

## HPLC-MS测定聚山梨酯20制药原料中的脂肪酸组成

Margaret Maziarz, Paul D. Rainville

Waters Corporation

### 摘要

聚山梨酯是一种非离子表面活性剂，广泛用作食品和药品中的辅料。由于其质量和纯度与药品安全性和患者健康相关，因此应采用适当的检测方法进行质量保证和控制。美国药典规定使用气相色谱(GC)-火焰离子化检测器(FID)方法分析聚山梨酯20，该方法将甲基化酸转化为游离脂肪酸，然后基于脂肪酸组成进行分析（美国药典国家处方集(USP-NF)2021第1版）。本研究提出了一种HPLC-MS联用方法来分析聚山梨酯20制药原料，新方法使用质谱检测技术测量脂肪酸组成，无需执行复杂的样品前处理程序，可实现快速直接的分析。

### 优势

- 通过HPLC-MS联用方法测量脂肪酸组成，快速评估聚山梨酯20制药原料质量
- 使用ACQUITY QDa检测器进行质谱检测的无发色团脂肪酸分析技术简单直接
- Arc HPLC系统具有稳定、可靠和可重现的性能

### 简介

聚山梨酯是一种非离子表面活性剂，业界表述常使用商品名“吐温”<sup>1-3</sup>，在药品生产中广泛用作乳化剂、稳定剂、润湿剂、增溶剂和分散剂<sup>3</sup>。

聚山梨酯是多种组分的复杂混合物，由饱和及/或不饱和脂肪酸的聚氧乙烯失水山梨醇单脂组成<sup>1</sup>。不同类型聚山

梨酯的区别在于脂肪酸侧链和酯化程度。由于其复杂性和异质性，聚山梨酯分析可能是一项艰巨的任务。此外，聚山梨酯缺乏UV检测所需的强发色团。针对主要聚山梨酯亚种的分析 and 表征已经开发并应用了多种分析技术，例如液相色谱(LC)结合电雾式检测器(CAD)、蒸发光散射检测器(ELSD)和质谱法<sup>1-3</sup>。其他技术则利用气相色谱(GC)结合质谱检测与核磁共振(NMR)进行分析<sup>2</sup>。若干文献报告方法能够定量单个聚山梨酯峰，但未能对所有脂肪酸提供专属性<sup>2</sup>。

聚山梨酯20在乳剂和混悬剂药品中广泛用作稳定剂，在滴眼液中用作润滑剂<sup>4</sup>。美国药典建议采用气相色谱-火焰离子化检测器(FID)方法，先将甲基化酸转换为游离脂肪酸，再基于脂肪酸组成分析聚山梨酯20<sup>5</sup>。该方法需要将聚山梨酯水解并衍生化为游离脂肪酸，此过程复杂且耗时，并不是QC实验室进行常规检测的理想方法。

本研究提出了一种基于脂肪酸组成分析聚山梨酯20制药原料的快速HPLC-MS方法（表1）。该方法可直接进样，省去复杂的样品前处理程序且无需使用气相色谱仪，快速准确地分析脂肪酸。

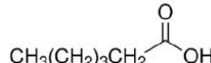
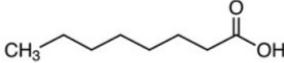
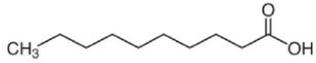
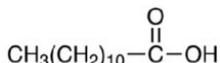
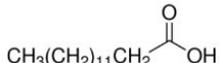
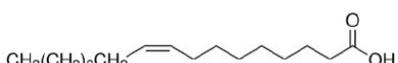
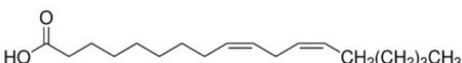
C-C链长	双键数量	脂肪酸	单同位素质量数 (Da)	结构
6	0	己酸	116.08	
8	0	辛酸	144.11	
10	0	癸酸	172.14	
12	0	月桂酸	200.11	
14	0	肉豆蔻酸	228.21	
16	0	亚油酸	256.24	
18	0	棕榈酸	284.27	
18	1	油酸	282.26	
18	2	硬脂酸	280.24	

表1. USP专论规定的聚山梨酯20所含脂肪酸<sup>5</sup>。C-C：碳-碳链长度。

## 实验

脂肪酸、聚山梨酯20和质谱级溶剂购自Sigma。

### 样品描述

用乙醇制备浓度为1 mg/mL的脂肪酸标准储备液。用水/乙醇(50:50, v/v)混合溶液将标准储备液稀释至浓度20  $\mu$ g/mL。

用1 M氢氧化钾水溶液水解聚山梨酯20供试品以释放出脂肪酸。将用1 M氢氧化钾制得的1.5 mg/mL供试品溶液在40 °C下温育6 h，然后用等体积1 M甲酸中和，用水/乙醇(50:50, v/v)混合溶液稀释至0.1 mg/mL，临分析前用PVDF针式过滤器过滤。

### 方法条件

#### 液相色谱条件

##### 液相色谱系统：

Arc HPLC系统、带制热/冷功能的柱温箱（配备被动预加热器）、ACQUITY QDa检测器、等度溶剂管理器(ISM)

##### 样品瓶：

LCMS最大回收样品瓶，容积2 mL（部件号：600000670CV）

##### 色谱柱：

XBridge BEH C<sub>18</sub>, 4.6 × 100 mm, 3.5  $\mu$ m（部件号：186003033）

##### 柱温：

60 °C

##### 样品温度：

10 °C

##### 进样体积：

25  $\mu$ L

##### 流速：

2.0 mL/min

流动相：

溶剂A：10 mM乙酸铵水溶液

溶剂B：乙腈

清洗溶剂：

灌注/样品清洗液：60:40水/乙腈

密封件清洗液：90:10水/乙腈

## 梯度表

时间 (min)	%A	%B	曲线
初始	95.0	5.0	6
1.00	95.0	5.0	6
1.10	60.0	40.0	6
14.00	5.0	95.0	6
16.00	5.0	95.0	6
16.10	95.0	5.0	6
20.00	95.0	5.0	6

## 质谱条件

质谱系统：

ACQUITY QDa检测器，Performance版本

电离模式：

ESI-

采集范围:	75–350 <i>m/z</i>
单离子扫描(SIR):	115.1, 143.1, 171.2, 199.2, 227.3, 279.3, 255.3, 281.3, 283.3 <i>m/z</i>
探头温度:	600 °C
毛细管电压:	0.5 kV
锥孔电压:	10 V

## 等度溶剂管理器(ISM)条件

补偿溶剂:	50:50水/乙腈 (含1 mM乙酸铵)
流速:	0.2 mL/min, 分流和稀释比为10:1

## 数据管理

色谱软件:	Empower 3 FR4SR2
-------	------------------

## 结果与讨论

本研究所用方法通过水解聚山梨酯20释放出脂肪酸，然后进行反相分离并使用质谱检测法测定脂肪酸组成。

饱和脂肪酸缺乏发色团（或双键），因此无法使用UV检测（表1）。虽然不能直接使用UV检测，但可以在ACQUITY QDa检测器上产生稳定的信号。MS总离子流色谱图(TIC)展示了ESI-模式下在*m/z* 75–350质量范围内检测到的所有峰（图1A）。从ACQUITY QDa检测器得到的质谱数据有助于快速鉴定脂肪酸。单离子扫描(SIR)模式可测定单个目标离子的强度（图1B），增强目标化合物的信号并简化其分析，因此在定量分析中使用单离子扫描(SIR)模式测量脂肪酸。

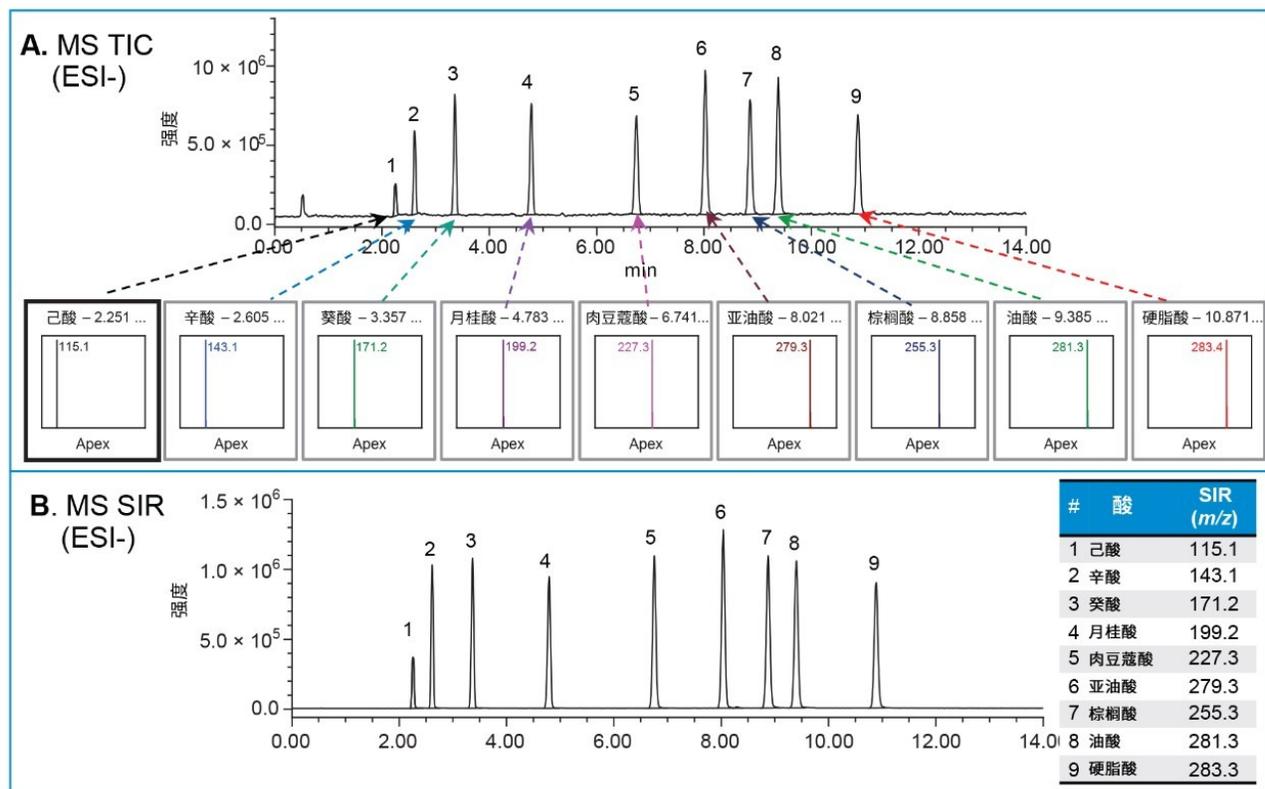
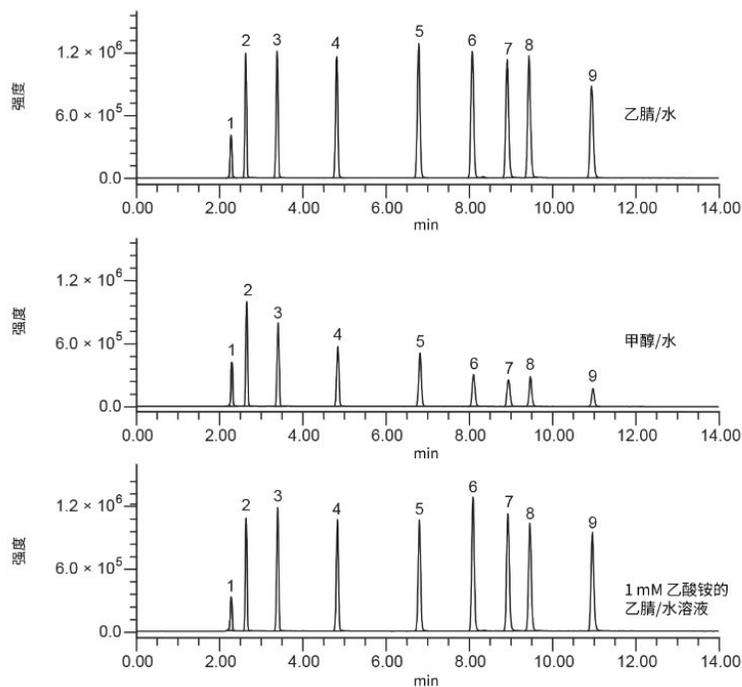


图1.利用ACQUITY QDa检测器分析游离脂肪酸。样品为20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准品溶液。A: 总离子流色谱图(TIC), B: 单离子扫描(SIR)通道叠加图。

利用等度溶剂管理器(ISM)<sup>6</sup>分流并稀释进入ACQUITY QDa检测器的液流。在柱后添加ISM补偿(稀释)溶剂,并与进入离子源的液流混合。研究期间筛选了包含乙腈、甲醇和乙酸铵缓冲液的各种ISM补偿溶剂,旨在增强MS信号,同时确保重复进样获得可接受的重现性。例如,包含乙腈和乙酸铵的补偿溶剂(图2)提供了稳定的脂肪酸信号,且重复进样( $n = 5$ )具有可接受的重现性。与研究期间筛选的其他补偿溶剂相比,使用1 mM乙酸铵补偿溶剂所得到的峰面积%RSD较低。



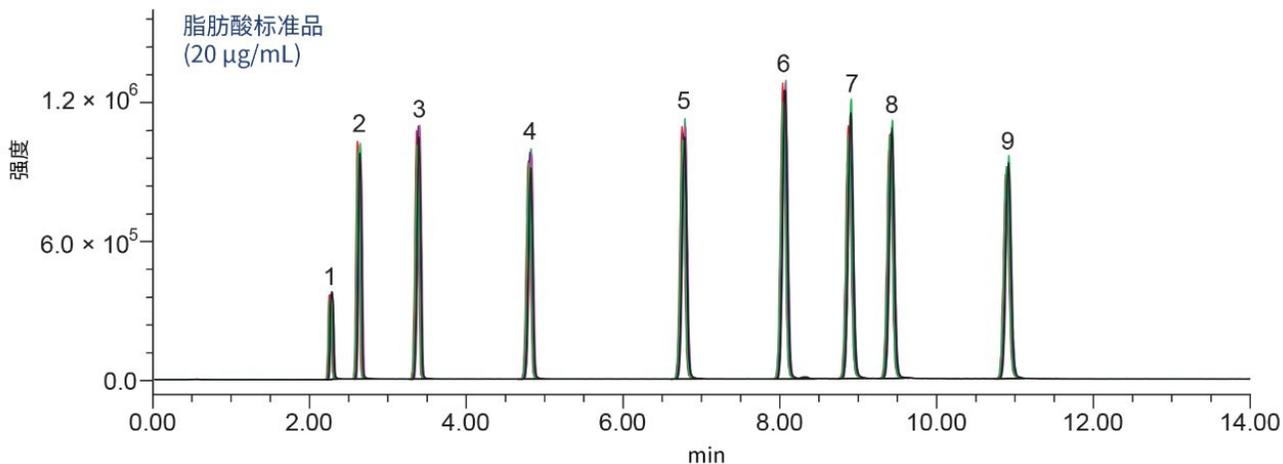
峰面积 %RSD

#	脂肪酸	乙腈/水	甲醇/水	1 mM AA 乙腈/水
1	己酸	2.47	1.10	2.39
2	辛酸	4.90	1.95	3.09
3	癸酸	2.89	3.96	2.88
4	月桂酸	5.91	2.40	2.66
5	肉豆蔻酸	3.83	5.78	2.77
6	亚油酸	2.21	9.91	3.20
7	棕榈酸	2.82	7.74	3.76
8	油酸	5.57	8.35	1.40
9	硬脂酸	5.97	6.47	3.14

图2. *ISM*补偿溶剂筛选，旨在增强MS信号和方法性能。A: 乙腈/水(50:50 v/v)，B: 甲醇/水(50:50 v/v)，C: 含1 mM乙酸铵的乙腈/水(50:50 v/v)。20 μg/mL脂肪酸标准品的MS S/R数据。

### 系统适应性

按照USP通则<621>“色谱法”中列出的质量标准，通过评估20 μg/mL脂肪酸标准品（图3）6次重复进样的系统适应性来衡量方法性能<sup>7</sup>。该方法成功分离出所有脂肪酸，且各峰之间的USP分离度( $R_s$ )  $\geq 4.2$ 。保留时间和峰面积的重现性(%RSD)范围分别为0.13~0.62%和1.29~4.19%。



System Suitability Report	
Sample Set ID: 9391	Result Set Id: 10037
Processed Channel Descr.: ([QDa 1: SIR Ch1]+[QDa 1: SIR Ch2]+[QDa 1: SIR Ch3]+[QDa 1: SIR Ch4]+[QDa 1: SIR	

#### 峰结果

名称	进样次数	平均RT	RT %RSD	峰面积 %RSD	平均USP 分离度	平均USP 拖尾因子
1 己酸	6	2.279	0.62	2.85		1.0
2 辛酸	6	2.653	0.59	2.82	4.8	1.0
3 癸酸	6	3.389	0.45	2.61	8.9	0.9
4 月桂酸	6	4.814	0.34	3.10	14.7	1.0
5 肉豆蔻酸	6	6.776	0.24	2.66	17.9	1.0
6 亚油酸	6	8.059	0.20	2.89	11.0	1.0
7 棕榈酸	6	8.895	0.17	4.19	6.9	1.0
8 油酸	6	9.421	0.15	1.29	4.2	1.0
9 硬脂酸	6	10.909	0.13	2.87	11.6	1.0

图3.20 µg/mL脂肪酸标准溶液6次重复进样的系统适应性评估结果。MS SIR数据。

## 聚山梨酯20分析

使用Empower软件，通过比较色谱进样中各脂肪酸的峰面积与所有脂肪酸的总面积，计算聚山梨酯20样品中各脂肪酸的百分比(%)。按照有关聚山梨酯20的USP专论进行计算<sup>5</sup>。聚山梨酯20样品溶液中脂肪酸组成的结果符合USP标准(图4)。

### 聚山梨酯20供试品分析

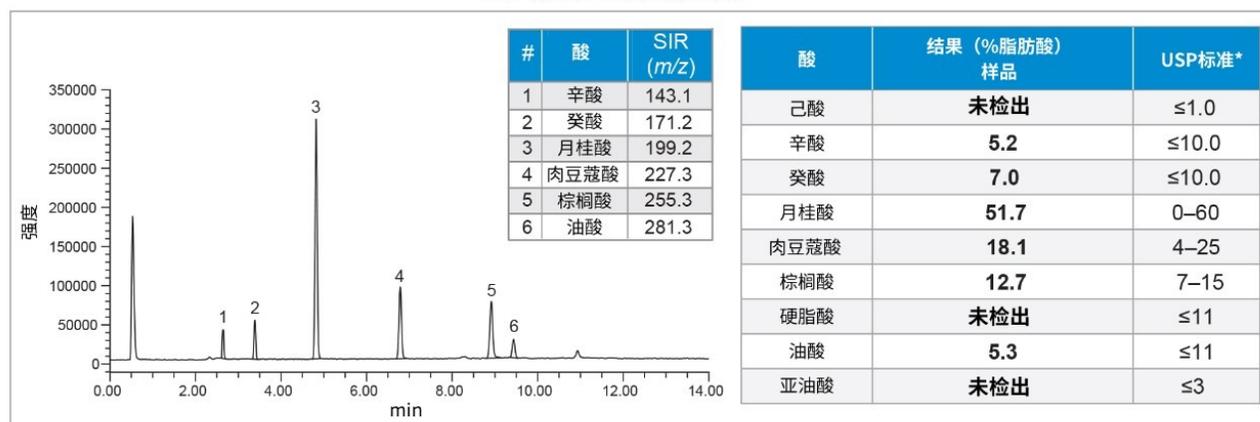


图4.聚山梨酯20供试品溶液中脂肪酸组成的测定结果（平均值， $n = 6$ ）。\*标准参考有关聚山梨酯20的USP专论<sup>5</sup>。

## 结论

本研究开发的HPLC-MS方法能够快速测定聚山梨酯20中的脂肪酸组成，并且无需对供试品进行复杂的水解和衍生化程序。通过质谱检测得到的质谱数据有助于准确快速地鉴定分析物。新方法可准确评估聚山梨酯20制药原料的质量和纯度，同时提高样品组分确认的可信度。

总体而言，Arc HPLC是一种现代仪器，提供了强大的性能、高进样精度、低残留和高耐压耐受性。ACQUITY QDa检测器是一款稳定且简便易用的质谱检测器，可提供准确可靠的结果。这些技术可轻松应用于QC实验室中制药原料的常规检测。

## 参考资料

1. Borisov OV, Ji JA, Wang YJ, Vega F, Ling VT. Toward Understanding Molecular Heterogeneity of Polysorbates by Application of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry with Computer-Aided Data Analysis. *Analytical Chemistry*, 2011, 3934-3942:83.
2. Martos A, Koch W, Jiskoot W, Wuchner K, Winter G, Friess W, Hawe A. Trends on Analytical Characterization of Polysorbates Their Degradation Products in Biopharmaceutical Formulations. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2017, 1722-1735:106.

3. Wang Z, Wang Y, Tie C, Zhang J. A Fast Strategy for Profiling and Identifying Pharmaceutical Excipient Polysorbates by Ultra-High Performance Liquid Chromatography coupled to High-Resolution Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2021, 460450:1609.
4. <https://go.drugbank.com/drugs/DB11178> <<https://go.drugbank.com/drugs/DB11178>>.
5. USP Monograph for Polysorbate 20, United States Pharmacopoeia, USP–NF 2021 Issue 1. The United States Pharmacopoeia Convention, Official 01-May-2020.
6. ACQUITY等度溶剂管理器概述和维护指南. 沃特世用户指南, [715004208ZH](https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/715004208ZH) <<https://www.waters.com/webassets/cms/support/docs/715004208ra.pdf>>, 修订版A, 2013.
7. USP General Chapter, <621>, Chromatography, USP–NF 2021 Issue 1, The United States Pharmacopoeia Convention, Official 01-August-2017.

## 特色产品

- [Arc HPLC系统](https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135068659) <<https://www.waters.com/waters/nav.htm?cid=135068659>>
- [ACQUITY QDa质谱检测器](https://www.waters.com/134761404) <<https://www.waters.com/134761404>>
- [Empower色谱数据系统](https://www.waters.com/10190669) <<https://www.waters.com/10190669>>

720007336ZH, 2021年8月



© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.