

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ROK HRIBŠEK

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

Univerza *v Ljubljani*
Fakulteta *za farmacijo*



ROK HRIBŠEK

**ANALIZA POLISORBATOV 20 IN 80 IN NJIHOVIH PRODUKTOV OKSIDACIJE
TER HIDROLIZE S TEKOČINSKO KROMATOGRAFIJO, SKLOPLJENO Z
MASNO SPEKTROMETRIJO IN JEDRSKO MAGNETNO REZONANCO**

**ANALYSIS OF POLYSORBATES 20 AND 80 AND THEIR HYDROLYTIC AND
OXIDATIVE DEGRADATION PRODUCTS BY LIQUID CHROMATOGRAPHY
COUPLED WITH MASS SPECTROMETRY AND NUCLEAR MAGNETIC
RESONANCE**

**MAGISTRSKA NALOGA
ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA**

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Staneta Pajka, mag. farm. in somentorstvom Eme Valentine Brovč, mag. farm.

ZAHVALA

Najlepše se zahvaljujem doc. dr. Stanetu Pajku, mag. farm. in somentorici Emi Valentini Brovč, mag. farm. za mentorstvo, strokovno pomoč, preneseno znanje ter zelo prijetno delovno okolje.

Iskreno se zahvaljujem tudi izr. prof. dr. Janezu Mravljaku, za vso strokovno pomoč in plodne diskusije.

Zahvaljujem se tudi vsem ostalim kolegom na Katedri za farmacevtsko kemijo, ki so mi kakorkoli pomagali pri izvedbi magistrskega dela.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko delo izdelal samostojno pod mentorstvom doc. dr. Staneta Pajka, mag. farm. in somentorstvom Eme Valentine Brovč, mag. farm.

Rok Hribšek

Ljubljana, 2018

Komisija za zagovor:

Predsednik komisije: prof. dr. Odon Planinšek, mag farm.

Mentor: doc. dr. Stane Pajk, mag. farm.

Somentorica: Ema Valentina Brovč, mag. farm.

Članica komisije: asist. dr. Nika Marđetko, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE.....	I
KAZALO SLIK.....	III
KAZALO PREGLEDNIC.....	VI
POVZETEK	VII
ABSTRACT	VIII
SEZNAM OKRAJŠAV	IX
1. UVOD.....	1
1.1 Površinsko aktivne snovi	1
1.2 Polisorbati	1
1.2.1 Sestava maščobno-kislinske frakcije polisorbata 80 glede na specifikacije v posameznih farmakopejah	3
1.2.2 Sestava maščobno-kislinske frakcije polisorbata 20 glede na specifikacije v posameznih farmakopejah	4
1.3 Pridobivanje polisorbatov	4
1.4 Stabilnost polisorbatov	6
1.4.1 Oksidacija	6
1.4.2 Hidroliza	8
1.5 Pogoste metode za analizo polisorbatov	8
1.6 Tekočinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo	10
1.6.1 Tekočinska kromatografija	10
1.6.2 Masna spektrometrija	11
1.7 Jedrska magnetna resonanca	13
2. NAČRT ZA DELO.....	14
3. MATERIALI IN METODE	15

3.1	Materiali.....	15
3.2	Aparature	15
3.3	Metode	16
3.3.1	Sinteza trietilenglikoleata	16
3.3.2	Hidroliza trietilenglikoleata.....	16
3.3.3	Oksidacija trietilenglikoleata.....	16
3.3.4	Hidroliza polisorbata 80 in 20	16
3.3.5	Oksidacija polisorbata 80 in 20	17
3.3.6	HPLC-MS.....	17
3.3.7	NMR.....	18
3.3.8	Iskanje aduktov.....	19
3.3.9	Risanje spojin in računanje točnih mas	19
4.	REZULTATI IN RAZPRAVA	20
4.1	Sinteza modelne spojine za oksidacijo in hidrolizo.....	20
4.1.1	Hidroliza modelne spojine.....	21
4.1.2	Oksidacija modelne spojine.....	23
4.2	NMR analiza polisorbata 80 in 20	23
4.2.1	Hidroliza	26
4.3	Analiza s HPLC-MS	28
4.3.1	Polisorbat 80.....	28
4.3.2	Polisorbat 20.....	39
4.3.3	Oksidacija	49
5.	SKLEP.....	52

KAZALO SLIK

Slika 1: Tipična kemijska struktura PS20 in PS80. Prirejeno po (8).	3
Slika 2: Primer sinteze PS80, gre za zaestritev z oleinsko kislino. Prirejeno po (8).	5
Slika 3: Avtooksidacija POE verige. Prirejeno po (5).	7
Slika 4: Sestava masnega spektrometra	12
Slika 5: Sinteza trietilenglikololeata.	20
Slika 6: NMR spekter in strukturna formula trietilenglikololeata z označenimi protoni glede na kemijske premike.	21
Slika 7: NMR spektra trietilenglikololeata po dodatku (zgoraj) in pred dodatkom KOH (spodaj) posneta v MeOH-d4. Označeno je izginotje signala pri 4,22 ppm po hidrolizi estrske vezi.	22
Slika 8: Hidroliza trietilenglikololeata in posledična sprememba kemijskih premikov v NMR spektru.	22
Slika 9: NMR spekter ultra čistega PS80 posnet v MeOH-d4.	23
Slika 10: NMR spekter PS80 proizvajalca Sigma Aldrich posnet v MeOH-d4.	24
Slika 11: NMR spekter linolne kisline, posnet v MeOH-d4.	25
Slika 12: Nekonjugirana linolna kislina (zgoraj) in konjugirana linolna kislina (spodaj).	25
Slika 13: NMR spektra PS80 proizvajalca Sigma Aldrich po dodatku (zgoraj) in pred dodatkom KOH (spodaj) posneta v MeOH-d4.	26
Slika 14: NMR spektra PS20 (zgoraj) in PS80 (spodaj) proizvajalca Sigma Aldrich posneta v MeOH-d4.	27
Slika 15: NMR spekter PS20 proizvajalca J. T. Baker posnet v MeOH-d4.	27
Slika 16: Totalni ionski kromatogram PS80 proizvajalca NOF. A-nezaestreni POE izosorbidi, B-nezaestreni POE sorbitani, C-POE sorbitan monoestri, D-POE izosorbidi monoestri, E- POE sorbitan diestri, F-POE izosorbidi diestri, G-POE sorbitan triestri.	28
Slika 17: Masni spekter PS80 proizvajalca NOF ob času 3,70 min, ko se eluirajo nezaestreni POE izosorbidi. M/z 824,48 predstavlja POE izosorbidi s 15 POE enotami kot adukt z NH_4^+ , m/z 784,49 pa je nezaestrena POE veriga s 17 POE enotami	29
Slika 18: Masni spekter PS80 proizvajalca NOF ob času 6,08 min, ko se eluirajo nezaestreni POE sorbitani. M/z 738,45 predstavlja nezaestren POE sorbitan z 29 POE enotami kot adukt z dvema NH_4^+ .	30

Slika 19: Masni spekter PS80 proizvajalca NOF ob času 18,22 min, ko se eluirajo monooleati POE sorbitana.	31
Slika 20: Razlika v strukturi estrov sorbitana in estrov izosorbida.	32
Slika 21: Masni spekter PS80 proizvajalca NOF ob času 18,57 min, ko se eluirajo monooleati POE izosorbida.	32
Slika 22: Masni spekter PS80 proizvajalca NOF ob času 28,00-28,24 min, ko se eluirajo dioleati POE sorbitana.	33
Slika 23: Masni spekter PS80 proizvajalca NOF ob času 28,71-28,92 min, ko se eluirajo dioleati POE izosorbida.	33
Slika 24: Masni spekter PS80 proizvajalca NOF ob času 32,57 min, ko se eluirajo trioleati POE sorbitana.	34
Slika 25: Fragment estra oleinske kisline z etilenglikolom s točno maso 309,27881.	35
Slika 26: Ekstrahiran ionski kromatogram PS80 proizvajalca NOF Corporation za $m/z=309,27-309,28$	35
Slika 27: Totalni ionski kromatogrami PS80 proizvajalcev NOF (črna), Sigma Aldrich (rdeča) in J. T. Baker (zelena).	36
Slika 28: Totalni ionski kromatogram PS80 proizvajalca NOF, posnet s prvotno C_{18} HPLC kolono (zgoraj) in C_{18} UPLC kolono (spodaj). Označene so spremembe v ločbi.	39
Slika 29: Totalni ionski kromatogram PS20 proizvajalca Sigma Aldrich.	39
Slika 30: Maščobne kisline, katerih estre smo našli v PS20.	40
Slika 31: Totalni ionski kromatograma PS20 proizvajalcev J. T. Baker (črna) in Sigma Aldrich (rdeča). A-nezaestren POE izosorbida, B-nezaestren POE sorbitan, C- monoestri s kaprilno kislino, D-monoestri s kaprinsko kislino, E-monoestri z lavrinsko kislino, F-monoestri z miristinsko kislino, G-monoestri s palmitinsko kislino, H-monoestri z oleinsko kislino, I-diestri z lavrinsko in kaprilno kislino, J-diestri s kaprinsko in lavrinsko kislino, K-diestri z dvema lavrinskima kislinama, L-diestri z lavrinsko in miristinsko kislino, M-diestri z lavrinsko in palmitinsko kislino, N-diestri z lavrinsko in oleinsko kislino, O-triestri, P-tetraestri.	41
Slika 32: Masni spekter PS20 proizvajalca Sigma Aldrich ob času 2,95 min, ko se eluirajo nezaestreni POE izosorbidi.	42
Slika 33: Masni spekter PS20 proizvajalca Sigma Aldrich ob času 4,95 min, ko se eluira nezaestren POE sorbitan.	42

Slika 34: Masni spekter PS20 proizvajalca Sigma Aldrich ob času 13,86 min, ko se eluirata POE sorbitan monolavrat (zelena) in POE izosorbid monolavrat (modra).....	43
Slika 35: Masni spekter PS20 proizvajalca Sigma Aldrich ob času 15,77 min, ko se eluira POE sorbitan monomiristat.	44
Slika 36: Masni spektri nekaterih kombiniranih diestrov. POE sorbitan dilavrat (zgoraj), POE sorbitan lavrat/miristat (sredina) in POE sorbitan lavrat/palmitat (spodaj).	45
Slika 37: Masni spekter PS20 proizvajalca Sigma Aldrich ob času 28,20 min, ko se eluira POE sorbitan trilavrat.	46
Slika 38: Totalni ionski kromatogram PS80 pred dodatkom AAPH (zgoraj), totalni ionski kromatogram PS80 po dodatku AAPH (v sredini) in masni spekter novo nastalega vrha po dodatku AAPH. Kromatograma sta prikazana za ione z m/z večjim od 400.	49
Slika 39: Prikaz dveh potencialnih produktov oksidacije, hidroksilnega derivata na levi in epoksidnega derivata na desni strani.	50

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Sestava PS80 glede na specifikacije v posameznih farmakopejah.....	3
Preglednica II: Sestava PS20 glede na specifikacije v posameznih farmakopejah.	4
Preglednica III: HPLC gradient.....	17
Preglednica IV: Najbolj intenzivni signali vseh identificiranih zvrsti v PS80 s HPLC-MS. T_r =retencijski čas, z =naboj iona, n =število POE enot.....	37
Preglednica V: Najintenzivnejši signali vseh zaznanih zvrsti v PS20 s HPLC-MS. T_r =retencijski čas, z =naboj iona, n =število POE enot.....	47
Preglednica VI: Najpogostejši adukti in njihova točna masa	48

POVZETEK

Polisorbati so amfifilne neionske površinsko aktivne snovi, ki jih uporabljamo v prehrambeni, kozmetični in farmacevtski industriji. Polisorbata 20 in 80 se pogosto uporabljata v formulacijah bioloških zdravil z namenom preprečevanja agregacije in denaturacije terapevtskih proteinov. Različne polisorbate in njihove produkte oksidacije in hidrolize smo z namenom karakterizacije preučevali z jedrsko magnetno resonanco in tekočinsko kromatografijo sklopljeno z masno spektroskopijo. S pomočjo masne spektroskopije smo uspešno identificirali mono-, di- in triestre polioksietiliranega sorbitana, mono- in diestre polioksietiliranega izosorbida in monoestre polioksietilena z maščobnimi kislinami. Največja je bila vsebnost monoestrov, nato diestrov in nazadnje triestrov. Tetraestre polioksietiliranega sorbitana smo našli le v polisorbatu 20. Prisotne so bile tudi predhodno našete zvrsti v nezaestreni obliki. Ultra prečiščen polisorbat 80 je v smislu sestave maščobno kislinske frakcije vseboval estre le z oleinsko kislino. Običanji polisorbati 80 so poleg oleinske kisline vsebovali še estre z linolno, stearinsko, palmitinsko in palmitoleinsko kislino. Polisorbat 20 pa je vseboval tudi estre s krajšimi maščobnimi kislinami, in sicer s kaprilno, kaprinsko, lavrinsko, miristinsko, plamitinsko, oleinsko in stearinsko kislino. Estri sorbitanov so v povprečju vsebovali 25 polioksietilenskih enot, estri izosorbidov pa 12, vendar se število enot na eno obročno hidroksilno skupino ni razlikovalo. Razpon števila polioksietilenskih enot v zaestrenih zvrsteh polisorbatov je izredno širok. V polisorbatu 80 sega od 6 do 37 enot, v polisorbatu 20 pa od 14 do 34 enot polioksietilena. Oba polisorbata smo oksidirali z vodotopnim oksidantom. Po oksidaciji je prišlo do enakomernega zmanjšanja deleža vseh zvrsti polisorbata, v polisorbatu 80 pa so nastale tudi nove zvrsti, za katere predvidevamo, da bi lahko bili peroksidni derivati. Z jedrsko magnetno resonanco smo še dodatno ovrednotili izbrane polisorbate 20 in 80. V polisorbatu 80 smo potrdili prisotnost estrov oleinske kisline in ocenili delež proste oleinske kisline. Nadaljnje smo potrdili, da so v nekaterih polisorbatih 80 prisotni tudi estri s konjugirano linolno kislino. Za preučevanje razgradnih produktov smo kot modelno spojino sintetizirali trietilenglikololeat, saj so polisorbati z analitskega stališča zelo kompleksne spojine. Kot primerna se je izkazala le za preučevanje produktov hidrolize.

Ključne besede: polisorbat 20, polisorbat 80, jedrska magnetna resonanca, tekočinska kromatografija, masna spektrometrija

ABSTRACT

Polysorbates are nonionic, amphiphilic surface active agents, commonly used in food, cosmetic and pharmaceutical industry. Polysorbates 20 and 80 are widely used in biopharmaceuticals in order to prevent aggregation and denaturation of therapeutic proteins. The aim of this master thesis was to characterize different polysorbates and their oxidative and hydrolytic degradation products by nuclear magnetic resonance spectroscopy and liquid chromatography coupled with mass spectrometry. Using mass spectrometry, we have successfully identified mono-, di- and triesters of polyoxyethylated sorbitan, mono- and diesters of polyoxyethylated isosorbide and monoesters of polyoxyethylene, all esterified with various fatty acids. Monoesters were the most abundant, followed by diesters and triesters, respectively. Tetraesters of polyoxyethylated sorbitan were found only in polysorbate 20. All aforementioned species were also present as nonesterified. In ultra pure polysorbate 80, only esters with oleic acid were present as opposed to multicompendial grade PS which also contained esters with linoleic, stearic, palmitic and palmitoleic acid. In comparison, polysorbate 20 comprised of esters with caprylic, capric, lauric, miristic, palmitic, oleic and stearic acid. Sorbitan esters consisted on average of 25 polyoxyethylene units, while isosorbide esters only of 12, but the number of units per hydroxyl group was the same. The range of polyoxyethylene units was very broad, 6-37 units in polysorbate 80 and 14-34 units in polysorbate 20. Both polysorbates were oxidized using a water-soluble oxidizing agent, which led to an even decrease in all observed species. Furthermore, in polysorbate 80 new species, presumably peroxide derivatives, were identified. With the use of nuclear magnetic resonance spectroscopy, we have further characterized the chosen polysorbates 20 and 80. In the case of polysorbate 80 we have confirmed the presence and amount of oleic acid esters and also estimated the quantity of free fatty acids. Additionally, we have confirmed that the linoleic acid found in some polysorbates 80 is in the form of conjugated linoleic acid. For studying the degradation products of polysorbates we synthesized triethylene glycol oleate as a model compound since polysorbates are very complex to analyze, however, it was only found suitable for studying the degradation products of hydrolysis.

Key words: polysorbate 20, polysorbate 80, nuclear magnetic resonance, liquid chromatography, mass spectrometry

SEZNAM OKRAJŠAV

AAPH	2,2'-azobis(2-amidinopropan) diklorid
APPI	fotoionizacija pri atmosferskem tlaku
APCI	kemična ionizacija pri atmosferskem tlaku
ChP	Kitajska farmakopeja
ESI	ionizacija z razprševanjem v električnem polju
HLB	hidrofilno lipofilno razmerje
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
JP	Japonska farmakopeja
KMK	kritična micelarna koncentracija
LC-MS	tekočinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo
MF	mobilna faza
MK	maščobne kisline
MS	masna spektrometrija
NMR	jedrska magnetna resonanca
PAS	površinsko aktivne snovi
Ph. Eur.	Evropska farmakopeja
POE	polioksietilen
PS20	polisorbat 20
PS80	polisorbat 80
TLC	tankoplastna tekočinska kromatografija
TOF	time of flight
UPLC	tekočinska kromatografija ultra visoke ločljivosti
UV	ultravijolična

1. UVOD

1.1 Površinsko aktivne snovi

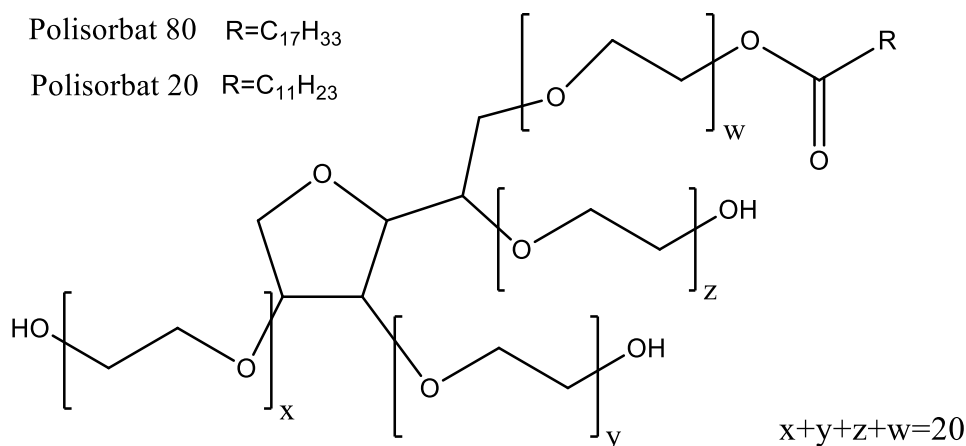
Površinsko aktivne snovi (PAS) so amfifilne spojine, kar pomeni, da imajo tako hidrofilne kot lipofilne lastnosti. Lipofilni del molekule običajno sestavljajo dolge verige ogljikovodikov, manj pogosto pa tudi aromatski ali heterociklični obroči. Polarni del imenujemo tudi polarna glava in se precej razlikuje med različnimi vrstami PAS. Glede na kemijsko sestavo polarnega dela, lahko PAS delimo na ionske in neionske. Ionske PAS nadaljnje razdelimo na anionske, kationske in »zwitterionske« oz. amfoterične. Anionske PAS vsebujejo sulfate, sulfonate, fosfate ali karboksilate, medtem ko kationske vsebujejo primarne, sekundarne ali terciarne amine. PAS amfoteričnega tipa pa vsebujejo kationski in anionski center. Kot je razvidno že iz imena, neionske PAS ne vsebujejo naboja v molekuli. Mednje uvrščamo etoksilate alkoholov in maščobnih kislin (MK), estre MK s sorbitolom, sulfoksidi, glicerolom ali glikozidi. Zaradi amfifilne narave imajo PAS težnjo po zbiranju na medfazah, s čimer znižujejo medfazno napetost. V odvisnosti od koncentracije lahko PAS v raztopinah agregirajo, kar povzroči nastanek supramolekularnih struktur, kot so miceli ali dvosloj. Najprej pride do združevanje PAS na medfazah, ko pa se ta površina zasiti pride do tvorbe micelov. Koncentracijo PAS pri kateri se začnejo tvoriti miceli imenujemo kritična micelarna koncentracija (KMK). Vrednost hidrofilno lipofilnega ravnotežja (HLB), ki nam pove kako hidrofilna ali lipofilna je določena PAS, se tudi uporablja za njihovo karakterizacijo. Izračunamo jo iz mase hidrofilnega in lipofilnega dela molekule. PAS z vrednostmi HLB od 0 do 10 so bolj topne v lipidih kot v vodi, tiste z vrednostmi 10-20 pa so bolj topne v vodi kot v lipidih. Površinsko aktivne snovi se uporabljajo kot detergenti, emulgatorji, sredstva za dispergiranje, penila in močilci (1).

1.2 Polisorbati

Polisorbati so skupina PAS, ki se uporabljajo v prehrambeni, kozmetični in farmacevtski industriji, kjer so poznani pod tržnim imenom Tween. Spadajo v razred amfifilnih, neionskih PAS (2,3). V farmacevtski industriji se že več desetletij uporabljajo za povečevanje topnosti slabo topnih učinkovin ter boljšo stabilnost emulzij in mikroemulzij (4). Zadnjih 30 let se zaradi njihove biokompatibilnosti, nizke toksičnosti in dobrih

stabilizacijskih lastnosti uporabljajo tudi kot pomožne snovi v formulacijah bioloških zdravil. Več kot 70 % vseh formulacij monoklonskih protiteles, ki so trenutno na tržišču vsebuje polisorbat 20 (PS20) ali polisorbat 80 (PS80). V formulacije jih dodajamo z namenom preprečevanja agregacije in adsorpcije proteina ter zmanjševanja denaturacije proteina na medfazah tekočina-zrak, tekočina-primarna ovojna med procesnimi fazami, kot so mešanje, odtaljevanje, zamrzovanje, liofiliziranje in rekonstituiranje. Njihova pogosta uporaba je posledica visoke HLB vrednosti in nizke KMK vrednosti, ki omogočata učinkovito površinsko aktivnost pri nizkih koncentracijah, zato tudi nizka koncentracija zadostuje za stabilizacijo velike količine proteina (2,3,5). V formulacijah bioloških zdravil se uporablja v koncentracijah 0.001-0.1 % m/v (6). Mehanizmi njihove stabilizacije proteinov zaenkrat še niso popolnoma pojasnjeni. Dva izmed mehanizmov sta tekmovanje s proteini za adsorpcijska vezavna mesta na površinah in vezava na hidrofobne regije v strukturi proteina, kar posledično zmanjša medmolekulske interakcije. Zvečali naj bi tudi prosto energijo razvitja proteinov in jo s tem otežili. Nenazadnje naj bi delovali tudi kot kemični šaperoni, ki se vežejo na delno zvite proteine in sterično ovirajo medmolekulske reakcije, ki bi drugače lahko vodile do njihove agregacije (7). PS so po svoji kemijski sestavi estri polioksietilen(20)sorbitana z višjimi MK, vendar pa so v praksi dostopni kot zelo heterogene mešanice strukturno različnih estrov. Višje MK predstavljajo hidrofobni del, medtem ko polioksietilenske (POE) podenote predstavljajo hidrofilen del molekule. V PS naj bi bilo približno 20 polioksietilenskih enot, a le te v resnici precej variirajo v številu in razporeditvi po OH skupinah (slika 1). Poimenovani so glede na to s katero MK je zaestrenega večino PS, čeprav so v njih prisotne tudi ostale MK.

- Tween 80, polioksietilen sorbitan monooleat, HLB=15
- Tween 60, polioksietilen sorbitan monostearat, HLB=14,9
- Tween 40, polioksietilen sorbitan monopalmitat, HLB=15,6
- Tween 20, polioksietilen sorbitan monolavrat, HLB=16,7 (2,3).



Slika 1: Tipična kemijska struktura PS20 in PS80. Prirejeno po (8).

Glede na Evropsko farmakopejo je PS80 definiran kot delni estri MK, večinoma oleinske kisline, s sorbitolom in njegovimi anhidridi, etoksilirani s približno 20 moli etilen oksida na mol sorbitola in sorbitol anhidridov. Definicija PS20 je enaka, le da je tam večina derivatov sorbitola zaestrena z lavrinsko kislino. Vizualno gre za rumenkasti, bistri ali rahlo opalescentni tekočini. PS80 pa je lahko tudi brezbarven. Topna sta v vodi, etanolu, etilacetatu in metanolu. V oljih in tekočem parafinu pa sta praktično netopna. Njuna relativna gostota je približno 1.10, viskoznost pa 400 mPas pri 25 °C (9).

1.2.1 Sestava maščobno-kislinske frakcije polisorbata 80 glede na specifikacije v posameznih farmakopejah

Preglednica I: Sestava PS80 glede na specifikacije v posameznih farmakopejah.

Maščobna kislina	Delež po Ph. Eur 9.5, USP 2015 in JP 17	Delež po ChP 2015
Miristinska kislina C(14:0)	Največ 5.0 %	Največ 0.5 %
Palmitinska kislina C(16:0)	Največ 16.0 %	Največ 0.5 %
Palmitoleinska kislina C(16:1)	Največ 8.0 %	Največ 0.5 %
Stearinska kislina C(18:0)	Največ 6.0 %	Največ 0.5 %
Oleinska kislina C(18:1)	Vsaj 58.0 %	Največ 98.0 %
Linolna kislina C(18:2)	Največ 18.0 %	Največ 0.5 %
Linolenska kislina C(18:3)	Največ 4.0%	Največ 0.5 %

Kot je razvidno iz preglednice I, Evropska, Ameriška in Japonska farmakopeja dopuščajo prisotnost estrov z večimi različnimi MK poleg oleinske kisline, v relativno visokih koncentracijah, medtem ko Kitajska farmakopeja v primeru monografije PS80 za injekcije, dopušča le zelo nizke deleže ostalih MK. Pomembna razlika pa je tudi v peroksidnem in kislinskem številu, ki ga dopuščajo posamične farmakopeje, saj ChP dopušča le 3 mEq/kg za peroksidno število, med tem ko ostale dopuščajo kar 10 mEq/kg. Za kislinsko število ChP dopušča ≤ 1 , ostale pa ≤ 2 . Zaenkrat še ni določeno kolikšen delež derivatov sorbitola mora biti zaestren. Tudi deleži di, tri in tetraestrov zaenkrat še niso določeni v nobeni od farmakopej (9,10).

1.2.2 Sestava maščobno-kislinske frakcije polisorbata 20 glede na specifikacije v posameznih farmakopejah

Preglednica II: Sestava PS20 glede na specifikacije v posameznih farmakopejah.

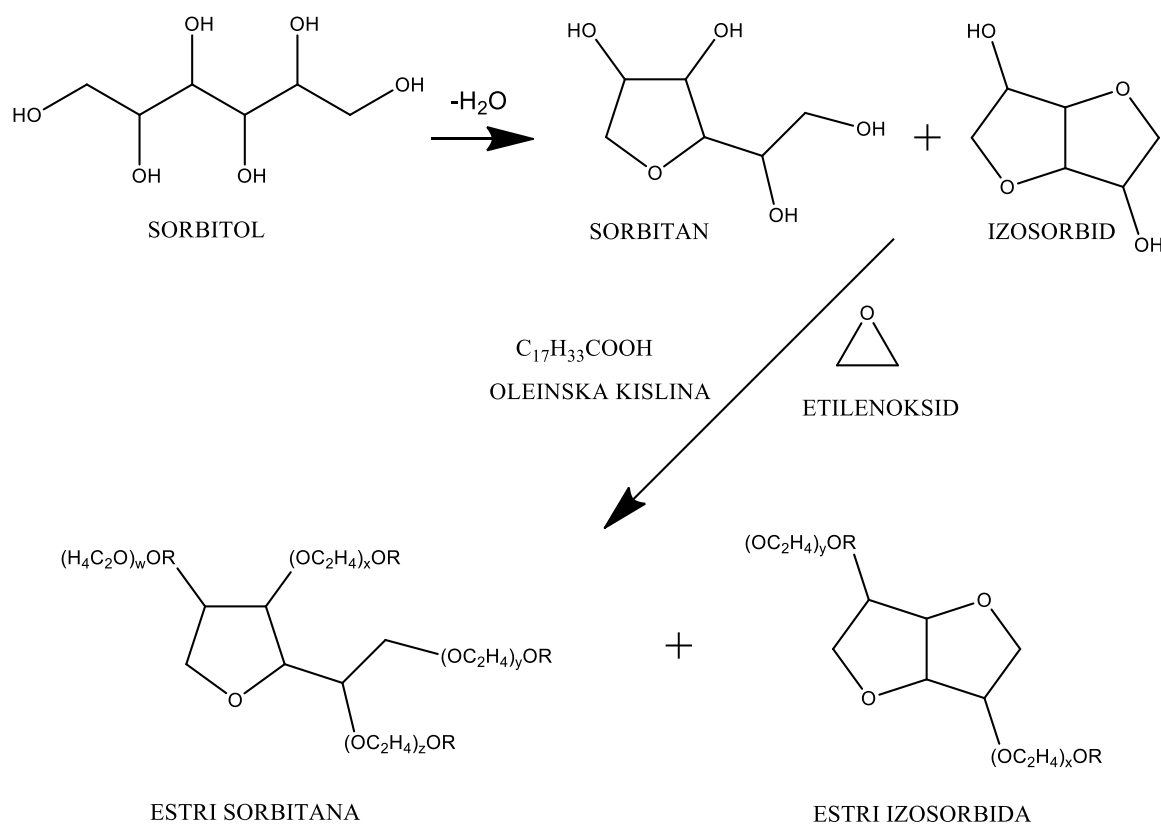
Maščobna kislina	Delež po Ph. Eur 9.5, USP 2015 in ChP 2015
Kaprojska kislina C(6:0)	Največ 1.0 %
Kaprilna kislina C(8:0)	Največ 10.0 %
Kaprinska kislina C(10:0)	Največ 10.0 %
Lavrinska kislina C12(:0)	Od 40.0 % do 60.0 %
Miristinska kislina C(14:0)	Od 14.0 % do 25.0 %
Palmitinska kislina C(16:0)	Od 7.0 % do 15.0 %
Stearinska kislina C(18:0)	Največ 7.0 %
Oleinska kislina C(18:1)	Največ 11.0 %
Linolna kislina C(18:2)	Največ 3.0 %

V PS20 je delež MK še bolj raznolik (preglednica II), kot v PS80. V primeru PS20 so zahteve med posameznimi farmakopejami Ph. Eur., ChP in USP poenotene. V JP ni specifične monografije za PS20. Enako kot v primeru PS80, tudi za PS20 ni določeno kolikšen delež derivatov sorbitola mora biti zaestren ter deleži di, tri in tetraestrov niso določeni v nobeni od farmakopej (9,10).

1.3 Pridobivanje polisorbatov

Sinteza PS (slika2) se prične z dehidracijo sorbitola. Reakcija poteka s pomočjo katalizatorja pri povišani temperaturi, kjer nastaneta dva različna ciklična etra sorbitola. Ob

izgubi 1 molekule vode nastane sorbitan, medtem ko ob izgubi 2 molekul vode nastane izosorbid. Nastale etre kondenzirajo z etilen oksidom, da pride do polimerizacije oksietilenskih enot. Polioksietiliranim cikličnim etrom sorbitola nato dodajo višje MK. Končni produkt reakcije je heterogena zmes estrov polioksietilensorbitana in polioksietilenizosorbida z višjimi MK. Vedno sicer ostane še nekaj prostih MK, ki se niso zaestri in prav tako ostane še nekaj prostih polioksietiliranih derivatov sorbitola. Prisotni so lahko tudi estri polietilenglikola z višjimi MK. Končni produkti se razlikujejo v strukturi polarne glave (izosorbid ali sorbitan), številu in razporejenosti POE enot, številu in položaju zaestrenih OH skupin, ter strukturi MK s katerimi tvorijo estre (3).



Slika 2: Primer sinteze PS80, gre za zaestritev z oleinsko kislino. Prirejeno po (8).

Fizikalno kemične lastnosti PS se precej razlikujejo med različnimi proizvodnimi serijami zaradi raznolikosti sinteznega postopka. Prav tako se razlikujejo tudi med različnimi proizvajalci zaradi uporabe različnih sinteznih postopkov in kakovosti uporabljenih reagentov. Sestava PS močno vpliva na parametra HLB in KMK (8).

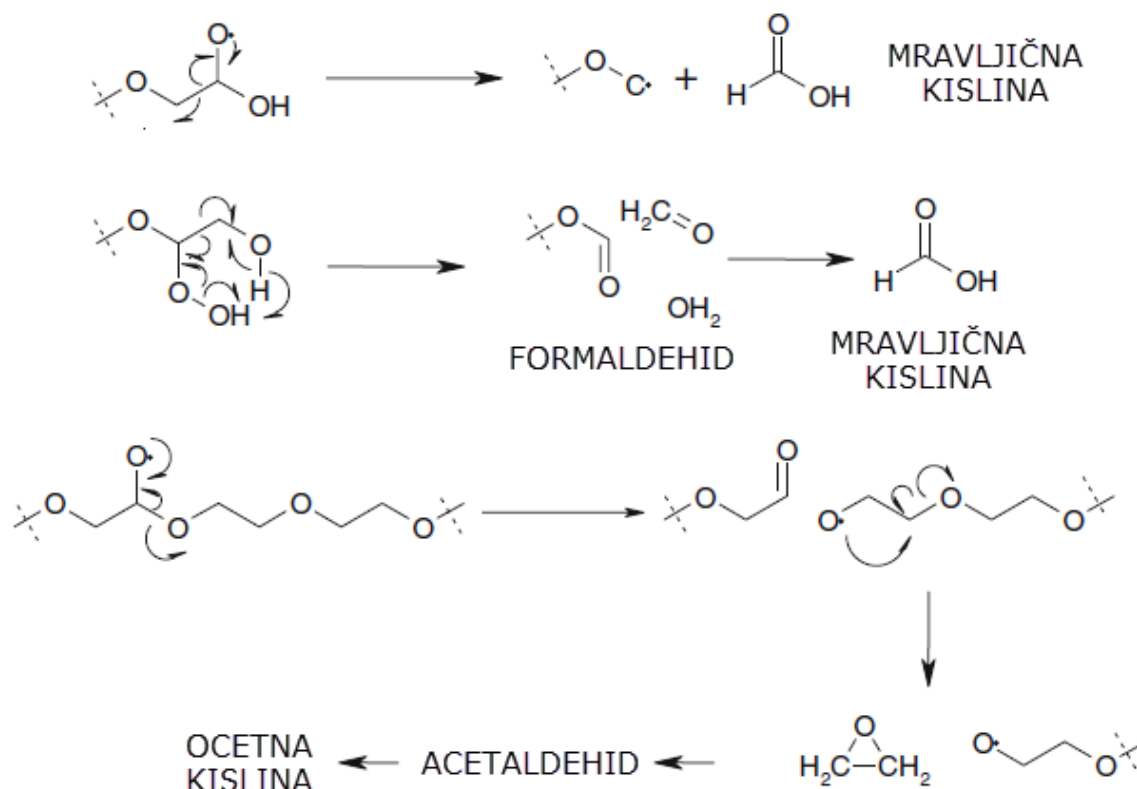
1.4 Stabilnost polisorbitov

PS v biofarmaceutiki se uporabljajo kot pomožne snovi v tekočih farmacevtskih oblikah in liofilizatih. Njihova kemična stabilnost je zato zelo pomembna. Glavna mehanizma razpada PS sta hidroliza in oksidacija. PS so občutljivi na svetlobo in povišano temperaturo, zato se shranjujejo na hladnem in po uporabi prepričavajo z inertnim plinom, kot je na primer dušik (11). Razgradni produkti, predvsem MK, lahko v raztopini tvorijo delce, čemur se skušamo izogniti, saj to vpliva na kakovost končnega izdelka. Če intaktnega PS ni dovolj za stabilizacijo proteina, le-ta lahko agregira. Do agregacije proteina pa lahko pride tudi zaradi reakcije proteina z razgradnimi produkti PS, kot so aldehidi in peroksidi. Agregati so problematični, ker lahko sprožijo nezaželen imunski odziv. Formulacije običajno vsebujejo presežek PS, zato da ga je dovolj tudi v primeru, če ga nekaj razpade. Presežek PS lahko solubilizira tudi svoje lastne razgradne produkte. V kolikor je na voljo dovolj intaktnega PS za stabilizacijo proteinov, je sprejemljiva tudi prisotnost razgradnih produktov (2,12,13).

1.4.1 Oksidacija

PS lahko razpadejo zaradi oksidacije, oziroma natančneje zaradi avtooksidacije. Dejavniki, ki vplivajo na avtooksidacijo so: prisotnost kisika in peroksidov, temperatura, UV svetloba in prisotnost kovinskih ionov (katalizatorja baker in železo, lahko ob prisotnosti dvojnih vezi, kot so v oleinski kislini, sprožita radikalske reakcije). Začetek avtooksidacije v raztopini je lahko iniciiran z UV svetlobo in kataliziran s kovinskimi ioni. V zadnjih letih so te reakcije pritegnile veliko pozornosti, ker lahko vplivajo na stabilizirajoče lastnosti PS in na nastajanje delcev v formulacijah bioloških zdravil. Mehanizem avtooksidacije PS je radikalske narave. Je verižna reakcija, ki je sestavljena iz treh faz: iniciacije, propagacije in terminacije. Faza iniciacije se začne z odtegnitvijo protona iz molekule PS in posledičnim nastankom radikala, ki hitro reagira z molekulo kisika. Produkt te reakcije je peroksi radikal, ki nato reagira z novo molekulo PS, kar imenujemo faza propagacije, ki se krožno ponavlja. Končni del radikalske reakcije imenujemo terminacija, do katere pride le v primeru, ko radikal reagira z antioksidantom, drugim radikalom ali pa se konča encimsko. Primarni produkti avtooksidacije so hidroperoksidi, katerih stabilnost je odvisna od pozicije hidroperoksida znotraj molekule. Sekundarni produkti pa so: ketoni, epoksidi, hidroksi derivati, itd. PS80 je dovzetnejši za oksidacijo kot PS20, ker vsebuje več estrov z oleinsko kislino, le ta pa vsebuje dvojno vez, ki se lažje oksidira. Oksidacija PS20 poteka

predvsem na α -C atomih POE verig, kot je prikazano na sliki 3. Končni razpadni produkti so med drugimi tudi kratkoverižne organske kisline.



Slika 3: Avtooksidacija POE verige. Prirejeno po (5).

Peroksidi, ki so nastali tekom omenjenih radikalskih reakcij lahko vplivajo tudi na oksidacijo metioninskih in triptofanskih aminokislinskih ostankov, kar lahko vodi v denaturacijo terapevtskega proteina. (7,11,14,15). Zhang in sodelavci so dokazali, da proste MK lahko nastanejo tudi z oksidacijo in ne le s hidrolizo. Kot iniciator za začetek oksidacije so uporabili AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropan)diklorid) (6). AAPH je vodotopna azo spojina, ki generira radikale. Postaja modelna spojina za oksidacijo malih molekul kot tudi terapevtskih proteinov, saj je sposobna sprožiti oksidacijske reakcije po nukleofilnem kot tudi po radikalskem mehanizmu. Razpolovni čas te spojine je 54 h pri 40 °C, zato v začetnih urah lahko privzamemo, da je hitrost nastanka radikalov linearna. Nastanku prostih MK zaradi oksidacije lahko preprečimo z dodatkom antioksidantov (6,16,17). V farmacevtsko relevantnih pogojih shranjevanja so PS bolj dovzetni za oksidacijo kot hidrolizo. Oksidacijo lahko upočasnimo ali ustavimo, s preprečitvijo radikalske iniciacije (5).

1.4.2 Hidroliza

V vodnih raztopinah lahko PS razpadejo zaradi hidrolize estrske vezi, ki je odvisna od temperature in pH vrednosti raztopine. Kislinsko ali bazično katalizirana hidroliza PS poteka pri pH vrednostih nižjih od 3.0 ali višjih od 7.6 (6). Na hitrost razpada nekaterih estrov v PS vpliva tudi prisotnost ali odsotnost terapevtskega proteina. Hidroliza estrov POE izosorbida in estrov POE poteka hitreje kot hidroliza estrov POE sorbitana (11). Produkti hidrolize so proste MK in zaradi njihove ločitve od PS pride do izgube površinske aktivnosti. Proste MK so zaradi svoje lipofilnosti slabo topne v vodi in lahko tvorijo netopne delce. Tvorbo delcev povzroča tudi interakcija s hidrofobnimi regijami proteinov. Nastanek delcev ima velik vpliv na kvaliteto in izgled končne formulacije. Do nastanka omenjenih delcev pride ko je na voljo premalo intaktnega PS, ki bi lahko solubiliziral nastale delce, ker je topnost PS v vodi zelo dobra, medtem ko je topnost prostih MK le nekaj $\mu\text{g/mL}$ in se zato lahko izobori iz raztopine. Topnost prostih MK se manjša z daljšanjem alkilne verige. Terapevtske proteine tekom proizvodnje očistijo z namenom preprečitve encimske hidrolize, ki je prav tako problematična. V primeru, ko so proteini preslabo očiščeni, so lahko zraven prisotni encimi iz celic, ki izhajajo iz proizvodnega procesa. Najbolj problematične so esteraze in lipaze iz družine karboksilester hidrolaz (EC 3.1.1) (2,13). Eden takšnih encimov je na primer lizosomski encim fosfolipaza A2 (18).

1.5 Pogoste metode za analizo polisorbitatov

Analiza PS je običajno sestavljena iz treh korakov. V prvem koraku poteka priprava vzorca. Kadar analiziramo čiste PS je ta del precej enostaven in običajno vključuje le raztapljanje in ustrezno redčenje vzorca. Ko analiziramo PS v formulacijah bioloških zdravil pa je to faza med katero odstranimo proteine in moteče pomožne snovi ter skoncentriramo morebitne molekule, kot so razgradni produkti ali nečistote, ki so navadno prisotni v nižjih koncentracijah. Čiščenju sledi separacija in na koncu še detekcija. Iz kvantitativnega pogleda je razvoj in validacija analitskih metod za analizo PS precej zahtevna že zaradi same heterogenosti vzorcev. Kvantitativna analiza je dodatno otežena še zaradi pomanjkanja ustreznih referenčnih standardov in kromoforov. Stabilnost PS v formulacijah bioloških zdravil je zato ovrednotena relativno glede na prvotno sestavo in koncentracijo PS. Iz omenjenega razloga je zato pomembno, da se tekom tekom razvoja formulacije ohrani prvotna serija, ki se lahko naknadno uporabi kot referenca. Referenčni standardi bi nam omogočili podrobnejši vpogled na vpliv izbranih zvrsti na stabilnost in

funkcionalnost posameznih zvrsti znotraj PS. Čeprav naj bi prav ta velika heterogenost PS bila odgovorna za njegove stabilizacijske lastnosti, to še ni povsem dokazano (10).

Reverznofazna tekočinska kromatografija je najpogostejša separacijska metoda v analitiki PS. Molekule s to tehniko ločimo po hidrofobnosti, kar pomeni, da se retencijski čas veča z večanjem deleža verige ogljikovodikov in manjša z večanjem deleža POE enot (14). C18, C8, C4 in ciano so najpogosteje uporabljane stacionarne faze. Kot organska mobilna faza (MF) je najpogosteje uporabljen acetonitril. Kadar se večkrat zaestrene zvrsti nepopolno eluirajo s kolone lahko uporabimo tudi močnejša topila, kot sta izopropanol in tetrahidrofuran, vendar se temu izogibamo, saj ima izopropanol večjo viskoznost od acetonitrila, tetrahidrofuran pa je precej bolj toksičen. Struktura PS ne vsebuje primernih kromoforov, ki nam bi omogočali optimalno detekcijo z UV/Vis spektroskopijo. Obstajajo sicer druge strategije, ki omogočajo določanje vsebnosti PS z UV/Vis ali fluorescenco. Na primer kvantifikacija na podlagi določanja frakcije MK ali frakcije POE sorbitana. Za kvantifikacijo PS na podlagi MK frakcije je potrebno PS najprej hidrolizirati. Ker tudi proste MK ne vsebujejo kromoforov, jih je potrebno nato še derivatizirati z reagenti, kot sta 1-pirenildiazometan in 9-antrildiazometan. Če izpustimo korak hidrolize, lahko na enak način določamo tudi delež razpadlega PS. Frakcije POE sorbitana lahko spektroskopsko zaznamo s pomočjo kompleksacije z železovim ali kobaltovim tiocianatom. Pomankljivost te metode je, da s tem načinom ne ločimo nezaestrenih zvrsti od zaestrenih. Nobena od teh metod ni primerna za preučevanje oksidativne degradacije PS.

Možna je tudi detekcija z ELSD (angl. evaporative light scattering detector) ali CAD (angl. charged aerosol detector) po predhodni separaciji z reverznofazno kromatografijo. Pri obeh tehnikah analit po eluciji s kolone razpršimo v toku dušika, da MF in hlapne spojine med tem odhlapijo. Pri detekciji s CAD nastale delce pozitivno nabijemo še z dodatnim tokom dušika. Gre za prenos naboja pri čemer število delcev proporcionalno narašča s količino analita. Nastale delce nato v primeru CAD detektiramo z merjenjem naboja, pri ELSD pa z zaznavanjem sipanja svetlobe zaradi delcev. CAD tehnika je približno desetkrat bolj občutljiva od ELSD.

Z jedrsko magnetno resonanco (NMR) lahko pridobimo informacije o celotni sestavi PS in manj o posamičnih zvrsteh. Poda nam informacije o stopnji zaestritve, količini proste MK in distribuciji POE verig. NMR omogoča tudi relativno kvantifikacijo, z uporabo originalne serije PS za pripravo umeritvene krivulje. Najboljši tehniki za analizo PS sta

tekočinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo (LC-MS) in plinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo, ker omogočata razlikovanje med več različnimi zvrstmi. Obe tehniki omogočata kvalifikacijo kot tudi kvantifikacijo PS. Z njima lahko ločimo tudi razpadne produkte od izhodnih spojin. Pomembno je omeniti, da razlike pri učinkovitosti ionizacije različnih spojin vodijo do različno intenzivnih signalov, četudi so te spojine v ekvimolarnih koncentracijah (10).

1.6 Tekočinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo

Tekočinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo je analitska tehnika, ki združuje lastnosti tekočinske kromatografije, da fizično ločijo komponente, z močnimi analitskimi sposobnostmi masnega spektrometra. To je tudi razlog za njeno široko uporabo v biotehnologiji, ekoloških analizah ter prehrambeni, kmetijski, kozmetični in farmacevtski industriji. Združitev omenjenih tehnologij potrebuje tudi vmesnik zaradi razlike v tlakih na obeh napravah, saj naprave za tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) ali tekočinsko kromatografijo ultra visoke ločljivosti (UPLC) delujejo pod visokim tlakom, medtem ko je v masnem spektrometru vakuum. Potrebno je uravnati tudi pretok tekočine, saj je za masno analizo potrebno odpariti odvečno topilo, kar je problematično, v primeru kadar gre za pretežno vodno fazo. Na splošno so za masno spektrometrijo potrebne tudi zelo nizke koncentracije analitov (19,20). Ker PS ne vsebujejo nobenih kromoforov in ker gre za zelo kompleksne zmesi več različnih spojin, jih ne moremo detektirati z UV detektorjem. Prav tako pa so PS zelo kompleksne zmesi več sto različnih spojin. Masni spektrometer je zato za njihovo detekcijo bolj primeren kot UV detektor (21).

1.6.1 Tekočinska kromatografija

Kromatografija na splošno, ne le tekočinska kromatografija omogoča ločevanje zmesi z več komponentami. Poznamo več vrst kromatografije glede na mehanizem ločevanja: porazdelitvena, ionska, izključitvena oz. gelska, adsorpcijska in afinitetna. Med njimi je najbolj razširjena uporaba reverzno fazne porazdelitvene tekočinske kromatografije, pri kateri se molekule, ki jih želimo ločiti, porazdeljujejo med lipofilno stacionarno fazo in MF, ki je v tem primeru polarno topilo. Molekule se ločijo glede na njihovo polarnost oz. afiniteto do stacionarne in mobilne faze. Najbolj pogosta reverzna faza je C₁₈, v kateri so C₁₈ alkilne verige pripete na nekaj μm velike delce silicijevega dioksida oz. silikagela. Polarno topilo je v takem primeru običajno zmes vode in drugih organskih topil kot so:

metanol, acetonitril, izopropanol, itd. Topilom so lahko dodane tudi kisle ali bazične komponente, saj s protoniranjem in deprotoniranjem vplivamo na ionizacijo molekul in posledično na njihovo porazdelitev med stacionarno in mobilno fazo. V zadnjih letih se najbolj pogosto uporabljata HPLC ali UPLC, pri katerih se le nekaj μL vzorca injicira v MF, ki pod visokim tlakom nato potuje skozi kolono v kateri poteka ločba (19,20,22).

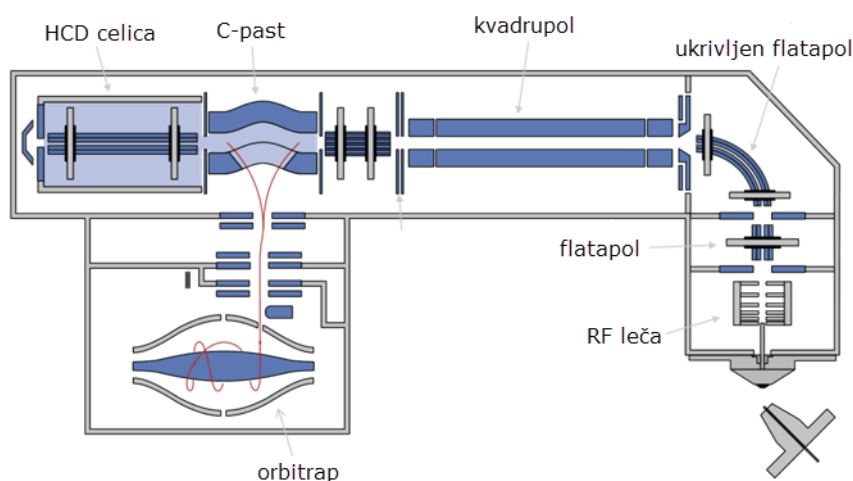
1.6.2 Masna spektrometrija

Masna spektrometrija (MS) nam poda informacije o strukturi posameznih komponent z visoko specifičnostjo in občutljivostjo. Je analitska tehnika, ki meri razmerje mase in naboja (m/z) nabitih delcev oz. ionov. MS je destruktivna tehnika, saj vzorca po analizi ne moremo povrniti v prvotno stanje. Masni spektrometer je sestavljen iz vira ionizacije, masnega analizatorja, vakuumskega sistema, detektorja in sistema za obdelavo podatkov. Molekule lahko ioniziramo kemično, elektronsko ali s svetlobo. Za ionizacija tekočih vzorcev, kot so na primer pri tekočinski kromatografiji se najpogosteje uporablja ionizacija z razprševanjem v električnem polju (ESI), fotoionizacija pri atmosferskem tlaku (APPI) in kemična ionizacija pri atmosferskem tlaku (APCI). ESI je primeren za ionizacijo srednje in zelo polarnih zvrsti, medtem ko sta APPI in APCI bolj primerna za ionizacijo nepolarnih in srednje polarnih zvrsti (20).

Pri ESI je tekoč vzorec razpršen skozi tanko kovinsko kapilaro, ki je pod napetostjo 2-5 kV, lahko pa je tudi ogrevana. Kapilira je postavljena pravokotno na vhod v masni spektrometer, z namenom preprečitve kontaminacije. Tekočina se na konici razprši v drobne nabite kapljice s katerih topilo počasi odpareva s pomočjo prepihanja s suhim dušikom. Z odparevanjem topila so kapljice vedno bolj nabite in ko dosežejo Rayleighovo mejo, sunkovito disociirajo na posamezne ione (23,24). Nabiti ioni nato potujejo v masni analizator v katerem je visok vakuum. Skozi masni analizator so ioni vodeni s pomočjo električnih in magnetnih polj. Z njimi lahko ione pospešujemo ter prilagajamo njihovo pot gibanja. Ioni z različnimi m/z se v teh poljih obnašajo različno in na podlagi česar jih lahko ločimo. Masni analizatorji so različni: sektorski, time of flight (TOF), kvadrupolni ali ionske pasti. Sektorski masni analizatorji se skoraj ne uporabljajo več, delujejo pa na podlagi statičnega magnetnega ali električnega polja, ki je skozi ukrivljeno pot spuščalo le ione s točno določenim m/z . Teorija v ozadju TOF analizatorja je, da se bodo v primeru enakega naboja lažji delci hitreje gibal skozi električno polje kot težji, kar se na koncu odraža v času, ki ga ioni potrebujejo, da dosežejo detektor. Kvadrupol z uporabo

oscilirajočih električnih polj stabilizira ali destabilizira poti ionov z določenimi m/z . S hitrim spreminjanjem parametrov lahko zaporedoma analizirajo delce z različnimi m/z . Ionske pasti so sposobne ujeti ione v določenem območju m/z in jih nato zaporedoma spuščati na detektor. Do sedaj omenjeni masni spektrometri kot detektorji večinoma uporabljajo elektronske ali fotoelektronske pomnoževalke.

Med novejših tehnologij na področju ionskih pasti spada »orbitrap«, prikazan na sliki 4. Ioni so skozi MS vodeni s pomočjo različnih električnih in magnetnih polj (HCD celica, C-past, kvadrupol, »flatapol«, ukrivljen »flatapol«, RF leča). Namen leče je, da zbere ione, maksimizira njihov prenos in oblikuje žarek ionov, ki je nato nadalje voden s pomočjo »flatapolov« do kvadrupola. Kvadrupol lahko s pomočjo spreminjanja radijske frekvence skozi prepušča le ione z določenim m/z . V C-pasti je približno 1 mTorr dušika, zato prihaja do kolizij, zaradi katerih ioni izgubljajo kinetično energijo in se ohlajajo. Od tu so nato v pulzih vodeni na »orbitrap«.



Slika 4: Sestava masnega spektrometra

V »orbitrapu« so ioni elektrostatsko ujeti okrog elektrode vretenaste oblike. Ujeti ioni krožijo ter hkrati oscilirajo levo in desno okrog longitudinalne osi centralne elektrode »orbitrapa«. Plošče detektorja v bližini vretena posnamejo nihanje električnega toka med njima, ki nastane zaradi teh oscilacij in je odvisen od m/z iona (25).

V masni spektrometriji ločimo pozitivni in negativni način merjenja. Med seboj se razlikujeta po tem, katere ione spremljamo. V pozitivnem načinu analiziramo pozitivno nabite delce, v negativnem načinu pa negativno nabite. Pri ESI v pozitivnem načinu v MF običajno dodamo mravljično kislino, ki donira protone našim analitom, da dobimo

pozitivno nabite zvrsti $[M+H]^+$. Obratno pa v negativnem načinu snemanja masnega spektra v MF dodamo na primer amonijev hidroksid, ki naše analite deprotonira. Na ta način dobimo negativno nabite analite $[M-H]^-$ (10).

1.7 Jedrska magnetna resonanca

Jedrska magnetna resonanca je spektroskopska tehnika, pri kateri z elektromagnetnim sevanjem vzbujamo atomska jedra v magnetnem polju in nato merimo elektromagnetno sevanje oddano med njihovo relaksacijo nazaj v osnovno stanje. NMR je nedestruktivna tehnika. To je še posebej uporabno pri analizi biološkega materiala. S to tehniko lahko vzbujamo le atomska jedra, ki imajo magnetni moment različen od 0. Najpogosteje preučevana jedra so ^1H in ^{13}C , preučujemo pa lahko tudi druga jedra, kot so ^{14}N , ^{17}O , ^{19}F , ^{23}Na , ^{31}P , itd. NMR spektri nam omogočajo določanje kemijske strukture in čistosti organskih spojin. Podajo nam informacije o številu določenih atomskih jeder v preučevanem vzorcu, njihovem položaju v molekuli in o prisotnosti funkcionalnih skupin (26,27). Priprava vzorcev za NMR je zelo enostavna in hitra, saj vključuje le raztapljanje vzorcev v devteriranih topilih in ne zahteva separacije posameznih komponent (10).

2. NAČRT ZA DELO

V eksperimentalnem delu magistrske naloge bomo s pomočjo HPLC-MS in NMR analizirali PS20 in PS80 različnih proizvajalcev, vrednotili njihovo heterogenost in poskusili okarakterizirati zvrsti, ki jih vsebujejo. V drugem delu naloge bomo analizirali tudi njihove razpadne produkte oksidacije in hidrolize, ki lahko nastanejo med stresiranjem vzorcev. Za karakterizacijo vsebujočih zvrsti in preiskovanje heterogenosti bomo vzorce PS20 in PS80 raztopili v ultra čisti vodi za analizo s HPLC-MS ter v devteriranem metanolu (MeOH-d₄) za analizo z NMR. Za preiskovanje produktov hidrolize z NMR bomo uporabili raztopino KOH v MeOH-d₄. Kot oksidant bomo uporabili AAPH in nato opravili HPLC-MS analizo. Kot modelno spojino za preučevanje produktov teh reakcij bomo sintetizirali trietilenglikololeat, saj so PS že v osnovi kompleksne zmesi različnih spojin. To nam bo kasneje olajšalo karakterizacijo razpadnih produktov oksidacije in hidrolize PS. Vrednotili bomo tudi primernost obeh tehnik za analizo PS20 in PS80.

3. MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

Polisorbat 80	J. T. Baker, ZDA
Polisorbat 80	Sigma Aldrich, Nemčija
Polisorbat 80 (ultra čist)	NOF Corporation, Japonska
Polisorbat 20	J. T. Baker, ZDA
Polisorbat 20	Sigma Aldrich, Nemčija
Acetonitril, hyper grade for LC-MS	Merck, Nemčija
Metanol, hyper grade for LC-MS	Merck, Nemčija
Mravljična kislina	Merck, Nemčija
Ultra čista voda	Fakulteta za farmacijo
Oleoil klorid 89 %	Sigma Aldrich, Nemčija
Trietilamin 99 %	Sigma Aldrich, Nemčija
Diklorometan	Merck, Nemčija
Metanol	Merck, Nemčija
Trietilenglikol 99 %	Neznan proizvajalec
AAPH	Sigma Aldrich, Nemčija
Silica gel 60	Merck, Nemčija
TLC ploščice	Merck, Nemčija
KOH	Merck, Nemčija
MeOH-d ₄	Eurisotop, VB
Silikagel ploščice za TLC	Merck, Nemčija

3.2 Aparature

Analitska tehtnica	Mettler Toledo, ZDA
HPLC	Thermo Scientific UHPLC Dionex Ultimate 3000, ZDA
Masni spektrometer	Thermo Scientific™ Exactive™ Plus Orbitrap, ZDA
NMR	Bruker AVANCE III 400, ZDA
Vakuumska črpalka	Büchi Rotavapor R-205, Švica
Vodna kopel	Büchi Heating Bath B-490, Švica
Inkubator	Memmert, Nemčija

3.3 Metode

3.3.1 Sinteza trietilenglikoleata

Trietilenglikol (10 mL, 74,91 mmol) in trietilamin (1,4 mL, 4,94 mmol) smo raztopili v 30 mL diklorometana. Reakcijo smo izvajali na ledeni kopeli v atmosferi argona. S pomočjo kapalnika smo nato postopoma dodajali 89 % oleoilchlorid (2,7 mL, 7,33 mmol) raztopljen v 20 ml diklorometana. Zmes smo še 30 minut pustili na ledeni kopeli ter še čez noč na sobni temperaturi med stalnim mešanjem. Naslednji dan smo reakcijsko zmes sprali z 1 M raztopino HCl (2×15 mL), vodo (15 mL) ter nasičeno raztopino NaCl (15 mL). Sušili smo jo z brezvodnim Na₂SO₄ in po filtriranju diklorometan odparili pod znižanim tlakom. Čistost spojine smo preverili s TLC. Uporabili smo aluminijaste ploščice s silikagelom. Spojine smo detektirali s pomočjo orositvenih reagentov bromkrezol zeleno in fosfomolibdensko kislino. Spojino smo očistili s kolonsko kromatografijo. Stacionarna faza je bil Silica gel 60 (premer delcev: 0.040-0.063 mm) Za MF smo uporabili diklorometan:metanol = 30:1. Ločeno smo združili zelo čiste frakcije in nato še manj čiste in jih uparili pod znižanim tlakom. Čistost smo dokazali z NMR.

3.3.2 Hidroliza trietilenglikoleata

Za hidrolizo naše modelne spojine smo uporabili raztopino KOH v devteriranem metanolu. Trietilenglikoleat (20,7 mg; 0,05 mmol) smo raztopili v 450 µL MeOH-d₄ in nato dodali KOH (5,6 mg; 0,1 mmol). Reakcijsko zmes smo pustili eno uro na sobni temperaturi in nato posneli NMR spekter.

3.3.3 Oksidacija trietilenglikoleata

Za oksidacijo smo uporabili reagent AAPH. Najprej smo pripravili 1 mg/mL trietilenglikoleata v acetonitrilu in 10 µL te raztopine dodali 960 µL MF-A. Pripravljeni zmesi smo nato dodali še 30 µL AAPH raztopljenega v ultra čisti vodi s koncentracijo 1 mg/mL. Reakcijsko zmes smo segrevali 48 ur na 40 °C.

3.3.4 Hidroliza polisorbata 80 in 20

30 mg PS smo raztopili v 450 µL MeOH-d₄ in posneli ¹H NMR. Pripravljeni raztopini smo dodali 10 µL KOH v MeOH-d₄ s koncentracijo 100 mg/mL ter pustili eno uro na sobni temperaturi.

3.3.5 Oksidacija polisorbata 80 in 20

Najprej smo pripravili raztopino oksidanta AAPH v ultra čisti vodi z masno koncentracijo 1 mg/mL, nato smo 1 mg PS raztopili v 1 mL te raztopine. Tako pripravljeno reakcijsko zmes smo nato inkubirali 12 ur na 40 °C. Po inkubaciji smo vzorce redčili, tako da smo 10 µL vzorca dodali 990 µL MF-A.

3.3.6 HPLC-MS

Vzorce PS smo redčili z ultra čisto vodo do koncentracije 1 mg/mL nato pa še z MF-A do končne koncentracije 0.01 mg/mL. Po vsakem redčenju smo vzorce homogenizirali na vorteksu. Za separacijo smo uporabili kolono C18 5µm (75 mm × 2,1 mm) segreto na 30 °C. Pretok MF je bil 0.7 mL/min. Uporabili smo gradientno ločbo (Pregeldnica III).

Pregeldnica III: HPLC gradient.

Čas (min)	MF A (%)	MF B (%)
0	100	0
1	100	0
33	0	100
39	0	100
40	100	0
43	100	0

Vodna faza MF-A je bila sestavljena iz acetonitrila, metanola, vode in mravljične kisline v razmerju 80:20:900:1, organska faza MF-B pa iz acetonitrila, metanola in mravljične kisline v razmerju 800:200:1. Volumen injiciranja je bil 5 µL. HPLC je bil z MS sklopljen s T-členom na katerem se je pretok razdelil, tako da je na MS prišlo le približno 20 % celotnega pretoka, preostanek je šel v odpad. Uporabili smo hibridni kvadrupol-orbitrap masni spektrometer z ESI. Programski vmesnik je bil Thermo Xcalibur.

Nastavitve masnega spektrometra so bile sledeče:

Vrsta skeniranja: Full MS
Območje skeniranja: 150 – 2000 m/z
Fragmentacija: izklopljeno
Resolucija: 70 000

Polarnost:	pozitivna
Mikroskeni:	1
»Sheath gas« pretok:	25
Pretok pomožnega plina	10
»Sweep gas« pretok	0
Napetost na kapilari	3,5 kV
Temperatura kapilare	350 °C
S-leča, RF nivo	50,0
Temperatura pomožnega plina	320 °C

3.3.7 NMR

¹H spektre smo snemali pri 400 MHz. Kot topilo smo uporabili devteriran metanol, MeOH-d₄. Za spremljanje hidrolize smo 20 mg naše modelne spojine (trietilenglikoleat) dodali 4 mg KOH raztopljenega v 1 ml MeOH-d₄, kar ustreza približno dvema ekvivalentoma KOH glede na trietilenglikololeat. Reakcijo smo pustili teči 1 uro pri sobni temperaturi, nato smo posneli NMR. Za obdelavo posnetih NMR spektrov smo uporabili računalniški program MestReNova proizvajalca Mestrelab research.

Uporabljeni parametri:

- Topilo: MeOH-d₄
- Frekvenca: 400 MHz
- Število skenov: 16
- Število »dummy skenov«: 2
- Spektralna širina: 20.55 ppm
- Čas skena: 4 s
- Čas zakasnitve: 1 s za trietilenglikololeat in 20 s za PS
- FID resolucija: 0.1255 Hz
- Receiver gain: 32
- temperatura probe: 300 K
- »Wobble sweep« širina: 4 MHz
- Interni standard: DMSO-*d*₆ s tetrametilsilanom

3.3.8 Iskanje aduktov

Za iskanje aduktov na masnih spektrih smo uporabili Excelovo preglednico, ki je prosto dostopna na internetu. Preglednico smo dopolnili še za adukt $[M+2NH_4^+]$ (28).

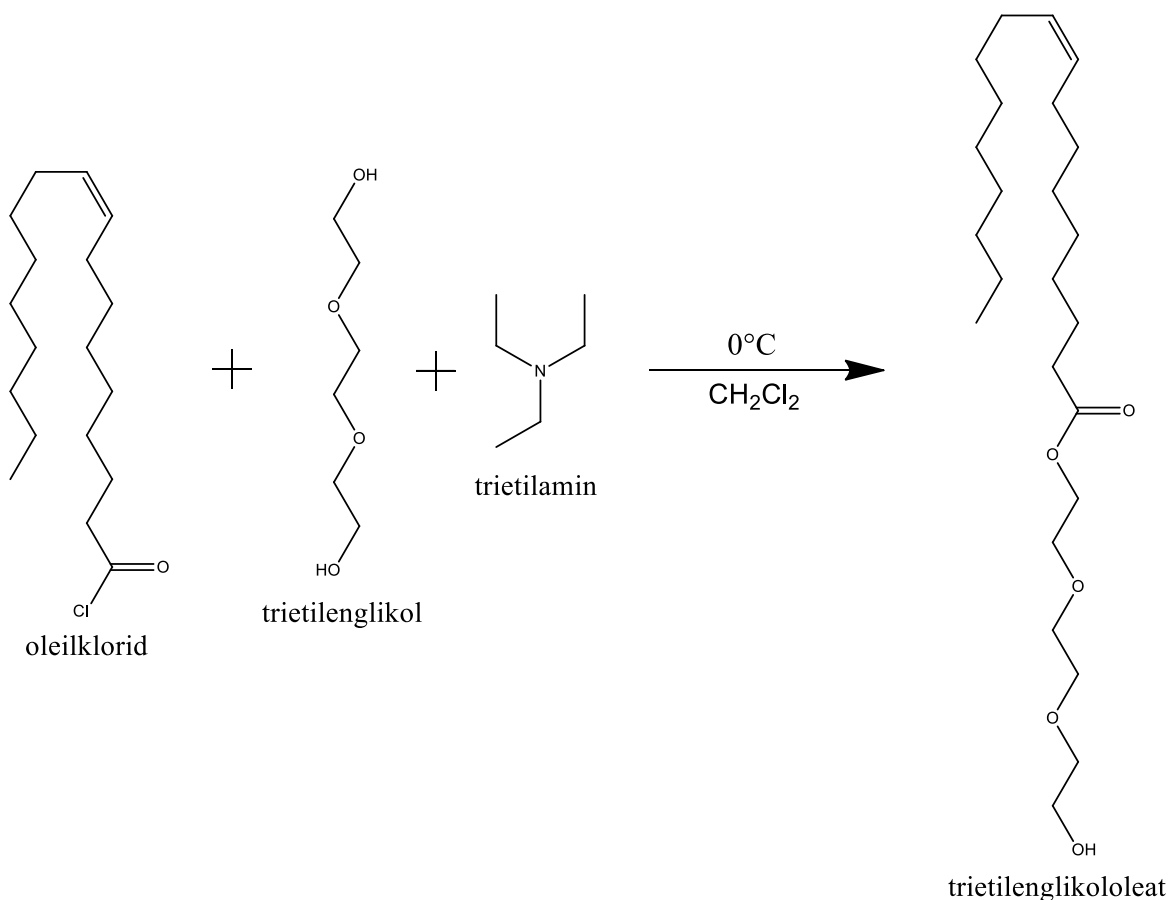
3.3.9 Risanje spojin in računanje točnih mas

Za risanje spojin in preračunavanje točnih mas smo uporabili program ChemDraw Professional 16.0.

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

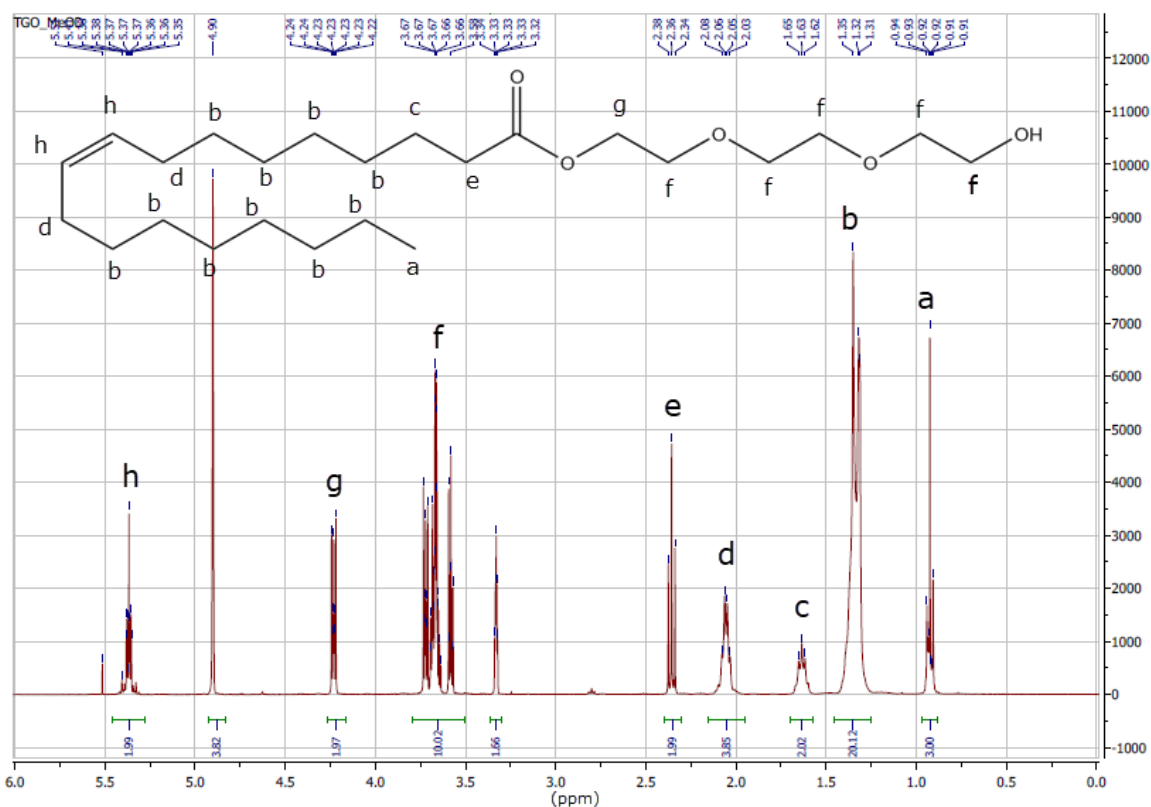
4.1 Sinteza modelne spojine za oksidacijo in hidrolizo

Ustrezno čisto modelno spojino smo sintetizirali v drugem poizkusu, saj smo morali uvesti nekaj modifikacij postopka. Sinteza modelne spojine je predstavljena na sliki 5. Ko smo reakcijo izvajali prvič nam je nastal le diester oleinske kisline in trietilenglikola, kar smo potrdili z NMR. Razlog neustrezne zaestritve je bil najverjetneje premajhen prebitek trietilenglikola in preveč koncentriran oleoil klorid.



Slika 5: Sinteza trietilenglikololeata.

Reakcijo smo optimizirali z redčenjem oleilklorida v diklorometanu in s počasnejšim kapljanjem v raztopino trietilenglikola ob konstantnem mešanju. Povečali smo tudi količino trietilenglikola iz 3 mL na 10 mL ter ga raztopili v večjem volumnu diklorometana. Reakcija je tako potekala počasneje, ker so bili reagenti bolj razredčeni. To je zmanjšalo verjetnost, da 2 molekuli oleoil klorida zreagirata z isto molekulo trietilenglikola, kot se je zgodilo v prvem poizkusu. Po sintezi in izolaciji smo strukturo končnega produkta potrdili z NMR (slika 6).

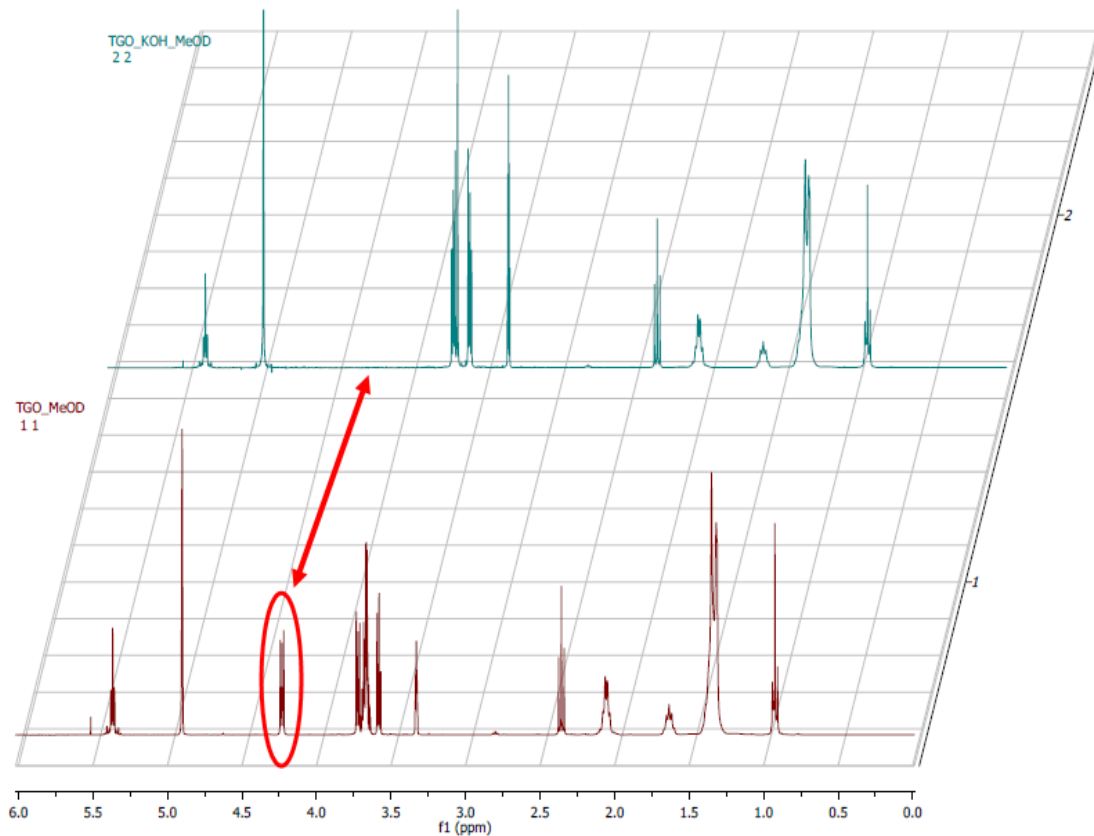


Slika 6: NMR spekter in strukturna formula trietilenglikololeata z označenimi protoni glede na kemijske premike.

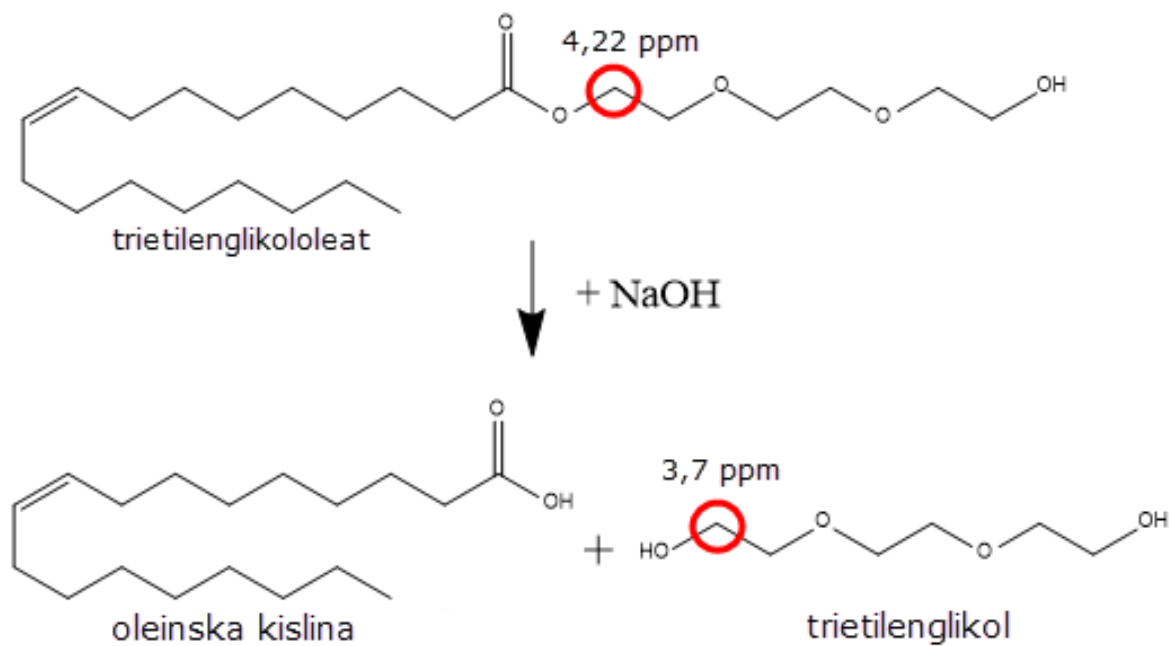
Sintetiziran trietilenglikololeat je bil glede na NMR spekter zelo čist (99 %), vseboval je le en odstotek proste oleinske kisline.

4.1.1 Hidroliza modelne spojine

Modelna spojina je po dodatku dveh ekvivalentov NaOH v eni uri na sobni temperaturi popolnoma hidrolizirala, kar je razvidno iz NMR spektra na sliki 7. Nastala je oleinska kislina ter prosti trietilenglikol. Slika 8 prikazuje spremembo kemijskega premika protonov CH₂ skupine na POE enoti zraven esterske vezi, ki so odgovorni za signal pri 4,22 ppm. Razlog za premik je sprememba kemijskega okolja po hidrolizi estrske vezi. Premaknil se je v območje 3,6-3,7 ppm, ki predstavlja protone CH₂ skupin na POE enotah, posledično se je tudi integral tega območja po reakciji povečal za 2 protona. Signalov OH in COOH skupin nismo zaznali zaradi devterijske izmenjave s topilom.



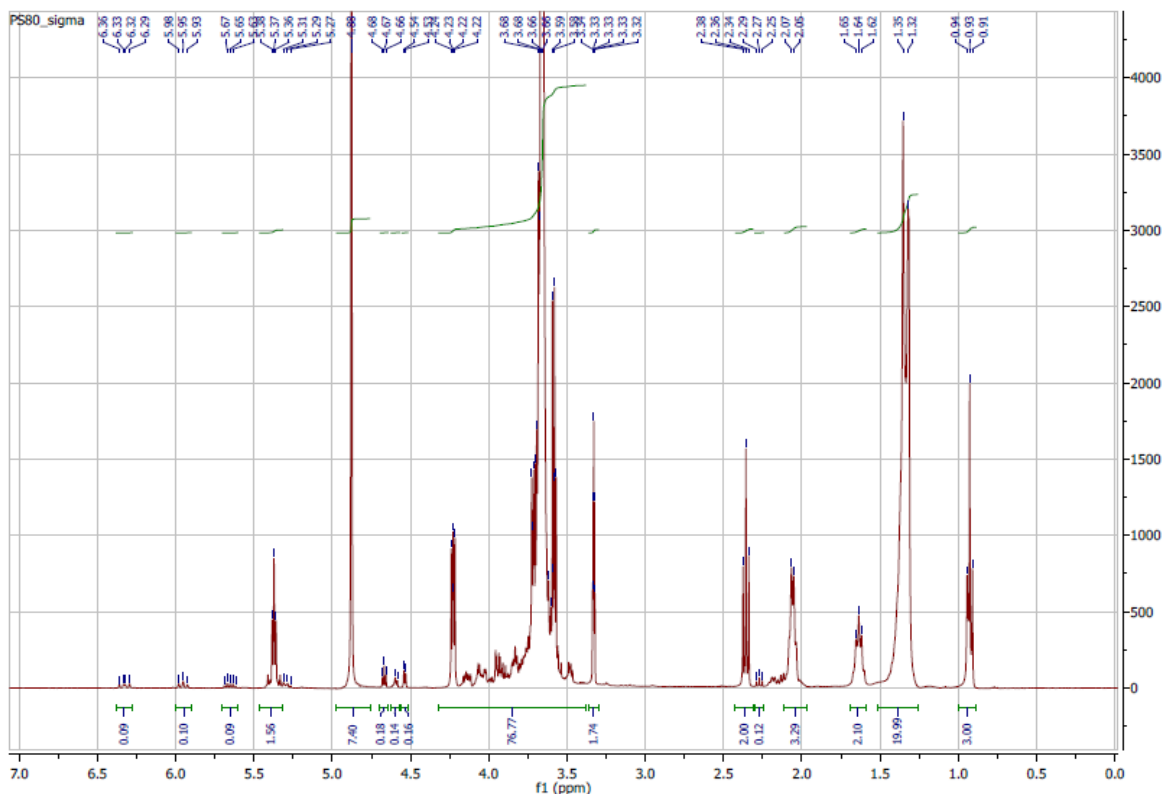
Slika 7: NMR spektra trietilenglikoleata po dodatku (zgoraj) in pred dodatkom KOH (spodaj) posneta v MeOH-d4. Označeno je izginotje signala pri 4,22 ppm po hidrolizi estrske vezi.



Slika 8: Hidroliza trietilenglikoleata in posledična sprememba kemijskih premikov v NMR spektru.

tudi odsotnost linolenske in linolne kisline, ki imata več dvojnih vezi, saj bi v nasprotnem primeru videli dodatne signale v območju 5-6 ppm.

V spektru PS80 Sigma Aldrich predstavljenem na sliki 10 lahko iz predhodno omenjenega razmerja integralov ocenimo vsebnost oleinske kisline na približno 78 %.

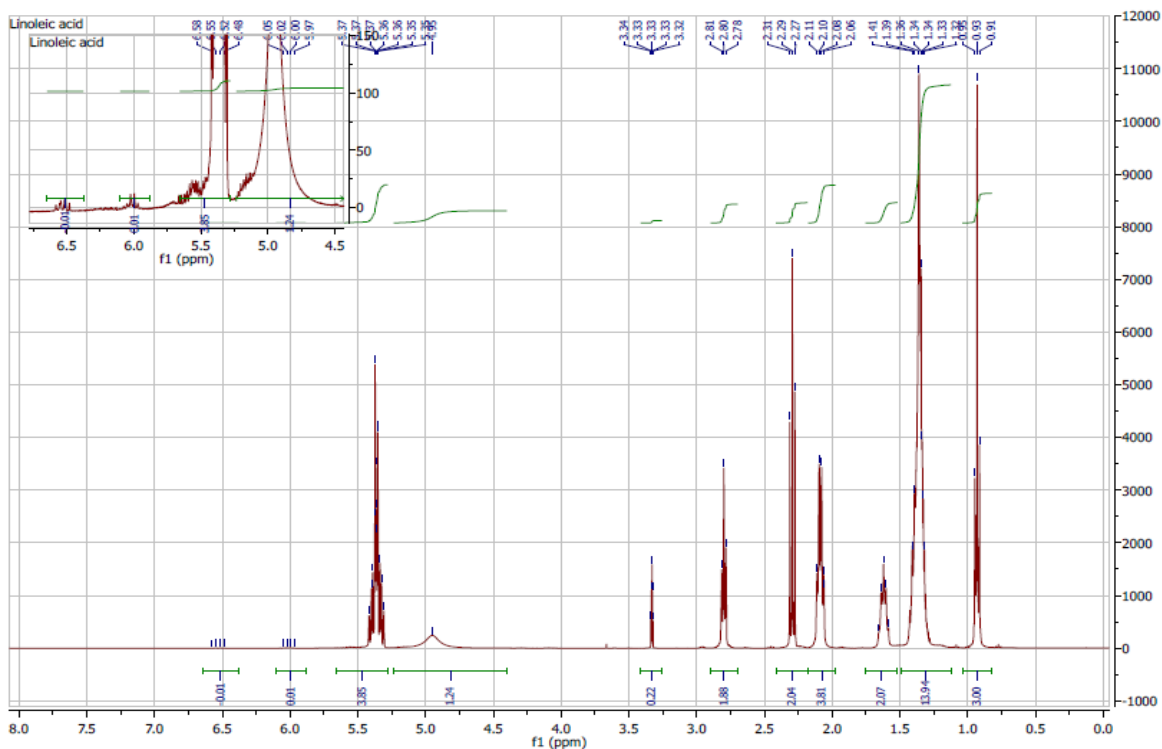


Slika 10: NMR spekter PS80 proizvajalca Sigma Aldrich posnet v MeOH-d4.

Majhen triplet pri 2,27 ppm predstavlja protone CH₂ skupine poleg COOH skupine oleinske kisline. Vsebnost prostih MK lahko s pomočjo tega integrala ocenimo na 6 %. V ultra čistem PS80 proizvajalca NOF pa prostih MK nismo zaznali. NMR spekter PS80 proizvajalca J. T. Baker je bil praktično identičen vzorcu Sigme Aldrich, le da smo v njem opazili nekoliko manjšo vsebnost prostih MK. Ostalih MK z NMR ne moremo okarakterizirati, ker nimajo dvojnih vezi, vsi ostali signali četudi različno dolgih MK pa se med seboj prekrivajo v območju 1-2,5 ppm.

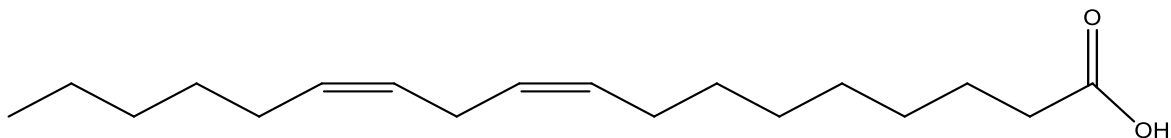
V PS80 proizvajalcev Sigma Aldrich in J. T. Baker so vidni štirje dodatni signali v območju 5-6,5 ppm, ki jih pri ultra čistem PS nismo opazili. Signali v tem območju najverjetneje pripadajo protonom na C-atomih s konjugiranimi C=C vezmi. Te štiri signale smo nato primerjali z NMR spektrom linolne kisline (slika 11), ki jo PS80 tudi lahko

vsebuje glede na farmakopejske specifikacije. Spektra se v predelu dvojnih vezi nista ujemala.

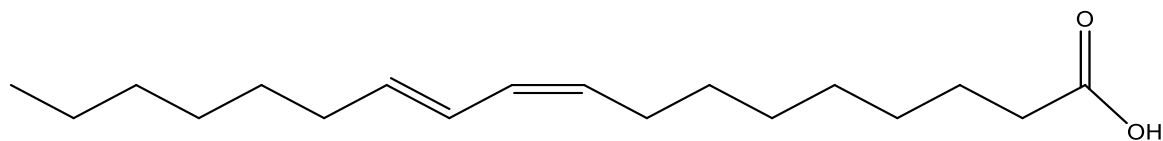


Slika 11: NMR spekter linolne kisline, posnet v MeOH- d_4 .

Linolna kislina je v naravi večinoma prisotna z dvema nekonjugiranimi dvojnima vezema v cis obliki, vendar lahko obstaja tudi v konjugirani obliki (slika 12).



cis-9, cis-12 linolna kislina



cis-9, trans-11 linolna kislina

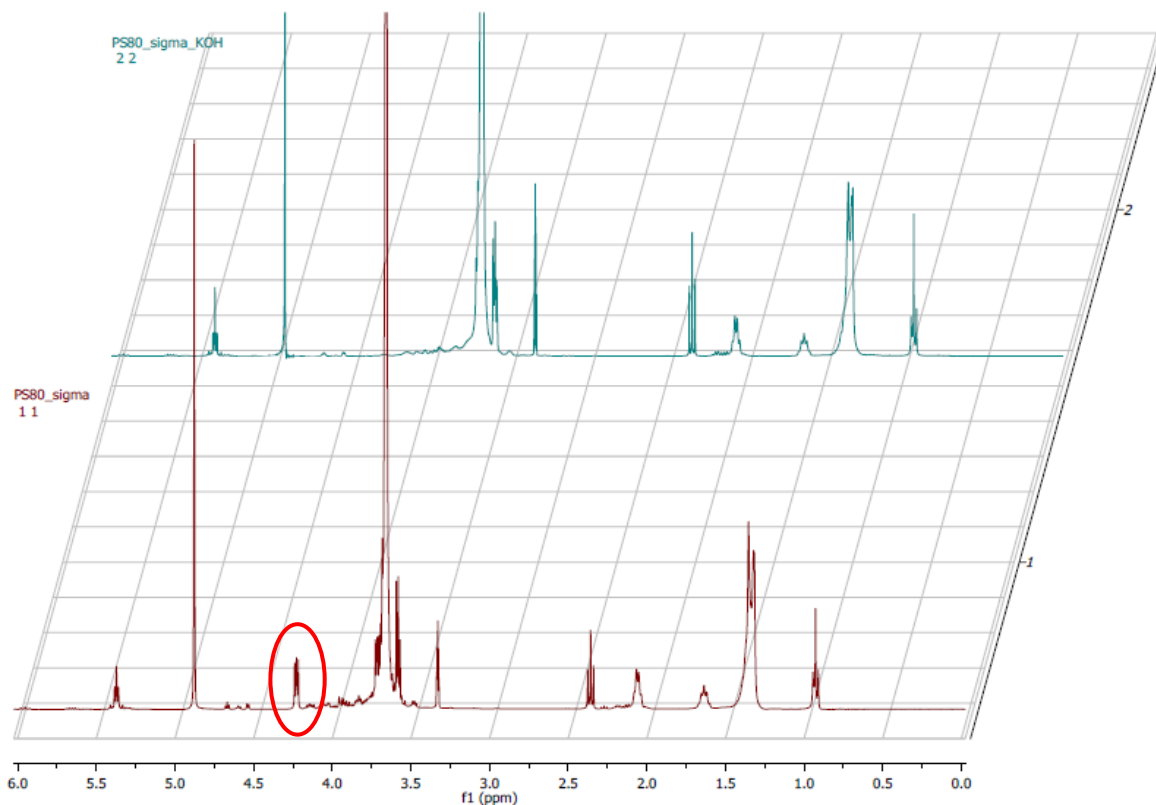
Slika 12: Nekonjugirana linolna kislina (zgoraj) in konjugirana linolna kislina (spodaj).

Po pregledu literature smo našli kemijske premike za konjugirano linolno kislino v $CDCl_3$, ki so bili za (9Z, 11E) obliko konjugirane linolne kisline sledeči: 5.32 ppm, 5.69 ppm, 5.97 ppm in 6.34 ppm (29). Ti kemijski premiki so primerljivi z našimi premiki, iz česar lahko potrdimo prisotnost konjugirane linolne kisline v zgoraj omenjenima vzorcema PS80. Če

signale omenjenih protonov integriramo glede na terminalno CH₃ skupino, vsebnost Z, E konjugirane linolne kisline v našem vzorcu predstavlja približno 9 % MK frakcije.

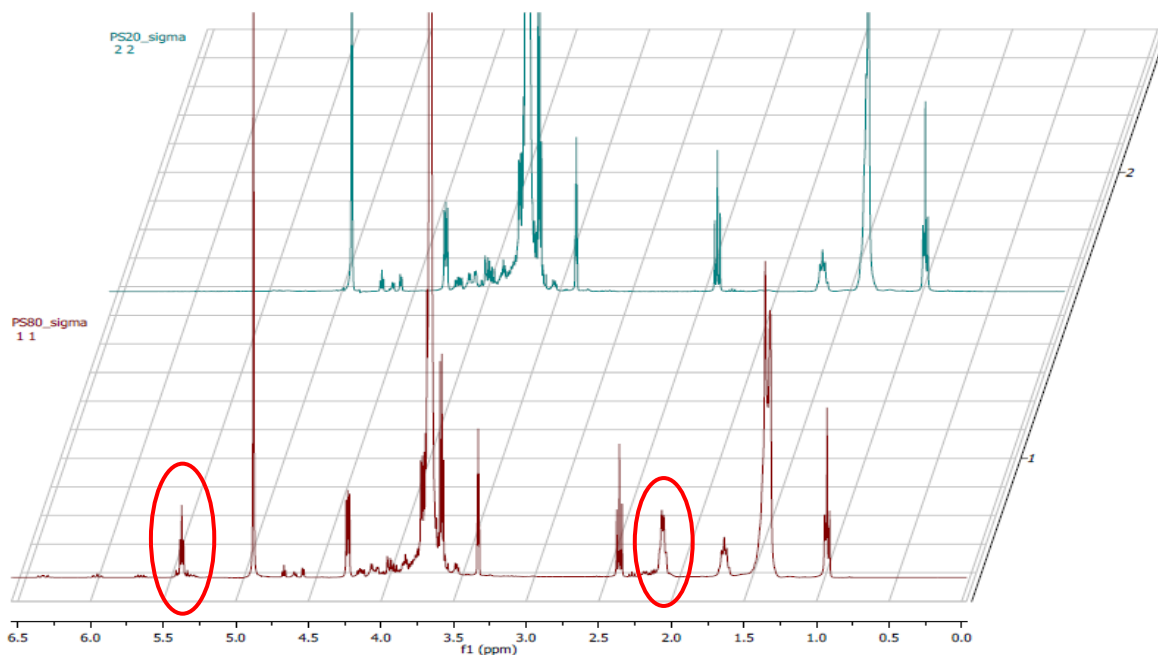
4.2.1 Hidroliza

Hidroliza PS80 je v eni uri na sobni temperaturi potekla do konca, kar sklepamo iz odsotnosti NMR signala pri 4,22 ppm na sliki 13 zgoraj. Opazili smo enako spremembo kot v primeru hidrolize trietilenglikololeata, ki se je v primeru spremljanja hidrolize izkazal kot dobra modelna spojina. Opazili smo tudi majhno razliko v kemijskem premiku signalov protonov CH₂-COOR pri 2,36 ppm, ki se po poteku hidrolize premaknejo za 0,03 ppm nižje. Do tega pride, ker po hidrolizi nastane CH₂-COO⁻, ki pa ima drugačen kemijski premik. Izginil je tudi signal protonov zraven karboksilne skupine, CH₂-COOH, ki je bil pred hidrolizo viden pri 2,27 ppm, saj so tudi proste MK prešle v COO⁻ obliko.



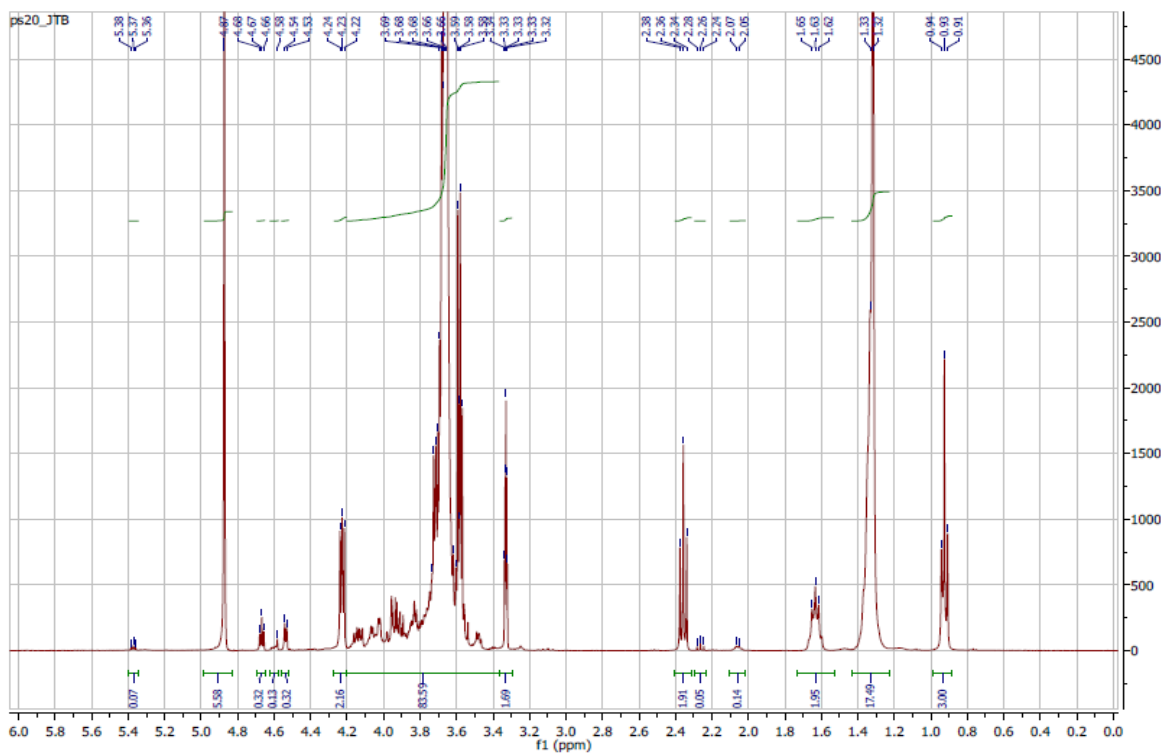
Slika 13: NMR spektra PS80 proizvajalca Sigma Aldrich po dodatku (zgoraj) in pred dodatkom KOH (spodaj) posneta v MeOH-d₄.

NMR spekter PS20 je na pogled podoben spektru PS80. Slika 14 prikazuje podobnosti in razlike med obema spektroma. Le-te so vidne v premikih protonov ob dvojnih vezeh oleinske kisline (5,4 ppm in 2,06 ppm), ki je prisotna v primeru PS80.



Slika 14: NMR spektra PS20 (zgoraj) in PS80 (spodaj) proizvajalca Sigma Aldrich posneta v MeOH-d4.

Iz slike 15 lahko sklepamo, da v PS20 najverjetneje ni sledov linolne kisline, saj ni nobenih signalov v območju 5-6,5 ppm razen nizkega signala pri 5,4 ppm, ki predstavlja protone ob dvojni vezi oleinske kisline (R-CH=CH-R) in je prisoten tudi v PS80. Kot že omenjeno o prisotnosti ostalih MK le malo izvemo iz NMR spektra, ker se signali različnih nenasičenih MK med seboj popolnoma prekrivajo.



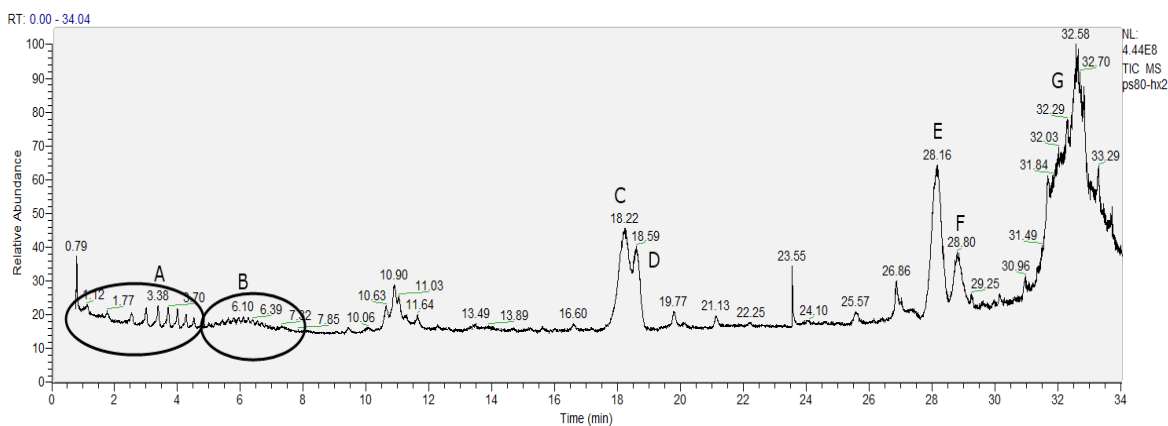
Slika 15: NMR spekter PS20 proizvajalca J. T. Baker posnet v MeOH-d4.

4.3 Analiza s HPLC-MS

V dobljenih masnih spektrih smo za maksimalno še sprejemljivo odstopanje mase upoštevali odmik do 5 ppm.

4.3.1 Polisorbat 80

Začeli smo z analizo »ultra čistega« (v smislu maščobnih kislin) PS80 japonskega proizvajalca NOF Corporation, ki ustreza specifikacijam ChP. Glede na zahteve ChP mora vsebovati vsaj 99 % oleinske kisline, zato smo pričakovali, da bo izmed vseh PS najmanj heterogen ter zato najenostavnejši za analizo. Po analizi smo najprej identificirali posamezne skupine vrhov v kromatogramu na sliki 16. V njem smo res našli le estre oleinske kisline ter nezaestrene zvrsti. Masni spekter smo začeli snemati šele pri času 0,8 min ker smo pred tem časom dobili le ogromen vrh topila, ki je posledica preklopa med HPLC in MS.

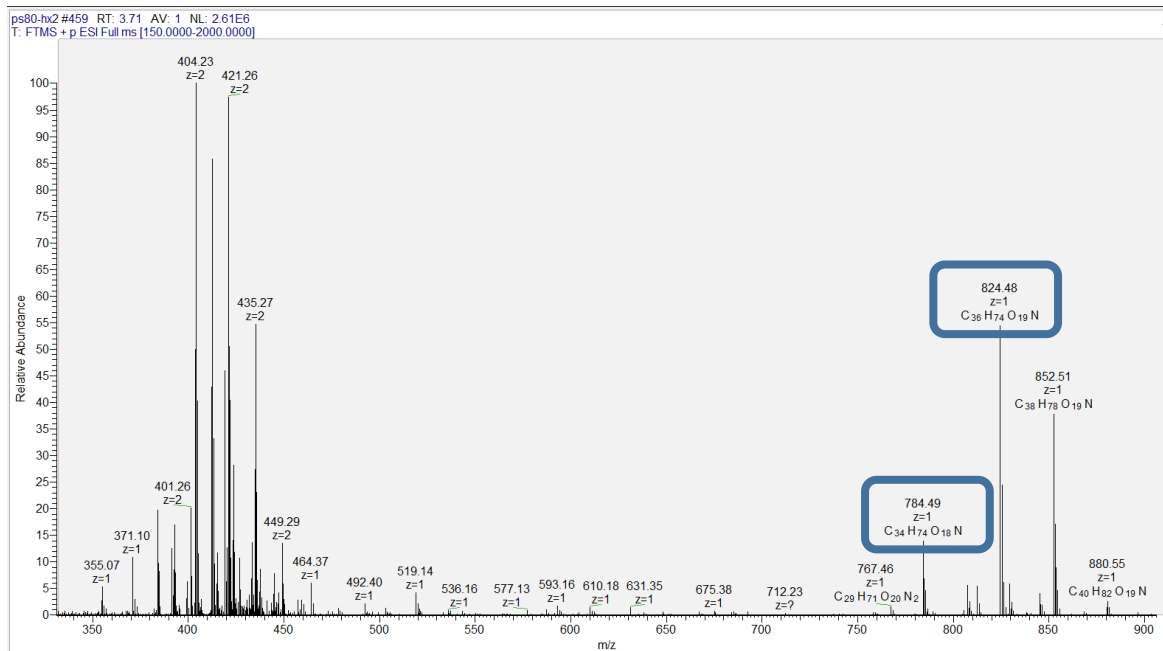


Slika 16: Totalni ionski kromatogram PS80 proizvajalca NOF. A-nezaestreni POE izosorbidi, B-nezaestreni POE sorbitani, C-POE sorbitan monoestri, D-POE izosorbid monoestri, E- POE sorbitan diestri, F-POE izosorbid diestri, G-POE sorbitan triestri.

Za HPLC separacijo smo uporabili kolono s stacionarno fazo C_{18} , zato so se najprej eluirale hidrofilne spojine kasneje pa vedno bolj lipofilne. Zvrsti so se eluirale v naslednjem zaporedju: nezaestreni POE izosorbidi = nezaestreni POE < nezaestreni POE sorbitani < monoestri POE sorbitana < POE monoestri = monoestri POE izosorbida < diestri POE sorbitana < diestri POE izosorbida < triestri POE sorbitana.

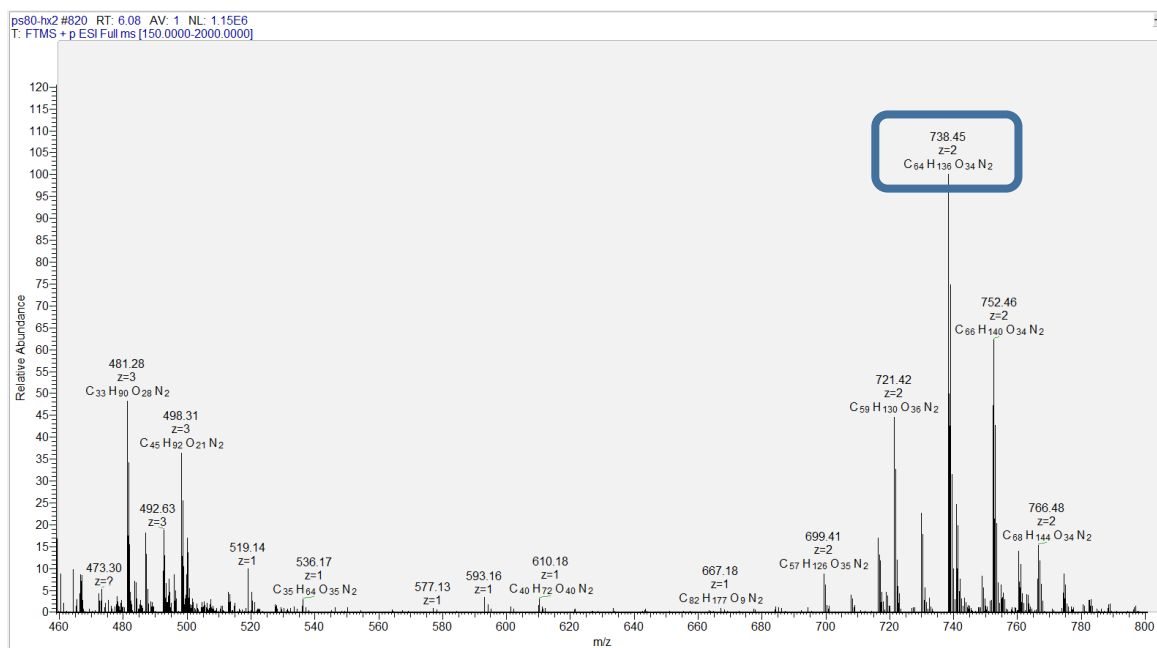
Vrhovi v območju A predstavljajo nezaestren polioksietiliran izosorbid z različnim številom POE enot ($n=9-21$). Na sliki 17 je prikazan eden izmed predstavnikov, ki vsebuje 16 POE enot. Razlike v retencijskem času so posledica različnih dolžin verige POE enot oz. števila POE enot, kar so potrdili tudi masni spektri teh spojin. Razlike m/z med posameznimi vrhovi so bile 44, kar predstavlja ravno eno POE enoto. Sočasno z njimi se

eluirajo tudi proste polimerne verige POE, ki niso vezane na sorbitan ali izosorbid, vendar se njihovih vrhov v kromatogramu ne vidi ločeno. Kasnejšo ločbo smo dosegli z uporabo UPLC kolone z manjšimi delci, ki imajo večjo separacijsko moč (1,7 μm delci namesto 5 μm).



Slika 17: Masni spekter PS80 proizvajalca NOF ob času 3,70 min, ko se eluirajo nezaestreni POE izosorbidi. M/z 824,48 predstavlja POE izosorbid s 15 POE enotami kot adukt z NH_4^+ , m/z 784,49 pa je nezaestrena POE veriga s 17 POE enotami

Takoj za POE izosorbidi se v kromatografskem vrhu B eluirajo nezaestreni POE sorbitani, katerega primer vidimo na sliki 18.

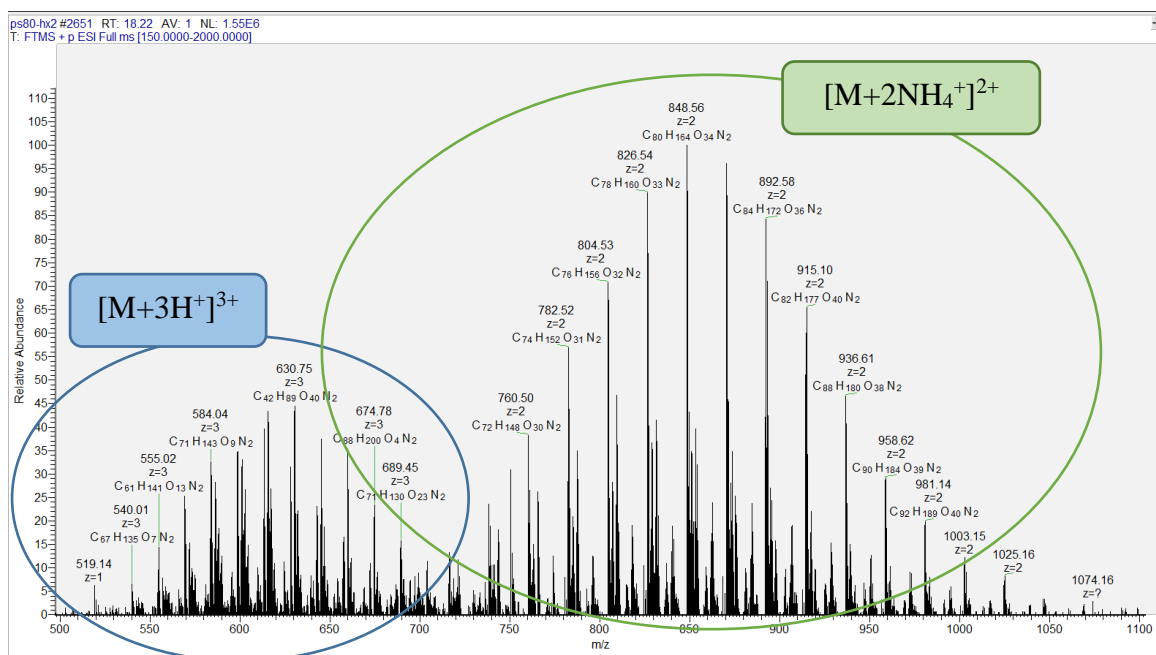


Slika 18: Masni spekter PS80 proizvajalca NOF ob času 6,08 min, ko se eluirajo nezaestreni POE sorbitani. m/z 738,45 predstavlja nezaestren POE sorbitan z 29 POE enotami kot adukt z dvema NH_4^+ .

Do kasnejše elucije pride predvsem zaradi večje velikosti teh molekul. POE sorbitani imajo v povprečju precej več POE enot kot POE izosorbidi, kar vodi do več interakcij med verigami POE in lipofilno C18 stacionarno fazo. Vrhovi POE sorbitana so že na pogled precej bližje skupaj kot vrhovi POE izosorbida. To zopet lahko pojasnimo z večjim številom POE enot, ki jih vsebuje POE sorbitan. Zaradi večjega števila POE enot ima vsaka dodatna POE enota manjši vpliv na retencijski čas, saj je relativna razlika med njimi manjša.

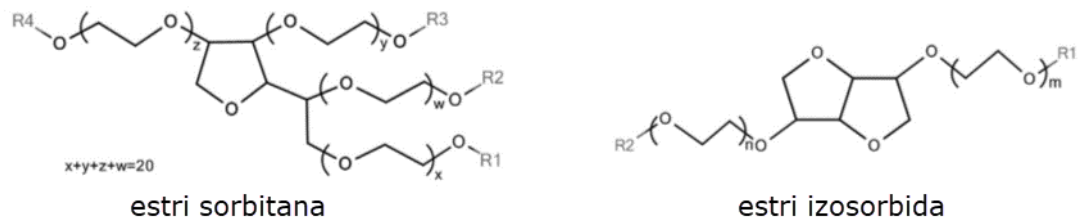
Vrh C tvorijo POE monoestri sorbitana. Na njegovem masnem spektru (slika 19) vidimo več različnih signalov, ki so zopet posledica različnega števila POE enot. Signali se nahajajo v več različnih predelih zaradi tvorbe različnih aduktov. Vsi ti signali torej predstavljajo iste spojine a se nahajajo drugje v masnem spektru zaradi različnih nabojev in posledično različnih m/z . Na naboj ionov lahko sklepamo že iz razlike med dvema glavnima signaloma, saj ima ena POE enota maso približno 44 Da. Naboj posameznih ionov smo potrdili tudi z masnim spektrometrom, saj le-ta omogoča tudi prikaz nabojev za posamezne ione. Če so adukti nabiti 1+ je torej razlika med signali 44 m/z , če so adukti nabiti 2+ so razlike med glavnimi signali le 22 m/z , če pa so nabiti 3+ so te razlike približno 14.67 m/z .

Signali v območju 400-500 m/z predstavljajo adukte $[M+3H^+]^{3+}$ s številom POE enot 26-37, $n=26-37$. V istem območju, vendar z manjšo intenziteto so tudi adukti $[M+2H^+]^{2+}$, $n=23-32$. Najvišji signali (m/z 700-800) predstavljajo adukte z amonijakom $[M+2NH_4^+]^{2+}$, $n=21-36$. Med adukti z nabojem ena je najbolj izstopal $[M+NH_4^+]^+$, $n=6-19$. Opazili smo, da se POE monoestri sorbitana eluirajo le v enem skupnem vrhu in ne v večih kot nezaestrene zvrsti. Za glavne interakcije s stacionarno fazo so v tem primeru odgovorne maščobne kisline. Dodatne POE enote zato na retencijski čas teh spojin vplivajo precej manj, kot pri nezaestrenih. To opazimo pri vseh vrhovih na kromatogramu, ki predstavljajo zaestrene zvrsti.

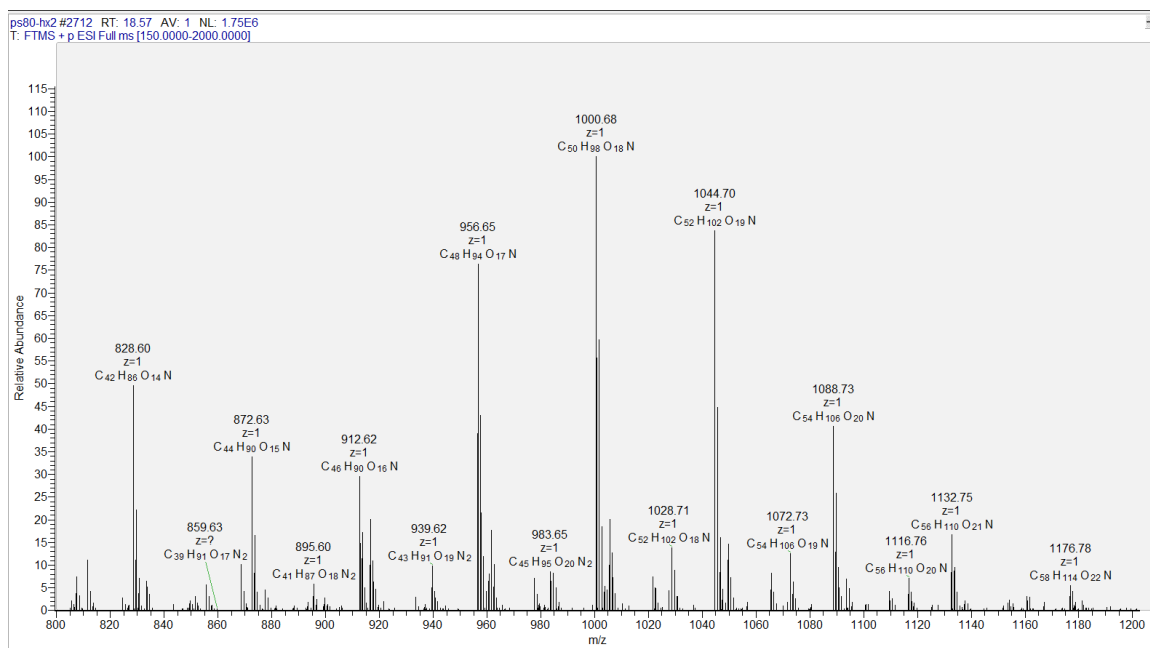


Slika 19: Masni spekter PS80 proizvajalca NOF ob času 18,22 min, ko se eluirajo monooleati POE sorbitana.

Vrh D, ki se nekoliko prekriva z vrhom C predstavljajo monoestri POE izosorbida. Tudi ti tvorijo različne adukte z amonijakom. Opazili smo adukte $[M+NH_4^++H^+]^{2+}$, $n=11-18$ in $[M+2NH_4^+]^{2+}$, $n=12-22$. Adukti $[M+NH_4^+]^+$, $n=6-19$, prikazani na sliki 21 so bili izvor najintenzivnejših signalov. Naboj ionov je povezan z velikostjo molekule, kar je v tem primeru odvisno od števila POE enot. Molekule z več POE enotami običajno tvorijo adukte z več naboji. Opazili smo, da estri POE izosorbida vsebujejo precej manj POE enot, kot estri POE sorbitana, kar lahko pojasnimo s tem, da izosorbid vsebuje le dve OH skupini in ne štirih kot sorbitan (slika 20), posledično se v času sinteze veže več POE enot na sorbitan. Estri POE izosorbida niso tvorili aduktov, ki bi imeli naboj 3+, saj so najverjetneje premajhne molekule za tvorbo takšnih aduktov.



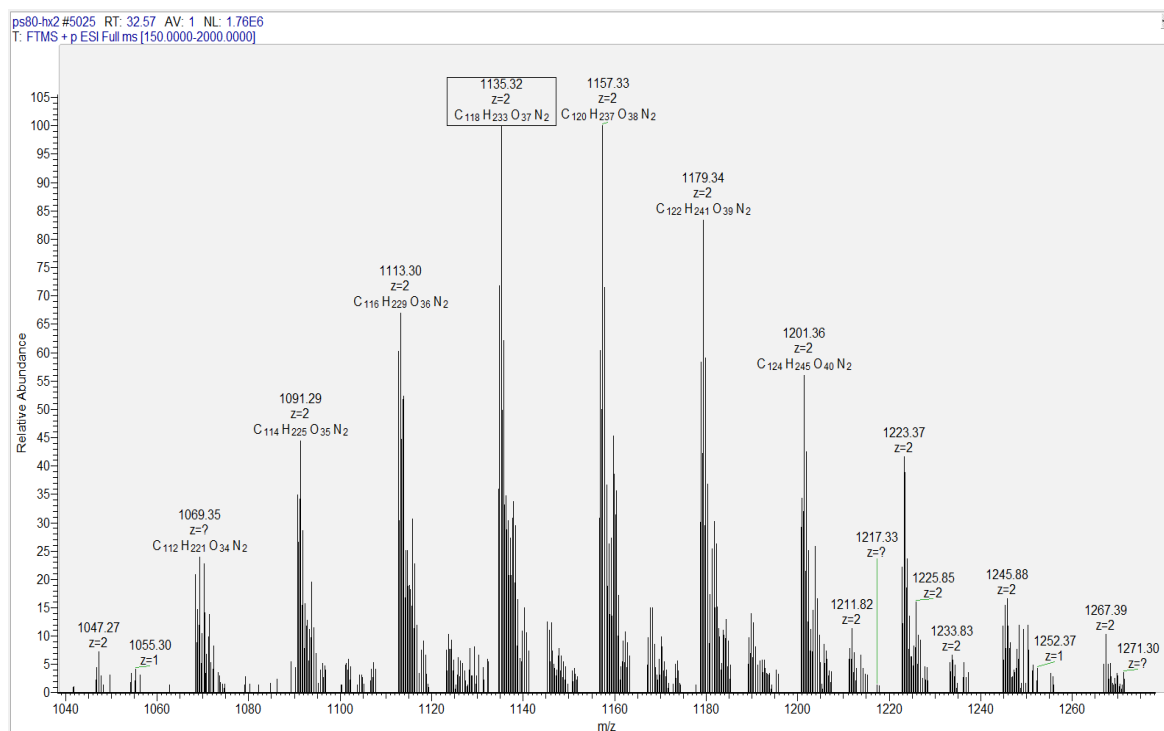
Slika 20: Razlika v strukturi estrov sorbitana in estrov izosorbida.



Slika 21: Masni spekter PS80 proizvajalca NOF ob času 18,57 min, ko se eluirajo monooleati POE izosorbida.

Kromatografska vrhova E (slika 22) in F (slika 23) predstavljata diestre POE sorbitana in POE izosorbida v takšnem zaporedju. Sorbitani se eluirajo pred izosorbidi enako kot so se monoestri v vrhovih C in D. Zaporedje elucije pa se razlikuje z zaporedjem pri nezaestrenih zvrsteh. Pri estrih se namreč sorbitani eluirajo pred izosorbidi. Razlog je, da zestreni POE izosorbidi vsebujejo manj POE enot kot zaestreni POE sorbitani in MK predstavlja večji delež molekule polisorbata. Ravno MK pa je odgovorna za večino interakcij s stacionarno fazo. Tako kot monoestri POE sorbitana tudi njegovi diestri prvenstveno tvorijo adukte z dvema NH₄⁺. Diestri izosorbida pa so enako kot monoestri tvorili adukte le z enim NH₄⁺. Število POE enot je primerljivo številu enot pri monoestrih, n=22-34 za diestre POE sorbitanov in n=12-20 za diestre POE izosorbidov. Estri POE sorbitanov torej povprečno vsebujejo 6-9 POE enot na eno OH skupino, izosorbidi pa 6-10 enot. Vredno je omeniti, da smo našli tudi estre POE sorbitanov z le 6 POE enotami, kar

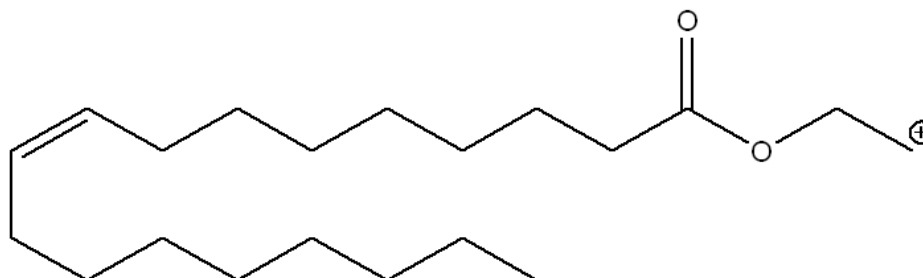
V zadnjem vrhu G, katerega masni spekter je predstavljen na sliki 24 se eluirajo triestri POE sorbitana ter mnogo drugih znanih in nezanih spojin in nečistot, za katere predvidevamo, da so lahko nezreagirane spojine iz sinteznega postopka, ali pa gre morda za spojine, ki so ostale na koloni še iz prejšnjih eksperimentov, saj je kolona rabljena. Triestri so vidni v obliki aduktov z dvema amoniakoma $[M+2NH_4^+]^{2+}$. Glede na sintezni postopek in strukturo so možni le triestri POE sorbitana, saj POE sorbitan vsebuje 4 proste OH skupine, med tem ko POE izosorbid vsebuje le dve prosti OH skupini in zato lahko z MK tvori največ diestre.



Slika 24: Masni spekter PS80 proizvajalca NOF ob času 32,57 min, ko se eluirajo trioleati POE sorbitana.

Tetraestrov nismo našli, zato smo podaljšali čas snemanja masnih spektrov iz 34 min na 40 min, v kolikor se morda eluirajo kasneje, a jih kljub temu nismo našli. Morda so preveliki, da bi tvorili stabilne adukte ali pa razpadejo že tekom ionizacije. Slednjo bi najverjetneje lahko izboljšali z dodatkom amonijevega formiata, saj bi tako tvorili več stabilnih aduktov $[M+2NH_4^+]^{2+}$. Glede na literaturne podatke, naj bi PS80 sicer vseboval tetraestre z oleinsko kislino, vendar so bile poročane mase teh spojin natančne le na eno decimalno mesto ter so sovpadale z masami triestrov in so bile zato nezanesljive (8).

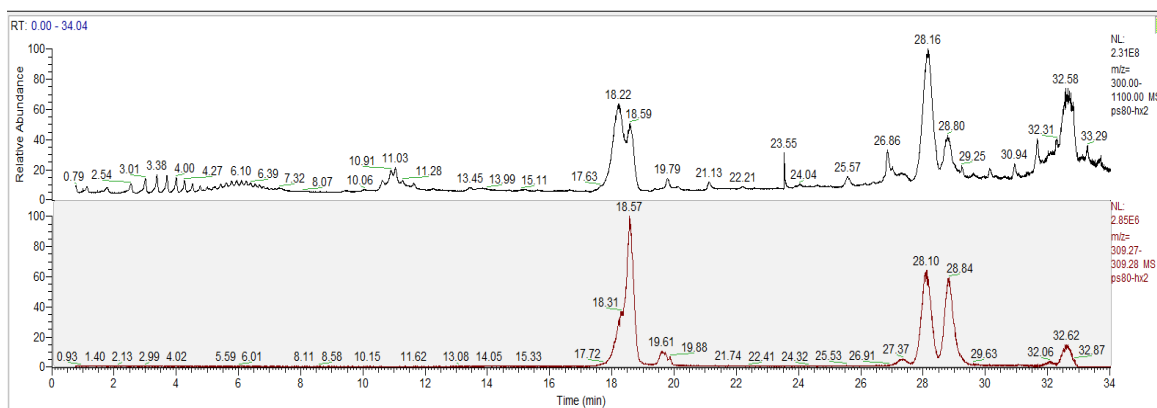
Ker »ultra čist« PS80 v MK frakciji vsebuje vsaj 99 % oleinske kisline, smo si pri iskanju njenih estrov pomagali z markerjem m/z 309.28, predstavljenim nasliki 25, do nastanka katerega pride zaradi fragmentacije med samo ionizacijo analita. Na sliki 26 je prikazan ekstrahiran kromatogram tega kationa.



Kemijska formula: $C_{20}H_{37}O_2^+$

Točna masa: 309.27881

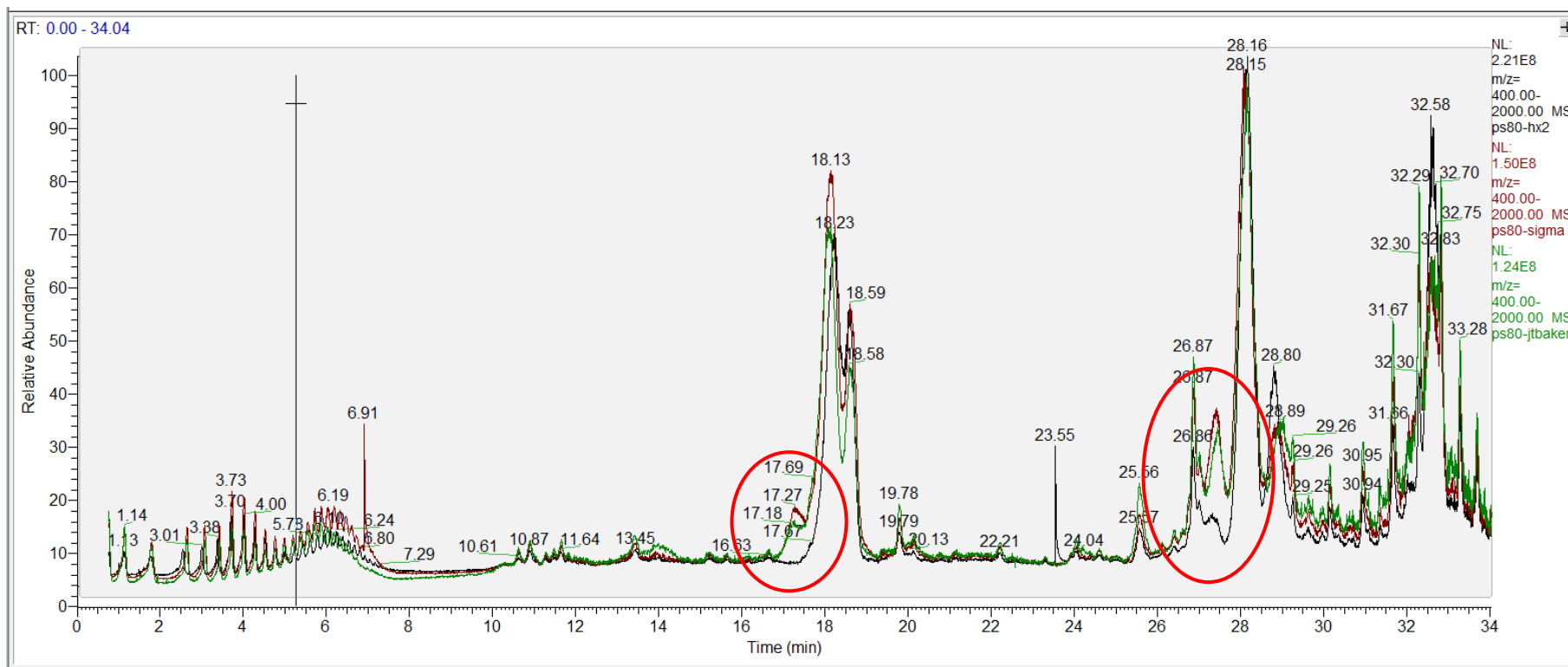
Slika 25: Fragment estra oleinske kisline z etilenglikolom s točno maso 309,27881.



Slika 26: Ekstrahiran ionski kromatogram PS80 proizvajalca NOF Corporation za m/z=309,27-309,28.

PS80 proizvajalcev J. T. Baker in Sigma Aldrich vsebujeta poleg oleinske kisline tudi ostale maščobne kisline, ki so dovoljene glede na specifikacije v Farmakopejah. V njih smo poleg estrov oleinske kisline našli tudi zvrsti zaestrene s palmitinsko, palmitoleinsko, linolno in stearinsko kislino, med tem ko nismo našli estrov miristinske in linolenske kisline (slednjo smo našli le v sledovih). Možno je, da estrov linolenske kisline nismo zaznali, ker je le-ta od vseh najbolj reaktivna, naši vzorci PS pa niso bili sveže odprti, ampak stari več mesecev ter med tem tudi večkrat odprti.

V kolikor med seboj primerjamo vse tri PS80, je vredno omeniti dve veliki razliki (slika 27). V kromatogramih PS80 proizvajalcev J. T. Baker in Sigma Aldrich pri 17,2 min ter pri 27,5 min opazimo dodatne vrhove, ki pa niso prisotni v kromatogramu »ultra čistega« PS80 proizvajalca NOF Corporation. Ob 17,2 min se eluirajo monoestri z linolensko kislino (C18:2) oziroma konjugirano linolensko kislino, kot je to pokazal NMR. Ob 27,5 min, se eluirajo kombinirani diestri z eno oleinsko in eno linolno oziroma konjugirano linolno kislino.



Slika 27: Totalni ionski kromatogrami PS80 proizvajalcev NOF (črna), Sigma Aldrich (rdeča) in J. T. Baker (zelena).

Vse identificirane spojine v PS80 proizvajalcev J. T. Baker in Sigma Aldrich so prikazane preglednici IV. Za vsako zvrst so prikazani le tisti predstavniki, katerih signali so bili najintenzivnejši. V PS80 proizvajalca NOF Corporation so bili iz spodnjega seznama prisotni le estri, ki so vsebovali oleinsko kislino, kar smo tudi pričakovali, saj gre za proizvajalca, ki ustreza specifikacijam ChP.

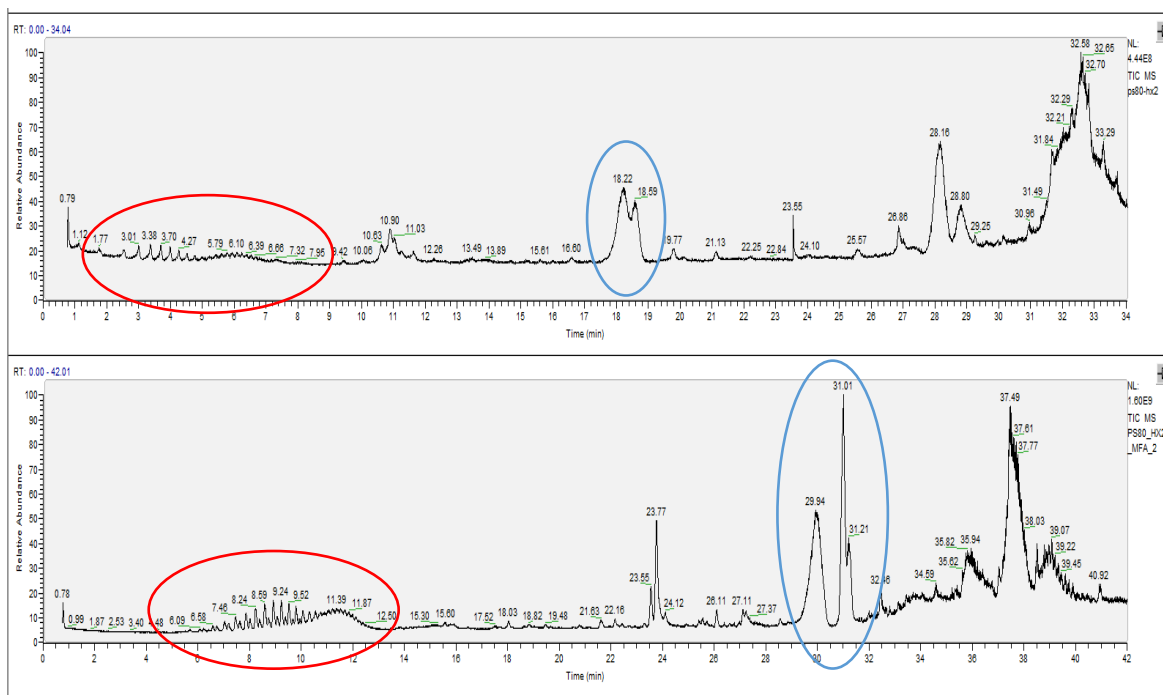
Preglednica IV: Najbolj intenzivni signali vseh identificiranih zvrsti v PS80 s HPLC-MS. t_r =retencijski čas, z =naboj iona, n =število POE enot.

Spojina	Formula	t_r	Izmerjen m/z	Točna masa	Odmik [ppm]	n	adukt	z
POE izosorbid	C ₃₂ H ₆₆ O ₁₇ N	3,07	736.43092	736.43253	-2.11	13	NH ₄ ⁺	1
POE sorbitan	C ₅₄ H ₁₁₆ O ₂₉ N ₂	5,19	628.38226	628.38264	-0.60	24	2×NH ₄ ⁺	2
POE sorbitan palmitoleat	C ₇₈ H ₁₆₀ O ₃₄ N ₂	16,41	834.54156	834.54208	-0.62	28	2×NH ₄ ⁺	2
POE sorbitan palmitat	C ₇₈ H ₁₆₂ O ₃₄ N ₂	17,65	835.55023	835.5499	-0.39	28	2×NH ₄ ⁺	2
POE sorbitan linolenat	C ₈₀ H ₁₆₀ O ₃₄ N ₂	16,33	846.5401	846.54208	-2.33	28	2×NH ₄ ⁺	2
POE sorbitan linolat	C ₈₀ H ₁₆₂ O ₃₄ N ₂	17,27	847.54883	847.5499	-1.26	28	2×NH ₄ ⁺	2
POE sorbitan oleat	C ₈₀ H ₁₆₄ O ₃₄ N ₂	18,13	848.55591	848.55773	-2.14	28	2×NH ₄ ⁺	2
POE sorbitan stearat	C ₈₀ H ₁₆₆ O ₃₄ N ₂	19,5	849.56464	849.56555	-1.07	28	2×NH ₄ ⁺	2
POE izosorbid palmitat	C ₄₄ H ₈₈ O ₁₆ N	18,06	886.6098	886.60976	0.04	11	NH ₄ ⁺	1
POE izosorbid linolat	C ₄₆ H ₈₈ O ₁₆ N	17,52	910.60919	910.60976	-0.63	11	NH ₄ ⁺	1
POE izosorbid oleat	C ₄₆ H ₉₀ O ₁₆ N	18,49	912.6239	912.62541	-1.66	11	NH ₄ ⁺	1
POE izosorbid stearat	C ₄₆ H ₉₂ O ₁₆ N	20,10	914.6394	914.63838	-1.82	11	NH ₄ ⁺	1
POE palmitoleat	C ₄₀ H ₈₂ O ₁₄ N	16,61	800.5722	800.57298	-0.98	12	NH ₄ ⁺	1
POE palmitat	C ₄₀ H ₈₄ O ₁₄ N	18,18	802.58698	802.58863	-2.06	12	NH ₄ ⁺	1
POE linolat	C ₄₂ H ₈₄ O ₁₄ N	17,65	826.58722	826.58863	-1.71	12	NH ₄ ⁺	1
POE oleat	C ₄₂ H ₈₆ O ₁₄ N	18,62	828.60236	828.60428	-2.32	12	NH ₄ ⁺	1
POE stearat	C ₄₂ H ₈₈ O ₁₄ N	20,28	830.61975	830.61993	-0.22	12	NH ₄ ⁺	1
POE sorbitan dioleat	C ₉₈ H ₁₉₆ O ₃₅ N ₂	28,16	980.67914	980.68038	-1.27	28	2×NH ₄ ⁺	2
POE Sorbitan oleat/linolat	C ₉₈ H ₁₉₄ O ₃₅ N ₂	27,47	979.67175	979.67256	-0.83	28	2×NH ₄ ⁺	2
POE sorbitan dilinolat ali oleat/linolenat	C ₉₈ H ₁₉₂ O ₃₅ N ₂	26,74	978.66315	978.66473	-1.62	28	2×NH ₄ ⁺	2

POE sorbitan oleat/palmitat	C ₉₆ H ₁₉₄ O ₃₅ N ₂	28,01	967.67059	967.67256	-2.04	28	2×NH ₄ ⁺	2
POE izosorbidi dioleat	C ₆₆ H ₁₂₆ O ₁₈ N	28,93	1220.8971	1220.8969	0.12	12	NH ₄ ⁺	1
POE izosorbidi oleat/linolat	C ₆₆ H ₁₂₄ O ₁₈ N	28,24	1218.8799	1218.8813	-1.16	12	NH ₄ ⁺	1
POE izosorbidi oleat/palmitat	C ₆₄ H ₁₂₄ O ₁₈ N	28,79	1194.8801	1194.8813	-0.97	12	NH ₄ ⁺	1
POE sorbitan trioleat	C ₁₀₈ H ₂₁₂ O ₃₂ N ₂	32,74	1024.7483	1024.7506	-2.27	24	2×NH ₄ ⁺	2
POE sorbitan dioleat/palmitat	C ₁₀₆ H ₂₁₀ O ₃₂ N ₂	32,72	1011.7418	1011.7428	-0.96	24	2×NH ₄ ⁺	2
POE sorbitan dioleat/linolat	C ₁₀₈ H ₂₁₀ O ₃₂ N ₂	32,33	1023.741	1023.7428	-1.72	24	2×NH ₄ ⁺	2
POE sorbitan triester	C ₁₀₈ H ₂₀₈ O ₃₂ N ₂	31,91	1022.7352	1022.735	0.26	24	2×NH ₄ ⁺	2

Za zelo izrazit vrh v kromatogramu pri 10.90 min predvidevamo, da gre za dibutilftalat, saj molekulska formula dobljena z MS temu signalu ustreza. Spojina je absorbirala UV svetlobo pri 210 in 220 nm iz česar lahko sklepamo, da so v strukturi konjugirane dvojne vezi ali aromatski obroč. Prisoten je bil tudi v slepem vzorcu. Dibutilftalat se uporablja kot mehčalo. Vir bi lahko bili plastični nastavki za pipete in plastične epice, ki smo jih uporabljali za pripravo vzorcev ali pa plastični konektorji za povezavo kapilar med HPLC in MS.

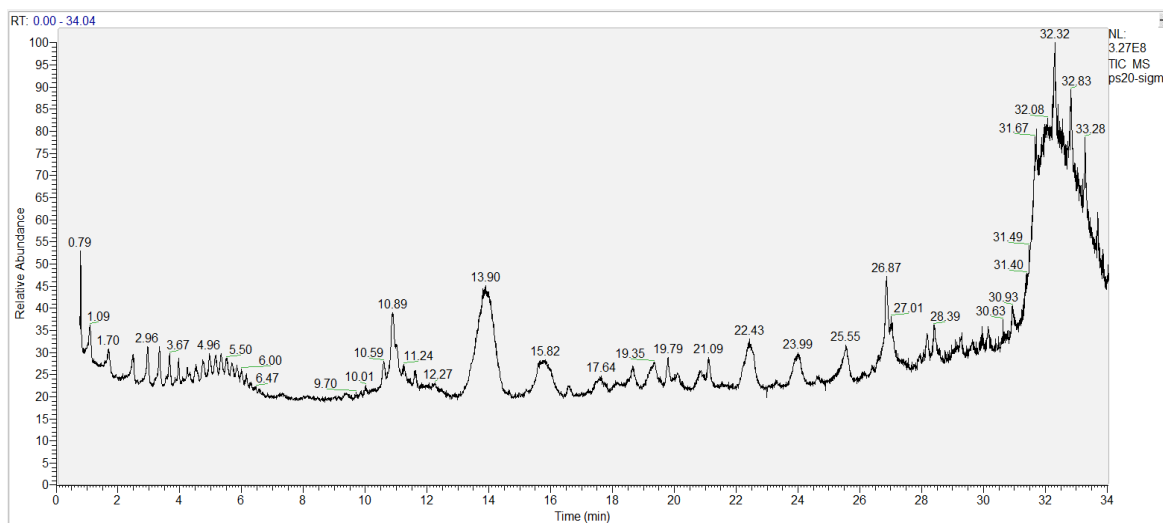
Z namenom boljše ločbe posameznih zvrsti PS smo vzorce PS80 analizirali še z UPLC kolono (1,7 µm; 2,1 mm × 10 mm). V kolikor pogledamo območje 6-10 min (slika 28) lahko vidimo, da so se sedaj ločili tudi nezaestreni POE izosorbidi (višji signali) in nezaestrene POE verige (nižji signali). Prav tako smo opazili, da smo s prvo kolono izgubili tri začetne signale nezaestrenih POE izosorbidov. Iz slike je razvidno tudi, da so se v 29. minuti med seboj ločili monoestri POE izosorbidov in monoestri POE sorbitanov.



Slika 28: Totalni ionski kromatogram PS80 proizvajalca NOF, posnet s prvotno C₁₈ HPLC kolono (zgoraj) in C₁₈ UPLC kolono (spodaj). Označene so spremembe v ločbi.

4.3.2 Polisorbat 20

Totalni ionski kromatogram PS20 na sliki 29 se že na videz precej razlikuje od kromatograma PS80, saj je mnogo bolj kompleksen in vsebuje več vrhov.

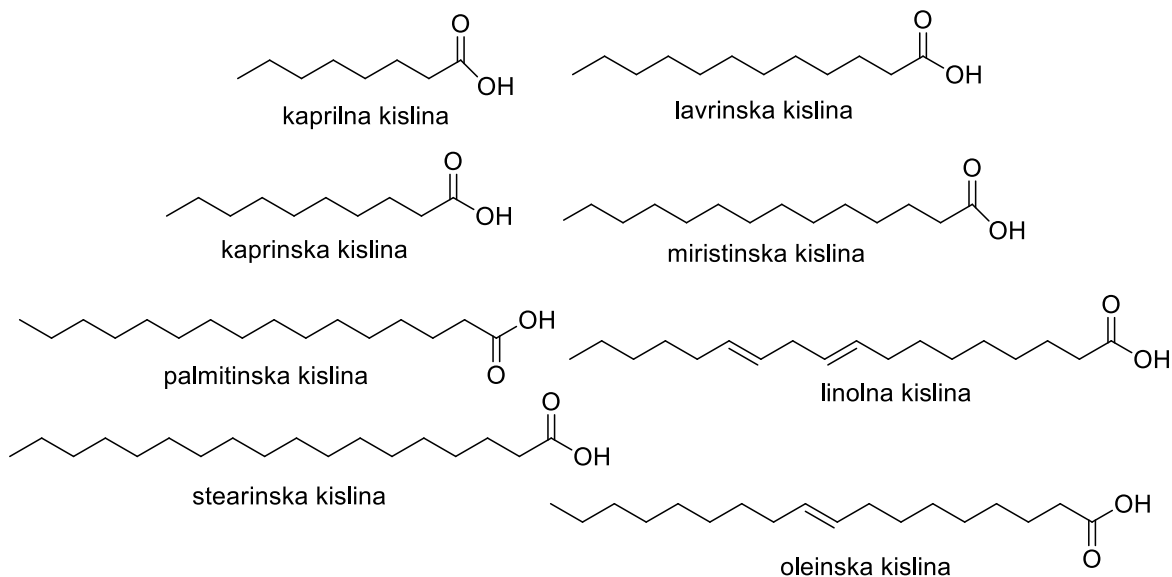


Slika 29: Totalni ionski kromatogram PS20 proizvajalca Sigma Aldrich.

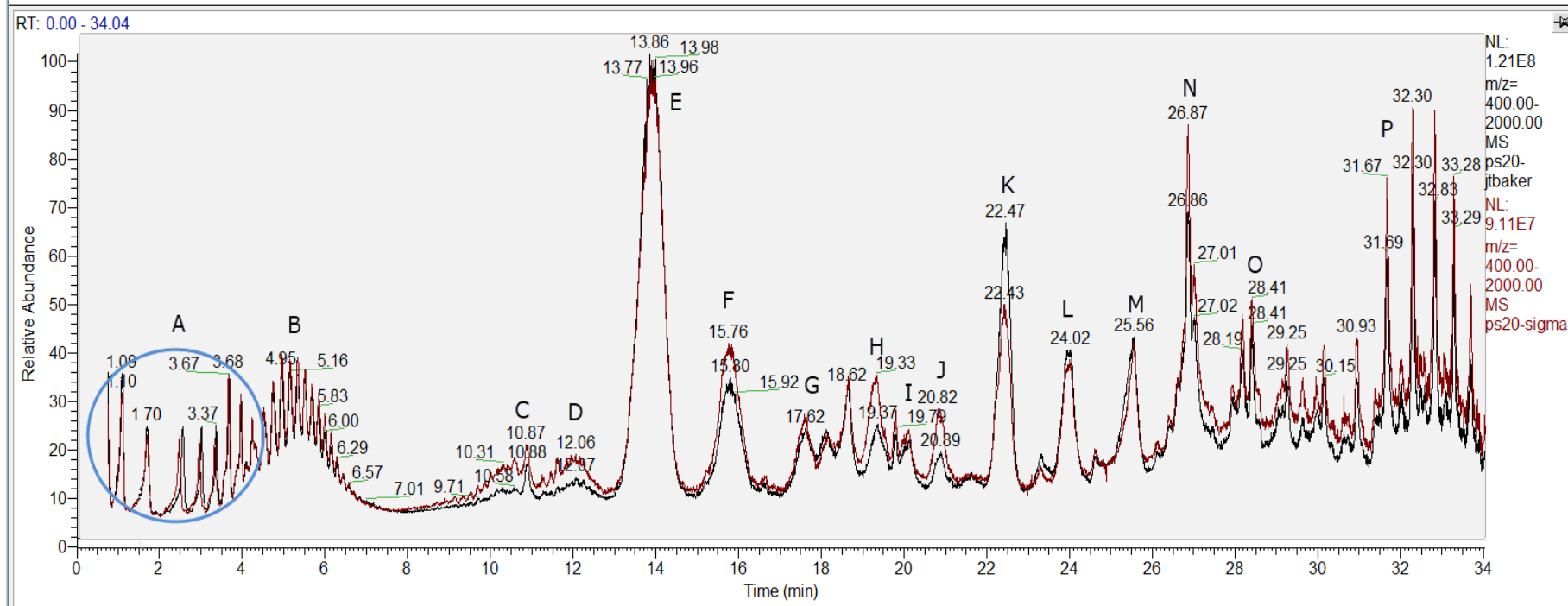
Zvrsti PS20 se eluirajo v sledečem zaporedju: nezaestreni POE izosorbidi = nezaestreni POE < nezaestreni POE sorbitani < monoestri POE sorbitana = POE monoestri = monoestri POE izosorbida < diestri POE sorbitana = diestri POE izosorbida < triestri POE sorbitana < tetraestri POE sorbitana.

Razlika v primerjavi s kromatogramom PS80 je, da se derivati izosorbidov in derivati sorbitanov ne eluirajo ločeno, temveč skupaj. Sklepamo, da je razlog v krajših verigah MK. Vrhov je več, kar smo tudi pričakovali, saj mora PS20 glede na farmakopejske zahteve vsebovati vsaj tri MK. Zahtevane so lavrinska, miristinska in palmitinska kislina.

V kolikor gledamo le območje m/z 400-1500, je spekter bolj pregleden in izrazit, saj PS skoraj ne vsebuje snovi z molekulsko maso manjšo od 400 (slika 31). Izognemo se tudi prekrivanju signalov ftalatov in drugih nečistot, s spojinami, ki nas zanimajo. Ko smo primerjali PS20 proizvajalcev Sigma Aldrich ter J. T. Baker, smo ugotovili, da sta glede na njun ionski kromatogram v razponu m/z od 400 do 2000 skoraj identična, le da prvi vsebuje nekoliko manjši delež lavrinske kisline in večji delež ostalih MK. Na sliki 30 so prikazane MK, katerih estre smo identificirali. Identificirali smo njihove estre z POE sorbitanom, POE izosorbidom in POE. Li in sodelavci so tekom karakterizacije PS20 proizvajalca J. T. Baker identificirali le estre z lavrinsko, miristinsko in palmitinsko kislino (11). V tem primeru nam je torej glede na dosedanje raziskave uspelo identificirati kar nekaj novih zvrsti v PS20.

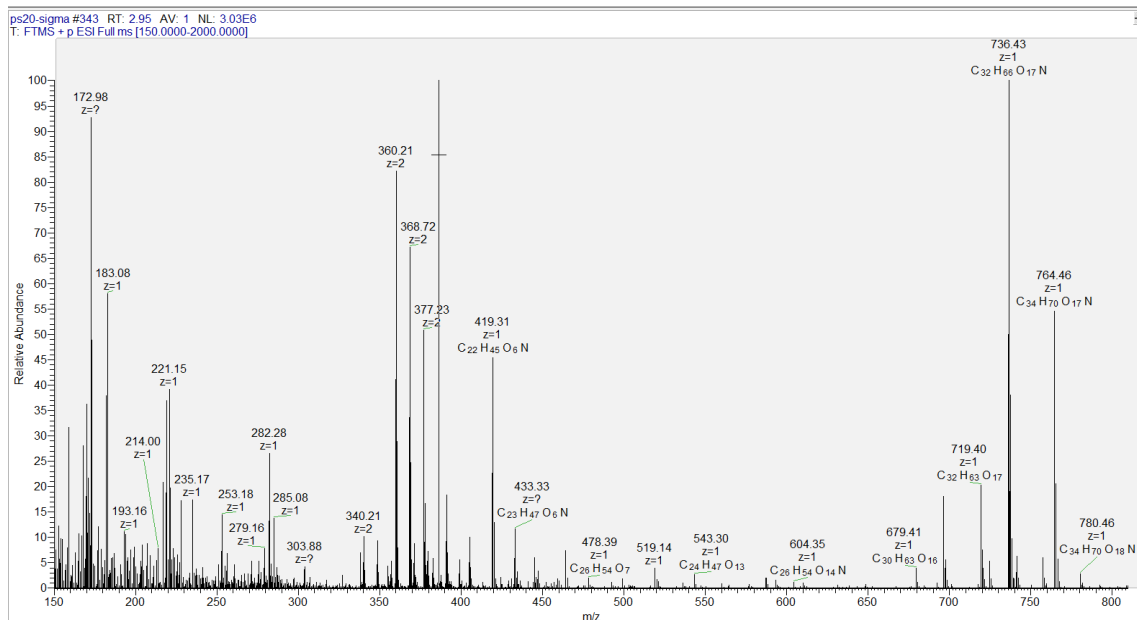


Slika 30: Maščobne kisline, katerih estre smo našli v PS20.



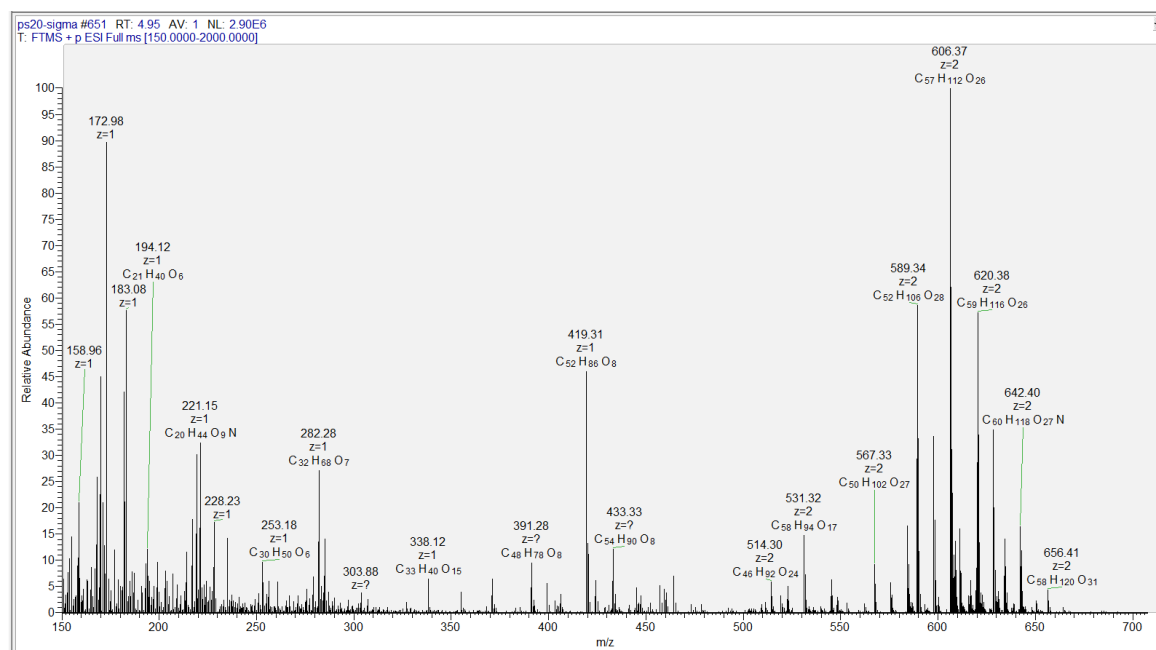
Slika 31: Totalni ionski kromatograma PS20 proizvajalcev J. T. Baker (črna) in Sigma Aldrich (rdeča). A-nezaestren POE izosordbid, B-nezaestren POE sorbitan, C-monoestri s kaprilno kislino, D-monoestri s kaprinsko kislino, E-monoestri z lavrinsko kislino, F-monoestri z miristinsko kislino, G-monoestri s palmitinsko kislino, H-monoestri z oleinsko kislino, I-diestri z lavrinsko in kaprilno kislino, J-diestri s kaprinsko in lavrinsko kislino, K-diestri z dvema lavrinskima kislinama, L-diestri z lavrinsko in miristinsko kislino, M-diestri z lavrinsko in palmitinsko kislino, N-diestri z lavrinsko in oleinsko kislino, O-triestri, P-tetraestri.

Vrhovi v območju A tudi pri PS20 predstavljajo nezaestrene POE izosorbide, $n=9-21$. Podroben pregled masnih spektrov kromatografskih vrhov je zopet pokazal, da je razlika med dvema vrhoma le ena POE enota. V sredinskem območju na masnem spektru na sliki 32 vidimo adukte $[M+2NH_4^+]^{2+}$ ter na desni strani adukte $[M+NH_4^+]^{1+}$.



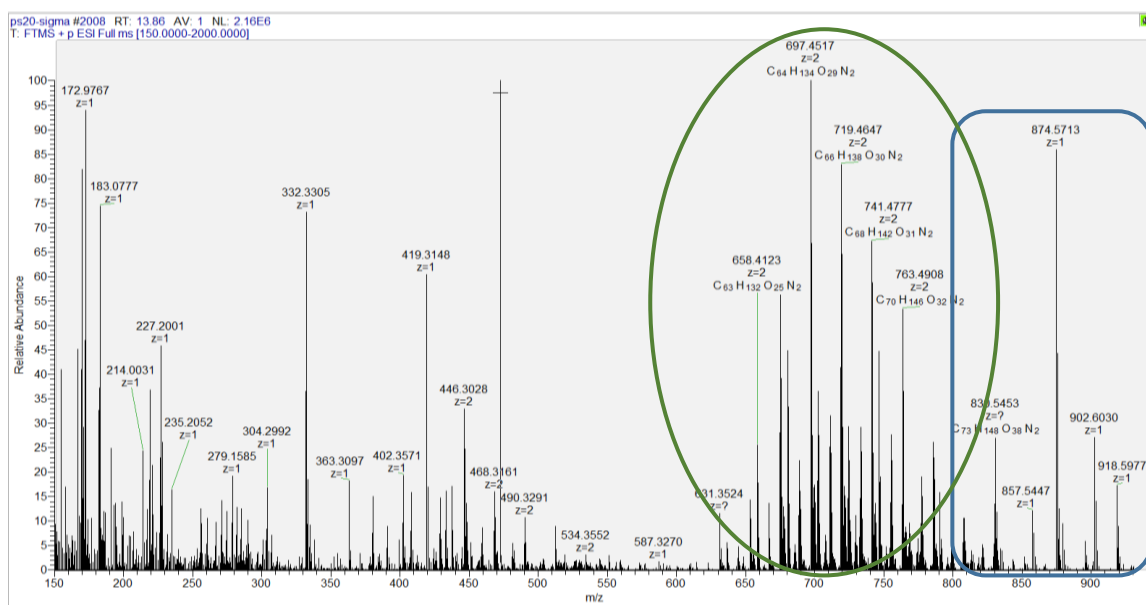
Slika 32: Masni spekter PS20 proizvajalca Sigma Aldrich ob času 2,95 min, ko se eluirajo nezaestreni POE izosorbidi.

Vrhovi v območju B so zopet nezaestreni POE sorbitani ($n=17-32$). Opazili smo predvsem adukte z $[M+2H]^{2+}$ in adukte z $[M+2NH_4^+]^{2+}$ (slika 33).



Slika 33: Masni spekter PS20 proizvajalca Sigma Aldrich ob času 4,95 min, ko se eluira nezaestren POE sorbitan.

V največjem vrhu na kromatogramu, označenim z E, se hkrati eluirajo POE sorbitan monolavrat, n=14-34, POE izosorbid monolavrat, n=6-17 in POE lavrat. Masni spekter tega vrha je prikazan na sliki 34. Vse tri zvrsti tvorijo najpogostejše adukte z amonijevimi ioni. Monoestri POE izosorbida ter POE monoestri z enim NH_4^+ in monoestri sorbitana z dvema NH_4^+ . Derivati sorbitanov vsebujejo približno dvakrat več POE enot kot derivati izosorbidov. Najbolj intenzivni signali derivatov sorbitana vsebujejo 25 POE enot, najbolj intenzivni signali derivatov izosorbida pa vsebujejo le 12 POE enot. Hvattum in sodelavci so najintenzivnejšim signalom POE sorbitana pripisali 25-27 POE enot, za POE izosorbid pa 10-14 enot (3). Obe vrednosti sta primerljivi z našimi rezultati.

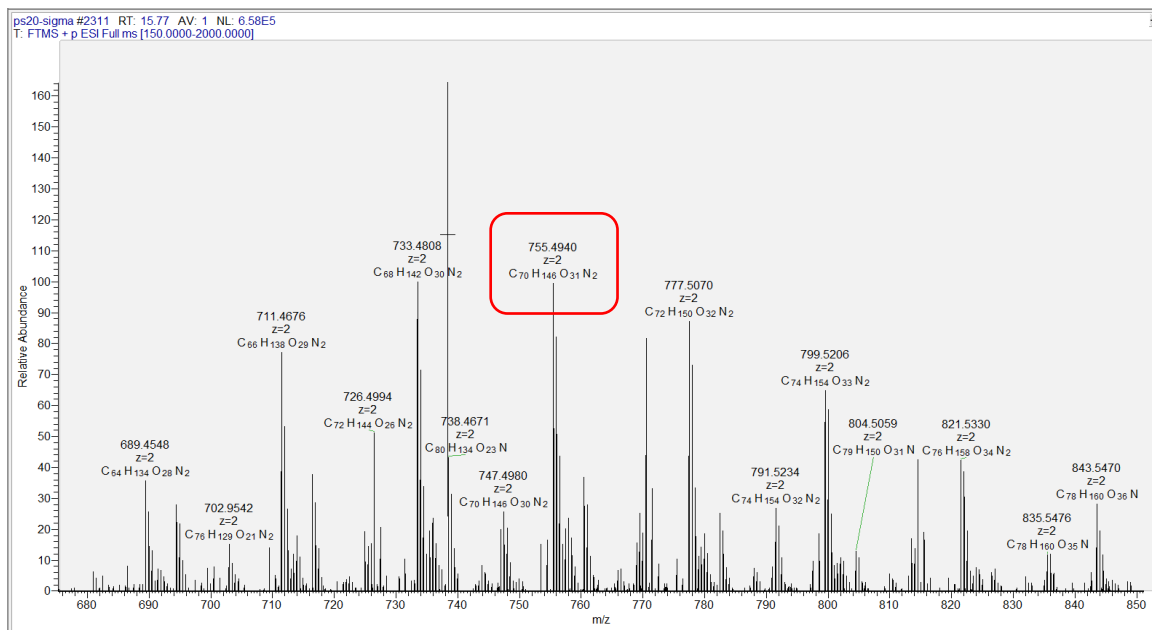


Slika 34: Masni spekter PS20 proizvajalca Sigma Aldrich ob času 13,86 min, ko se eluirata POE sorbitan monolavrat (zelena) in POE izosorbid monolavrat (modra).

Malce pred vrhom E opazimo dva precej manjša vrhova označena s C pri 10,5 min in D pri 12 min. Tu se eluirajo estri s kaprilno (C8:0) in kaprinsko kislino (C10:0) v takšnem zaporedju. V vsakem od teh vrhov najdemo estre izosorbidov, sorbitanov ter estre MK le z POE enotami, ki niso del cikličnih derivatov sorbitana ali izosorbida. Razlog za hitrejšo elucijo so krajše MK, ki jih te zvrsti vsebujejo in posledično prihaja do manj interakcij s stacionarno fazo.

Na kromatogramu desno od vrha E, so vrhovi estrov z MK, ki so daljše od lavrinske kisline. Miristinska kislina (C14:0) je 2 C-atoma daljša od lavrinske kisline, njena prisotnost pa je prav tako zahtevana v farmakopejah. Tako v kromatografskem vrhu F vidimo signale za POE sorbitan monomiristat. Najintenzivnejši signal zanj je bil $m/z=755.5$ (n=25), kot adukt z dvema molekulama NH_4^+ (slika 35). Hkrati sta se zopet

eluirala še POE izosorbid miristat ($m/z=902.6$, $n=12$) in POE miristat ($m/z=774.6$, $n=12$), obe zvrsti kot adukta z NH_4^+ .



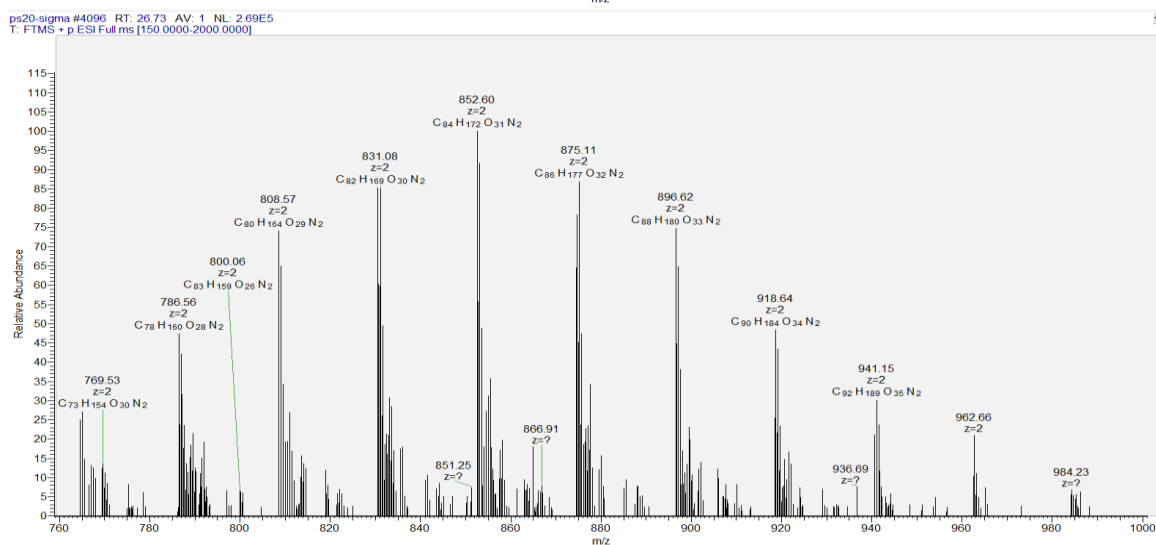
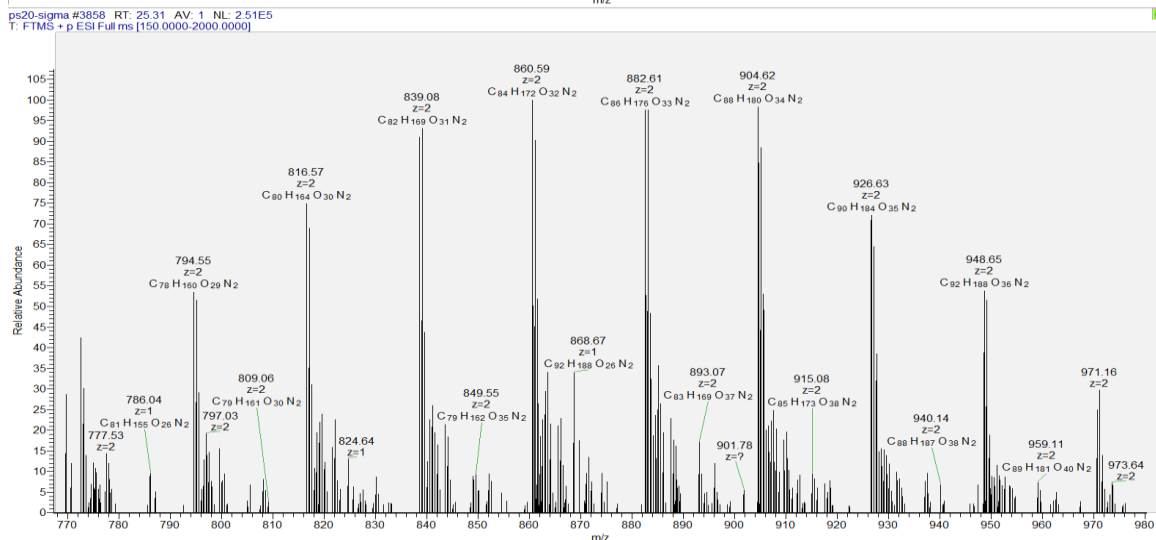
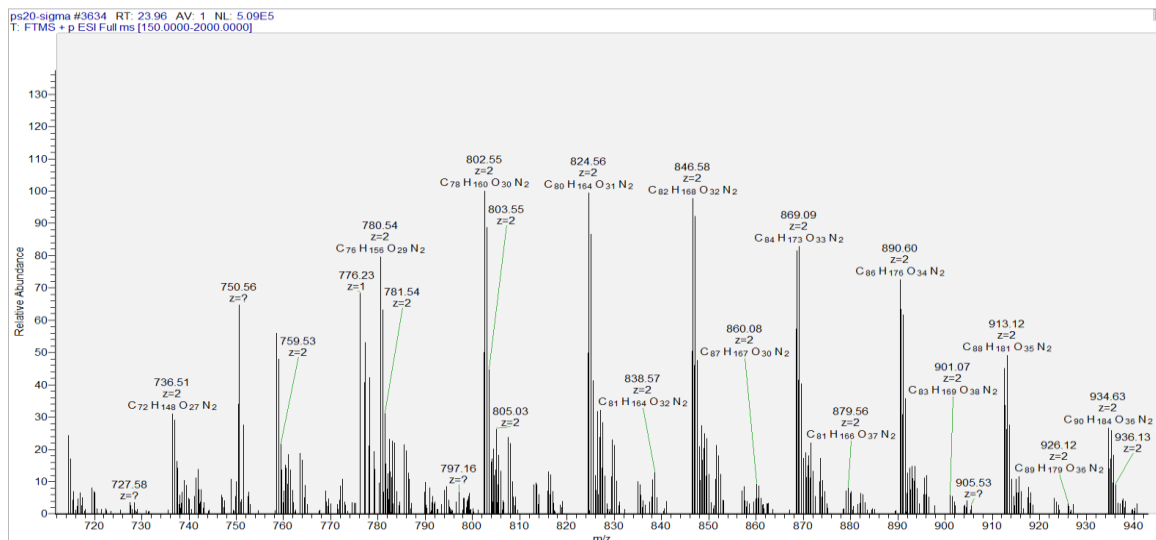
Slika 35: Masni spekter PS20 proizvajalca Sigma Aldrich ob času 15,77 min, ko se eluira POE sorbitan monomiristat.

Po enakem logičnem zaporedju se v vrhu G eluirajo monoestri palmitinske kisline (C16:0) s POE sorbitani, POE izosorbidi ter POE. Sledijo monoestri z oleinsko kislino (C18:0) v vrhu H. V PS20 smo našli tudi estre z stearinsko kislino, a je vrh zelo majhen in se vidi le v ekstrahiranem kromatogramu.

Vrhovi od I do N predstavljajo različne kombinacije diestrov POE sorbitana in POE izosorbida. Nekaj teh estrov lahko vidimo na sliki 36. Diestri izosorbida tvorijo najbolj stabilne adukte z enim amonijevim ionov, diestri sorbitana pa z dvema. Najpogostejše so kombinacije lavrinske kisline z drugimi MK, kar je v skladu s pričakovanji. Lavrinska kislina predstavlja največji del maščobno kislinske frakcije PS, zato je kombinatorično največja verjetnost, da večina kombiniranih diestrov vsebuje prav lavrinsko kislino. Verjetna je seveda prisotnost prav vseh kombinacij diestrov, vendar smo zaznali le tiste, ki jih je največ. Opazili smo tudi, da je POE izosorbid diestrov količinsko mnogo manj kot POE sorbitan diestrov (pričakovano glede na sintezni postopek), medtem ko je ta razlika mnogo manjša pri monoestrih. To je bilo zelo razvidno tudi v PS80.

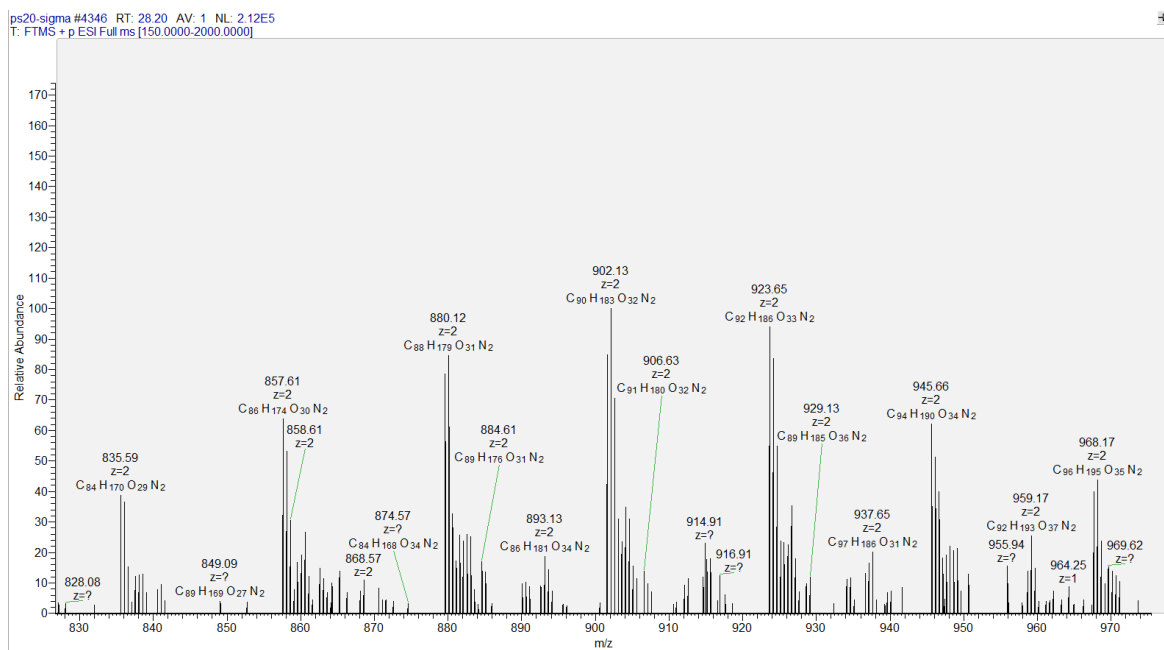
V vrhu N se eluira diester z lavrinsko (C12:0) in stearinsko kislino (C18:0), katere je zelo malo. Vrh N ima lažno tako veliko površino, saj se ob istem času eluirajo tudi nečistote z

m/z 679 in 684, ki predvidoma izvirajo iz dodatno prečiščene vode, filter za topila ter kapilar iz silicijevega dioksida .



Slika 36: Masni spektri nekaterih kombiniranih diestrov. POE sorbitan dilavrat (zgoraj), POE sorbitan lavrat/miristat (sredina) in POE sorbitan lavrat/palmitat (spodaj).

V vrhu O se nato eluirajo še triestri POE sorbitana (slika 37) in v vrhu P tetraestri POE sorbitana. Oboji tvorijo najstabilnejše adukte v obliki $[M+2NH_4]^{2+}$. Opazili smo jih večinoma le v obliki trilavrata in tetralavrata. V sledovih pa zaznamo tudi ogromno kombinacij z različnimi MK. Pri tri- in tetraestrih so molekule teh spojin že tako velike, da glavni signali ne predstavljajo več monoizotopske mase. Pri analiziranju kemijskih formul teh spojin smo zato morali paziti, da smo za izračun formule izbrali monoizotopski signal, čeprav je bil manjši.



Slika 37: Masni spekter PS20 proizvajalca Sigma Aldrich ob času 28,20 min, ko se eluira POE sorbitan trilavrat.

Pregled najdenih spojin v PS20 iz preglednice V, nam pokaže, kako zelo heterogeni so v resnici polisorbati in kako kompleksna je posledično njihova analitika. Glavni adukti so se tvorili z amonijevimi ioni. Ostali adukti analiziranih spojin, ki smo jih opazili tekom raziskovalnega dela, pa so zbrani v preglednici VI. Lepo je razvidno kako zvrsti s sorbitanom vsebujejo približno dvakrat več POE enot kot zvrsti z izosorbidom. Tipična kemijska struktura PS glede na literaturne podatke prikazuje ester sorbitana z le eno MK in vseboval naj bi povprečno 20 POE enot (8). Kot vidimo iz vseh naših analiz, ta spojina predstavlja le manjšinski delež v PS.

HPLC-MS analiza nam je omogočila dobro strukturno karakterizacijo zvrsti v PS. Za boljše razumevanje njihovih lastnosti, bi morali ovrednotiti še fizikalnokemijske lastnosti posameznih identificiranih komponent.

Preglednica V: Najintenzivnejši signali vseh zaznanih zvrsti v PS20 s HPLC-MS. t_r =retencijski čas, z =naboj iona, n =število POE enot

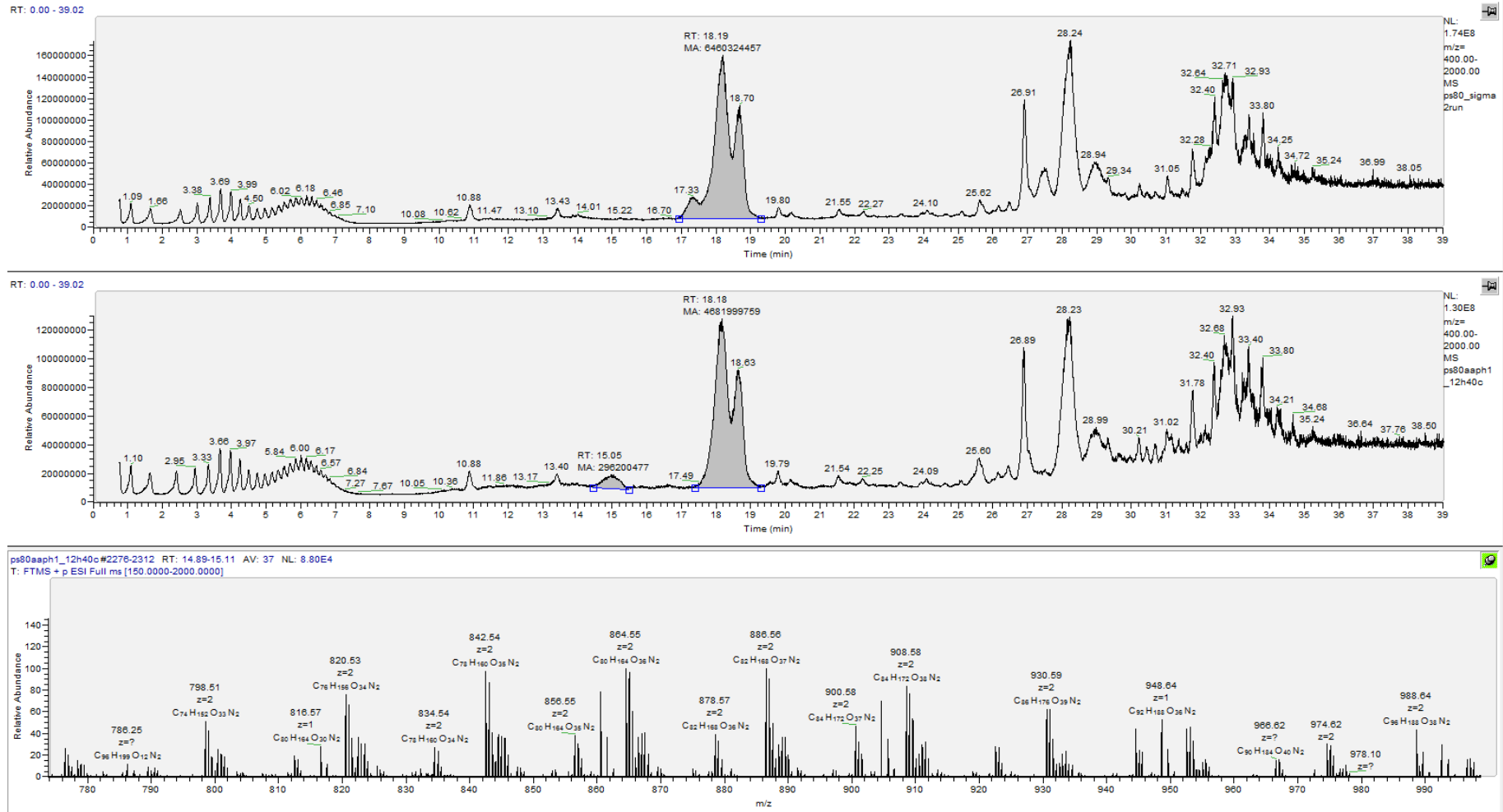
Spojina	Formula	t_r	Izmerjen m/z	Točna masa	Odmik [ppm]	n (POE)	adukt	z
POE izosorbid	C ₃₂ H ₆₆ O ₁₇ N	2,96	736.43091	736.43253	-2.28	13	NH ₄ ⁺	1
POE sorbitan	C ₅₄ H ₁₁₆ O ₂₉ N ₂	5,19	628.38214	628.38264	-0.79	24	2×NH ₄ ⁺	2
POE kaprilat	C ₃₂ H ₆₈ O ₁₄ N	9,27	690.46307	690.46343	-0.52	12	NH ₄ ⁺	1
POE kaprinat	C ₃₄ H ₇₂ O ₁₄ N	11,60	718.49426	718.49473	-0.66	12	NH ₄ ⁺	1
POE lavrat	C ₃₆ H ₇₆ O ₁₄ N	13,82	746.5238	746.52603	-2.99	12	NH ₄ ⁺	1
POE miristat	C ₃₈ H ₈₀ O ₁₄ N	16,02	774.55615	774.55733	-1.53	12	NH ₄ ⁺	1
POE palmitat	C ₄₀ H ₈₄ O ₁₄ N	18,19	802.58771	802.58863	-1.15	12	NH ₄ ⁺	1
POE stearat	C ₄₂ H ₈₈ O ₁₄ N	20,26	830.61859	830.61993	-1.62	12	NH ₄ ⁺	1
POE linolat	C ₄₂ H ₈₀ O ₁₄ N	20,05	826.58746	826.58863	-1.42	12	NH ₄ ⁺	1
POE sorbitan monokaprilat	C ₆₄ H ₁₃₄ O ₃₁ N ₂	10,52	713.44754	713.44798	-0.74	25	2×NH ₄ ⁺	2
POE sorbitan monokaprinat	C ₆₆ H ₁₃₈ O ₃₁ N ₂	12,21	727.46307	727.46363	-0.77	25	2×NH ₄ ⁺	2
POE sorbitan monolavrat	C ₆₈ H ₁₄₂ O ₃₁ N ₂	13,86	741.47772	741.47928	-2.10	25	2×NH ₄ ⁺	2
POE sorbitan monomiristat	C ₇₀ H ₁₄₆ O ₃₁ N ₂	15,82	755.49402	755.49493	-1.20	25	2×NH ₄ ⁺	2
POE sorbitan monopalmitat	C ₇₂ H ₁₅₀ O ₃₁ N ₂	17,64	769.50952	769.51058	-1.38	25	2×NH ₄ ⁺	2
POE sorbitan monooleat	C ₇₄ H ₁₅₂ O ₃₁ N ₂	19,35	782.51733	782.5184	-1.37	25	2×NH ₄ ⁺	2
POE sorbitan monostearat	C ₇₄ H ₁₅₄ O ₃₁ N ₂	19,51	783.52502	783.52623	-1.54	25	2×NH ₄ ⁺	2
POE izosorbid monokapronat	C ₃₆ H ₇₂ O ₁₇ N	7,32	790.47894	790.47948	-0.68	12	NH ₄ ⁺	1
POE izosorbid monokaprilat	C ₃₈ H ₇₆ O ₁₇ N	9,52	818.50995	818.51078	-1.01	12	NH ₄ ⁺	1
POE izosorbid monokaprinat	C ₄₀ H ₈₀ O ₁₇ N	11,72	846.5412	846.54208	-1.04	12	NH ₄ ⁺	1
POE izosorbid monolavrat	C ₄₂ H ₈₄ O ₁₇ N	13,87	874.57129	874.57338	-2.39	12	NH ₄ ⁺	1
POE izosorbid monomiristat	C ₄₄ H ₈₈ O ₁₇ N	16,00	902.60297	902.60468	-1.89	12	NH ₄ ⁺	1
POE izosorbid monopalmitat	C ₄₆ H ₉₂ O ₁₇ N	18,08	930.63434	930.63598	-1.76	12	NH ₄ ⁺	1
POE izosorbid monostearat	C ₄₈ H ₉₆ O ₁₇ N	20,11	958.66583	960.66728	-1.51	12	NH ₄ ⁺	1
POE izosorbid monooleat	C ₄₈ H ₉₄ O ₁₇ N	20,04	956.6507	956.65163	-0.97	12	NH ₄ ⁺	1
POE sorbitan lavrat/kaprilat	C ₇₆ H ₁₅₆ O ₃₂ N ₂	19,35	804.53021	804.53151	-1.62	25	2×NH ₄ ⁺	2
POE sorbitan lavrat/kaprinat	C ₇₈ H ₁₆₀ O ₃₂ N ₂	20,88	818.54596	818.54716	-1.47	25	2×NH ₄ ⁺	2

POE sorbitan dilavrat	C ₈₀ H ₁₆₄ O ₃₂ N ₂	22,43	832.56146	832.56281	-1.62	25	2×NH ₄ ⁺	2
POE sorbitan lavrat/miristat	C ₈₂ H ₁₆₈ O ₃₂ N ₂	23,99	846.57688	846.57846	-1.87	25	2×NH ₄ ⁺	2
POE sorbitan lavrat/palmitat	C ₈₄ H ₁₇₂ O ₃₂ N ₂	25,55	860.59268	860.59411	-1.66	25	2×NH ₄ ⁺	2
POE sorbitan lavrat/stearat	C ₈₆ H ₁₇₆ O ₃₂ N ₂	26,67	874.60826	874.60976	-1.72	25	2×NH ₄ ⁺	2
POE sorbitan lavrat/oleat	C ₈₆ H ₁₇₄ O ₃₂ N ₂	26,09	873.60016	873.60194	-2.03	25	2×NH ₄ ⁺	2
POE izosorbid lavrat/kaprilat	C ₅₀ H ₉₈ O ₁₈ N	20,02	1000.677	1000.677	-0.85	12	NH ₄ ⁺	1
POE izosorbid lavrat/kaprinat	C ₅₂ H ₁₀₂ O ₁₈ N	21,76	1028.7076	1028.7091	-1.29	12	NH ₄ ⁺	1
POE izosorbid dilavrat	C ₅₄ H ₁₀₆ O ₁₈ N	23,35	1056.7394	1056.7404	-1.01	12	NH ₄ ⁺	1
POE izosorbid lavrat/miristat	C ₅₆ H ₁₁₀ O ₁₈ N	24,87	1084.7714	1084.7717	-0.35	12	NH ₄ ⁺	1
POE izosorbid lavrat/palmitat	C ₅₈ H ₁₁₄ O ₁₈ N	26,28	1112.8025	1112.803	-0.50	12	NH ₄ ⁺	1
POE izosorbid lavrat/stearat	C ₆₀ H ₁₁₈ O ₁₈ N	27,54	1140.8334	1140.8343	-0.85	12	NH ₄ ⁺	1
POE sorbitan trilavrat	C ₉₀ H ₁₈₂ O ₃₂ N ₂	28,28	901.63177	901.63324	-1.63	24	2×NH ₄ ⁺	2
POE sorbitan tetralavrat	C ₁₀₂ H ₂₀₄ O ₃₃ N ₂	31,43	992.71698	992.71677	0.21	24	2×NH ₄ ⁺	2

Preglednica VI: Najpogostejši adukti in njihova točna masa

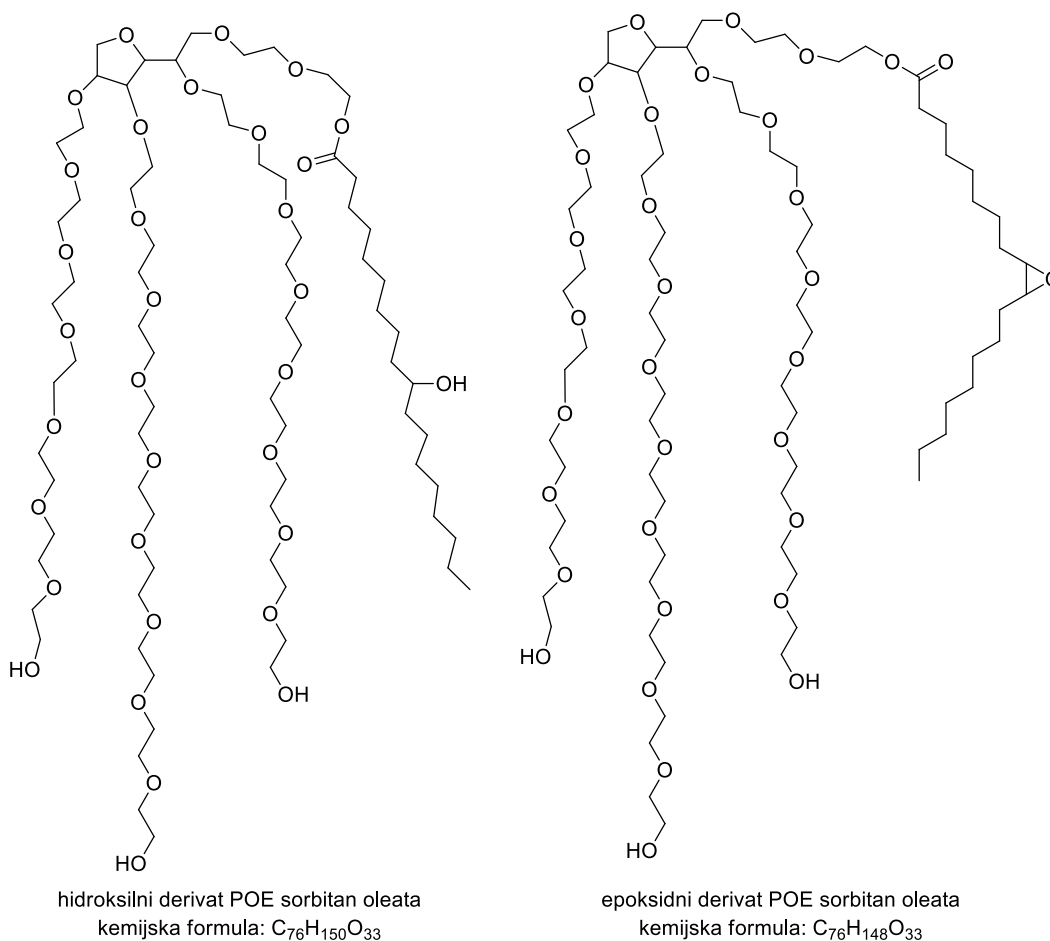
adukt	točna masa
[M+H] ⁺	1,00783
[M+2H] ²⁺	2,01565
[M+NH ₄] ⁺	18,03437
[M+2NH ₄] ²⁺	36,06875
[M+Na] ⁺	22,98977
[M+K] ⁺	38,96371
[M+H+NH ₄] ²⁺	19,04220
[M+3H] ³⁺	3,02348

4.3.3 Oksidacija



Slika 38: Totalni ionski kromatogram PS80 pred dodatkom AAPH (zgoraj), totalni ionski kromatogram PS80 po dodatku AAPH (v sredini) in masni spekter novo nastalega vrha po dodatku AAPH. Kromatograma sta prikazana za ione z m/z večjim od 400.

Po dodatku oksidacijskega sredstva AAPH PS80 proizvajalca Sigma Aldrich smo po 12 urah na 40 ° C opazili zmanjšanje monoestrov za približno 30 %. Signal za monoestre in diestre z linolno kislino je izginil, pojavil pa se je nov signal pri 15,05 min. Najintenzivnejši signal za POE sorbitan monolinolat je vseboval 28 POE enot, njegova kemijska formula je $C_{80}H_{154}O_{34}$. Zaznali smo ga kot adukt z dvema NH_4^+ , s formulo $C_{80}H_{162}O_{34}N_2$. Strukturno najbližja kemijska formula za spojino v novem vrhu na kromatogramu je $C_{80}H_{164}O_{36}N_2$. Razlika je torej v dveh atomih vodika in dveh atomih kisika. Najverjetneje je prišlo do oksidacije dvojne vezi, saj je to mesto precej reaktivno, vendar bi predstavljeni mehanizem morali dodatno potrditi. V kolikor je prišlo do oksidacije v peroksid, bi to ustrezalo razliki v masi. Dva izmed predvidenih oksidacijskih produktov, hidroksilni in epoksidni derivat sta prikazana na sliki 39, mi pa jih v posnetih spektrih nismo našli.



Slika 39: Prikaz dveh potencialnih produktov oksidacije, hidroksilnega derivata na levi in epoksidnega derivata na desni strani.

Pričakovali smo, da se bo povprečno število POE enot na molekulo PS zmanjšalo, kot so o tem poročali Borisov in sodelavci, ki so opazili izgubo simetrije najintenzivnejših signalov

monoestrov in diestrov ter premik polidisperznosti proti manjšemu številu POE enot (14). Zmanjšali so se le deleži posameznih zvrsti, med tem ko je razpon POE enot na molekulo ostal nespremenjen. Pričakovali smo tudi porast nezaestrenih zvrsti, saj bi oksidacija lahko sprožila tudi cepitev estrske vezi v PS in nastanek prostih MK. Tudi tu nismo opazili večjih sprememb. O kvantifikaciji v kromatografskem pomenu besede v MS analitiki težko govorimo, saj bi morda lahko novo nastali produkti oksidacije motili ionizacijo ostalih analitov in so opazne razlike v ionizaciji enakih zvrsti že med posameznimi sekvencami. Kakršnakoli kvantifikacija tu ni mogoča brez ustreznih standardov. Glede na stresne oksidacijske pogoje in literaturne podatke, bi lahko nastali tudi zaestreni hidroksilni, keto in epoksidni derivati oleinske kisline (3). Karakterizacija oksidacijskih produktov je bila izredno zahtevna in nepredvidljiva v primerjavi s celostno karakterizacijo PS. Za lažjo karakterizacijo teh spojin bi lahko uporabili fragmentacijo, ki pa bo verjetno predmet nadaljnjih raziskav.

HPLC-MS metoda se je izkazala kot primerna za spremljanje oksidativne degradacije polisorbato, vendar pa bi bilo potrebno metodo še optimizirati. Razumevanje degradacijskih poti polisorbato in karakterizacija njihovih razgradnih produktov igra pomembno vlogo v razvoju formulacij bioloških zdravil in z uporabo masne spektrometrije smo na dobri poti, da to dosežemo.

5. SKLEP

V našem magistrskem delu smo prišli do naslednjih ugotovitev in sklepov:

- Polisorbati so zelo heterogene zmesi več spojin. Z masno spektroskopijo smo potrdili, da poleg estrov maščobnih kislin s polioksietiliranim sorbitanom in izosorbidom vsebujejo tudi nezaestrene zvrsti.
- Polisorbat 80 poleg monoestrov vsebuje še diestre in triestre, polisorbat 20 pa tudi tetraestre. Izosorbidi zaradi dveh obročnih hidroksilnih skupin tvorijo največ diestre, medtem ko sorbitani lahko tvorijo estre z do štirimi maščobnimi kislinami.
- Največja je bila vsebnost monoestrov, nekoliko manj je bilo diestrov, najmanj pa triestrov. Tetraestre smo opazili le v polisorbatu 20.
- Estri POE sorbitana v povprečju vsebujejo 25 polioksietilenskih enot, estri izosorbida pa 12, vendar na eno hidroksilno skupino vsebujejo približno enako število enot. Razpon POE enot v zaestrenih zvrsteh polisorbatov je izredno širok. V primeru POE sorbitan monooleata v PS80 obsega celo od 6 do 37 POE enot, v primeru POE sorbitan monolavrata v PS20 pa od 14 do 34 POE enot. Pri estrih POE izosorbida je razpon POE enot precej manjši, ker ima izosorbid le 2 hidroksilni skupini.
- Običajni polisorbat 80 proizvajalcev J. T. Baker in Sigma Aldrich vsebuje tudi estre s konjugirano linolno kislino, ki je v konfiguraciji EZ ali ZE ter estre s stearinsko, palmitinsko in palmitoleinsko kislino.
- Ultra čist PS80 proizvajalca NOF vsebuje le estre z oleinsko kislino.
- Polisorbat 20 vsebuje estre s kaprilno, kaprinsko, lavrinsko, miristinsko, plamitinsko, oleinsko in stearinsko kislino.
- PS20 proizvajalca Sigmee Aldrich vsebuje nekoliko manjši delež lavrinske kisline in večji delež ostalih MK kot PS20 proizvajalca J. T. Baker.
- S HPLC-MS metodo lahko med seboj razlikujemo polisorbate različnih proizvajalcev. S pomočjo ustreznih standardov bi jih lahko tudi natančneje kvantificirali in tako boljše ovrednotili razlike med njimi.
- NMR je primerna tehnika za analizo polisorbatov, v kolikor nas zanima prisotnost in delež prostih maščobnih kislin, možna pa je tudi kvantifikacija posameznih zvrsti polisorbatov.

- Trietilenglikololeat se je izkazal kot primerna modelna spojina za spremljanje hidrolize polisorbatov, vendar njegova slaba topnost onemogoča spremljanje oksidacije polisorbatov z oksidacijskim reagentom AAPH.
- Oksidacija polisorbatov z AAPH vodi do zmanjšanja količine vseh vsebujočih zvrsti, a se ohrani razpon POE enot. Predvidevamo, da oksidacija PS80 vodi do tvorbe peroksida na dvojni vezi oleinske kisline.

Literatura

1. M. Y. Pletnev: Chemistry of surfactants, Möbius D, Miller R (eds). Studies in Interface Science, Izdaja 13, Surfactants, Elsevier, 2001; 1–97 v Fainerman VB.
2. N. Doshi, B. Demeule, and S. Yadav: Understanding Particle Formation: Solubility of Free Fatty Acids as Polysorbate 20 Degradation Byproducts in Therapeutic Monoclonal Antibody Formulations, *Mol. Pharm.*, 2015; 12(11): 3792–3804.
3. E. Hvattum, W. L. Yip, D. Grace, and K. Dyrstad: 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.
4. E. Ha, W. Wang, and Y. J. Wang: YJ. Peroxide formation in polysorbate 80 and protein stability, *J. Pharm. Sci.*, 2002; 91(10): 2252–2264.
5. R. S. K. Kishore, S. Kiese, S. Fischer, A. Pappenberger, U. Grauschopf, and H.-C. Mahler: The degradation of polysorbates 20 and 80 and its potential impact on the stability of biotherapeutics, *Pharm. Res.*, 2011; 28(5): 1194–1210.
6. L. Zhang, S. Yadav, B. Demeule, Y. J. Wang, O. Mozziconacci, and C. Schöneich: Degradation Mechanisms of Polysorbate 20 Differentiated by 18O-labeling and Mass Spectrometry, *Pharm. Res.*, 2017; 34(1): 84–100.
7. M. Agarkhed, C. O'Dell, M.-C. Hsieh, J. Zhang, J. Goldstein, and A. Srivastava: Effect of Polysorbate 80 Concentration on Thermal and Photostability of a Monoclonal Antibody, *AAPS PharmSciTech* 2012; 14(1): 1–9.
8. R. Zhang, Y. Wang, L. Tan, H. Y. Zhang, and M. Yang: Analysis of polysorbate 80 and its related compounds by RP-HPLC with ELSD and MS detection, *J. Chromatogr. Sci.* 2012; 50(7): 598–607.
9. European Pharmacopoeia Online 9.5; <http://online6.edqm.eu/ep905/>, dostopano maj 2018.
10. A. Martos *et al.*: Trends on Analytical Characterization of Polysorbates and Their Degradation Products in Biopharmaceutical Formulations, *J. Pharm. Sci.* 2017; 106(7): 1722–1735.
11. Y. Li, D. Hewitt, Y. K. Lentz, J. A. Ji, T. Y. Zhang, and K. Zhang: Characterization and Stability Study of Polysorbate 20 in Therapeutic Monoclonal Antibody Formulation by Multidimensional Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography–Charged Aerosol Detection–Mass Spectrometry, *Anal. Chem.* 2014; 86(10): 5150–5157.

12. M. Saggi, J. Liu, and A. Patel: Identification of Subvisible Particles in Biopharmaceutical Formulations Using Raman Spectroscopy Provides Insight into Polysorbate 20 Degradation Pathway, *Pharm. Res.* 2015; 32(9): 2877–2888.
13. A. C. McShan, P. Kei, J. A. Ji, D. C. Kim, and Y. J. Wang: Hydrolysis of Polysorbate 20 and 80 by a Range of Carboxylester Hydrolases, *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 2016; 70(4): 332–345.
14. O. V. Borisov, J. A. Ji, and Y. J. Wang: Oxidative degradation of polysorbate surfactants studied by liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Pharm. Sci.* 2015; 104(3): 1005–1018.
15. M. Donbrow, E. Azaz, and A. Pillersdorf, “Autoxidation of polysorbates: Autoxidation of polysorbates, *J. Pharm. Sci.* 1978; 67(12): 1676–1681.
16. S. Betigeri, A. Thakur, and K. Raghavan: Use of 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride as a reagent tool for evaluation of oxidative stability of drugs, *Pharm. Res.* 2005; 22(2): 310–317.
17. J. Werber, Y. J. Wang, M. Milligan, X. Li, and J. A. Ji: Analysis of 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride degradation and hydrolysis in aqueous solutions, *J. Pharm. Sci.* 2011; 100(8): 3307–3315.
18. T. Hall, S. L. Sandefur, C. C. Frye, T. L. Tuley, and L. Huang: Polysorbates 20 and 80 Degradation by Group XV Lysosomal Phospholipase A2 Isomer X1 in Monoclonal Antibody Formulations, *J. Pharm. Sci.* 2016; 105(5): 1633–1642.
19. R. E. Ardrey: *Liquid Chromatography - Mass Spectrometry: An Introduction*, John Wiley & Sons, 2003 ;7–73.
20. C. Dass: *Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry*, John Wiley & Sons, 2007.
21. A. Christiansen, T. Backensfeld, S. Kühn, and W. Weitschies: Stability of the non-ionic surfactant polysorbate 80 investigated by HPLC-MS and charged aerosol detector, *Pharm.* 2011; 66(9): 666–671.
22. W. M. A. Niessen: *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, Third Edition*, CRC Press, 2006; 23–53.
23. C. Ho *et al.*: *Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications*, *Clin. Biochem. Rev.* 2003; 24(1): 3–12.
24. P. Kebarle and U. H. Verkerk: *Electrospray: From ions in solution to ions in the gas phase, what we know now*, *Mass Spectrom. Rev.*, 28(6): 898–917.

25. Q. Hu, R. J. Noll, H. Li, A. Makarov, M. Hardman, and R. Graham Cooks: The Orbitrap: a new mass spectrometer, *J. Mass Spectrom.* 2005; 40(4): 430–443.
26. M. Balci: Basic ¹H- and ¹³C-NMR Spectroscopy. Elsevier, 2005.
27. The Basics of NMR; <https://www.cis.rit.edu/htbooks/nmr/inside.htm>, dostopano april 2018.
28. Fiehn Lab - MS Adduct Calculator; <http://fiehnlab.ucdavis.edu/staff/kind/Metabolomics/MS-Adduct-Calculator>, dostopano april 2018.
29. Anon. Conjugated Linoleic Acid (CLA) - AOCS Lipid Library; <http://lipidlibrary.aocs.org/Analysis/content.cfm?ItemNumber=40260>, dostopano julij 2018.