

使用HPLC-MS联用方法测定聚山梨酯80制药原料中的脂肪酸

Margaret Maziarz, Paul D. Rainville, Kerri M. Smith

Waters Corporation

摘要

聚山梨酯80是一种非离子表面活性剂，广泛用作药物制剂中的辅料。辅料的质量及纯度对于成品药的安全性至关重要，因此必须使用合适的分析检测方法予以监测。美国药典(USP)建议使用气相色谱(GC)结合火焰离子化检测(FID)方法，根据脂肪酸组成评估聚山梨酯80的质量（USP-NF 2021年第1期）。该方法需要将聚山梨酯80水解并使甲基化酸转化为游离脂肪酸。本研究提出了一种HPLC-MS联用方法来分析聚山梨酯80制药原料中的脂肪酸，新的HPLC方法通过直接分析来快速准确地测定脂肪酸，无需使用复杂的样品前处理程序及气相色谱仪。

优势

- 使用HPLC-MS联用方法直接分析脂肪酸组成，借此快速评估聚山梨酯80制药原料质量
- 使用ACQUITY QDa质谱检测器，通过质谱检测分析无发色团脂肪酸
- Arc HPLC系统具有稳定、可靠和可重现的性能

简介

聚山梨酯80又称吐温80，是一种常见的非离子表面活性剂，广泛用作药品中的辅料或非活性成分¹⁻³。它的主要功能是提高难溶性药物的溶解度以及稳定用于注射给药或疫苗接种的水性制剂。

聚山梨酯80是饱和及不饱和脂肪酸酯和山梨醇酐与约20摩尔环氧乙烷共聚的混合物²。文献中描述了将液相色谱(LC)与电雾式检测器(CAD)、蒸发光散射检测器(ELSD)和高分辨率质谱仪结合用于定量和表征聚山梨酯80的多种分析技术¹⁻⁴。还报告了将离子淌度分离与串联质谱、超临界流体色谱和核磁共振技术联用的其他方法³⁻⁴。但是,分析通过这些技术得到的复杂数据是一项耗时且艰巨的任务。此外,这些方法虽然能够定量单个聚山梨酯80峰,但未能对所有脂肪酸提供专属性²。由于聚山梨酯80不含强发色团,因此UV方法不适用。USP规定了一种GC-FID方法,通过水解聚山梨酯80并使甲基化酸转化为游离脂肪酸来实施质量评估⁵。此过程复杂且耗时,并不是常规检测的理想方法。

本研究开发出一种HPLC-MS方法,通过直接分析水解样品来测定聚山梨酯80制药原料中的脂肪酸组成。不同批次样品的分析显示存在USP目前尚未规定的其他脂肪酸。利用与UPLC系统联用的四极杆飞行时间(QToF)质谱仪验证这些脂肪酸的鉴定结果。

新的HPLC-MS方法通过直接分析水解样品,省去了复杂的样品前处理程序且无需使用气相色谱仪,能够快速评估聚山梨酯80制药原料质量。

实验

脂肪酸购自Sigma和Nu-Chek Prep, Inc。聚山梨酯80和质谱级溶剂购自Sigma。

样品描述

用乙醇配制浓度为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10 μg/mL。

用1 M氢氧化钾(KOH)水溶液水解聚山梨酯80供试品以释放出脂肪酸。将用1 M KOH制得的1.5 mg/mL供试品溶液在40 °C下培养6 h,然后使溶液冷却至室温,用等体积1 M甲酸中和,并用水/乙醇(50:50, v/v)混合溶液稀释至0.1 mg/mL。所有供试品溶液临分析前用GHP针式过滤器(部件号:[WAT097962 < https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/sample-preparation--filtration/wat097962-acrodiscghp13mm-02-m-w-minispikes-100-pk.html](https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/sample-preparation--filtration/wat097962-acrodiscghp13mm-02-m-w-minispikes-100-pk.html))过滤。

HPLC-MS方法条件

液相色谱系统:

Arc HPLC系统与带制热/冷功能的柱温箱(配备被动预热加热器)、ACQUITY QDa质谱检测器、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 ₁₈ , 4.6 × 100 mm, 3.5 μm (部件号: 186003033)
柱温:	60 °C
样品温度:	10 °C
进样体积:	25 μL
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 溶剂C: 异丙醇 (用于系统清洗)
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

UPLC-QToF方法条件

液相色谱系统:	配备Xevo G2-XS QToF的ACQUITY UPLC I-Class PLUS (FTN)
色谱柱:	XBridge BEH C ₁₈ , 2.1 × 150 mm, 1.7 μm (部件号: 186002353)
柱温:	60 °C

样品温度： 10 °C

进样体积： 2.0 µL

流速： 0.3 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

Gradient Table

时间 (min)	%A	%B	曲线
初始	60.0	40.0	6
2.10	60.0	40.0	6
30.00	20.0	80.0	6
30.10	5.0	95.0	6
32.00	5.0	95.0	6
32.10	60.0	40.0	6
36.00	60.0	40.0	6

质谱条件

质谱系统： Xevo G2-XS QToF质谱仪

电离模式：	ESI-
采集范围：	50–1200 <i>m/z</i>
分析器模式：	分辨率
毛细管电压：	2.0 kV
采样锥孔电压：	80
电离源补偿：	50
脱溶剂气温度：	600 °C
离子源温度：	120 °C
锥孔气流速：	10 L/h
脱溶剂气流速：	1000 L/h
实时校正标准液：	亮氨酸脑啡肽(556.2271 <i>m/z</i>)

数据管理

色谱软件：	MassLynx v4.2SCN996
-------	---------------------

结果与讨论

利用ACQUITY Arc系统结合ACQUITY QDa质谱检测器执行脂肪酸分析。利用等度溶剂管理器(ISM)⁶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。

USP⁵规定的脂肪酸如表1所示。饱和脂肪酸缺乏UV检测所需的发色团（或双键），但可在ACQUITY QDa检测器上产生稳定的MS信号。本研究开发的HPLC-MS方法成功分离了USP规定的所有脂肪酸（图1）。质谱数据能够快速

鉴定脂肪酸（图1A），而定量分析则采用单离子扫描(SIR)完成（图1B）。

酸	C:D*	单同位素质量数 (Da)	结构
肉豆蔻酸	14:0	228.21	<chem>CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)O</chem>
棕榈酸	16:0	256.24	<chem>CCCCCCCCCCCCCCCC(=O)O</chem>
棕榈油酸	16:1	254.22	<chem>CCCCC=CCCCCCCC(=O)O</chem>
硬脂酸	18:0	284.27	<chem>CCCCCCCCCCCCCCCCC(=O)O</chem>
油酸	18:1	282.26	<chem>CCCC=CCCCCCCCCCCC(=O)O</chem>
亚油酸	18:2	280.24	<chem>CCCC=CC=CCCCCCCC(=O)O</chem>
亚麻酸	18:3	278.22	<chem>CCCC=CC=CC=CCCC(=O)O</chem>

表1.有关聚山梨酯80的USP专论中规定的脂肪酸⁵

* C:D - 碳-碳链长度:双键数。

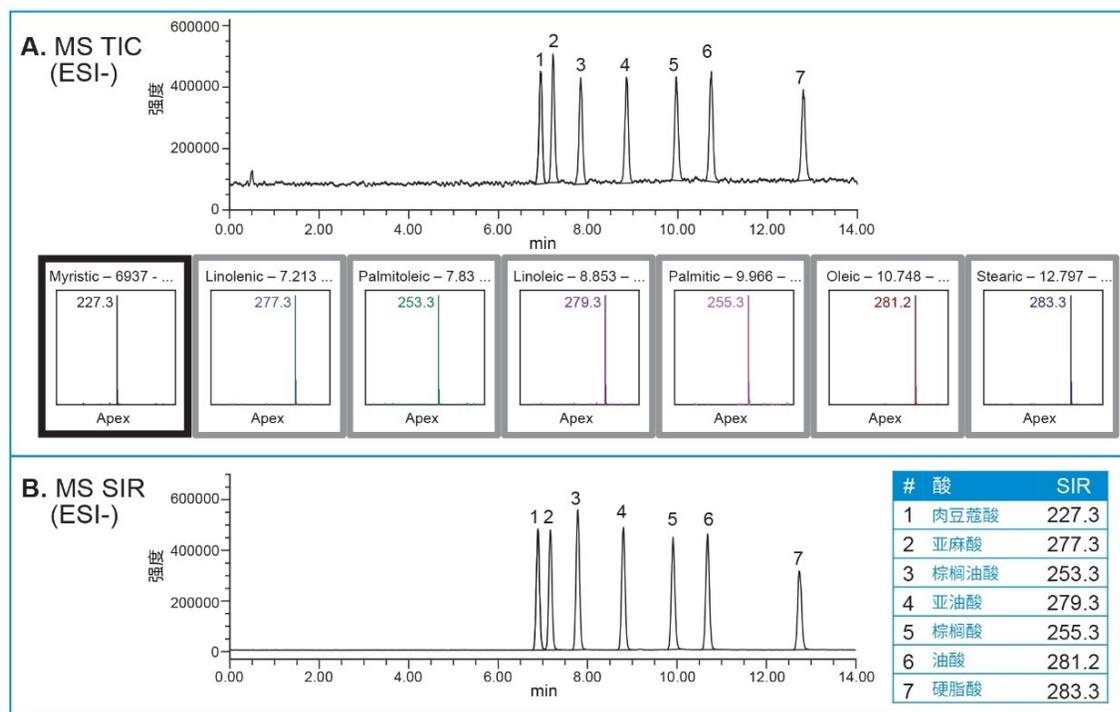


图1.ACQUITY Arc HPLC系统结合ACQUITY QDa质谱检测器分析USP规定脂肪酸的色谱分离结果。样品为10 μg/mL的标准品溶液。总离子流色谱图(TIC)和质谱数据(A)以及单离子扫描(SIR)通道叠加图(B)。

使用10 µg/mL脂肪酸标准品六次重复进样的结果评估方法重现性（图2）。保留时间和峰面积的相对标准偏差百分比(RSD)范围分别为0.12%~0.15%和1.77%~4.28%。各峰对之间的最低USP分离度为2.0。

 System Suitability Report Sample Set ID: 13861 Result Set Id: 13952 Processed Channel Descr.: [QDa 1: SIR Ch1]+[QDa 1: SIR Ch2]+[QDa 1: SIR Ch3]+[QDa 1: SIR Ch4]+[QDa 1: SIR]							
Peak Results							
	Name	# of Inj.	Ave RT	%RSD RT	%RSD Peak Areas	Ave USP Resolution	Ave USP Tailing
1	Myristic	6	6.918	0.15	2.33		1.0
2	Linolenic	6	7.199	0.14	1.85	2.0	1.0
3	Palmitoleic	6	7.810	0.15	1.77	4.3	1.1
4	Linoleic	6	8.831	0.16	4.28	7.0	1.0
5	Palmitic	6	9.943	0.13	3.20	7.3	1.1
6	Oleic	6	10.713	0.12	2.58	4.9	1.1
7	Stearic	6	12.774	0.12	2.35	12.8	1.1

图2.10 µg/mL脂肪酸标准品溶液六次重复进样的结果。ACQUITY Arc系统与ACQUITY QDa质谱检测器结合使用。MS SIR数据。

通过测量聚山梨酯80批次水解后释放的脂肪酸组成评估批次质量。研究过程中考察了不同的反应介质，确保从供试品中完全提取所有脂肪酸。这些反应介质包括水、水/乙醇(50:50, v/v)、1 M氢氧化钠 (NaOH)和1 M氢氧化钾(KOH)。将样品溶液在40 °C下培养6小时。研究表明，与用水和水/乙醇介质水解相比，碱水解释放出更多脂肪酸（图3）。此外，之前也有研究介绍碱水解在聚山梨酯80样品前处理中的应用¹。因此，所有样品均用1 M KOH水解，用甲酸中和，并用水/乙醇(50:50, v/v)稀释至0.1 mg/mL。对聚山梨酯80样品的分析显示，在9 min和11 min附近存在未知峰，其m/z值分别与亚油酸(18:2)和油酸(18:1)相同，分别为279.2和281.3（图4）。由此得出以下结论：未知峰为亚油酸与油酸的位置异构体。将Xevo G2-XS QToF质谱仪与UPLC系统联用，通过异构体标准品（购自Nu-Chek Prep.Inc.）的保留时间和分析，确认这些峰的鉴定结果。为执行UPLC分离，将HPLC条件缩放至1.7 µm粒径，尺寸为2.1 × 150 mm的色谱柱。

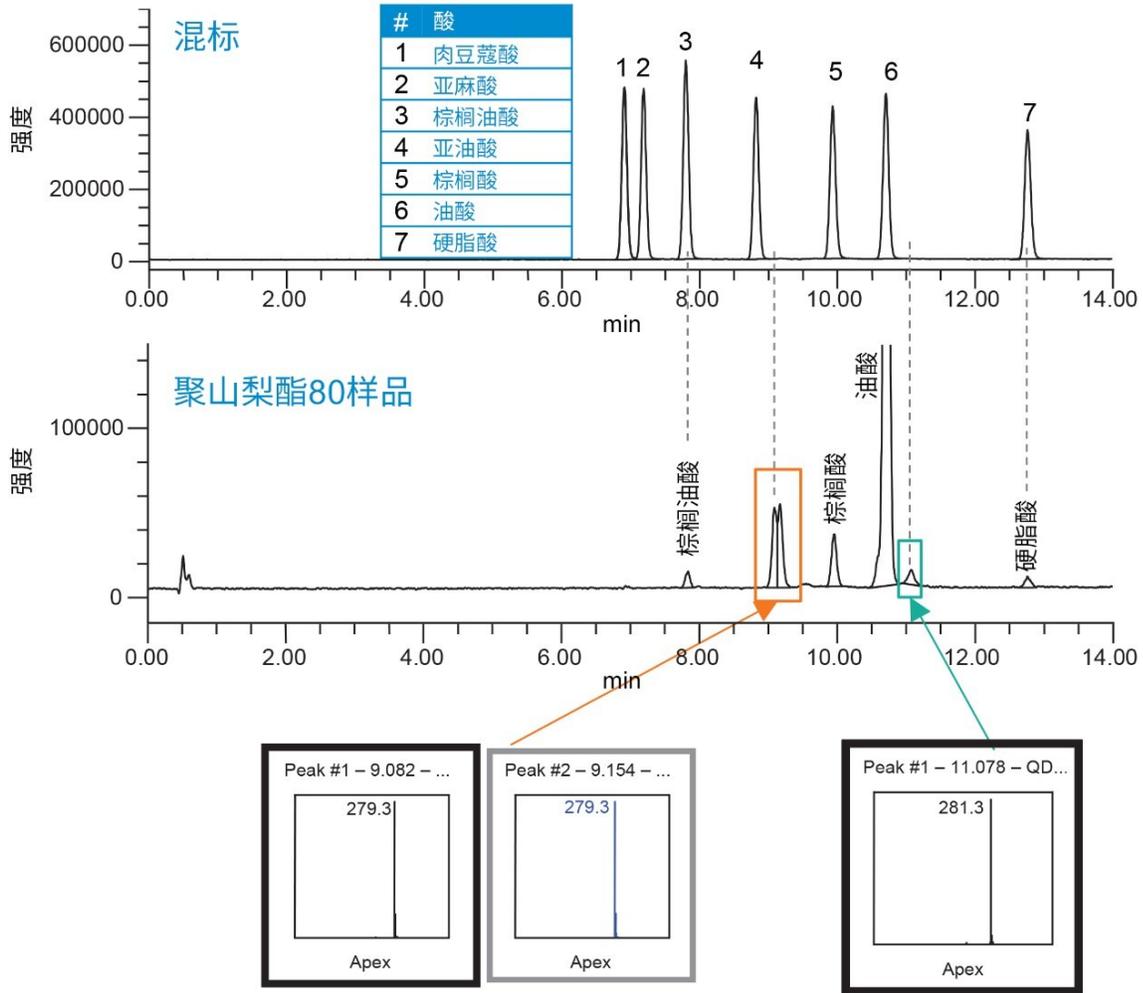


图4. Arc HPLC系统与ACQUITY QDa质谱检测器结合使用得到的聚山梨酯80样品分析结果，MS SIR数据。

使用QToF数据，将 m/z 为279.2的未知峰鉴定为共轭亚油酸异构体的混合物($\Delta 9, 11$; $\Delta 10, 12$) (图5)。质量精度分别为-0.5 mDa和0.4 mDa (图5C)。此外，分析显示存在油酸的两种位置异构体，分别在油酸峰之前和之后洗脱 (图6)。经鉴定，这些化合物为顺式异油酸和反油酸，质量精度分别为0.7 mDa和0.8 mDa (图6C)。

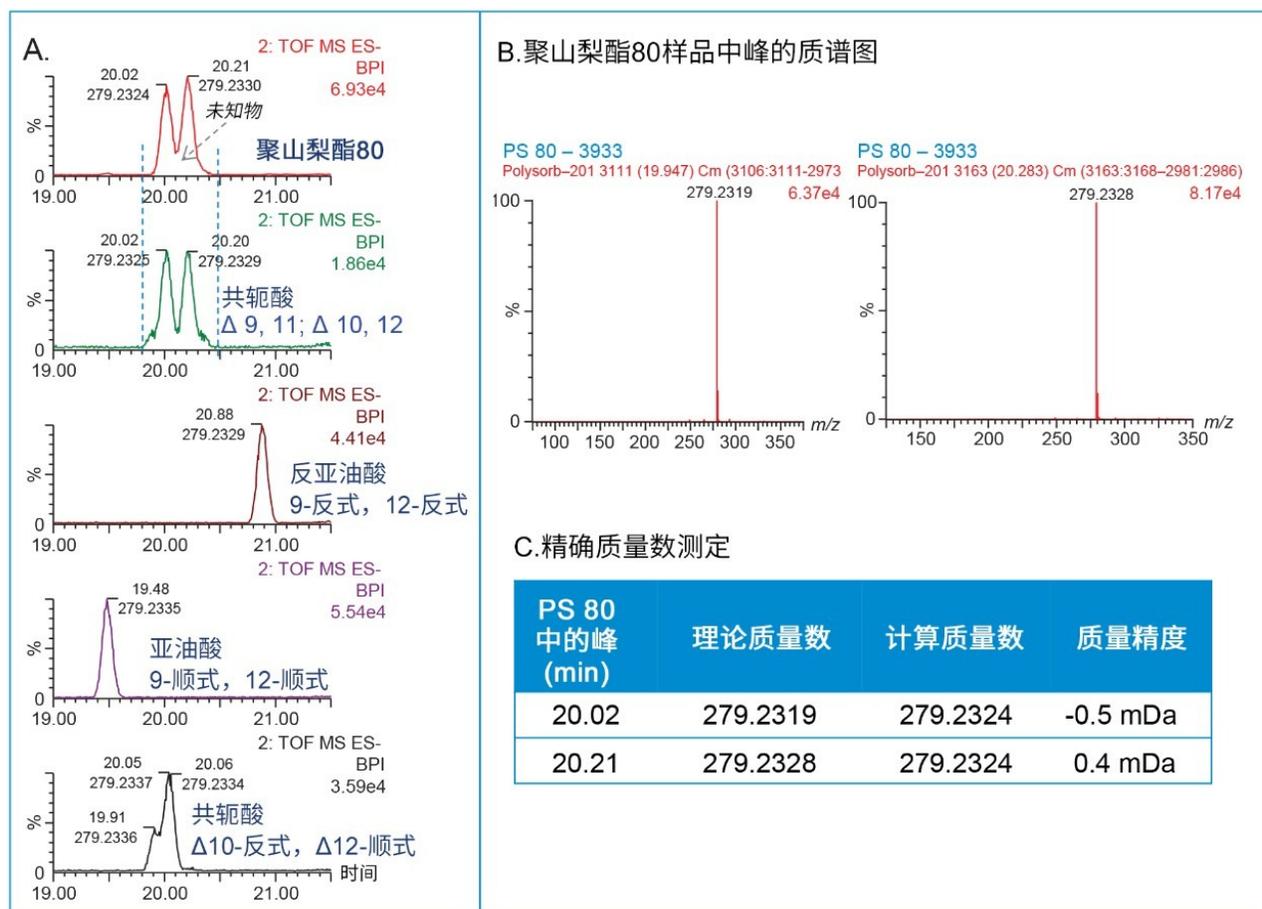


图5.Xevo G2-XS QToF数据。聚山梨酯80中的亚油酸异构体(A)、峰的质谱数据(B)以及精确质量数测定(C)。

按照USP规定，通过比较色谱进样中检出的各脂肪酸峰面积与所有脂肪酸的总峰面积，来确定聚山梨酯80批次的脂肪酸组成⁵。本例的计算包括在供试品中检出的USP规定脂肪酸以及通过新的HPLC-MS方法检出的亚油酸和油酸异构体，所有计算均在Empower软件中完成（表2）。所有三个被测批次的油酸含量范围为70.8~79.8%，符合不低于(NLT) 58.0%的USP标准。批次1的亚油酸含量为0.2%，在所有批次中检出共轭亚油酸异构体混合物($\Delta 9, 11; \Delta 10, 12$)的含量范围为11.5~12.2%。总而言之，在所有批次中发现的USP规定脂肪酸均处于USP标准限值范围内。

酸名称	SIR (m/z)	%酸 批次1	%酸 批次2	%酸 批次3	USP标准*
肉豆蔻酸	227.3	0.1	0.5	未检出	NMT 5.0%
亚麻酸	277.3	未检出	未检出	未检出	NMT 4.0%
棕榈油酸	253.3	1.2	1.1	1.0	NMT 8.0%
亚油酸	279.3	0.2	未检出	未检出	NMT 18.0%
共轭酸 △ 9,11; △ 10,12	279.3	11.5	12.2	11.6	N/A
棕榈酸	255.3	11.4	4.2	4.3	NMT 16.0%
顺式异油酸	281.2	1.1	未检出	未检出	N/A
油酸	281.2	70.6	79.2	79.8	NLT 58.0%
反油酸	281.2	1.9	1.3	2.0	N/A
硬脂酸	283.3	2.0	1.7	1.1	NMT 6.0%

表2.ACQUITY Arc系统与ACQUITY QDa质谱检测器结合使用获得的聚山梨酯80批次中脂肪酸组成(%酸)测定结果。NMT: 不超过; NLT: 不低于。* 有关聚山梨酯80的USP专论⁵。

结论

本研究开发的HPLC-MS方法能够快速测定水解聚山梨酯80的脂肪酸组成, 避免了GC分析所需的复杂样品预处理程序。此外, 这种新的方法能够分离有关聚山梨酯80的现行USP专论(USP-NF 2021年第1期)所述GC-FID方法中未规定的其他脂肪酸。使用QToF质谱仪所得数据, 将这些脂肪酸鉴定为亚油酸和油酸的异构体。

总之, Arc HPLC系统与ACQUITY QDa质谱检测器联用可提供准确可靠的结果, 使该技术适用于在QC实验室中对制药原料进行常规检测。

参考资料

1. Hu M, Niculescu M, Zhang XM, Hui A. High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Polysorbate 80 in Pharmaceutical Suspensions. *Journal of Chromatography A*, 2003, 233–236:984.
2. Mondal B, Kote Mahesh, Lunagariya C, Patel M. Development of a Simple High Performance Liquid Chromatography (HPLC)/Evaporative Light Scattering Detector (ELSD) Method to Determine Polysorbate 80 in Pharmaceutical Formulation. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 2020, 325–328:28.
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*, 2020, 460450:1609.

4. 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.
5. USP Monograph for Polysorbate 80, 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/715004208ra.pdf>>, 2013.

特色产品

- [Arc HPLC系统](https://www.waters.com/135068659) <<https://www.waters.com/135068659>>
- [ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统](https://www.waters.com/134613317) <<https://www.waters.com/134613317>>
- [ACQUITY QDa质谱检测器](https://www.waters.com/134761404) <<https://www.waters.com/134761404>>
- [Xevo G2-XS QToF四极杆飞行时间质谱仪](https://www.waters.com/134798222) <<https://www.waters.com/134798222>>
- [MassLynx MS软件](https://www.waters.com/513662) <<https://www.waters.com/513662>>

720007392ZH, 2021年10月



© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.