

中图分类号: R917; R927 文献标志码: A 文章编号: 1006-4931(2023)06-0055-06
doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2023.06.014



聚山梨酯指纹图谱建立及成分鉴定*

王珏, 许凯, 杨洋, 杨锐, 孙会敏, 肖新月[△]

(中国食品药品检定研究院·国家药品监督管理局药用辅料质量研究与评价重点实验室, 北京 100050)

摘要:目的 建立聚山梨酯的超高效合相色谱(UPCC)指纹图谱并指认其成分。方法 采用超高效合相色谱质谱联用(UPCC-MS)法。MS条件, 离子化模式为ESI⁺; 雾化气温度为500℃、流速为800 L/h, 源温度为120℃, 毛细管电压为2.5 kV, 锥孔电压为40 V, 采集模式为MS^E, 扫描范围 m/z 50~3 000; UPCC条件, 色谱柱为ACQUITY UPC² Torus Diol柱(100 mm×3.0 mm, 1.7 μm), 流动相为CO₂-甲醇/乙腈(30:70, V/V), 离子化溶剂为甲醇+5 mmol/L甲酸铵(流速为0.2 mL/min), 梯度洗脱, 流速为1.0 mL/min, 柱温为50℃, 背压为2 500 psi, 进样量为1 μL。测定12批不同来源的聚山梨酯80样品及其美国药典(USP)标准品的UPCC图谱, 采用中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012.130723版)进行相似度评价, 确定共有峰, 计算相似度, 并指认成分。结果 样品的UPCC图谱有22个共有峰, 均指认出具体的成分, 相似度为0.884~0.966; 经验证, 样品UPCC图谱与对照指纹图谱一致性较好。结论 建立的UPCC-MS法可快速分离聚山梨酯中的复杂组分, 所建UPCC指纹图谱可用于聚山梨酯批间一致性的快速分析。

关键词:超高效合相色谱质谱联用法; 指纹图谱; 聚山梨酯; 成分鉴定

Establishment of Fingerprints and Identification Method of Polysorbates

WANG Jue, XU Kai, YANG Yang, YANG Rui, SUN Huimin, XIAO Xinyue

(National Institutes for Food and Drug Control · NMPA Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Pharmaceutical Excipients, Beijing, China 100050)

Abstract: Objective To establish ultra-performance convergence chromatography (UPCC) fingerprints of polysorbates, and to identify its components. **Methods** UPCC-mass spectrometry (UPCC-MS) was adopted. The MS conditions were as follows: ionization mode was ESI⁺, the atomized gas temperature was 500℃, the flow rate was 800 L/h, the source temperature was 120℃, the capillary voltage was 2.5 kV, the cone voltage was 40 V, the acquisition mode was MS^E, and the scanning range was m/z 50-3 000. The UPCC conditions were as follows: the chromatographic column was ACQUITY UPC² Torus Diol column (100 mm×3.0 mm, 1.7 μm), the mobile phase was CO₂-methanol-acetonitrile (30/70, V/V), and the ionization solvent was methanol+5 mmol/L ammonium formate (0.2 mL/min) with gradient elution, the flow rate was 1.0 mL/min, the column temperature was 50℃, the backpressure was 2 500 psi, and injection volume was 1 μL. The UPCC chromatograms of 12 batches of polysorbate 80 samples from different sources and USP standard samples were determined, and the Similarity Evaluation System for the Chromatographic Fingerprint of Traditional Chinese Medicine (Version 2012.130723) was adopted to determine the common peak, calculate the similarity, and identify the components. **Results** The UPCC chromatogram of the sample had 22 common peaks, all of which were identified as the specific components, and the similarity was in the range of 0.884-0.966. It was verified that the UPCC fingerprints of the sample were consistent with the reference fingerprint. **Conclusion** The established UPCC-MS method can rapidly separate the complex components in polysorbates, and the established UPCC fingerprints can be used for rapid analysis of the batch-to-batch consistency of polysorbates.

Key words: UPCC-MS; fingerprint; polysorbates; component identification

聚山梨酯系列为常用非离子表面活性剂辅料, 俗称吐温。2020年版《中国药典(四部)》、美国药典、欧洲药典均收载聚山梨酯20、聚山梨酯40、聚山梨酯60及聚山梨酯80, 其中聚山梨酯20和聚山梨酯80应用较广, 尤其用于高风险制剂^[1-2]。超临界流体色谱(SFC)法是依靠超临界流体为流动相实现复杂物质分离的色谱技术^[3], 分离效能高且绿色环保, 常用超临界状态下的CO₂作为流动相, 辅以少量有机溶剂。近年来在中药药物分析领域

和食品的油脂分析中应用较多^[4-8], 其兼具气相色谱和液相色谱的特点, 但尚不如气相和液相色谱法应用普遍。为此, 本研究中建立了聚山梨酯80的超高效合相色谱(UPCC)指纹图谱, 并对不同来源的12批聚山梨酯80进行相似度评价, 为优化聚山梨酯产品批间一致性和稳定性监测方法提供参考。现报道如下。

1 仪器与试剂

仪器: ACQUITY UPCC串联Xevo G2-XS Q-TOF-

*基金项目: 国家药典委员会标准提高课题[2021Y27]。

第一作者: 王珏, 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向为药用辅料质量控制与应用, (电子信箱)myxwj2007@163.com。

[△]通信作者: 肖新月, 女, 硕士, 研究员, 研究方向为药用辅料和包装材料质量控制和标准物质, (电话)010-67095721。

MS系统,含MassLynx V4.1质谱工作站、Waters UNIFI 1.9.3分析软件(美国Waters公司);XS205DV型电子天平(瑞士Mettler Toledo公司,精度为0.01 mg)。

试药:聚山梨酯20、聚山梨酯60均购自南京威尔药业有限公司;聚山梨酯80分别购自英国禾大化学品公司(批号分别为49087,50021)、南京威尔药业有限公司(批号为20210602)、江苏保易制药有限公司(批号分别为C05181201,C05200902)、J. T. Baker化学品公司(批号分别为0000275460,0000281769)、日油株式会社(批号分别为202859,107359D)、湖北葛店人福药用辅料有限公司(批号分别为F104C210401,F119C220201)、江西益普生药业有限公司(批号为20220301);聚山梨酯20美国药典(USP)标准物质(批号为R079C0)、聚山梨酯60USP标准物质(批号为R09110)和聚山梨酯80 USP标准物质(批号为R072G0)作为对照品;甲醇、乙腈、甲酸铵均为质谱纯,其余试剂均为分析纯,水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 试验条件

2.1.1 UPCC 条件

色谱柱:ACQUITY UPC²Torus Diol柱(100 mm × 3.0 mm,1.7 μm);流动相:CO₂(A)-甲醇/乙腈(B,30:70,V/V),离子化溶剂为甲醇+5 mmol/L甲酸铵(流速为0.2 mL/min),梯度洗脱(0~0.2 min时8%B,0.2~12.0 min时8%B→15%B,12.0~18.0 min时15%B→20%B,18.0~31.0 min时20%B→35%B,31.0~34.0 min时35%B→50%B,34.0~34.2 min时50%B→8%B,34.2~37.0 min时8%B);流速:1.0 mL/min;柱温:50℃;背压:2 500 psi;进样量:1 μL。

2.1.2 质谱条件

离子化模式:电喷雾离子源正离子模式(ESI⁺);雾化气温度:500℃;雾化气流速:800 L/h;源温度:120℃;毛细管电压:2.5 kV;锥孔电压:40 V;采集模

式:MS^E;扫描范围: m/z 50~3 000。

2.2 溶液制备

取样品适量,精密称定,置100 mL容量瓶,加甲醇溶解并定容,摇匀,制成质量浓度为0.2 mg/mL的供试品溶液。取聚山梨酯标准物质适量,同法制备对照品溶液。

2.3 精密度试验

取聚山梨酯80对照品溶液,按2.1项下试验条件连续进样测定6次,记录色谱图,结合保留时间选取连续稳定出峰且相对峰面积大于5%的色谱峰作为主要色谱峰。结果保留时间的RSD均小于0.3%,相对峰面积的RSD大多小于10%($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.4 UPCC 指纹图谱建立与分析

先分别对聚山梨酯20、聚山梨酯60和聚山梨酯80样品及各自对照品进行红外光谱测试,各样品均获得与对照品基本一致的红外光谱图。取2.2项下溶液各适量,并按2.1项下试验条件进样测定,计算基峰色谱图(图1)各峰积分,将所获得的基峰色谱图及积分数据导入中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012.130723版),以各对照品图谱作为校正参照,使用中位数进行峰自动匹配并进行多点校正,得到聚山梨酯80的UPCC叠加指纹图谱和对照指纹图谱,详见图2、图3。

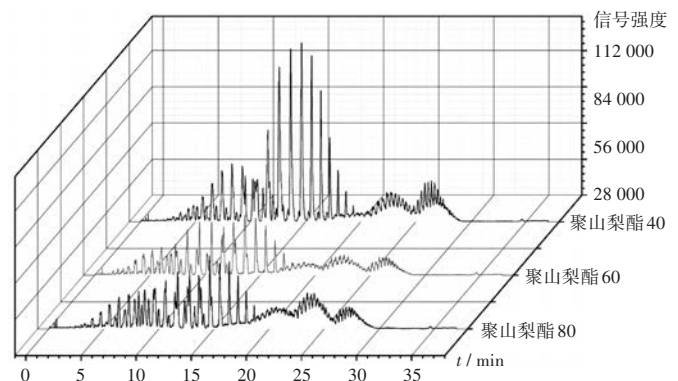


图1 聚山梨酯(20,60,80)基峰色谱图

Fig.1 Base peak chromatograms of polysorbates (20,60,80)

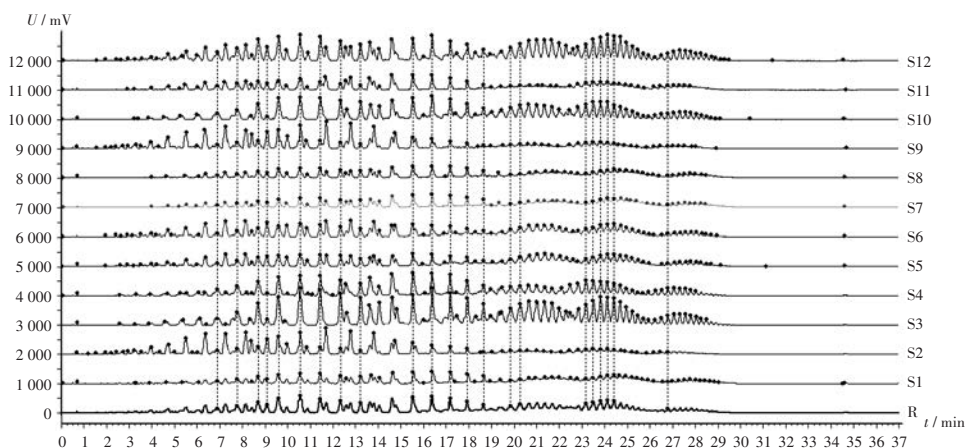


图2 12批聚山梨酯80样品的超高效合相色谱叠加指纹图谱

Fig.2 UPCC superimposed fingerprints of 12 batches of polysorbate 80

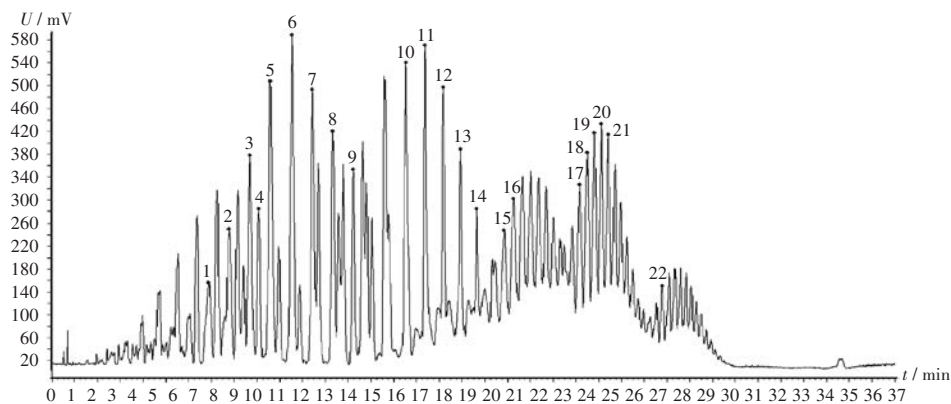


图3 聚山梨酯80样品超高效液相色谱对照指纹图谱

Fig.3 UPCC reference fingerprint of polysorbate 80

表1 12批聚山梨酯80样品相似度分析

Tab.1 Similarity analysis of 12 batches of polysorbate 80

编号	R	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7	S8	S9	S10	S11	S12
R	1.000	0.955	0.906	0.963	0.957	0.955	0.926	0.944	0.948	0.884	0.966	0.925	0.963
S1	0.955	1.000	0.789	0.992	0.980	0.944	0.903	0.925	0.921	0.758	0.995	0.886	0.983
S2	0.906	0.789	1.000	0.794	0.805	0.900	0.904	0.812	0.833	0.990	0.806	0.880	0.854
S3	0.963	0.992	0.794	1.000	0.982	0.942	0.900	0.948	0.947	0.770	0.996	0.876	0.969
S4	0.957	0.980	0.805	0.982	1.000	0.931	0.883	0.958	0.960	0.785	0.990	0.915	0.960
S5	0.955	0.944	0.900	0.942	0.931	1.000	0.983	0.932	0.935	0.884	0.948	0.897	0.976
S6	0.926	0.903	0.904	0.900	0.883	0.983	1.000	0.908	0.897	0.873	0.901	0.902	0.956
S7	0.944	0.925	0.812	0.948	0.958	0.932	0.908	1.000	0.993	0.793	0.945	0.910	0.928
S8	0.948	0.921	0.833	0.947	0.960	0.935	0.897	0.993	1.000	0.826	0.946	0.893	0.920
S9	0.884	0.758	0.990	0.770	0.785	0.884	0.873	0.793	0.826	1.000	0.783	0.831	0.818
S10	0.966	0.995	0.806	0.996	0.990	0.948	0.901	0.945	0.946	0.783	1.000	0.894	0.977
S11	0.925	0.886	0.880	0.876	0.915	0.897	0.902	0.910	0.893	0.831	0.894	1.000	0.924
S12	0.963	0.983	0.854	0.969	0.960	0.976	0.956	0.928	0.920	0.818	0.977	0.924	1.000

取12批聚山梨酯80样品及其USP标准物质,用建立的超高效液相色谱质谱联用(UPCC-MS)法进样分析,确定了22个共有峰(同图2)。采用夹角余弦法对不同来源的12批样品进行指纹图谱相似度评价,结果见表1,相似度为0.884~0.966,产品间组成分布上的相似程度基本可区分。同时,聚山梨酯20、聚山梨酯60与聚山梨酯80的相似度分别为0.408和0.450,说明该方法建立的UPCC-MS指纹图谱可对不同品种的聚山梨酯进行区分。

2.5 聚山梨酯80的22个共有峰结构确认

采用UPCC-MS的MS^E模式分析,由于使用极性柱的超临界流体色谱分离机理类似于正相色谱,因此理论上酯化程度越高的成分越先流出。结合各色谱峰的保留时间识别聚山梨酯80的22个共有峰,详见表2[其中*n*表示分子中聚氧乙烯(-OC₂H₄)的重复单元数]。

3 讨论

3.1 研究背景

聚山梨酯辅料组成极复杂,这种复杂性源于原料

和合成过程中的多样性和多种不确定性,包括可同时存在2种母核类型(即山梨醇酐和异山梨醇酐),侧链的多分散性(即不同数目的聚氧乙烯重复单元),脂肪酸的类型(来源于原料不同的脂肪酸构成),酯化程度的不确定性(即未酯化、单酯、二酯、三酯)^[9-10]。通过聚山梨酯的理论结构式、实际化合物分类及其化学结构通式,推断其种类可得聚氧乙烯山梨坦及其脂肪酸酯类、聚氧乙烯异山梨坦及其脂肪酸酯类、聚乙二醇及其脂肪酸酯类三大类物质,共包含理论化合物约1.7万个^[11]。

指纹图谱在复杂药用辅料中鉴定分析的应用少有报道^[12-14]。事实上,药用辅料中有很多组成复杂的混合物体系如吐温、司盘类表面活性剂、三酰甘油及天然来源的油脂等均面临质量控制难题。采用传统的分析检测手段常难以发现其化合物组成上的差异或操作步骤烦琐,检验检测效能低。因此,近年来基于液相/高分辨质谱联用手段对此类辅料定性或定量方面的研究很多^[15-18]。一般来说,建立定制数据库是对此类药用辅料进行组成分析和鉴定的常用策略^[19-20]。但此方法事倍

表 2 聚山梨酯 80 的 22 个共有峰结构解析
Tab. 2 Structural analysis of 22 common peaks of polysorbate 80

序号	保留时间(min)	m/z	峰类型	分子式	组分名称	序号	保留时间(min)	m/z	峰类型	分子式	组分名称		
1	6.889	824.559 8	m^+	$C_{42}H_{80}O_{15}$	聚氧乙烯山梨醇单油酸酯($n=9$)	11	16.361	780.447 9	m^+	$C_{34}H_{68}O_{19}$	聚氧乙烯山梨醇单油酸酯($n=7$)		
					聚氧乙烯山梨醇二油酸酯($n=3$)						$[m+NH_4]^+$	$C_{32}H_{62}O_{17}$	聚氧乙烯山梨醇二油酸酯($n=3$)
					$[m+NH_4]^+$						$C_{42}H_{80}O_{14}$	聚氧乙烯山梨醇三油酸酯($n=3$)	聚氧乙烯山梨醇三油酸酯($n=7$)
					聚氧乙烯山梨醇四油酸酯($n=3$)						聚氧乙烯山梨醇四油酸酯($n=7$)		
					聚氧乙烯山梨醇五油酸酯($n=3$)						聚氧乙烯山梨醇五油酸酯($n=7$)		
2	7.770	868.587 0	m^+	$C_{44}H_{84}O_{16}$	聚氧乙烯山梨醇单油酸酯($n=10$)	12	17.174	824.471 6	m^+	$C_{36}H_{72}O_{20}$	聚氧乙烯山梨醇单油酸酯($n=8$)		
					聚氧乙烯山梨醇二油酸酯($n=4$)						$[m+NH_4]^+$	$C_{34}H_{70}O_{18}$	聚氧乙烯山梨醇二油酸酯($n=4$)
					$[m+NH_4]^+$						$C_{44}H_{84}O_{15}$	聚氧乙烯山梨醇三油酸酯($n=4$)	聚氧乙烯山梨醇三油酸酯($n=8$)
					聚氧乙烯山梨醇四油酸酯($n=4$)						聚氧乙烯山梨醇四油酸酯($n=8$)		
					聚氧乙烯山梨醇五油酸酯($n=4$)						聚氧乙烯山梨醇五油酸酯($n=8$)		
3	8.697	912.609 1	m^+	$C_{46}H_{88}O_{17}$	聚氧乙烯山梨醇单油酸酯($n=11$)	13	17.906	868.496 5	m^+	$C_{38}H_{76}O_{21}$	聚氧乙烯山梨醇单油酸酯($n=9$)		
					聚氧乙烯山梨醇二油酸酯($n=5$)						$[m+NH_4]^+$	$C_{36}H_{74}O_{19}$	聚氧乙烯山梨醇二油酸酯($n=5$)
					$[m+NH_4]^+$						$C_{46}H_{88}O_{16}$	聚氧乙烯山梨醇三油酸酯($n=5$)	聚氧乙烯山梨醇三油酸酯($n=9$)
					聚氧乙烯山梨醇四油酸酯($n=5$)						聚氧乙烯山梨醇四油酸酯($n=9$)		
					聚氧乙烯山梨醇五油酸酯($n=5$)						聚氧乙烯山梨醇五油酸酯($n=9$)		
4	9.160	960.666 6	m^+	$C_{42}H_{80}O_{22}$	聚乙二醇($n=21$)	14	18.632	912.522 6	m^+	$C_{40}H_{80}O_{22}$	聚氧乙烯山梨醇单油酸酯($n=17$)		
					聚氧乙烯单油酸酯($n=15$)						$[m+NH_4]^+$	$C_{38}H_{78}O_{21}$	聚氧乙烯单油酸酯($n=15$)
					聚氧乙烯二油酸酯($n=9$)						聚氧乙烯二油酸酯($n=17$)		
					聚氧乙烯三油酸酯($n=9$)						聚氧乙烯三油酸酯($n=17$)		
					聚氧乙烯四油酸酯($n=9$)						聚氧乙烯四油酸酯($n=17$)		
5	9.612	956.636 8	$[m+NH_4]^+$	$C_{48}H_{92}O_{18}$	聚氧乙烯山梨醇单油酸酯($n=12$)	15	19.845	936.643 0	$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{94}H_{180}O_{33}$	聚氧乙烯山梨醇单油酸酯($n=11$)		
					聚氧乙烯山梨醇二油酸酯($n=6$)						$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{94}H_{180}O_{33}$	聚氧乙烯山梨醇二油酸酯($n=6$)
					m^+						$C_{48}H_{92}O_{17}$	聚氧乙烯山梨醇三油酸酯($n=6$)	聚氧乙烯山梨醇三油酸酯($n=11$)
					聚氧乙烯山梨醇四油酸酯($n=6$)						聚氧乙烯山梨醇四油酸酯($n=11$)		
					聚氧乙烯山梨醇五油酸酯($n=6$)						聚氧乙烯山梨醇五油酸酯($n=11$)		
6	10.538	1 000.659 3	$[m+NH_4]^+$	$C_{50}H_{96}O_{19}$	聚氧乙烯山梨醇单油酸酯($n=13$)	16	20.274	959.151 3	$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{96}H_{184}O_{34}$	聚氧乙烯山梨醇单油酸酯($n=12$)		
					聚氧乙烯山梨醇二油酸酯($n=7$)						$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{96}H_{184}O_{34}$	聚氧乙烯山梨醇二油酸酯($n=7$)
					m^+						$C_{50}H_{96}O_{18}$	聚氧乙烯山梨醇三油酸酯($n=7$)	聚氧乙烯山梨醇三油酸酯($n=12$)
					聚氧乙烯山梨醇四油酸酯($n=7$)						聚氧乙烯山梨醇四油酸酯($n=12$)		
					聚氧乙烯山梨醇五油酸酯($n=7$)						聚氧乙烯山梨醇五油酸酯($n=12$)		
7	11.436	1 044.686 3	$[m+NH_4]^+$	$C_{52}H_{100}O_{20}$	聚氧乙烯山梨醇单油酸酯($n=14$)	17	23.179	804.521 7	$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{76}H_{148}O_{32}$	聚氧乙烯山梨醇单油酸酯($n=13$)		
					聚氧乙烯山梨醇二油酸酯($n=8$)						$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{76}H_{148}O_{32}$	聚氧乙烯山梨醇二油酸酯($n=8$)
					m^+						$C_{52}H_{98}O_{19}$	聚氧乙烯山梨醇三油酸酯($n=8$)	聚氧乙烯山梨醇三油酸酯($n=13$)
					聚氧乙烯山梨醇四油酸酯($n=8$)						聚氧乙烯山梨醇四油酸酯($n=13$)		
					聚氧乙烯山梨醇五油酸酯($n=8$)						聚氧乙烯山梨醇五油酸酯($n=13$)		
8	12.346	1 088.708 9	$[m+NH_4]^+$	$C_{54}H_{104}O_{21}$	聚氧乙烯山梨醇单油酸酯($n=15$)	18	23.511	826.535 3	$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{78}H_{152}O_{33}$	聚氧乙烯山梨醇单油酸酯($n=14$)		
					聚氧乙烯山梨醇二油酸酯($n=9$)						$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{78}H_{152}O_{33}$	聚氧乙烯山梨醇二油酸酯($n=9$)
					m^+						$C_{54}H_{102}O_{20}$	聚氧乙烯山梨醇三油酸酯($n=9$)	聚氧乙烯山梨醇三油酸酯($n=14$)
					聚氧乙烯山梨醇四油酸酯($n=9$)						聚氧乙烯山梨醇四油酸酯($n=14$)		
					聚氧乙烯山梨醇五油酸酯($n=9$)						聚氧乙烯山梨醇五油酸酯($n=14$)		
9	13.210	1 132.727 8	$[m+NH_4]^+$	$C_{56}H_{108}O_{22}$	聚氧乙烯山梨醇单油酸酯($n=16$)	19	23.826	848.548 0	$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{80}H_{156}O_{34}$	聚氧乙烯山梨醇单油酸酯($n=15$)		
					聚氧乙烯山梨醇二油酸酯($n=10$)						$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{80}H_{156}O_{34}$	聚氧乙烯山梨醇二油酸酯($n=10$)
					m^+						$C_{56}H_{106}O_{21}$	聚氧乙烯山梨醇三油酸酯($n=10$)	聚氧乙烯山梨醇三油酸酯($n=15$)
					聚氧乙烯山梨醇四油酸酯($n=10$)						聚氧乙烯山梨醇四油酸酯($n=15$)		
					聚氧乙烯山梨醇五油酸酯($n=10$)						聚氧乙烯山梨醇五油酸酯($n=15$)		
10	15.515	736.421 0	m^+	$C_{32}H_{64}O_{18}$	聚氧乙烯山梨醇单油酸酯($n=13$)	20	24.123	870.560 2	$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{82}H_{160}O_{35}$	聚氧乙烯山梨醇单油酸酯($n=16$)		
					聚氧乙烯山梨醇二油酸酯($n=7$)						$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{82}H_{160}O_{35}$	聚氧乙烯山梨醇二油酸酯($n=7$)
					聚氧乙烯山梨醇三油酸酯($n=7$)						聚氧乙烯山梨醇三油酸酯($n=16$)		
					聚氧乙烯山梨醇四油酸酯($n=7$)						聚氧乙烯山梨醇四油酸酯($n=16$)		
					聚氧乙烯山梨醇五油酸酯($n=7$)						聚氧乙烯山梨醇五油酸酯($n=16$)		
11	16.361	780.447 9	m^+	$C_{34}H_{68}O_{19}$	聚氧乙烯山梨醇单油酸酯($n=7$)	21	24.421	892.567 0	$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{84}H_{164}O_{36}$	聚氧乙烯山梨醇单油酸酯($n=17$)		
					聚氧乙烯山梨醇二油酸酯($n=3$)						$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{84}H_{164}O_{36}$	聚氧乙烯山梨醇二油酸酯($n=3$)
					聚氧乙烯山梨醇三油酸酯($n=3$)						聚氧乙烯山梨醇三油酸酯($n=17$)		
					聚氧乙烯山梨醇四油酸酯($n=3$)						聚氧乙烯山梨醇四油酸酯($n=17$)		
					聚氧乙烯山梨醇五油酸酯($n=3$)						聚氧乙烯山梨醇五油酸酯($n=17$)		
12	17.174	824.471 6	m^+	$C_{36}H_{72}O_{20}$	聚氧乙烯山梨醇单油酸酯($n=8$)	22	26.812	672.402 9	$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{58}H_{116}O_{31}$	聚氧乙烯山梨醇单油酸酯($n=18$)		
					聚氧乙烯山梨醇二油酸酯($n=4$)						$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{58}H_{116}O_{31}$	聚氧乙烯山梨醇二油酸酯($n=4$)
					聚氧乙烯山梨醇三油酸酯($n=4$)						聚氧乙烯山梨醇三油酸酯($n=18$)		
					聚氧乙烯山梨醇四油酸酯($n=4$)						聚氧乙烯山梨醇四油酸酯($n=18$)		
					聚氧乙烯山梨醇五油酸酯($n=4$)						聚氧乙烯山梨醇五油酸酯($n=18$)		
13	17.906	868.496 5	m^+	$C_{38}H_{76}O_{21}$	聚氧乙烯山梨醇单油酸酯($n=9$)	23	27.612	694.414 8	$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{60}H_{120}O_{32}$	聚氧乙烯山梨醇单油酸酯($n=19$)		
					聚氧乙烯山梨醇二油酸酯($n=5$)						$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{60}H_{120}O_{32}$	聚氧乙烯山梨醇二油酸酯($n=5$)
					聚氧乙烯山梨醇三油酸酯($n=5$)						聚氧乙烯山梨醇三油酸酯($n=19$)		
					聚氧乙烯山梨醇四油酸酯($n=5$)						聚氧乙烯山梨醇四油酸酯($n=19$)		
					聚氧乙烯山梨醇五油酸酯($n=5$)						聚氧乙烯山梨醇五油酸酯($n=19$)		
14	18.632	912.522 6	m^+	$C_{40}H_{80}O_{22}$	聚氧乙烯山梨醇单油酸酯($n=17$)	24	28.412	716.426 7	$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{62}H_{124}O_{33}$	聚氧乙烯山梨醇单油酸酯($n=20$)		
					聚氧乙烯山梨醇二油酸酯($n=11$)						$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{62}H_{124}O_{33}$	聚氧乙烯山梨醇二油酸酯($n=11$)
					聚氧乙烯山梨醇三油酸酯($n=11$)						聚氧乙烯山梨醇三油酸酯($n=20$)		
					聚氧乙烯山梨醇四油酸酯($n=11$)						聚氧乙烯山梨醇四油酸酯($n=20$)		
					聚氧乙烯山梨醇五油酸酯($n=11$)						聚氧乙烯山梨醇五油酸酯($n=20$)		
15	19.845	936.643 0	$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{94}H_{180}O_{33}$	聚氧乙烯山梨醇单油酸酯($n=26$)	25	29.212	738.438 6	$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{64}H_{128}O_{34}$	聚氧乙烯山梨醇单油酸酯($n=21$)		
					聚氧乙烯山梨醇二油酸酯($n=6$)						$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{64}H_{128}O_{34}$	聚氧乙烯山梨醇二油酸酯($n=6$)
					聚氧乙烯山梨醇三油酸酯($n=6$)						聚氧乙烯山梨醇三油酸酯($n=21$)		
					聚氧乙烯山梨醇四油酸酯($n=6$)						聚氧乙烯山梨醇四油酸酯($n=21$)		
					聚氧乙烯山梨醇五油酸酯($n=6$)						聚氧乙烯山梨醇五油酸酯($n=21$)		
16	20.274	959.151 3	$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{96}H_{184}O_{34}$	聚氧乙烯山梨醇单油酸酯($n=27$)	26	30.000	760.450 4	$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{66}H_{132}O_{35}$	聚氧乙烯山梨醇单油酸酯($n=22$)		
					聚氧乙烯山梨醇二油酸酯($n=14$)						$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{66}H_{132}O_{35}$	聚氧乙烯山梨醇二油酸酯($n=14$)
					聚氧乙烯山梨醇三油酸酯($n=14$)						聚氧乙烯山梨醇三油酸酯($n=22$)		
					聚氧乙烯山梨醇四油酸酯($n=14$)						聚氧乙烯山梨醇四油酸酯($n=22$)		
					聚氧乙烯山梨醇五油酸酯($n=14$)						聚氧乙烯山梨醇五油酸酯($n=22$)		
17	23.179	804.521 7	$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{76}H_{148}O_{32}$	聚氧乙烯山梨醇单油酸酯($n=26$)	27	31.796	782.462 1	$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{68}H_{136}O_{36}$	聚氧乙烯山梨醇单油酸酯($n=23$)		
					聚氧乙烯山梨醇二油酸酯($n=20$)						$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{68}H_{136}O_{36}$	聚氧乙烯山梨醇二油酸酯($n=20$)
					聚氧乙烯山梨醇三油酸酯($n=20$)						聚氧乙烯山梨醇三油酸酯($n=23$)		
					聚氧乙烯山梨醇四油酸酯($n=20$)						聚氧乙烯山梨醇四油酸酯($n=23$)		
					聚氧乙烯山梨醇五油酸酯($n=20$)						聚氧乙烯山梨醇五油酸酯($n=23$)		
18	23.511	826.535 3	$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{78}H_{152}O_{33}$	聚氧乙烯山梨醇单油酸酯($n=27$)	28	32.584	804.473 9	$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{70}H_{140}O_{37}$	聚氧乙烯山梨醇单油酸酯($n=24$)		
					聚氧乙烯山梨醇二油酸酯($n=21$)						$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{70}H_{140}O_{37}$	聚氧乙烯山梨醇二油酸酯($n=21$)
					聚氧乙烯山梨醇三油酸酯($n=21$)						聚氧乙烯山梨醇三油酸酯($n=24$)		
					聚氧乙烯山梨醇四油酸酯($n=21$)						聚氧乙烯山梨醇四油酸酯($n=24$)		
					聚氧乙烯山梨醇五油酸酯($n=21$)						聚氧乙烯山梨醇五油酸酯($n=24$)		
19	23.826	848.548 0	$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{80}H_{156}O_{34}$	聚氧乙烯山梨醇单油酸酯($n=28$)	29	33.372	826.485 7	$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{72}H_{144}O_{38}$	聚氧乙烯山梨醇单油酸酯($n=25$)		
					聚氧乙烯山梨醇二油酸酯($n=28$)						$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{72}H_{144}O_{38}$	聚氧乙烯山梨醇二油酸酯($n=28$)
					聚氧乙烯山梨醇三油酸酯($n=28$)						聚氧乙烯山梨醇三油酸酯($n=25$)		
					聚氧乙烯山梨醇四油酸酯($n=28$)						聚氧乙烯山梨醇四油酸酯($n=25$)		
					聚氧乙烯山梨醇五油酸酯($n=28$)						聚氧乙烯山梨醇五油酸酯($n=25$)		
20	24.123	870.560 2	$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{82}H_{160}O_{35}$	聚氧乙烯山梨醇单油酸酯($n=29$)	30	34.160	848.497 5	$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{74}H_{148}O_{39}$	聚氧乙烯山梨醇单油酸酯($n=26$)		
					聚氧乙烯山梨醇二油酸酯($n=29$)						$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{74}H_{148}O_{39}$	聚氧乙烯山梨醇二油酸酯($n=29$)
					聚氧乙烯山梨醇三油酸酯($n=29$)						聚氧乙烯山梨醇三油酸酯($n=26$)		
					聚氧乙烯山梨醇四油酸酯($n=29$)						聚氧乙烯山梨醇四油酸酯($n=26$)		
					聚氧乙烯山梨醇五油酸酯($n=29$)						聚氧乙烯山梨醇五油酸酯($n=26$)		
21	24.421	892.567 0	$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{84}H_{164}O_{36}$	聚氧乙烯山梨醇单油酸酯($n=30$)	31	34.948	870.509 3	$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{76}H_{152}O_{40}$	聚氧乙烯山梨醇单油酸酯($n=27$)		
					聚氧乙烯山梨醇二油酸酯($n=30$)						$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{76}H_{152}O_{40}$	聚氧乙烯山梨醇二油酸酯($n=30$)
					聚氧乙烯山梨醇三油酸酯($n=30$)						聚氧乙烯山梨醇三油酸酯($n=27$)		
					聚氧乙烯山梨醇四油酸酯($n=30$)						聚氧乙烯山梨醇四油酸酯($n=27$)		
					聚氧乙烯山梨醇五油酸酯($n=30$)						聚氧乙烯山梨醇五油酸酯($n=27$)		
22	26.812	672.402 9	$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{58}H_{116}O_{31}$	聚氧乙烯山梨醇单油酸酯($n=26$)	32	35.736	892.521 1	$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{78}H_{156}O_{41}$	聚氧乙烯山梨醇单油酸酯($n=28$)		
					聚氧乙烯山梨醇二油酸酯($n=26$)						$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{78}H_{156}O_{41}$	聚氧乙烯山梨醇二油酸酯($n=28$)
					聚氧乙烯山梨醇三油酸酯($n=26$)						聚氧乙烯山梨醇三油酸酯($n=28$)		
					聚氧乙烯山梨醇四油酸酯($n=26$)						聚氧乙烯山梨醇四油酸酯($n=28$)		
					聚氧乙烯山梨醇五油酸酯($n=26$)						聚氧乙烯山梨醇五油酸酯($n=28$)		
23	27.612	694.414 8	$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{60}H_{120}O_{32}$	聚氧乙烯山梨醇单油酸酯($n=27$)	33	36.524	914.532 9	$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{80}H_{160}O_{42}$	聚氧乙烯山梨醇单油酸酯($n=29$)		
					聚氧乙烯山梨醇二油酸酯($n=27$)						$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{80}H_{160}O_{42}$	聚氧乙烯山梨醇二油酸酯($n=29$)
					聚氧乙烯山梨醇三油酸酯($n=27$)						聚氧乙烯山梨醇三油酸酯($n=29$)		
					聚氧乙烯山梨醇四油酸酯($n=27$)						聚氧乙烯山梨醇四油酸酯($n=29$)		
					聚氧乙烯山梨醇五油酸酯($n=27$)						聚氧乙烯山梨醇五油酸酯($n=29$)		
24	28.412	716.426 7	$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{62}H_{124}O_{33}$	聚氧乙烯山梨醇单油酸酯($n=28$)	34	37.312	936.545 1	$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{82}H_{164}O_{43}$	聚氧乙烯山梨醇单油酸酯($n=30$)		
					聚氧乙烯山梨醇二油酸酯($n=28$)						$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{82}H_{164}O_{43}$	聚氧乙烯山梨醇二油酸酯($n=30$)
					聚氧乙烯山梨醇三油酸酯($n=28$)						聚氧乙烯山梨醇三油酸酯($n=30$)		
					聚氧乙烯山梨醇四油酸酯($n=28$)						聚氧乙烯山梨醇四油酸酯($n=30$)		
					聚氧乙烯山梨醇五油酸酯($n=28$)						聚氧乙烯山梨醇五油酸酯($n=30$)		
25	29.212	738.438 6	$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{64}H_{128}O_{34}$	聚氧乙烯山梨醇单油酸酯($n=29$)	35	38.100	958.557 3	$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{84}H_{168}O_{44}$	聚氧乙烯山梨醇单油酸酯($n=31$)		
					聚氧乙烯山梨醇二油酸酯($n=29$)						$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{84}H_{168}O_{44}$	聚氧乙烯山梨醇二油酸酯($n=31$)
					聚氧乙烯山梨醇三油酸酯($n=29$)						聚氧乙烯山梨醇三油酸酯($n=31$)		
					聚氧乙烯山梨醇四油酸酯($n=29$)						聚氧乙烯山梨醇四油酸酯($n=31$)		
					聚氧乙烯山梨醇五油酸酯($n=29$)						聚氧乙烯山梨醇五油酸酯($n=31$)		
26	30.000	760.450 4	$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{66}H_{132}O_{35}$	聚氧乙烯山梨醇单油酸酯($n=30$)	36	38.888	980.569 5	$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{86}H_{172}O_{45}$	聚氧乙烯山梨醇单油酸酯($n=32$)		
					聚氧乙烯山梨醇二油酸酯($n=30$)						$[m+2NH_4]^{2+}$	$C_{86}H_{172}O_{45}$	聚氧乙烯山梨醇二油酸酯(

功半,对于某些质控场景(如对产品批间稳定性监测等)来说并非最佳选择。此外,高效液相色谱(HPLC)法虽能将多组分进行有效分离,但难免会由于液相色谱本身的局限性而不得不增加洗脱时间,消耗大量有机溶剂,并不符合“绿色检验”高质量发展的检验检测趋势。

3.2 超临界流体相色谱法分析聚山梨酯系列辅料

本研究中采用UPCC法建立的分析方法对聚山梨酯20、聚山梨酯60和聚山梨酯80进行组分分离,可在37 min内成功检测到各自50~70个色谱峰,单针进样使用的有机溶剂不足10 mL。与传统的HPLC法相比分析效能大幅提升。然而,聚山梨酯各组分在色谱系统中的保留时间特征性不强,各色谱峰交叉重叠现象显著,仅从质谱得到的相对分子量信息指认单个色谱峰的物质结构存在多种可能的化合物。如聚山梨酯20的UPCC色谱图中,保留时间在11.1~14.7 min之间的峰可同时与聚氧乙烯山梨醇、聚氧乙烯异山梨醇、聚氧乙烯单月桂酸酯、聚乙二醇相匹配,增加了判断难度。

3.3 聚山梨酯UPCC指纹图谱分析

UPCC法与MS法联用后建立的聚山梨酯80 UPCC指纹图谱,实现了不同来源聚山梨酯80产品总体成分分布的相似度评价,能与聚山梨酯20和聚山梨酯60有效区分。聚山梨酯辅料各品种间的主要区别在于原料脂肪酸的不同,聚山梨酯20的原料以月桂酸为主,含部分肉豆蔻酸和棕榈酸;聚山梨酯60的原料以硬脂酸和棕榈酸为主;聚山梨酯80的原料则以油酸为主,肉豆蔻酸、棕榈酸、棕榈油酸、硬脂酸、亚油酸、亚麻酸等其他多种脂肪酸为辅^[21]。在实验过程中发现,相对简单的原料脂肪酸组成则与对照品一致性较好,而聚山梨酯80原料中过多的脂肪酸类型加剧了产品组成复杂化,更易造成产品质量的差异。

3.4 聚山梨酯组成分析的质控挑战

聚山梨酯系列辅料属油脂衍生物,组成的复杂性是造成其质控难题的重要因素,对组分的定性鉴别和定量技术方面仍存在挑战。在确认聚山梨酯组分结构的过程中发现,虽然其中大量组分化学结构类似,但离子化效应差异较大,有些成分虽有可能含量占比较大,但在质谱检测中的信号响应强度不足。此外,由于存在大量的同分异构体,对聚山梨酯中全部组分进行结构确认的难度较大,后续研究将采用多维色谱并结合定制数据库进一步深入研究,以完成对其组分全面精准的了解。同时,将收集更多样本量的聚山梨酯20和聚山梨酯60,完成UPCC指纹图谱的建立,将2种对聚山梨酯组成分析的质控策略相结合,以应对不同的应用场景。

综上所述,本研究中建立的聚山梨酯80 UPCC指纹图谱分析方法,精密度良好,样品制备简单,分析速

度快,可作为产品稳定性监测或质量一致性评价的方法,可为深入研究聚山梨酯辅料质量标准 and 谱效关系提供理论依据,同时也可作为“绿色检验”标准体系的推广提供可借鉴的技术方法和数据参考。

参考文献

- [1] JONES MT, MAHLER HC, YADAV S, et al. Considerations for the Use of Polysorbates in Biopharmaceuticals[J]. *Pharm Res*, 2018, 35(8):148.
- [2] SCHWARTZBERG LS, NAVARI RM. Safety of Polysorbate 80 in the Oncology Setting[J]. *Adv Ther*, 2018, 35(6):754 - 767.
- [3] WEST C. Current trends in supercritical fluid chromatography[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2018, 410:6441 - 6457.
- [4] WU WJ, ZHANG Y, ZHANG F, et al. An analytical strategy for accurate, rapid and sensitive quantitative analysis of isoflavones in traditional Chinese medicines using ultra - high performance supercritical fluid chromatography: Take Radix Puerariae as an example[J]. *J Chromatogr A*, 2019, 1606:460385.
- [5] LI BQ, LI XK, LIN Y, et al. Development and validation of ultra - high performance supercritical fluid chromatography method for quantitative determination of six compounds in Guizhi Fuling capsule and tablet samples [J]. *J Sep Sci*, 2021, 44 (17) : 3199 - 3207.
- [6] SUN T, LUO J, XU Y, et al. Ultra - high performance supercritical fluid chromatography method for separation and quantitation of saikosaponins in herbal medicine [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2021, 199:114039.
- [7] GARCIA AR, VELDE B, ROSKAM G, et al. Supercritical fluid chromatography as a rapid single - step method for the determination of mineral oil saturated and aromatic hydrocarbons in purified mineral oils for food and cosmetics applications [J]. *J Chromatogr A*, 2020, 1614:460713.
- [8] TANG GY, HUANG Y, ZHANG TT, et al. Determination of phenolic acids in extra virgin olive oil using supercritical fluid chromatography coupled with single quadrupole mass spectrometry[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2018, 157:217 - 225.
- [9] BROVČEV, MRAVLJAK J, ŠINK J, et al. Rational design to biologics development: The polysorbates point of view[J]. *Int J Pharm*, 2020, 581:119285.
- [10] YANG RS, BUSH DR, DEGRAAN WN, et al. Advancing Structure Characterization of PS - 80 by Charge - Reduced Mass Spectrometry and Software - Assisted Composition Analysis[J]. *J Pharm Sci*, 2022, 111(2):314 - 322.
- [11] YANG K, HEWARATHNA A, GEERLOF VI, et al. Screening of Polysorbate - 80 Composition by High Resolution Mass Spectrometry with Rapid H / D Exchange [J]. *Anal Chem*, 2019, 91(22):14649 - 14656.
- [12] CHANG YY, WU HL, WANG T, et al. Geographical origin traceability of traditional Chinese medicine *Atractylodes macrocephala* Koidz. by using multi - way fluorescence