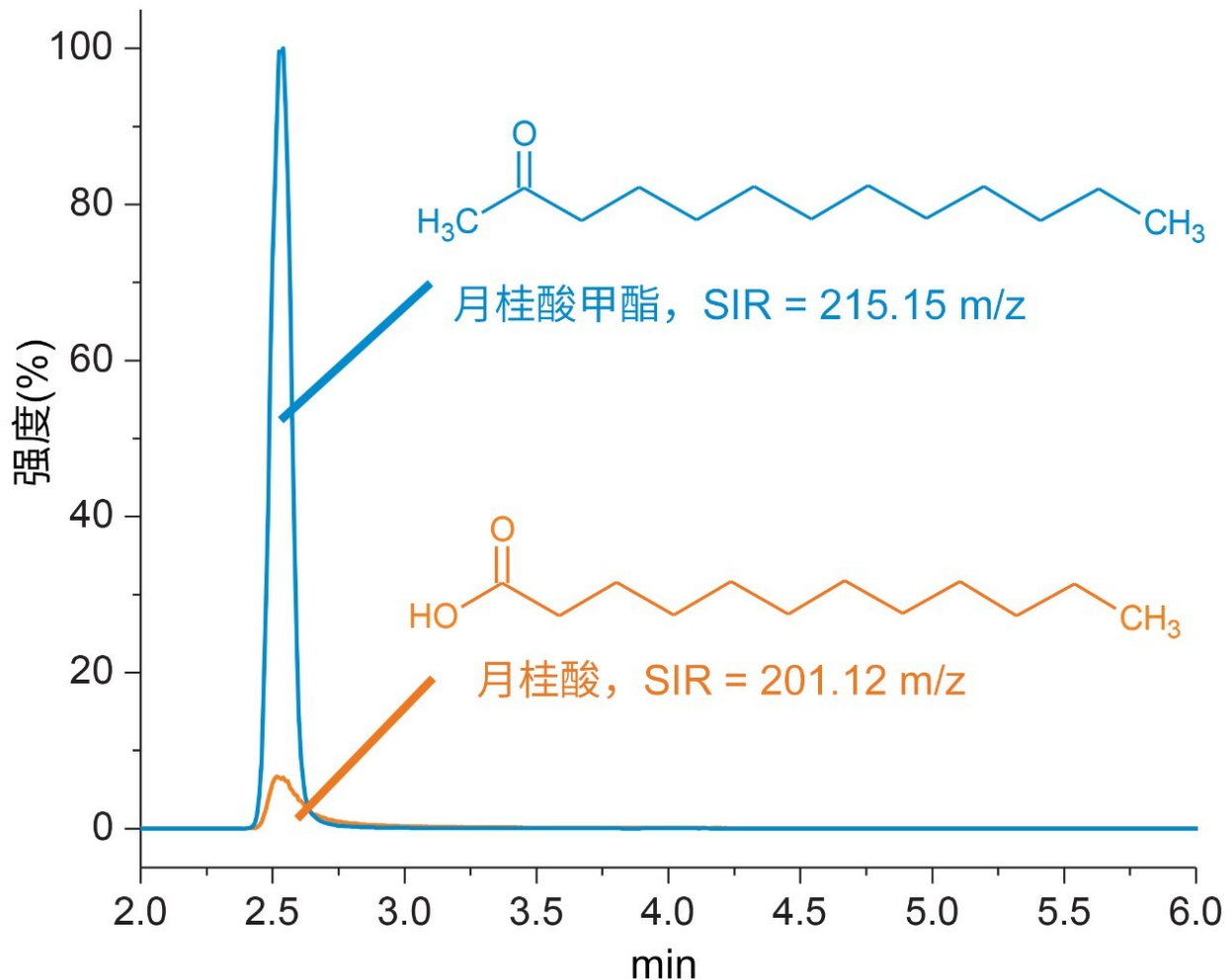


图5.MS响应。使用反相梯度条件结合ACQUITY QDa质谱检测器进行SIR检测分析月桂酸和月桂酸甲酯得到的RPLC-MS叠加色谱图。样品以基于重量的等效浓度制备并归一化至月桂酸甲酯。

提取效率

除提高MS响应以外，游离脂肪酸的甲基化还减少了液体萃取步骤中引入盐溶液以诱导相分离的需求（此方案在我们之前的方法中提出），由此简化了样品前处理操作并减少了外来盐的引入，否则这些盐可能抑制MS电

离效率并降低整体分析灵敏度。使用纯标准品进行抽提研究以确定甲基化脂肪酸的提取效率。简单来讲，就是制备低浓度(50 ppm)、中等浓度(250 ppm)和高浓度(500 ppm)的月桂酸甲酯和油酸甲酯储备液。将等体积的等分试样加入样品溶液中，该溶液准确反映了甲基化处理后样品基质的组成特征（不含蛋白质水解副产物氨基酸）。然后将1.0 mL己烷和水的等分试样加入样品中，略微涡旋混合，离心分离底部水层（盐/氨基酸）和顶部有机层（甲基化脂肪酸），使用3 mL平端Hamilton注射器(1725 RNR, GA 22/51 mm/pst 3)进行萃取。将萃取后的样品转移至独立的样品瓶中，干燥，并复溶于75:25乙腈:水中。使用相同的加标样品，将这一过程再重复两次。通过RPLC-MS方法以提取物进样间穿插空白进样的方式监测残留。使用相同的处理方法对色谱图进行积分，并使用整个萃取过程中的总峰面积来确定回收率%。如图6所示，在首次萃取中，以高浓度加标的月桂酸甲酯(PS-20)回收率达到99.2%，其余月桂酸甲酯在第二步萃取中得到萃取，且两次进样之间未观察到残留。在月桂酸甲酯和油酸甲酯的浓度范围内观察到类似的提取效率（数据未显示）。这些结果表明，脂肪酸甲酯会严格、高效地分配到有机相中，因此只需要分析一部分或等分有机相，大大简化了优化方法的萃取过程。

。

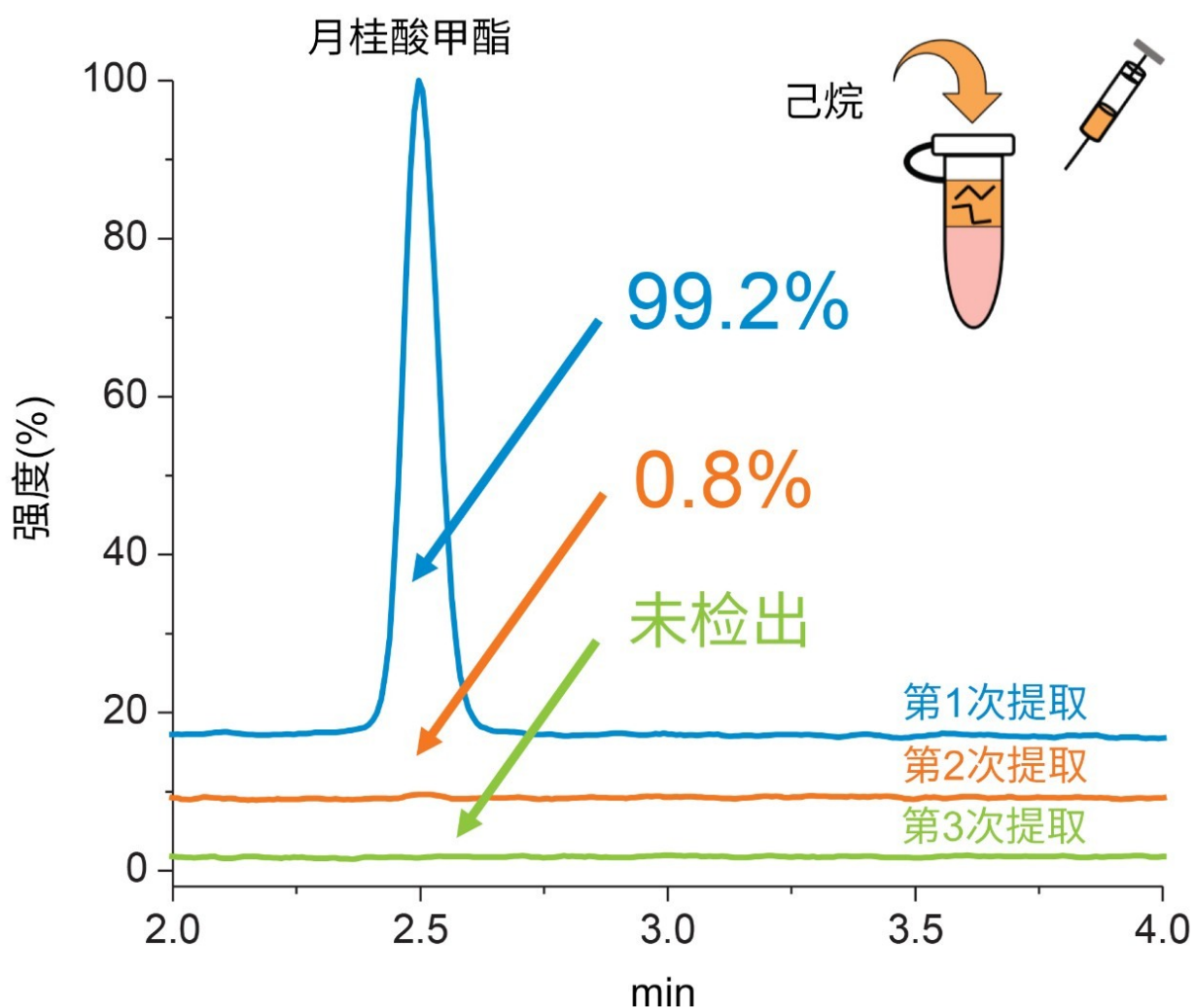


图6. 提取效率。75:25乙腈:水月桂酸甲酯加标样品3份提取物的RPLC-MS叠加色谱图。根据所有三次萃取的总峰面积计算出回收率%。

适用性

为证明当前研究结果的适用性，使用表2中所示的优化方法分析两种不同药品中的聚山梨酯浓度，其中一种药品包含聚山梨酯20（样品1），另一种则包含聚山梨酯80（样品2）。出于定量目的，根据表2中列出的原材料水解产物生成每种聚山梨酯的校准曲线，由此可以直接定量每个样品的聚山梨酯浓度，以提高分析准确度。此外，与之前的方法一样，使用购自Nu-Chek Prep, Inc.的内标十三酸甲酯(PS-20)和顺式10-甲基十一烯酸甲酯(PS-80)来解决样品前处理过程中的非特异性损失问题（如果有）。

工作流程	试剂	浓度	体积
1) 水解	内标	0.3%，溶于甲醇	50 μ L
	样品	~	50 μ L
	NaOH	0.5 M	50 μ L
	在65 °C下温育		18h
2) 甲基化	HCl	1.0 M	50 μ L
	甲醇	~	1.5 mL
	甲基化试剂	8% HCl的甲醇溶液	0.3 mL
	在100 °C下温育		1h
3) 萃取	己烷	~	1 mL
	水	~	1 mL
	萃取	顶层	0.5 mL
	干燥	~	~
	75:25	~	0.5 mL ²
	乙腈:水	~	

表2. 优化的样品前处理方法。“一锅法”水解和甲基化样品前处理程序，使包含聚山梨酯的原材料或溶液在碱水解后发生游离脂肪酸甲基化。

简单来讲，就是用LC-MS级水连续稀释1000 ppm (wt/wt)原材料聚山梨酯储备液，制备浓度为50 ppm、100 ppm、150 ppm、200 ppm、250 ppm 和300 ppm的六种聚山梨酯溶液。将六种溶液的50 μ L等分试样转移至5 mL Eppendorf锥形管中（盛有50 μ L内标），随后加入50 μ L 0.5 M NaOH。用胶带仔细密封锥形管以尽量减小蒸发损失。在65 °C下温育18 h后，将反应容器冷却至室温，并用50 μ L 1.0 M HCl酸化。然后进行甲醇分解/甲基化，同样注意在加入甲基化试剂后仔细密封容器。在100 °C下温育1 h后，将反应容器冷却至室温，然后向反应溶液中加入1 mL己烷和1 mL水。随后对反应容器进行涡旋混合并离心，以分离有机层和水层。取一部分(0.5 mL)顶部有机层用真空离心机萃取并干燥。然后将样品重悬于0.50 mL的75:25乙腈:水中。使用50 μ L样品1和样品2的等分试样，以相同方式制备三份样品。使用LC-MS级甲醇连续稀释1000 ppm wt/wt储备液，用75:25乙腈:水制备浓度为100 ppm的内标对照。

如图7所示，按照优化方案使用原材料聚山梨酯生成校准曲线后，可直接确定每个原料药样品中的聚山梨酯浓度。本例测得样品1中包含 152 ± 2 ppm聚山梨酯20，样品2中包含 242 ± 6 ppm聚山梨酯80。校准曲线呈现的高度线性以及三分重复样之间的细微偏差说明，ACQUITY QDa质谱检测器在检测分析物浓度细微变化时具有出色的一致性和准确性。该方法的灵敏度表现如下：根据表2中列出的样品和提取体积，检测前将样品和校准曲线标样从初始浓度稀释了20倍。这种情况下得到的数据证明了ACQUITY QDa质谱检测器为该方法带来的价值，其能够有效检测接近亚ppm水平范围内的脂肪酸甲酯。由于月桂酸(PS-20)等饱和脂肪酸的响应因子普遍较低，因此这一结果令人惊叹。在类似分析中，可轻松调整样品基质体积以浓缩或进一步稀释样品，提供可扩展性以应对不同实验室的样品浓度差异性。综上所述，这些结果表明改进后的方法可以广泛应用于整个组织中

，分析和定量含聚山梨酯的生物药物产品。

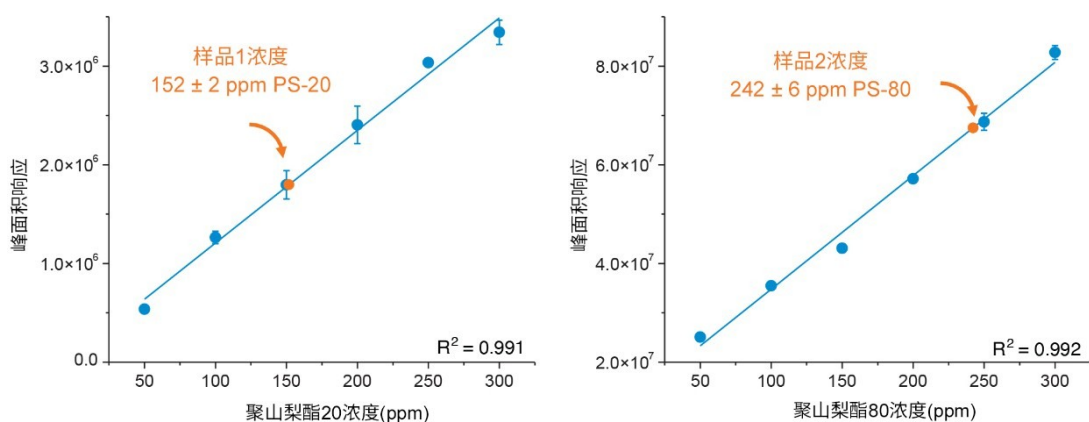


图7.实验结果。使用聚山梨酯20和聚山梨酯80原材料得到的月桂酸甲酯和油酸甲酯连续稀释液的峰面积响应校准图（蓝色数据）。绘制样品1（含PS-20）和样品2（含PS-80）的峰面积结果，根据校准图确定的相应浓度显示为橙色数据。

结论

聚山梨酯20和聚山梨酯80等表面活性剂用作稳定性辅料时，进行表征和监测对于确保药品的稳定性、安全性和有效性至关重要。但是，由于聚山梨酯原材料中含有各种成分，且其理化性质多变，为开发对目标分析物具有专属性和灵敏度的平台式方法增加了挑战。本研究证明基于MS的水解方法非常实用，该方法具有良好的灵敏度和专属性，可广泛应用于分析含聚山梨酯20或聚山梨酯80的样品。该方法可作为“一锅法”实施，减少了样品处理需求，可直接测量生物药品中的聚山梨酯。ACQUITY QDa质谱检测器使方法专属性和灵敏度进一步提升，进而能够使用RPLC梯度以适当的通量同时检测聚山梨酯20和聚山梨酯80的目标脂肪酸组分。此外，该方法具有良好的可扩展性，可以灵活部署在不同的实验室中分析不同聚山梨酯类型和浓度范围的样品。综上所述，这些结果证明了平台式水解方法在生物药物开发和生产中分析含聚山梨酯20或聚山梨酯80的样品方面的适用性和价值。

利益冲突声明

Aude Smeets、Michel Gerodez和Xavier Taillieu是葛兰素史克集团的员工。

参考资料

1. Kerwin, B. Polysorbate 20 and 80 Used in the Formulation of Protein Biotherapeutics: Structure and Degradation Pathways. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2007. 97(8):2924–2935.
2. Honemann, M., Wendler, J. Graf, T., Bathke, A., Bell, C. Monitoring polysorbate hydrolysis in biopharmaceuticals using a QC-ready free fatty acid quantification method. *Journal of Chromatography B*. 2019 Mar; 1116 (2019) 1-8.
3. Labrenz, S. Ester Hydrolysis of Polysorbate 80 in mAb Drug Product: Evidence in Support of the Hypothesized Risk After the Observation of Visible Particulate in mAb Formulations. 2014 May. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 103:2268–2277.
4. Hewitt, D., Zhang, T., Kao, T. Quantitation of polysorbate 20 in protein solutions using mixed-mode chromatography and evaporative light scattering detection. *Journal of Chromatography A*. 2008 Nov; 1215 (2008) 156–160.
5. Ilko, D., Braun, A., Germershaus, O., Meinel, L., Holzgrabe, U. Fatty acid composition analysis in polysorbate 80 with high performance liquid chromatography coupled to charged aerosol detection. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 2014 Nov; 94 (2015) 569–574.
6. Birdsall, R., Yu, Y. An Efficient UV-Based Method for the Assessment of Oleic Acid Content in Biotherapeutic Drug Products Containing Polysorbate-80. Waters Application Note 720006129EN <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2018/an-efficient-uv-based-method-for-the-assessment-of-oleic-acid-content--in-biotherapeutic-drug-products-containing-polysorbate-80.html>> .2008 Feb.
7. Ichihara, K., Fukubayashi, Y. Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography. *Journal of Lipid Research*. 2009 Sep.

致谢

Robert E. Birdsall、David Dao、Brooke M. Koshel、Ying Qin Yu（沃特世公司）；Aude Smeets、Michel Gerodez、Xavier Taillieu（葛兰素史克）；

特色产品

ACQUITY UPLC H-Class PLUS Bio系统 <<https://www.waters.com/10166246>>

ACQUITY UPLC可变波长紫外检测器 <<https://www.waters.com/514228>>

ACQUITY QDa质谱检测器 <<https://www.waters.com/134761404>>

Empower色谱数据系统 <<https://www.waters.com/10190669>>

720007249ZH, 2021年5月