

Orbitrap超高分辨质谱表征药用辅料聚山梨酯（吐温）的成分

邝江濛 曹建明 郭藤 徐牛生

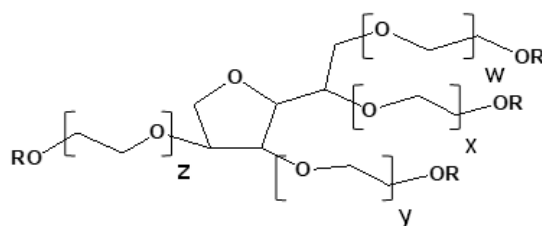
赛默飞世尔科技（中国）有限公司

关键词：药用辅料，吐温，Orbitrap，超高分辨质谱，成分表征

1. 引言

聚山梨酯（Polysorbate），亦称吐温（Tween），是一类非离子型的表面活性剂，为聚氧乙烯脱水山梨醇的脂肪酸酯，其脂肪酸链构成了疏水部分，聚氧乙烯链构成了亲水部分。由于其良好的表面活性、稳定性、生物相容性以及低毒性和低成本，吐温被广泛用作中药、化药、生物药等的乳化剂、增溶剂、湿润剂、分散剂和稳定剂。基于脂肪酸链的不同、酯化程度的不同、聚氧乙烯（POE）聚合度的不同以及脱水山梨醇的异构，可以衍生出成百上千种不同的结构（图1）。实际应用中，不存在所谓吐温的“纯品”，而是以上各系列成分的混合物。混合物中各成分的结构和相对含量均能够影响制剂的性能甚至安全性。因此，对吐温成分的详细表征在相关产品的研发和生产过程中十分必要。然而，由于吐温的组成复杂，各成分的结构也相近，使得对每一个成分的详细表征较为困难。目前采用的分析方法有液相色谱连接二极管阵列（DAD）、电喷雾（CAD）、蒸发光散射（ELSD）等不同的检测器直接分析，或者先将脂肪酸链水解再利用气相色谱进行分析。以上方法不仅耗时耗力，而且只能分析样品的整体情况，无法精确得到每种成分的结构和含量。静电场轨道阱质谱（Orbitrap）是一种超高分辨质谱仪，其超高的分辨率（> 120,000）、准确的质量测定（< 1 ppm）和极高的灵敏度（亚ppb级）能完整地检出吐温中含量各异的不同成分，并对其作出精确区分，再结合超高效液相色谱的分离，可以快速方便地对待测样品中的吐温成分进行完整、准确的表征。

本文使用赛默飞静电场轨道阱超高分辨质谱Orbitrap Exploris 120与液相色谱联用，分析了不同类型的吐温样品，采用Polymer Studio™药用辅料数据处理软件对采集数据进行处理，实现了对待测样品中吐温成分的快速准确表征。在此基础上，进一步比较了不同来源样品间的差异。本方案操作简单方便，结果细致准确，对于药用辅料吐温及其含吐温的药物制剂的研发、表征、质控均有帮助。



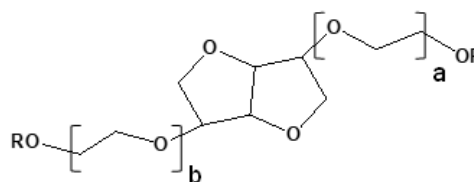
POE脱水山梨醇单脂肪酸酯: R=FA, H, H, H

POE脱水山梨醇双脂肪酸酯: R=FA, FA, H, H

POE脱水山梨醇三脂肪酸酯: R=FA, FA, FA, H

POE脱水山梨醇四脂肪酸酯: R=FA, FA, FA, FA

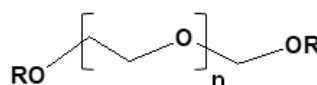
POE脱水山梨醇: R=H, H, H, H



POE异脱水山梨醇单脂肪酸酯: R=FA, H

POE异脱水山梨醇双脂肪酸酯: R=FA, FA

POE异脱水山梨醇: R=H, H



POE单脂肪酸酯: R=FA, H

POE双脂肪酸酯: R=FA, FA

POE: R=H, H

FA(Fatty Acid): 油酸、硬脂酸、棕榈酸、月桂酸等脂肪酸

图1 吐温成分的结构

2. 实验方法

2.1 样品前处理

分别选取5种不同的吐温样品，用10% 乙腈/水 (v/v) 稀释500倍，涡旋混匀，过0.22 μm滤膜后上机分析。

2.2 色谱条件

液相系统：Thermo Scientific Vanquish Horizon

色谱柱：Thermo Accucore™-150-C4, 100 X 2.1 mm, 2.6 μm

柱温：45 °C, forced air

流动相：A相：水 (5 mM 甲酸铵+0.1% 甲酸)；B相：乙腈

流速：0.4 mL/min

进样量：2 μL

洗脱模式：梯度洗脱 (表1)

表1 梯度洗脱程序

时间 (min)	B%
0	10
12	100
18	100
18.1	10
22	10

2.3 质谱条件

质谱系统：Thermo Scientific Orbitrap Exploris 120

离子源：ESI (+)

喷雾电压：3000 V

雾化温度：300 °C

毛细管温度：320 °C

鞘气：40 arb

辅助气：15 arb

反吹气：0 arb

RF透镜电压：70%

扫描模式：全扫描-全碎裂采集 (full MS-AIF)

数据类型：Centroid

MS¹扫描范围：m/z 200-3000

MS¹分辨率：120,000

AIF隔离范围：m/z 200-2000

HCD碰撞电压 (%)：20

MS²扫描范围：m/z 100-1000

MS²分辨率：15,000

3. 结果与讨论

以吐温80为例，图2展示的是样品的总离子流图 (TIC)。可以看出，吐温组成复杂，TIC图上明显分为几个不同的区域，但具体组成需要进一步分析。

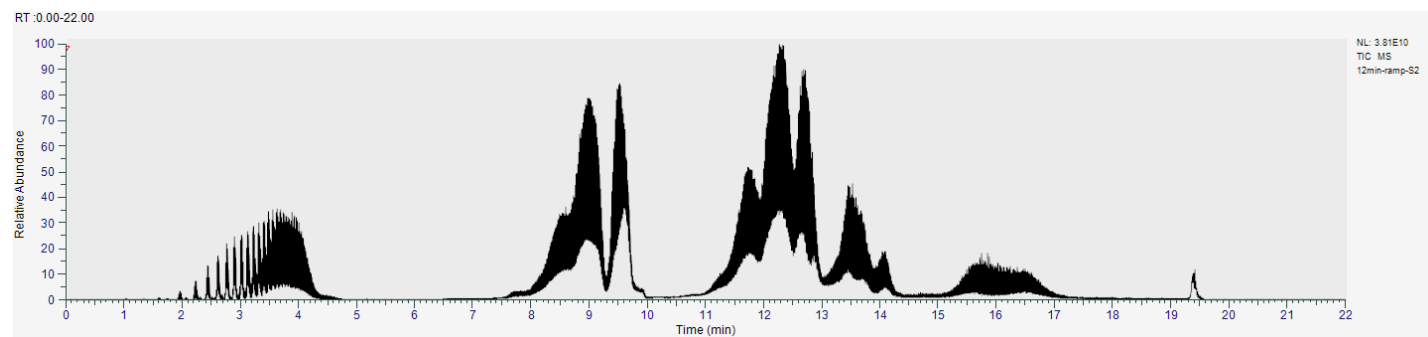


图2 吐温80样品的总离子流图

3.1 质谱数据分析

Orbitrap Exploris 120采集得到的高分辨质谱数据可通过一级高分辨准分子离子质荷比直接推断未知物分子式。以聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸酯类成分 (PSMO) 为例，如图3所示，质谱图上可清晰地观察到单电荷区 ($[M+NH_4]^+$) 与双电荷区 ($[M+2NH_4]^{2+}$) 峰簇，单电荷区相邻质谱峰间距m/z 44.02621，双电荷区相距 m/z 22.01311，与聚氧乙烯重复单元-C₂H₄O-的相对分子量相符。无论是单电荷还是双电荷区，质量测定误差均在1 ppm内。

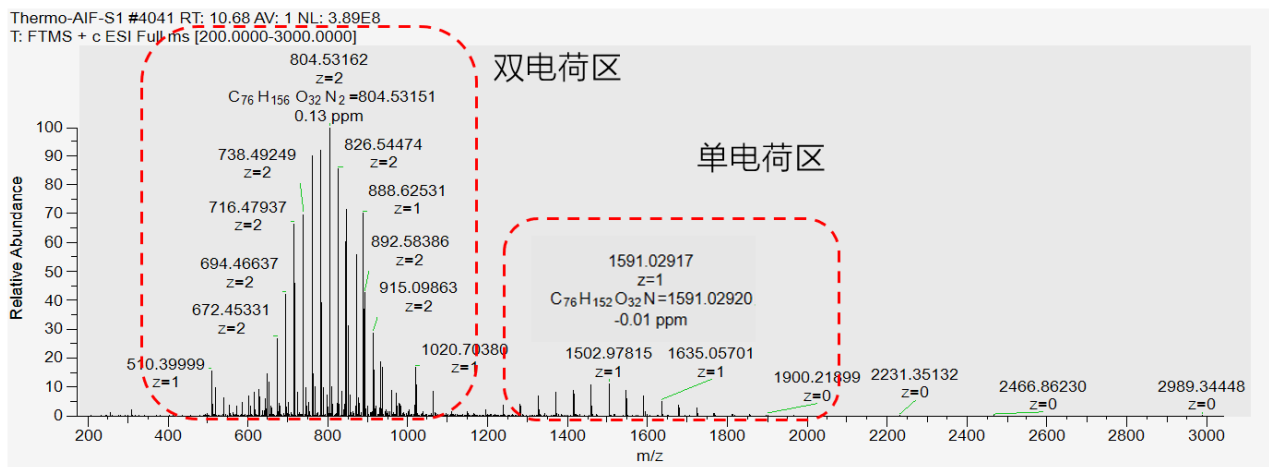


图3 PSMO的一级质谱图

吐温所含成分虽然数量多，但其二级质谱图中的特征碎片离子均遵循特定的规律，因此可以根据母核及脂肪酸链分为不同的亚类，同一亚类的成分均能产生相同的特征碎片。通过解析待测样本中化合物的特征碎片离子，可以实现吐温成分的进一步确证。Orbitrap不仅一级质量数测定准确，二级碎片的测定值也与理论值也相差无几 (< 3 ppm, 图4)。

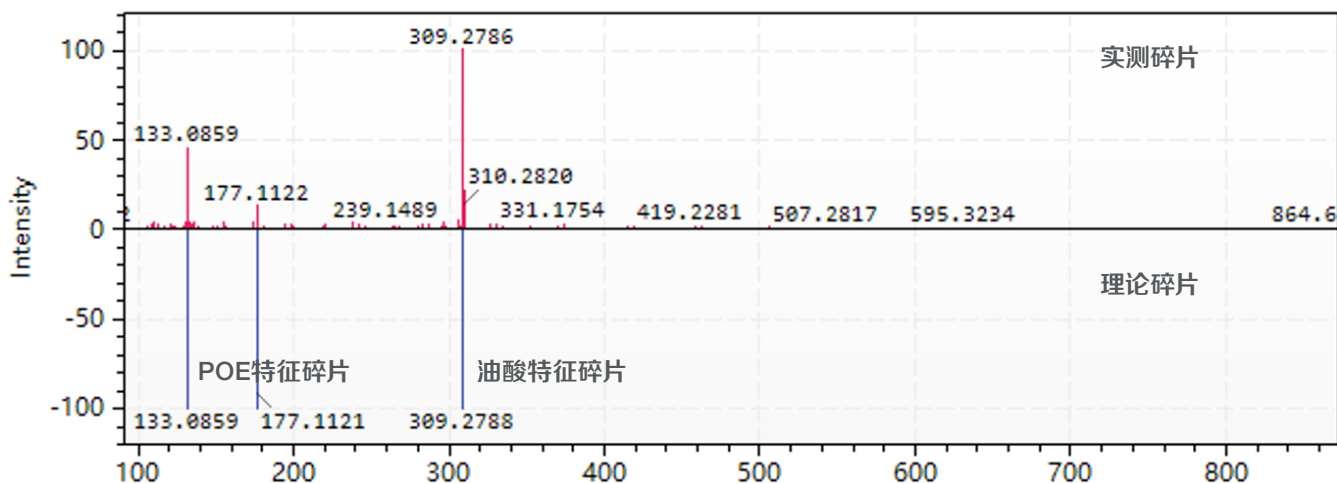


图4 PSMO二级特征碎片的比对

3.2 建立数学鉴别模型

依据吐温成分的一级高分辨质量数可提取出其XIC图（图5），由于同一亚类成分的母核相同，仅是聚合度不同，故不同聚合度的同亚类成分的保留时间具有一定规律性。以聚氧乙烯脱水山梨醇单油酸酯（PIMO）为例，其保留时间随着聚合度的增加而降低，符合线性关系，可建立相对保留时间与聚合度的数学关系模型（图6）。以此类推，吐温中每一类成分都可建立相对保留时间与聚合度的数学关系模型。因此，在分析未知样品时，在色谱条件不变的情况下，可以通过预测所有成分的保留时间作为化合物快速鉴定的依据。

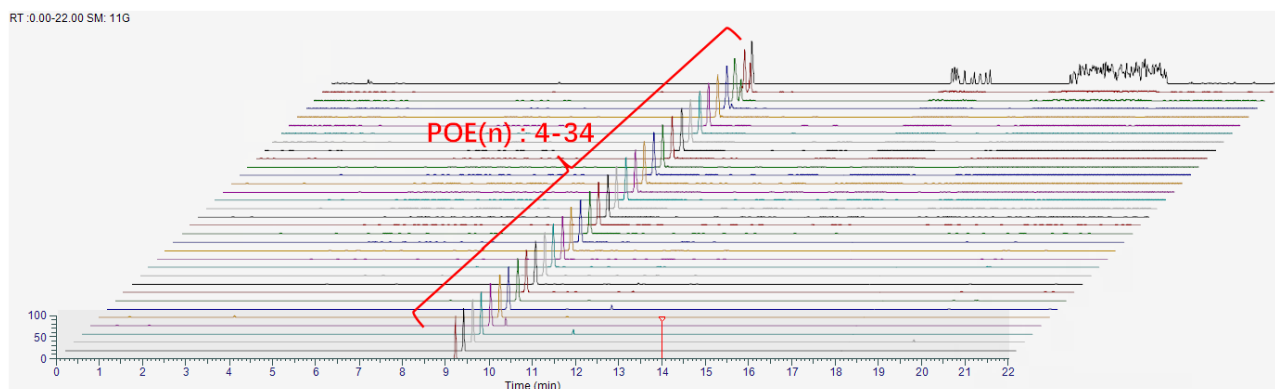


图5 不同聚合度PIMO的XIC叠加图

POE isosorbitan monooleate

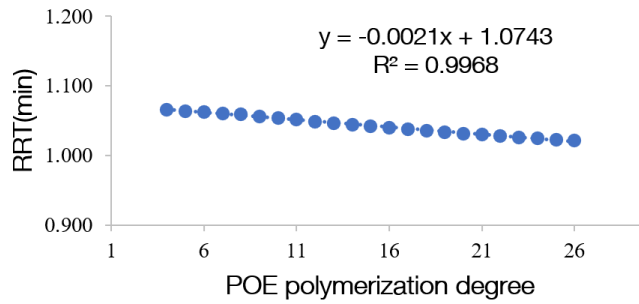


图6 PIMO的聚合度与相对保留时间关系的数学模型

3.3 样品分析流程

将吐温成分的一级高分辨准分子离子、二级特征碎片离子，以及通过数学模型预测的保留时间整合建立数据库（图7）。对于待测的药用辅料样品或药物制剂样品，采用相同的色谱质谱分析条件经过UHPLC-Orbitrap超高分辨质谱采集数据后，进行搜索，对待测样品中的吐温成分进行鉴定。为了快速实现该分析流程，中国医学科学院&北京协和医学院药物研究所张金兰团队和科迈恩（北京）科技有限公司联合研发了一款专门用于复杂药用辅料成分及其相关杂质精细表征与鉴定的色谱质谱数据处理软件Polymer Studio™。将待测样本的原始数据导入该软件后，通过选择数据库并设置检索参数后即可快速准确地获得样品中所有吐温成分的定性和相对定量分析结果^[1]。

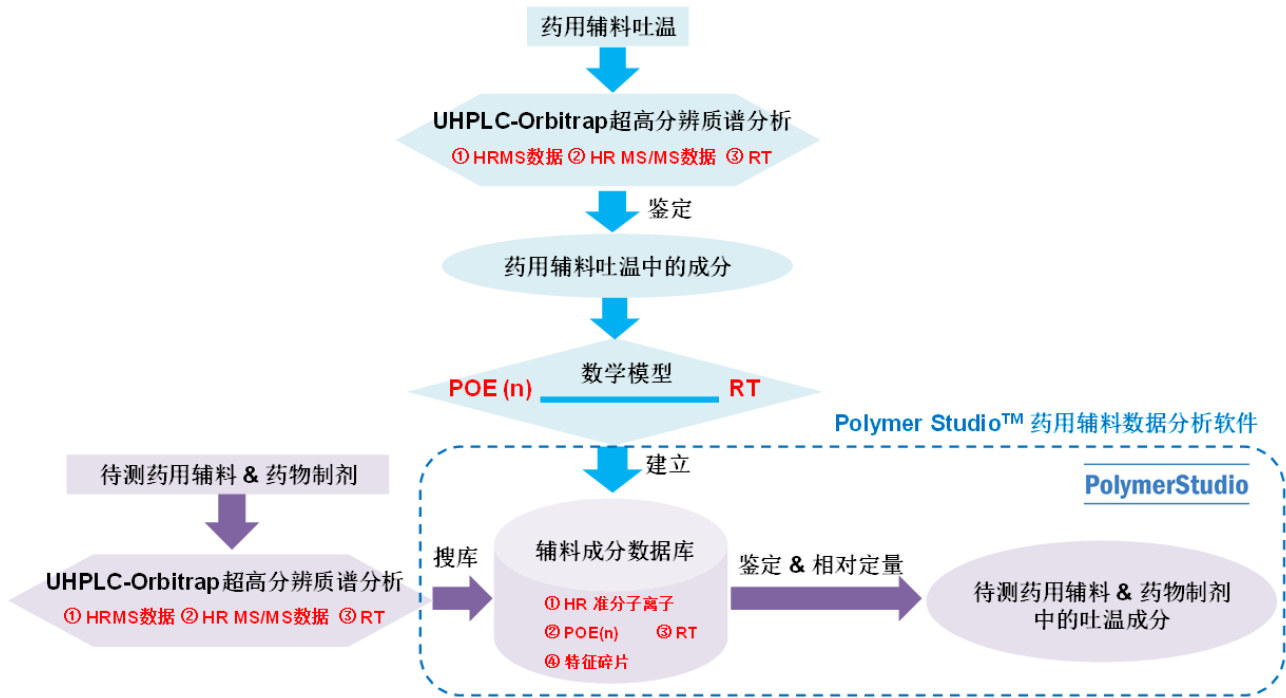


图7 数据库的建立及待测样品分析流程

3.4 方法应用

采用上述分析流程测定了药用辅料吐温80样品（编号：S3）。图8是该样品中成分分布的散点图，在该样品中共鉴定到1130种成分，平均聚合度22.09，平均酯化程度1.36。图9是样品中不同亚类成分的相对比例，其中含量较高的亚类成分包括：聚氧乙烯脱水山梨醇单/双/三油酸酯、聚氧乙烯异脱水山梨醇单/双油酸酯、聚氧乙烯单/双油酸酯、聚氧乙烯、聚氧乙烯脱水山梨醇/异脱水山梨醇等。图10是样品中不同亚类成分的POE聚合度分布热图，可见不同亚类成分的聚合度并不相同。

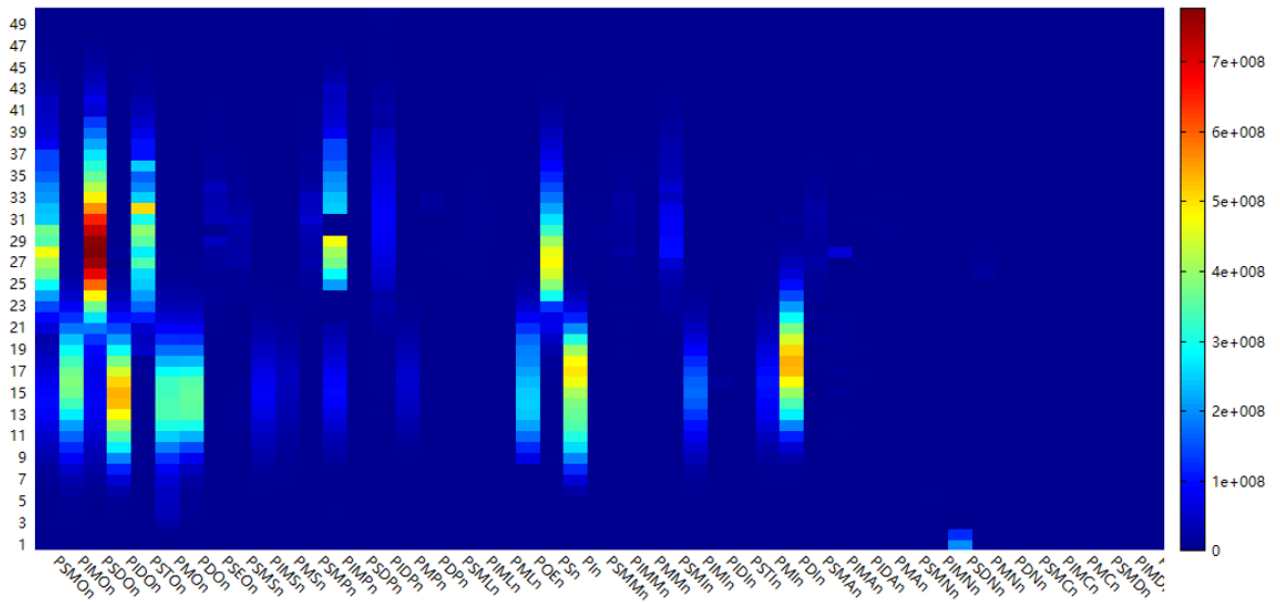
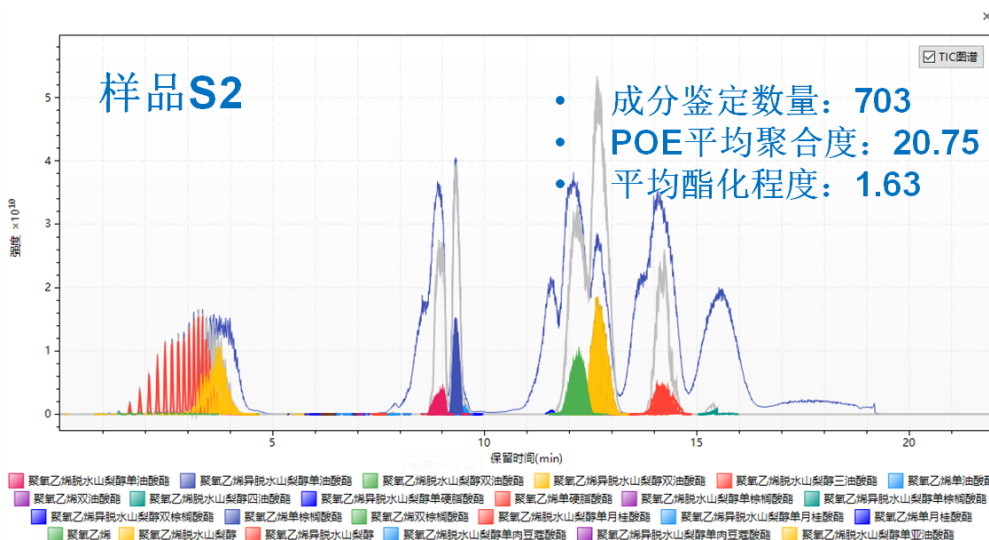
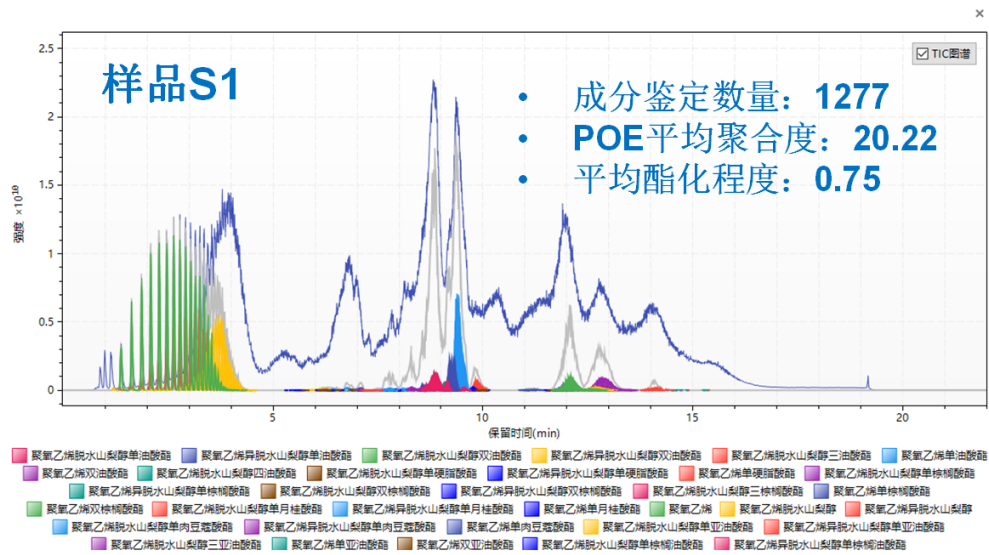


图10 样品S3中不同亚类成分的POE聚合度分布热图

此外，在解析每个样品成分的基础上，可进一步比较不同样品间的差异。图11是5份不同来源的吐温80样品所含成分的XIC叠加图，图12是这些样品所含成分的峰面积对比图。可见：即使同为吐温80，其所含成分的种类、数量、聚合度、酯化程度以及不同成分的相对含量均有差别。



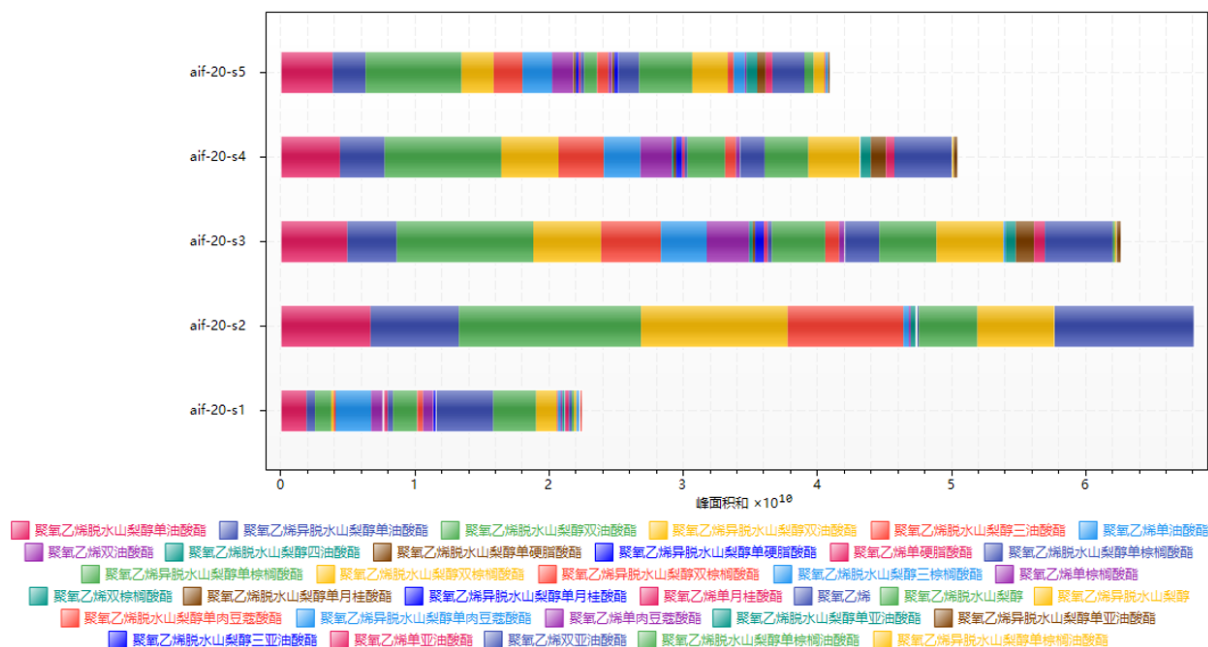


图12 5份不同来源的吐温80样品所含成分的峰面积对比

4. 结论

本文利用赛默飞静电场轨道阱超高分辨质谱Orbitrap Exploris 120分析了药用辅料吐温，利用Orbitrap Exploris质谱准确的质量测定以及高质量的二级谱图对样品中复杂的成分进行了分析。在Polymer Studio™软件中建立了包含近4000种吐温成分一级质谱信息、二级特征碎片信息及保留时间模型的数据库。结合高质量的原始数据及准确的模型，成功解析了样品中含有的吐温成分。进一步比较了不同来源样品中吐温成分的差异，发现即使同为吐温80，其所含成分的种类、数量、聚合度、酯化程度以及不同成分的相对含量均有差别。Orbitrap超高分辨质谱结合Polymer Studio™软件可快速、完整地分析复杂样品中吐温的物质组成，可极大地帮助相关人员用于吐温及其相关制剂的生产、研发与质控。

5. 参考文献

[1] A fast strategy for profiling and identifying pharmaceutical excipient polysorbates by ultra-high performance liquid chromatography coupled with high-resolution mass spectrometry[J]. Zhe Wang#, Yanan Wang#, Cai Tie, Jinlan Zhang*. Journal of Chromatography A, 2020, 1609, 460450.



赛默飞
官方微信

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

thermo scientific