

利用 LC/MS/MS 简化聚山梨酯氧化副产物的筛查流程

使用 Agilent AdvanceBio 表面活性剂分析 HPLC 柱

作者

Wendi A. Hale
安捷伦科技有限公司
Jeremy P. Koelmel 和
Krystal J. Godri Pollitt
耶鲁大学公共卫生学院

摘要

生物药物制剂中表面活性剂的氧化问题越来越受关注和重视。发生表面活性剂氧化时，有必要建立有效的筛选方法来应对这一问题。本应用简报介绍了一种采用 Agilent AdvanceBio 表面活性剂分析 HPLC 柱的新型 LC/MS/MS 工作流程。

前言

表面活性剂，特别是聚山梨酯，在稳定蛋白质类治疗药物方面起着至关重要的作用。然而，表面活性剂容易发生氧化，残留的过氧化物、光照或可沥滤物（如过渡金属，特别是铁）都可能造成表面活性剂氧化^[1]。聚山梨酯氧化会生成活性降解产物，这些产物可能会影响生物治疗药物的稳定性，导致生物治疗药物及其制剂难以维持其有效性和安全性。

建立一种筛查方法来快速、明确地鉴别制剂缓冲液中的氧化降解标志物非常重要^[2-8]。科学家可以通过这些筛查方法来确定针对氧化问题的应对措施，如减少铁污染和氧气暴露，从而确保生物制药产品的长期稳定性。本应用简报介绍了使用 AdvanceBio 表面活性剂分析 HPLC 色谱柱、Agilent 6546 LC/Q-TOF 系统、Agilent MassHunter 定性分析软件 12.0 和 PolyMatch^[9] 软件鉴定聚山梨酯氧化标志物的工作流程。

实验部分

材料与样品前处理

所有化学品均购自 Sigma-Aldrich，所有流动相均为 LC/MS 级。使用流动相 A 将聚山梨酯 80 稀释至最终浓度为 0.02% (w/v)。将聚山梨酯 80 与 3% (w/v) 过氧化氢在 40 °C 水浴中孵育过夜。

仪器

将 Agilent 1290 Infinity II UHPLC 系统与 Agilent 6546 LC/Q-TOF 系统联用，UHPLC 系统配备：

- Agilent 1290 Infinity II 高速泵 (G7120A)
- Agilent 1290 Infinity II Multisampler (G7167B)
- Agilent 1290 Infinity II 柱温箱 (G7116B)

软件

- Agilent MassHunter 软件
- PolyMatch^[9] 软件

LC/MS/MS 分析和数据处理

采用 1290 Infinity II UHPLC 与配备双安捷伦喷射流离子源的 6546 LC/Q-TOF 的联用系统进行 LC/MS/MS 分析。使用 Agilent MassHunter 采集工作站软件 (11.00) 和自动

MS/MS 方法采集数据。使用具有分子式查找 (FBF) 算法的 MassHunter 定性分析软件 12.0 和个人化合物数据库与谱库 (PCDL) 管理器 B.8.00.00 进行靶向分析。使用 PolyMatch Flow 和 Visualizer 进行疑似物筛查分析^[9]。请注意，聚乙二醇 (PEG) 和聚氧乙烯 (POE) 为化学同义词。PCDL 中使用术语 POE，这一术语在描述聚山梨酯的成分时更常用。PolyMatch 中使用术语 PEG，因为该软件旨在用于分析各类聚合物。因此，本应用简报中这两个术语可以互换使用。

方法条件

表 1. 液相色谱参数

参数	设定值												
色谱柱	Agilent AdvanceBio 表面活性剂分析柱 300 Å, 3.5 µm, 2.1 × 100 mm (部件号 861775-907), 带保护柱 (部件号 821126-927)												
流动相 A	10 mM 乙酸铵												
流动相 B	甲醇												
流速	0.3 mL/min												
进样量	2 µL												
柱温	50 °C												
LC 梯度	<table border="1"><thead><tr><th>时间 (min)</th><th>%B</th></tr></thead><tbody><tr><td>0-1</td><td>5</td></tr><tr><td>1-10</td><td>5-91</td></tr><tr><td>10-14</td><td>91</td></tr><tr><td>14-14.1</td><td>91-5</td></tr><tr><td>14.1-15</td><td>5</td></tr></tbody></table>	时间 (min)	%B	0-1	5	1-10	5-91	10-14	91	14-14.1	91-5	14.1-15	5
时间 (min)	%B												
0-1	5												
1-10	5-91												
10-14	91												
14-14.1	91-5												
14.1-15	5												
后运行时间	3 min												
进样针清洗	20:80 甲醇:水, 10 s												

表 2. Agilent 6546 LC/Q-TOF 参数

参数	设定值
离子源	双安捷伦喷射流
气体温度	200 °C
气体流量	12 L/min
雾化器	30 psig
鞘气温度	350 °C
鞘气流量	11 L/min
毛细管电压 (VCap)	3500 V
喷嘴电压	0 V
碎裂电压	145 V
参比质量	121.0509, 922.0098
采集速率 (MS; MS/MS)	5 和 3 幅质谱图/秒
MS 和 MS/MS 范围	m/z 50-3000
每个循环的最大母离子数	5
碰撞能量	10、20 和 40 V

结果与讨论

聚山梨酯的氧化是一个复杂的过程，部分原因在于组成和结构的复杂性。聚山梨酯由四条不同的 POE 链组成，上面共分布了 20 个 POE 基团。此外，每条链的末端都可以连接一个脂肪酸。氧化可以发生在游离脂肪酸的不饱和位点以及 20 个 POE 基团中的任何一个上。另外，氧化过程由自由基引起，并可以不断扩展，从而产生大量潜在的降解产物，进一步增加了复杂性。针对这一情况，高分辨精确质量液相色谱/串联质谱法 (LC/MS/MS) 通常是明确鉴别这些降解产物的首选方法。本应用简报介绍了两种方法，旨在大大增加可鉴别的氧化副产物的数量。

数据采集

由于聚山梨酯的氧化非常复杂，LC/MS/MS 方法的运行时间往往较长。AdvanceBio 表面活性剂分析柱旨在缩短运行时间，同时实现聚山梨酯成分的高分离度分离。我们选择了 100 mm 长的色谱柱，通过 18 分钟方法来实现更高的分离度。为了确保获得的数据可用于靶向方法及疑似物筛查方法，我们采用自动 MS/MS 方法采集数据，这是一种数据依赖型方法，它会选择每个质谱图中信号强度最高的五个峰进行 MS/MS 分析，并应用主动排除。由于对照样品并非新购，且曾暴露于光线下，因此可能存在一定程度的氧化。而经过人工氧化处理的样品，预计氧化程度会更高。图 1 的总离子流色谱图表明，重复测定之间具有很高的重现性。特别是在氧化样品的色谱图中，单酯、二酯和三酯洗脱位置处的信号降低以及色谱图前面一段信号略微增加，表明存在一定程度的降解。

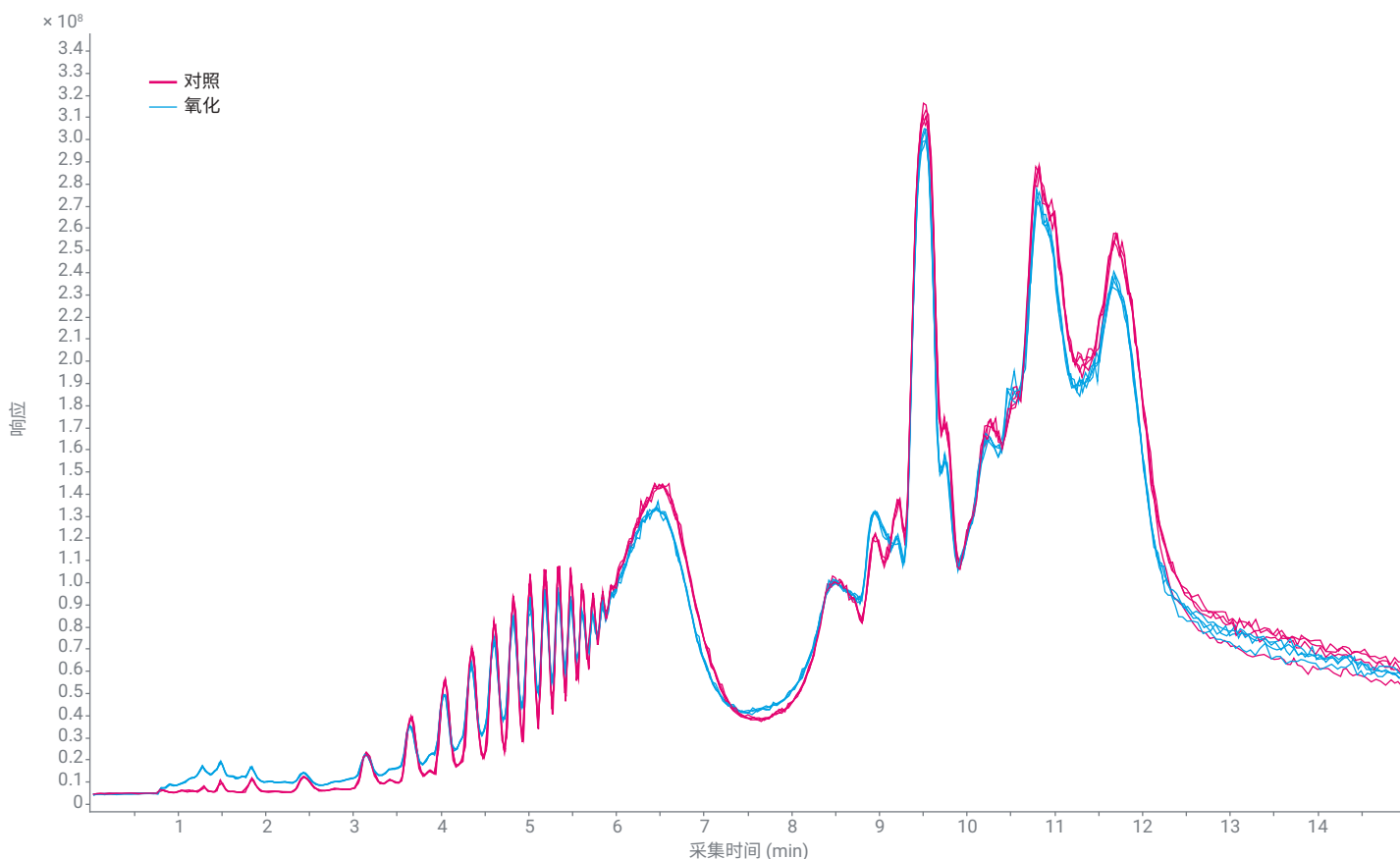


图 1. 比较对照样品和氧化样品的总离子流色谱图发现已经发生了一定程度的降解

靶向分析

如前所述，聚山梨酯的复杂结构和自由基引发的氧化过程都会导致氧化情况非常复杂，可能产生数百甚至数千种潜在的降解产物。若已知某些降解产物，则可采用靶向分析方法进行检测。近年来，关于聚山梨酯已知降解产物的研究文献越来越多，可以将这些文献中的数据整合到靶向分析方法中。最近发表的一篇文章提供了超过 4800 种潜在降解产物，并为每种产物提供了 MS/MS 诊断离子^[2]。基于该列表，创建了 PCDL 并将其整合到定性分析软件 12.0 的 FBF 算法中。FBF 算法根据质量准确度、同位素丰度和间隔对化合物进行评分。此外，该算法还能够为 MS/MS 离子分配化学式。

图 2 和图 3 为已鉴定的化合物 POE1 单辛酸酯的色谱图示例。每个对照样品和氧化样品进行了四次重复测定。对照样品中含有少量该化合物，这一点已通过 FBF 算法得到验证。不过，对照样品中该化合物的丰度尚未达到触发 MS/MS 分析的条件。对照样品中氧化峰的强度较低是符合预期的。由于对照样品的保留时间与氧化样品的保留时间相匹配，且 FBF 得分为 82.5 分（满分 100 分），因此能够可靠地鉴定该化合物。由于 POE1 单辛酸酯属于低丰度化合物，同位素保真度略有下降，这解释了 FBF 得分为何不足 90。与对照样品相比，氧化样品中 POE1 单辛酸酯的丰度增加了一个数量级，且 FBF 得分也达到 99.5。此外，检测到了参考文献中提到的 MS/MS 诊断离子^[2]，同时还标注了其他 MS/MS 峰。

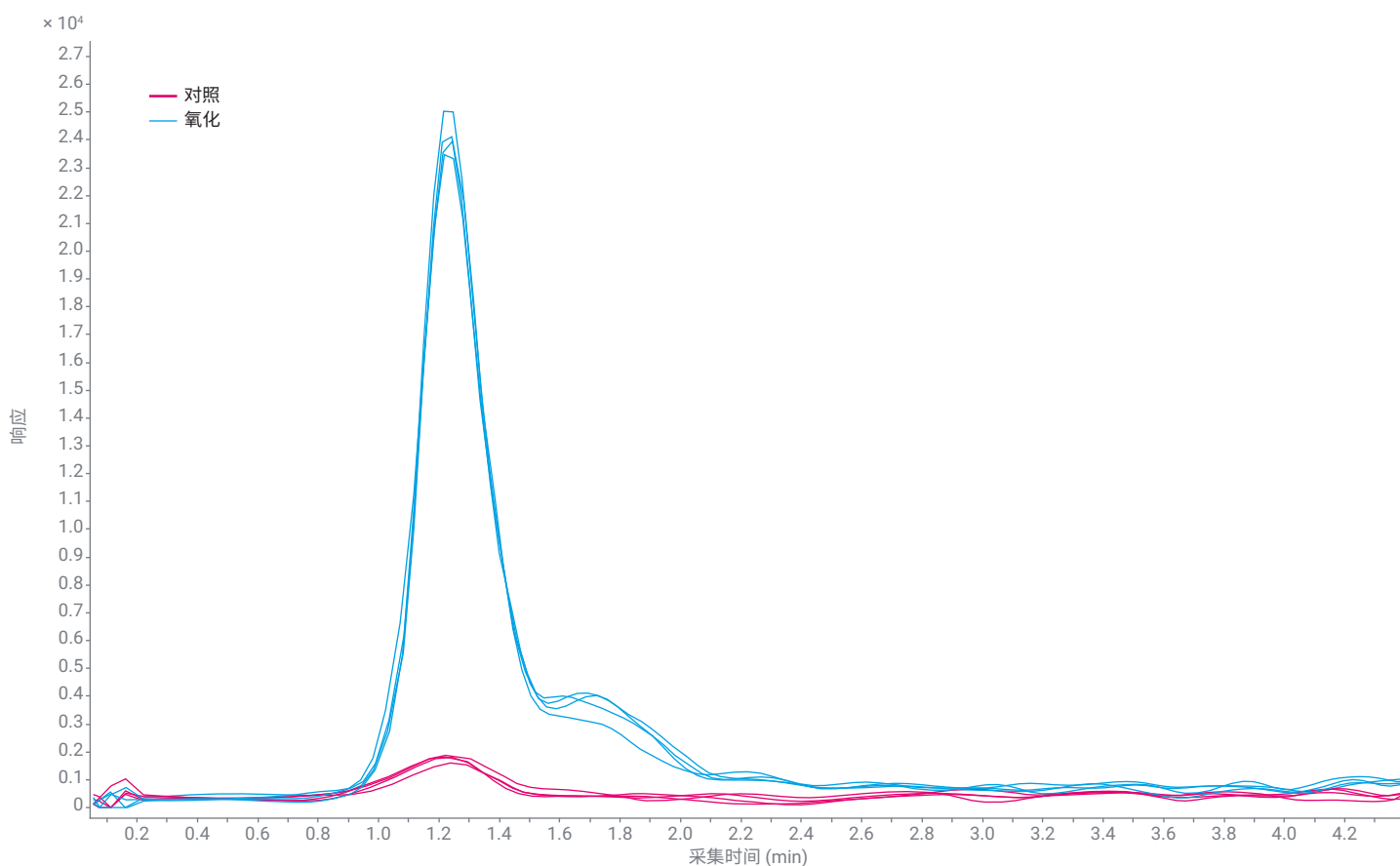


图 2. 对照样品和氧化样品的 POE1 单辛酸酯的提取离子色谱图。重复测定的峰面积具有高精度，RSD 分别为 13.4% 和 1.9%

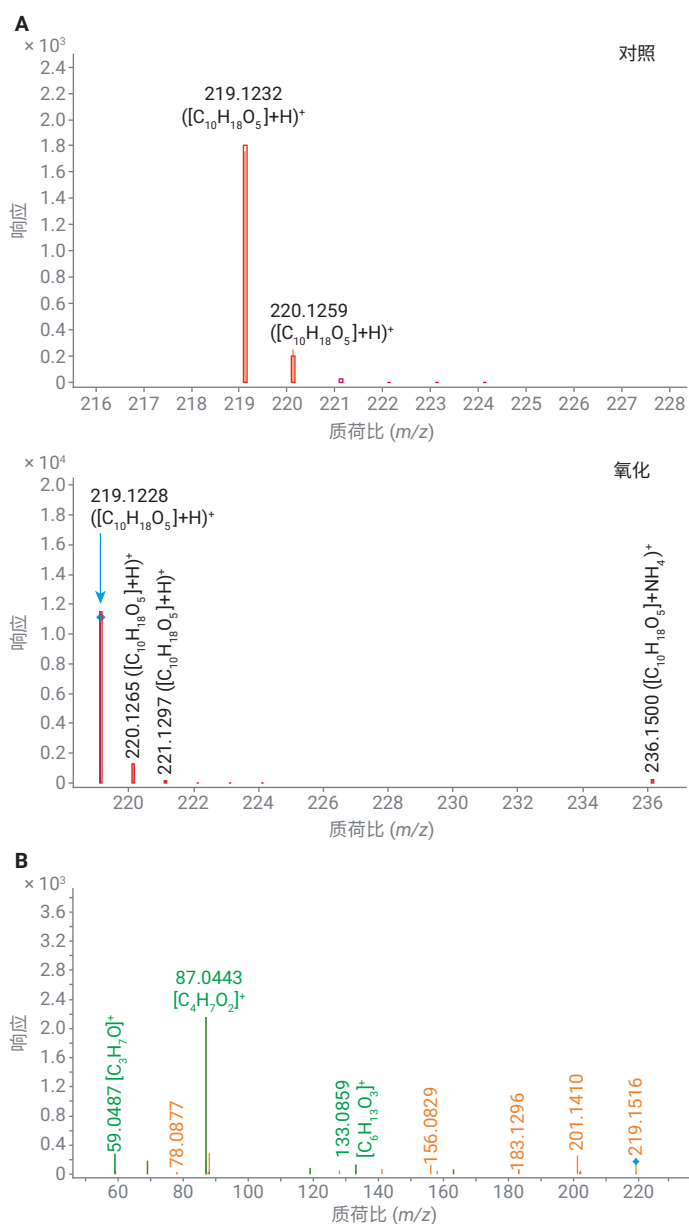


图 3. (A) 基于 FBF 算法对 POE1 单辛二酸酯的 MS1 谱图进行标注。氧化样品的检测结果还表明该化合物生成了铵加合物。只有在氧化样品中，该化合物的丰度才足以触发 MS/MS (B)

已鉴定化合物的第二个例子是一系列同系物，即 POE11 至 POE15 单氢过氧油酸酯，每种物质之间仅相差一个 POE 基团。这一系列化合物的 FBF 得分都非常高，从 96.3 到 99.7，平均为 98.8。如图 4 所示，所有五种化合物八次重复测定的质量误差均低于 1 ppm。虽然在对照样品中检测到了部分氢过氧油酸酯，但在氧化样品中，这些氢过氧油酸酯的含量一致增加。所有重复测定的峰面积重现性良好，RSD 在 1.9%–5.9% 之间。图 5 为其中一个氧化样品中 POE13 单氢过氧油酸酯的谱图示例。使用靶向分析方法具有许多优势：PCDL 的设置非常简单，只需提供名称和分子式即可；FBF 算法处理速度快，可以清楚了解到样品间的差异。然而，这种方法无法鉴别数据库中未包含的化合物。其他数据分析方法可以提供互补性的优势。

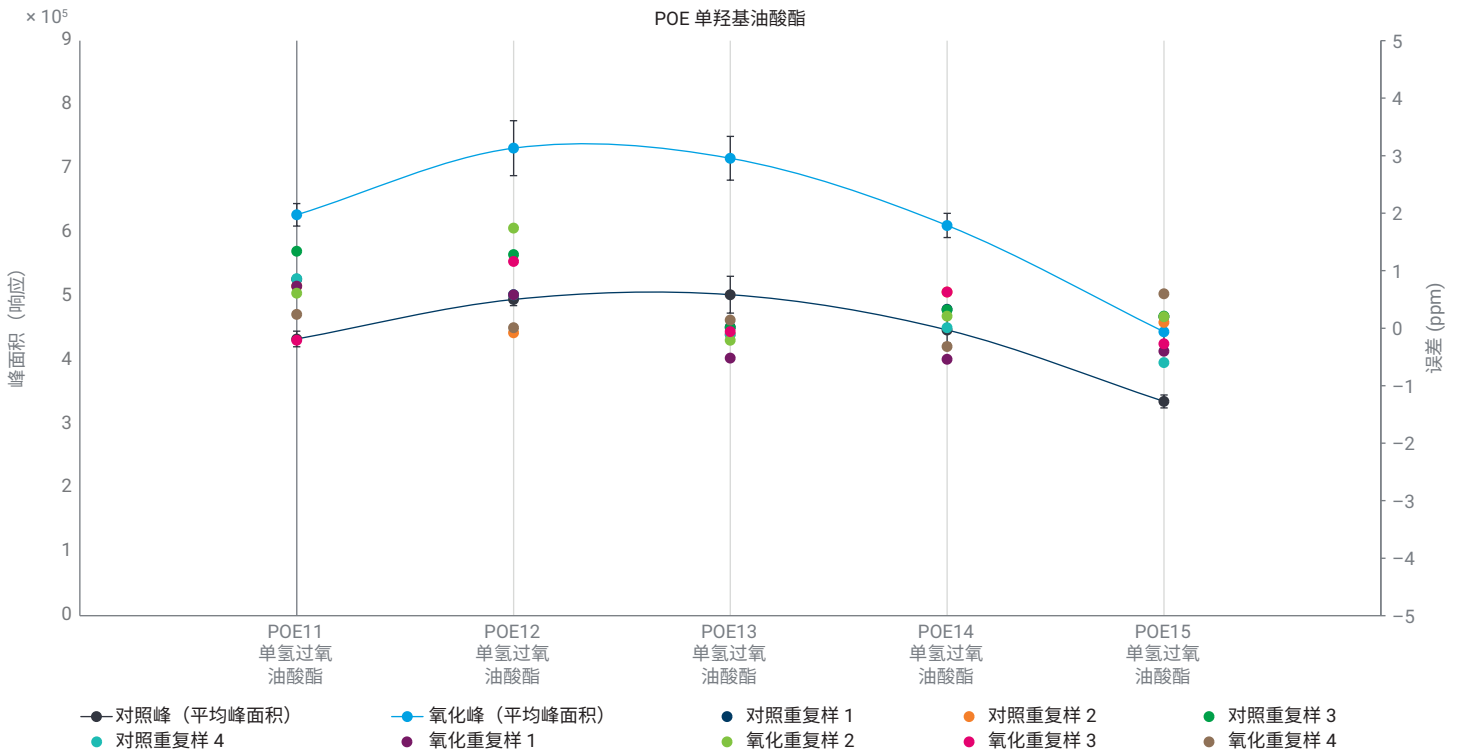


图 4. POE(n) 单氢过氧油酸酯系列的结果汇总。氧化样品中降解产物增加，并表现出出色的重现性。所有重复测定的 FBF 得分均较高，从 96.3 到 99.7，这得益于质量误差小于 1 ppm 的高精度检测

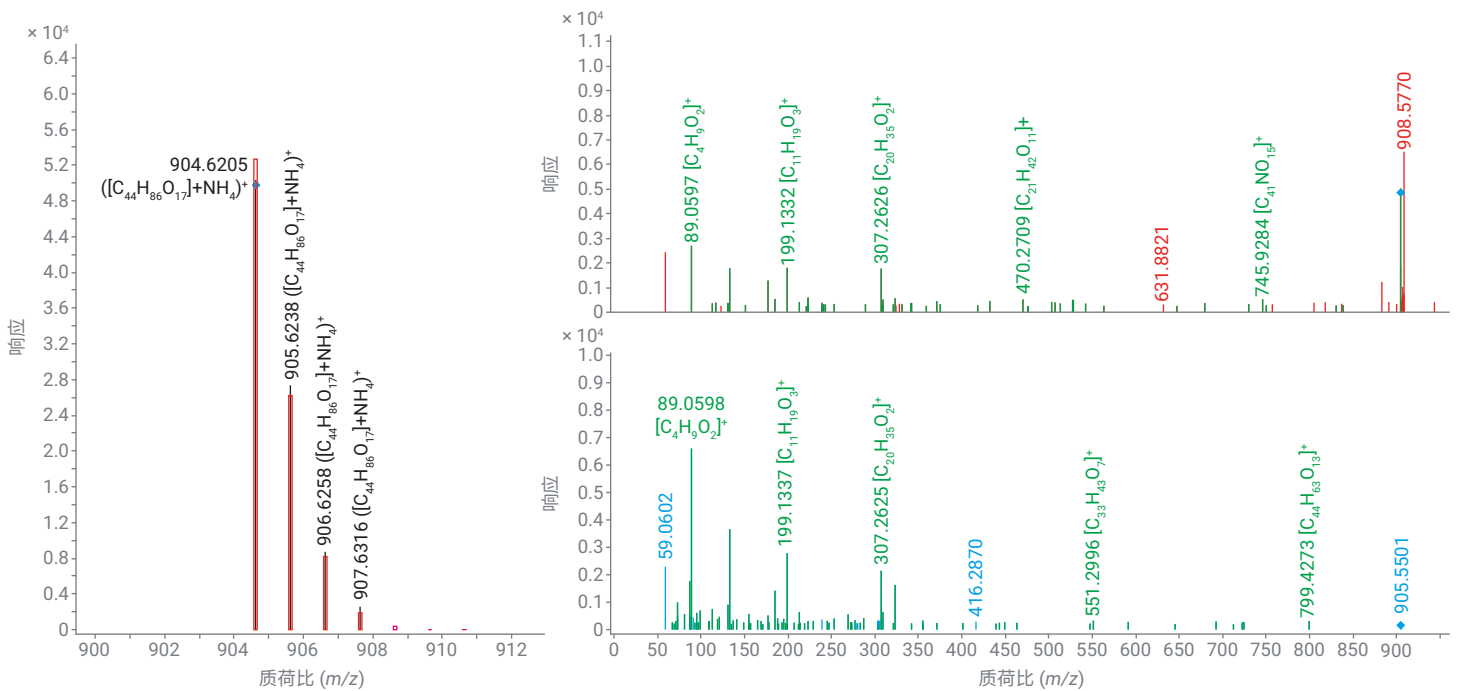


图 5. 以其中一个氧化样品中的 POE13 单氢过氧油酸酯为例，其 FBF 得分为 98.4。三幅 MS/MS 谱图中，有两幅出现了 MS/MS 诊断离子 307.2632，质量准确度为 -2.3 ppm 或更低。下方的谱图中存在另一个 MS/MS 离子 323.2572，表明发生了氧化

疑似物筛查分析

虽然靶向分析方法对于分析聚山梨酯氧化产物来说是一种不错的起始方法，但非靶向分析方法通过综合考察保留时间、串联质谱数据及质量亏损等多个参数，不仅能够提升鉴定的可靠性，还可揭示新的降解产物。PolyMatch 整合了广泛的数据来对聚合物进行分类，包括质量亏损、保留时间和精确质量，这些数据可以与同系物特征结合使用，从而得到可能属于同一类别的化学物质组。MS/MS 数据能够提供分子结构信息，为化合物鉴定和分类提供有力支持^[9]。

PolyMatch 现在可通过片段筛选、同系物检测和“通用”库来检测未知聚合物，包括氧化产物。同系物检测与 PEG 相关片段筛选将提取出所有具有聚乙二醇单元的聚合物，无论它们是否已收录在包含已知聚合物结构的基于规则的 PolyMatch 库中。此外，“通用”库还能捕获氧化聚合物（图 6）。该聚合物库中的聚合物通过双键当量、引入的各种官能团和加合物、聚乙二醇单元的数量以及存在的 CH₂ 进行特征描述。图 7 为 PolyMatch 库中的 PEGs 及其特征的示例，包括图 10 中鉴定的一些结构的图示。尽管 PolyMatch 库目前尚未包含具体的聚山梨酯氧化产物及其裂解模式，但未来将通过扩展该数据库来增加这一功能。该软件程序提供自动峰识别、空白过滤、注释和可视化功能^[9]。

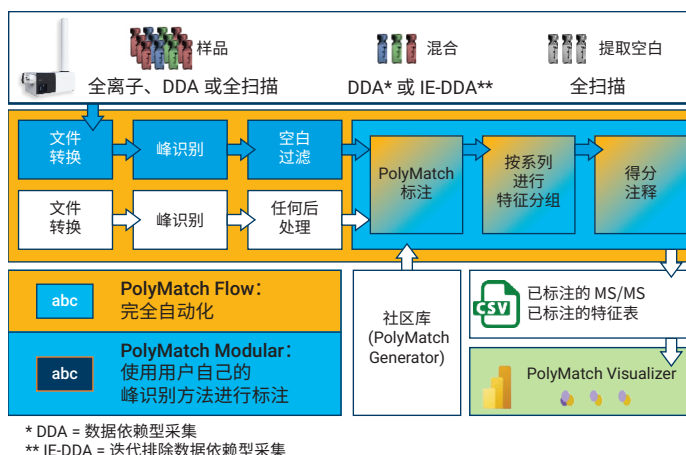


图 6. PolyMatch 工作流程概述。本实验采用了全自动 PolyMatch Flow 界面

模拟 PEGs: 64450 种物质		
示例	定义	内置范围
n = 3	PEG 单元数量	3-44
NH ₄ ⁺	加合物	NH ₄ ⁺ , Na ⁺ , H ⁺
CH ₂ = 6	碳原子数 (非 PEG)	0-19
DBE = 4	双键当量	0-6
(4-OH)	官能团	OH (0-4), NH ₃ (0-2), =O (0-2)

结构和命名规则:

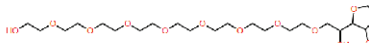
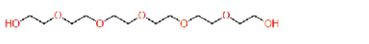
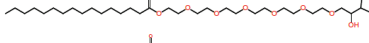

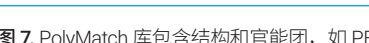
 聚山梨酯_PEG-8
 PEG_PEG-6
 聚山梨酯-R1_FA(16:0)_PEG-6
 聚异山梨醇酯-R1_FA(18:0)_PEG-9
 聚山梨酯-R1_FA(18:2)_PEG-9

图 7. PolyMatch 库包含结构和官能团，如 PEGs/POEs。所示的结构由 PolyMatch 生成的简化分子线性输入规范 (SMILES) 文件生成，然后通过 <https://www.cheminfo.org> 网站绘制

使用质量亏损尤其有效，因为它利用了聚山梨酯中重复的 POE 基团这一特性。PolyMatch 可以确认降解产物所属的系列并直观地呈现出来，从而轻松排除假阳性结果。图 8A 显示了一系列聚山梨酯成分及其重复的 POE/PEG 单元，经鉴定为聚山梨酯-R1_FA(16:0)-PEG(n)。PolyMatch 的命名规则与 PCDL 不同。因此，聚山梨酯-R1_FA(16:0)-PEG(n)与图 4 和图 5 中提到的 POE(n) 单氢过氧油酸酯实际上是相同的结构和系列。

图 8B 充分表明了 AdvanceBio 表面活性剂分析柱与 PolyMatch 软件相结合的优势。图 8A 为单一系列的聚山梨酯相关成分，而图 8B 则揭示了质量亏损系列中通过色谱得到分离的一组异构体。该液相色谱柱凭借优异的选择性，无需冗长的分析方法即可实现异构体的分离。图 9 为每组异构体的 MS/MS 谱图示例。上方的谱图来自较晚洗脱的异构体组，碎片大多已得到标注。下方的谱图则来自较早洗脱的异构体组，其中部分碎片与

上方谱图一致。然而，下方谱图与上方谱图存在显著差异，因为它包含一个尚未标注的高丰度峰 m/z 323.2576。文献表明，该 MS/MS 离子为酮油酸，为聚山梨酯氧化提供了有力证据。这个离子将添加到 PolyMatch 库中^[4-6]。

本研究主要聚焦于一组聚山梨酯成分的分析，同时还检测到了多种其他成分。PolyMatch 采用 A 至 E 字母评分系统。其中评分为 A 的化合物被视为高度可信的鉴定结果，其依据是精确质量和特定化合物类别的碎裂模式。有 261 种化合物获得 A 评分。图 10 显示了这些高分化合物的质量亏损和相应的保留时间与 m/z 的关系图。由于聚山梨酯的氧化是一个复杂且涉及自由基的过程，强大的软件工具对于确定氧化程度至关重要。此外，使用 AdvanceBio 表面活性剂分析柱可以加快数据采集过程，为研究提供了重要支持。

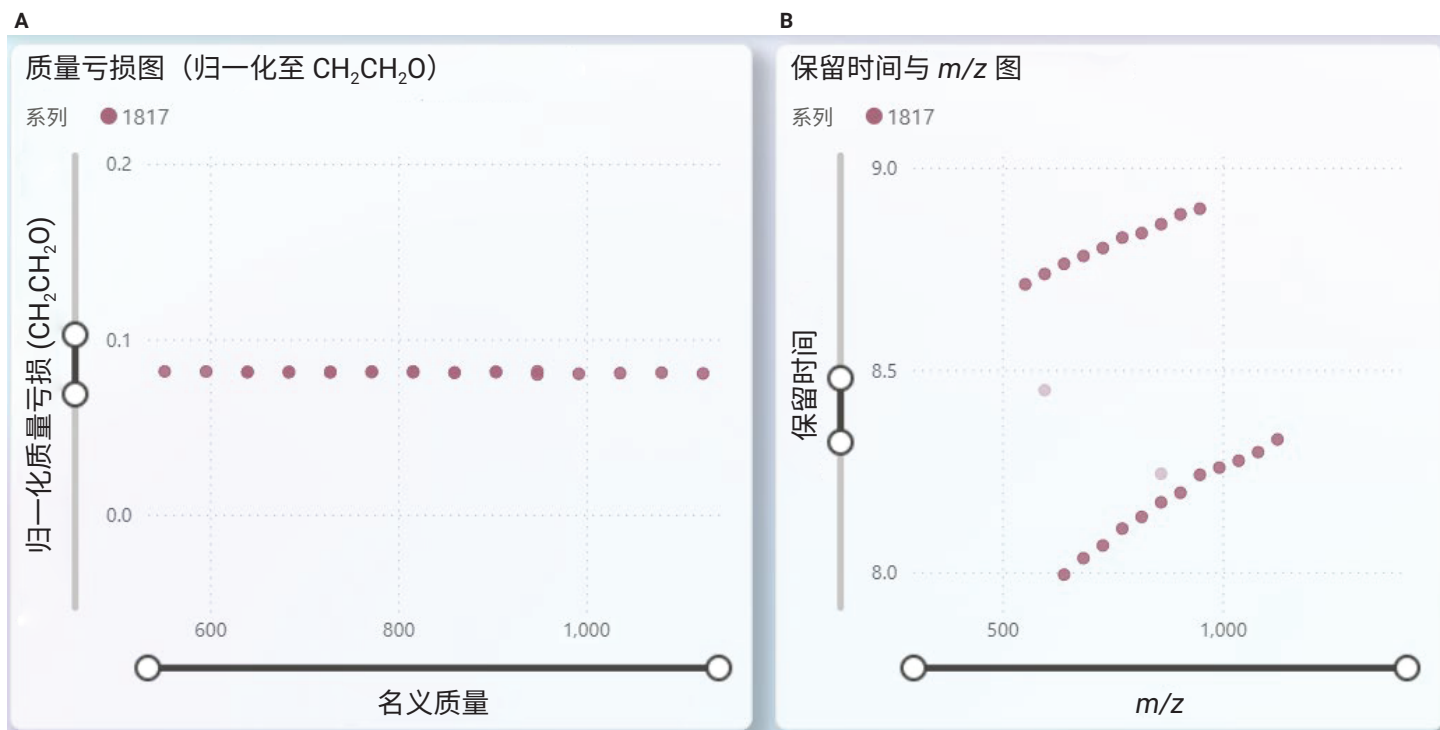


图 8. 基于 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ 归一化的 Kendrick 质量图 (A)，显示了一系列被鉴定为聚山梨酯-R1_FA(16:0)-PEG(5-18) 的聚山梨酯成分。保留时间与 m/z 图 (B) 显示了质量亏损系列中通过色谱得到分离的一组异构体

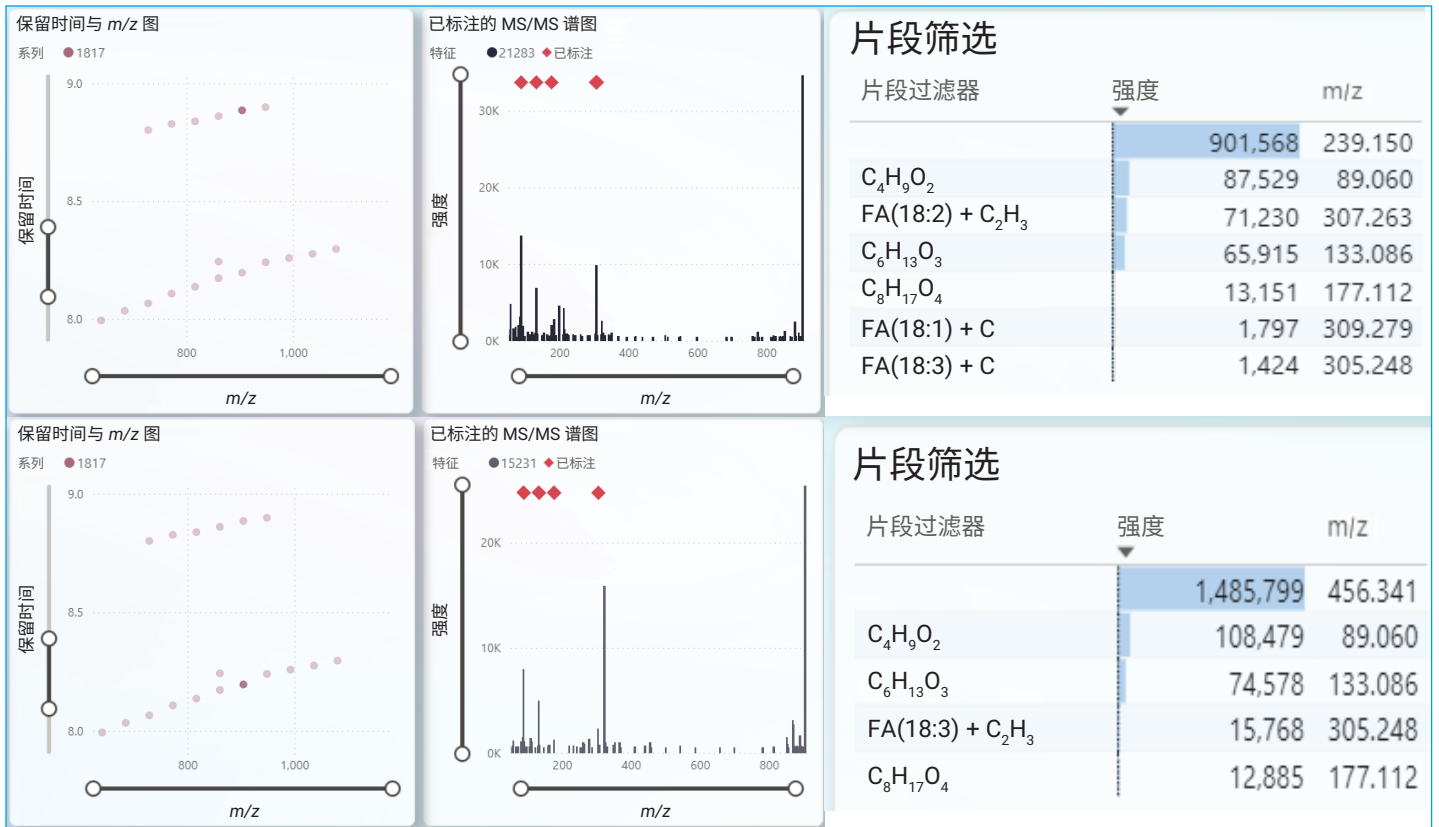


图 9. 每组异构体的 MS/MS 谱图和碎片标注示例。MS/MS 分析通过诊断离子 m/z 323.2576 确认下方的化合物已被氧化

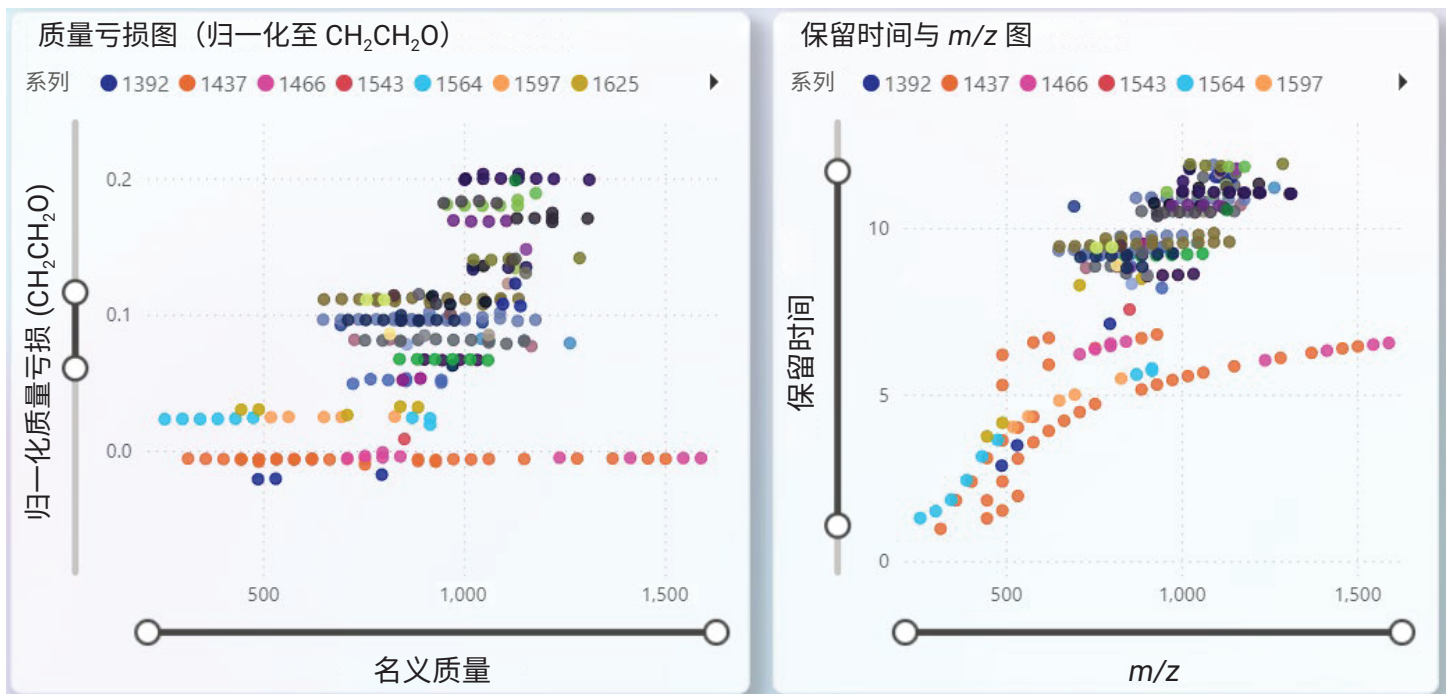


图 10. 所有高分化合物的质量亏损图和保留时间与 m/z 图

结论

我们开发了一种用于鉴定聚山梨酯氧化副产物的 LC/MS/MS 工作流程，旨在作为实验室监测生物治疗产品和制剂稳定性的筛查工具。Agilent AdvanceBio 表面活性剂分析柱可缩短运行时间，同时实现聚山梨酯成分的高分离度分离。Agilent 6546 LC/Q-TOF 系统可生成高分辨的精确质量数据，并具有出色的同位素保真度，可用于鉴定降解产物。Agilent MassHunter 定性分析软件 12.0 的分子式查找 (FBF) 算法适用于靶向分析方法，而 PolyMatch 软件则更适合非靶向的疑似物筛查方法。

参考文献

1. Weber, J.; Buske, J.; Mäder, K.; Garidel, P.; Diederichs, T. Oxidation of Polysorbates: an Underestimated Degradation Pathway? *Int. J. Pharm. X* **2023**, *6*, 100202–100232. DOI: 10.1016/j.ijpx.2023.100202
2. Li, X.; Wang, Z.; Zheng, B.; Wang, Y.; Zhang, J. Novel Strategy to Rapidly Profile and Identify Oxidized Species of Polysorbate 80 Using Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Coupled with High-Resolution Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* **2023**, *95*, 9156–9163. DOI: 10.1021/acs.analchem.2c04956
3. Kranz, W.; Wuchner, K.; Corradini, E.; Berger, M.; Hawe, A. Factors Influencing Polysorbate's Sensitivity Against Enzymatic Hydrolysis and Oxidative Degradation. *J. Pharm. Sci.* **2019**, *108*, 2022–2032. DOI: 10.1016/j.xphs.2019.01.006
4. Borisov, O. V.; Ji, J. A.; Wang, Y. J. Oxidative Degradation of Polysorbate Surfactants Studied by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *J. Pharm. Sci.* **2015**, *104*, 1005–1018. DOI: 10.1002/jps.24314
5. Hvattum, E.; Yip, W. L.; Grace, D.; Dyrstad, K. Characterization of Polysorbate 80 with Liquid Chromatography Mass Spectrometry and Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy: Specific Determination of Oxidation Products of Thermally Oxidized Polysorbate 80. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2012**, *62*, 7–16. DOI: 10.1016/j.jpba.2011.12.009
6. Liu, H.; Jin, Y.; Menon, R.; Laskowich, E.; Bareford, L.; de Vilmorin, P.; Kolwyck, D.; Yeung, B.; Yi, L. Characterization of Polysorbate 80 by Liquid Chromatography-Mass Spectrometry to Understand Its Susceptibility to Degradation and Its Oxidative Degradation Pathway. *J. Pharm. Sci.* **2022**, *111*, 323–334. DOI: 10.1016/j.xphs.2021.08.017
7. Kishore, R. S. K.; Pappenberger, A.; Dauphin, I. B.; Ross, A.; Buergi, B.; Staempfli, A.; Mahler, H.-C. Degradation of Polysorbates 20 and 80: Studies on Thermal Autoxidation and Hydrolysis. *J. Pharm. Sci.* **2011**, *100*, 721–731. DOI: 10.1002/jps.22290
8. Brovc, E. V.; Pajk, S.; Sink, R.; Mravljak, J. Protein Formulations Containing Polysorbates: Are Metal Chelators Needed at All? *Antioxid.* **2020**, *9*, 441–453. DOI: 10.3390/antiox9050441
9. Koelmel, J. P.; Stelben, P.; Oranzi, N.; Kummer, M.; Godri, D.; Qi, J.; Rennie, E. E.; Lin, E.; Weil, D.; Pollitt, K. J. G. PolyMatch: Novel Libraries, Algorithms, and Visualizations for Discovering Polymers and Chemical Series. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2024**, *35*, 413–420. DOI: 10.1021/jasms.3c00313

www.agilent.com

DE-004223

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。

© 安捷伦科技（中国）有限公司，2025
2025 年 2 月 12 日，中国出版
5994-8140ZHCN

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

