

利用配备二极管阵列检测器的高效液相色谱分析吐温 80

作者

Jianxin Yu、Scott Citrowske、
Nikki Carlson、Jacob Strange
Abbott Laboratories, Saint
Paul, MN 55117

John Rhoads
安捷伦科技公司

摘要

吐温 80 通常用作药物中的稳定剂，或用于组织处理的抗钙化剂。吐温 80 是不均匀混合物，且缺乏良好的发色团，定量分析具有挑战性。本研究使用 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 色谱柱和 Max Plot 二极管阵列检测器 (DAD) 开发出一种简单快速的高效液相色谱 (HPLC) 分析方法，用于分析溶于 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液中的吐温 80。基于吐温 80 洗脱区域中色谱峰的峰面积总和进行定量测定。经方法学评估，其精度、准确度、线性和定量限/检测限实验均得到了可接受的结果。这种方法可用于对含吐温 80 的各种水溶液进行质量控制和稳定性监测。

前言

吐温 80 也称为聚山梨酯 80，是一种常用的非离子表面活性剂、乳化剂、稳定剂和增溶剂，广泛用于药物、食品、化妆品、维生素、疫苗、静脉制剂、洗剂和肥皂中。在蛋白质制剂中，吐温 80 及其他聚山梨酯可最大程度减小表面吸附，降低蛋白质变性的速率，并提高药物的溶解性和稳定性。吐温 80 也可用于心脏瓣膜组织制备中，戊二醛前、后组织处理（固定）的抗钙化剂¹。鉴于这些关键作用，需要准确定量吐温 80 以确保产品质量。

吐温 80 是脂肪酸（主要是油酸）偏酯与山梨糖醇及其酸酐乙氧基化（每摩尔山梨糖醇和山梨酸酐用 20 摩尔左右环氧乙烷进行乙氧基化）的混合物。图 1 示出其分子结构。作为大分子化合物，由于混合物不均匀且缺乏紫外发色团，因此难以对聚山梨酯进行定量分析。文献中描述了聚山梨酯 80 的几种定量分析方法。已经报道了基于聚山梨酯 80 化学转化的间接方法，如碱诱导水解成油酸^{2,3}。这些方法费时费力，包括在 40 °C 至 60 °C 的高温下消解 6 至 18 小时。也有将 HPLC 分离与不同检测方法（如蒸发光散射检测 (ELSD)⁴⁻⁶、电喷雾检测 (CAD)⁷ 和质谱 (MS)⁸）联用，开发出几种吐温 80 的直接分析方法。一些研究人员试图不分离并用单一色谱峰进行定量分析^{4,9}。这些方法可能需要复杂的仪器，而且可能无法用于监测吐温 80 溶液的稳定性。

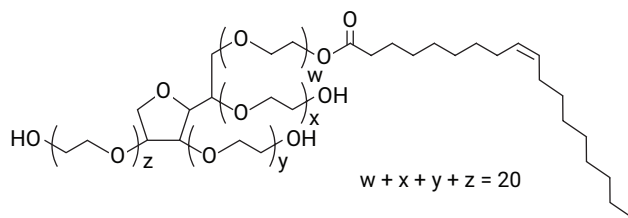


图 1. 吐温 80 的分子结构

本研究介绍了一种用于测定水溶液中吐温 80 的简单快速的方法，该方法基于 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 色谱柱和二极阵列检测器进行反相 HPLC 分离。通过测试其专属性、线性、精度、灵敏度和准确度来评估该方法用于测定磷酸盐缓冲液中吐温 80 的适用性。这种方法为科学家提供了一种理想选择，因为二极阵列检测器比 ELSD、CAD 和 MS 检测器更常用于 HPLC 分析。

实验部分

材料和仪器

吐温 80 标准品购自 US Pharmacopeial Convention (Rockville, MD)。利用购自 Fisher Chemical (Fair Lawn, NJ) 的吐温 80 配制吐温 80 样品。乙腈 (HPLC 级)、磷酸二氢钠二水合物 (经认证的晶体)、磷酸氢二钠二水合物 (经认证的晶体) 和磷酸 (> 85%) 购自 Fisher Chemical。水采用 Milli-Q 水纯化系统 (Millipore, Bedford, MA) 制备得到。

将 HPLC 系统与二极管阵列检测器 (DAD) 联用，对吐温 80 样品进行分析。利用 Agilent InfinityLab Poroshell 120 EC-C18, 3.0 × 100 mm, 2.7 μm 色谱柱 (部件号 695975-302A, 安捷伦科技公司, 加利福尼亚州圣克拉拉) 来洗脱吐温 80 峰。将 DAD 分辨率设置为 1.2 nm, 在 195–400 nm 的波长范围内进行扫描。采集 Max Plot 信号进行定量分析。进样量为 20 μL, 使用等度流动相运行, 其中包括流动相 A (0.1% 磷酸水溶液) 和流动相 B (0.1% 磷酸乙腈溶液), A:B 的恒定比例为 20:80。在整个分析过程中, 色谱柱保持为 30 °C, 流动相流速保持为 0.4 mL/min。

结果与讨论

分析的优化

文献推荐使用几种 HPLC 色谱柱和流动相 (如 HPLC C18 色谱柱)⁴, 梯度开始时为 70:30 的水:甲醇, 在 4 分钟时改变为水:甲醇 10:90⁴。吐温 80 未获得单个峰, 也未完全洗脱。使用 InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 色谱柱和 Max Plot 二极阵列检测器的上述当前条件, 得到一种快速且相对简单的方法来分析磷酸盐缓冲液中吐温 80 的浓度。

通过对每个时间点处测得的最大光谱吸光度绘图，得到 Max Plot 色谱图。Max Plot 色谱图使分析人员能够看到样品中的所有色谱峰，无论 λ_{\max} （最大吸光度所对应的波长）是多少。图 2 示出溶于 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液中的 USP 吐温 80 标样的 Max Plot 色谱图。

吐温 80 的弱紫外吸光度限制了通过固定单波长来分析吐温 80。M. Klein 等人¹⁰ 使用凝胶过滤色谱 (GFC) 柱和 UV 245 nm 条件分析吐温 80。Klein 方法的灵敏度较差。当我们尝试从 DAD 数据中提取 245 nm 处的色谱图时，获得了出人意料的色谱图。图 3 示出吐温 80 样品的 Max Plot 及其在 245 nm 处提取的色谱图之间的比较。在 245 nm 处提取的色谱图相比原始 Max Plot 色谱图峰数量更少，并且 Max Plot 色谱图中的所有峰在 245 nm 处表现出较弱的紫外吸光度。结果清楚地表明，Max Plot 二极管阵列检测器更适合用于吐温 80 分析。

Max Plot 色谱图中的一个峰或一组峰能否用于吐温 80 的定量分析？对由 USP 吐温 80 标准品和 Fisher 吐温 80 制得的浓度为 10 mg/mL 的吐温 80 溶液的分析结果进行比较，它们的 Max Plot 色谱图分别如图 2 和图 3A 所示。即使吐温 80 的浓度相当 (10.033 mg/mL USP 吐温 80 和 10.145 mg/mL Fisher 吐温 80)，色谱图在相似保留时间处仍表现出不同的峰强度。

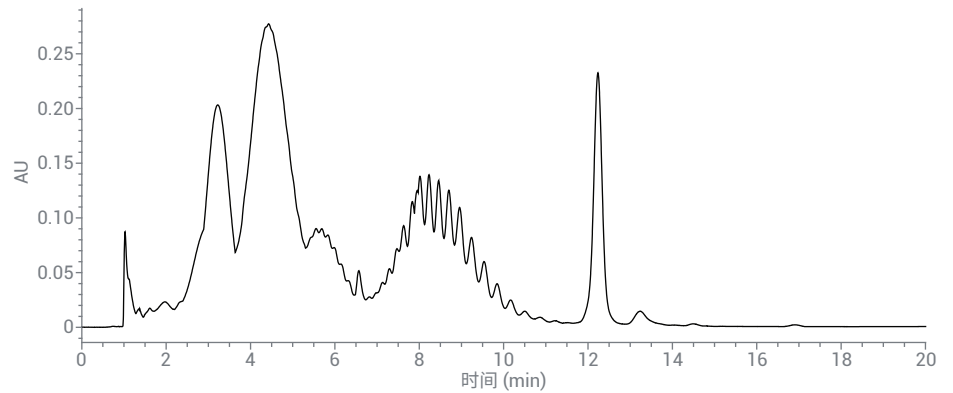


图 2. 通过 Max Plot 二极管阵列检测器在 195–400 nm 范围内获得的溶于 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液中 10 mg/mL USP 吐温 80 标样的色谱图

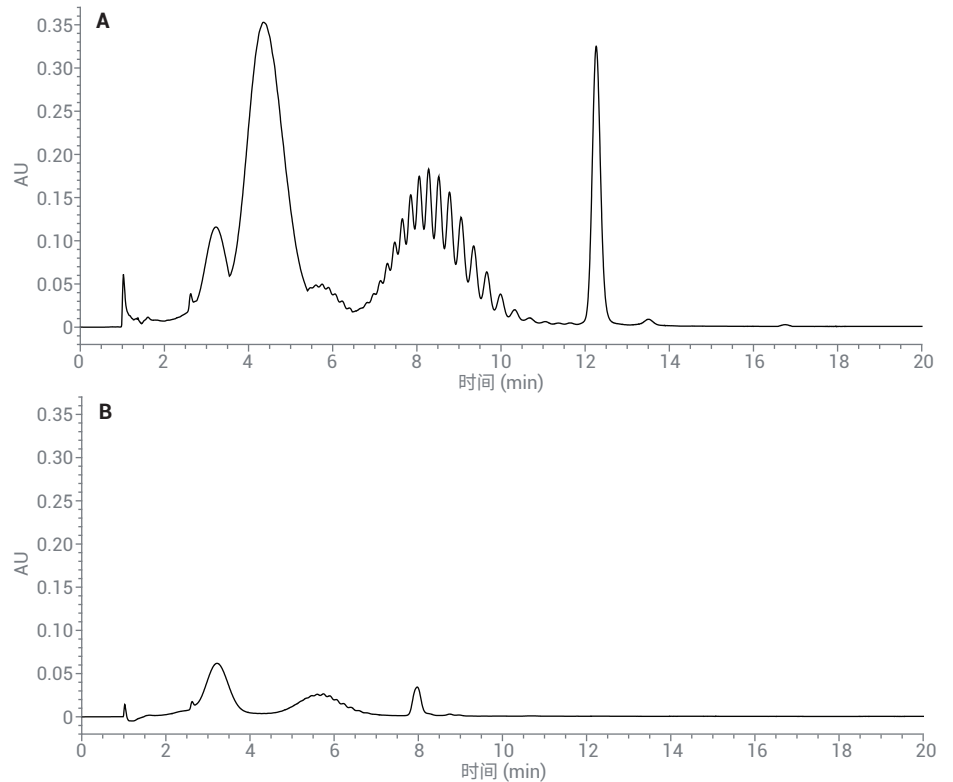


图 3. 溶于 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液中的 10 mg/mL 吐温 80 样品的 Max Plot (A) 及其 245 nm 处提取色谱图 (B) (采用相同刻度) 的比较

如果将一幅色谱图分成五组峰，表 1 列出了每组峰占总峰面积的比例：

- 第 1 组：1.8–3.7 min
- 第 2 组：3.7–5.3 min
- 第 3 组：5.3–6.8 min
- 第 4 组：6.8–11.6 min
- 第 5 组：11.6–14.2 min

两种吐温 80 材料在相似保留时间组的比例并不是 0.99 (10.033/10.145)，表明这些单独的峰组无法代表吐温 80 中的全部混合物。还比较了 1.8–14.2 分钟的总峰面积，所得比例为 0.98–0.99，结果非常接近这两种溶液中的吐温 80 浓度比例。因此，建议使用 1.8–14.2 分钟的色谱峰面积对吐温 80 进行定量分析。

磷酸盐缓冲液中吐温 80 的分析

利用用于组织处理的吐温 80（溶于 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液中）的测定结果来评估所提出的分析方法。评估的参数包括线性、专属性、准确度、精度和定量限 (LOQ)。

线性：通过进样分析溶于 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液中的吐温 80 标准溶液，对响应的线性进行评估。考察的吐温 80 浓度范围为理论目标吐温 80 含量的 10%–200%（目标含量为 10 mg/mL，因此考察的浓度范围为 1–20 mg/mL）。通过线性回归，对每种标准溶液中所有峰面积的总和对吐温 80 浓度（1.0、2.5、5.0、10、15 和 20 mg/mL）作图。线性方程

为 $y = (4.57 \times 10^6)x + (6.06 \times 10^5)$ ，相关系数 $R^2 = 0.999951$ （有关详细信息，请参见图 4）。从低浓度到高浓度各种浓度的偏差百分比为 -3.8%、-1.0%、0.2%、0.4%、0.8% 和 -0.5%。线性结果表明，该方法在 1–20 mg/mL 的吐温 80（溶于 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液中）浓度范围内具有优异的线性。

表 1. 各组峰的总峰面积之比

峰组	购自 USP/Fisher 的吐温 80 的峰面积比					%RSD
	第 1 次重复进样	第 2 次重复进样	第 3 次重复进样	第 4 次重复进样	第 5 次重复进样	
第 1 组 (1.8–3.7 min)	1.94	1.95	1.98	1.97	1.97	0.9%
第 2 组 (3.7–5.3 min)	0.79	0.80	0.79	0.79	0.80	0.7%
第 3 组 (5.3–6.8 min)	2.23	2.19	2.21	2.19	2.19	0.9%
第 4 组 (6.8–11.6 min)	0.81	0.82	0.82	0.80	0.82	1.1%
第 5 组 (11.6–14.2 min)	0.77	0.78	0.77	0.75	0.77	1.1%
峰面积总和 (1.8–14.2 min)	0.98	0.99	0.99	0.98	0.99	0.6%

两种溶液分别含 10.033 mg/mL 的 USP 吐温 80 和 10.145 mg/mL 的 Fisher 吐温 80。它们的浓度比为 0.99。

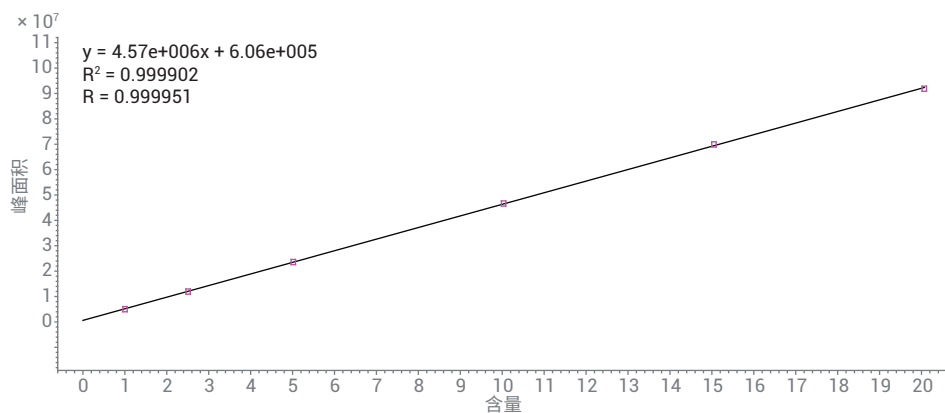


图 4. 线性图和公式

准确度: 通过分析溶于 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液中浓度约为吐温 80 目标浓度 (10 mg/mL) 10% (低)、100% (中) 和 160% (高) 的吐温 80 测试溶液, 来评估准确度。表 2 示出每个浓度平行测定的实测含量和配制含量、回收率百分比、平均回收率以及 %RSD。结果表明, 低、中和高浓度下的 %RSD (n = 3) 分别为 11%、1% 和 1%。

专属性: 通过进样分析样品溶液、0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液 (基质) 以及溶于 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液中的 1 mg/mL 吐温 80 标准溶液, 对专属性进行评估。样品基质的进样获得了强度较弱的宽峰, 无法通过软件对其进行积分。如果对它们进行手动积分, 峰面积总和比吐温 80 最低浓度校准标样 (1 mg/mL) 的总峰面积小 5%。这可能是由于吐温 80 的粘性引起了交叉污染。为减少色谱柱中积聚的物质, 在每个序列后进样乙腈并进行色谱柱冲洗 (100% 流动相 B) 可能有用。如果样品溶液接近 10 mg/mL, 则可以忽略交叉污染带来的影响。

方法精度

通过制备和分析来自同一均质样品溶液的六个重复样品, 在一次分析运行过程中评估方法精度。计算得到六次测定结果的 %RSD 为 0.3%, 远低于典型 HPLC 方法 2%-5% 的方法精度要求。

LOQ 和检测限 (LOD)

由于吐温 80 有多个峰, 因此无法根据峰的信噪比来估算方法 LOD 和 LOQ。用 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液将吐温 80 标准溶液稀释至 0.1 mg/mL; 三次重复测定

获得的回收率为 96%、111% 和 143%, 且 RSD 为 20%。%RSD 偏高, 因此估算得到的 LOD 为 0.1 mg/mL。对于 LOQ, 线性和准确度结果表明该方法的 LOQ 约为 1 mg/mL 吐温 80 (溶于缓冲液中)。

稳定性

该方法可用于监测吐温 80 样品和标准溶液的稳定性。图 5 比较了 10 mg/mL 吐温 80 标准溶液与 5 天后重新进样 (室温下带穿孔盖) 溶液的分析结果。6.5、8、12 分钟处的色谱峰增高, 而 2-5 分钟处的色谱峰减小。溶液如何改变以及改变的结果超出了本研究的范围。

表 2. 准确度结果

浓度	峰面积	实测浓度 (mg/mL)	理论浓度 (mg/mL)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD
低_1	5007741	1.1272	1.0145	111.1%	106.9%	11%
低_2	5318193	1.1971	1.0284	116.4%		
低_3	4167663	0.9381	1.0073	93.1%		
中_1	44297696	9.9714	10.1450	98.3%	99.4%	1%
中_2	45302502	10.1976	10.2840	99.2%		
中_3	45041302	10.1388	10.0730	100.7%		
高_1	72116909	16.2335	16.4400	98.7%	98.8%	1%
高_2	71863773	16.1765	16.4630	98.3%		
高_3	74398919	16.7471	16.8730	99.3%		

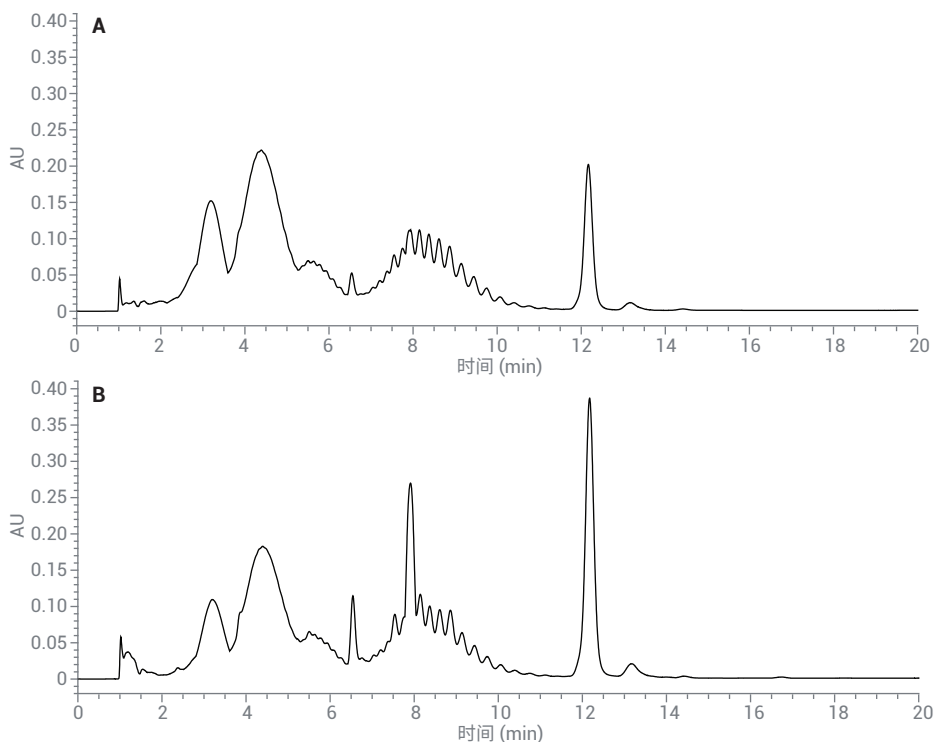


图 5. 10 mg/mL 吐温 80 标准溶液 (A) 与 5 天后重新进样 (室温下带穿孔盖) 溶液 (B) 的分析结果比较

结论

本研究开发出一种简单快速的 HPLC 分析方法，分析溶于 0.02 mol/L 磷酸盐缓冲液中的吐温 80，该方法使用 InfinityLab Poroshell 120 EC-C18 色谱柱和 Max Plot 二极管阵列检测器 (DAD)。该方法准确、精密而灵敏。如采用适当的样品预处理，较宽的校准范围可以使该方法应用于各种水溶液（如治疗性蛋白质制剂）。此外，该方法可用于研究吐温 80 溶液的稳定性。

参考文献

1. Yperman, J. Cell Repopulation of Bioprosthetic Heart Valves, (Leuven University Press, Belgium, **2006**), 77
2. Hu, M.; et al. *J. Chromatogr. A* **2003**, 984, 233–236
3. Adamo, M.; et al. *Chromatogr. B* **2010**, 878, 1865–1870
4. Nair, L. M.; et al. *J. Chromatogr. A* **2003**, 1012, 81–86
5. Nayak, V. S.; et al. *Chromatogr. Sci.* **2012**, 50, 21–25
6. Wu, Y.; et al. *AOAC International* **2010**, 93, 917–921
7. Shi, S.; et al. *Anal. Bioanal. Tech.* **2015**, 6, 245–252
8. Zhang, R.; et al. *Chromatogr. Sci.* **2012**, 50, 598–607
9. McCarthy, S. M. *Waters Application Note*, 720005323EN, Mar **2015**
10. Klein, M.; Preston, J. *Phenomenex Application Note*, App ID 23389

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

www.agilent.com

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。