

## 标准研讨

超高效液相色谱 – 串联四极杆飞行时间质谱法  
测定壬苯醇醚分子量分布及  $n$  值\*张伟<sup>1</sup>, 张慧<sup>1</sup>, 韩治国<sup>2</sup>, 孙明辉<sup>3</sup>, 梁成罡<sup>1\*\*</sup>(1. 中国食品药品检定研究院激素室 国家药品监督管理局化学药品质量研究与评价重点实验室, 北京 102629;  
2. 安捷伦科技有限公司, 北京 100102; 3. 布鲁克科技有限公司, 北京 100081)

**摘要** 目的: 研究并建立超高效液相色谱 – 串联四极杆飞行时间质谱法测定壬苯醇醚低聚物的分子量分布及  $n$  值, 并用国内外多批次壬苯醇醚样品进行考察。方法: 采用 Techmate STV SUNSHELL Peptide C<sub>18</sub> (100 mm × 2.1 mm, 2.6 μm, 300 Å) 色谱柱, 以 0.1% 三氟乙酸水溶液 (A) – 0.1% 三氟乙酸乙腈溶液 (B) 为流动相, 线性梯度洗脱, 流速 0.3 mL · min<sup>-1</sup>, 柱温 60 °C, 进样量 5 μL。采用串联四极杆飞行时间质谱检测器, 离子源为 Dual ESI, 氦气为碰撞气, 以正离子模式, 采集范围  $m/z$  50 ~ 3 000 进行检测。采用 ChemDraw 19.0 软件绘制相关结构, 通过 MassHunter PCDL Manager 软件建立数据库, 并编辑计算公式。结果: 用新建的方法对国内外生产的 6 批壬苯醇醚原料药的重均分子量及数均分子量进行了测定, 并计算得到结构中  $n$  值的范围, 结果发现国内外产品之间以及同一企业不同批次产品之间的重均分子量及数均分子量均有一定差异; 产品结构中的  $n$  值也各不相同。数均分子量范围在 664.6 ~ 686.8 ( $n$  值约为 10); 重均分子量范围在 677.1 ~ 715.5 ( $n$  值约为 11)。结论: 此类低聚物药物的分子量分布及  $n$  值亟需在生产过程及质量标准中增加控制; 新建的方法灵敏度高, 精密度和重现性好, 可以满足测定壬苯醇醚原料药的分子量分布及  $n$  值的需要, 为此类低聚物分子量分布的测定提供了解决方案, 同时为《中华人民共和国药典》标准提高及修订提供了依据。

**关键词:** 超高效液相色谱 – 串联四极杆飞行时间质谱法; 基质辅助激光解析串联飞行时间质谱技术; 壬苯醇醚; 低聚物; 数据库; 分子量分布;  $n$  值

中图分类号: R 917 文献标识码: A 文章编号: 0254 – 1793 (2024) 10 – 1807 – 09  
doi: 10.16155/j.0254 – 1793.2024 – 0130Molecular weight distribution and  $n$  value of nonoxynol were  
determined by ultra – high performance liquid chromatography with  
tandem quadrupole time – of – flight mass spectrometry\*ZHANG Wei<sup>1</sup>, ZHANG Hui<sup>1</sup>, HAN Zhi – guo<sup>2</sup>,  
SUN Ming – hui<sup>3</sup>, LIANG Cheng – gang<sup>1\*\*</sup>

(1. Division of Hormone, National Institutes for Food and Drug Control, NMPA Key Laboratory for Quality Research and Evaluation of Chemical Drugs, Beijing 102629, China; 2. Agilent Technology Co., Ltd., Beijing 102629, China; 3. Bruker Technology Co., Ltd., Beijing 100081, China)

**Abstract Objective:** To develop an ultra – high performance liquid chromatography tandem quadrupole

\* 国家药典委员会药品标准制修订研究课题 (2023H048)

\*\* 通信作者 Tel: (010) 53851638; E – mail: liangchenggang@nifdc.org.cn

第一作者 Tel: (010) 53851619; E – mail: zhangwei125@nifdc.org.cn

time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q TOF MS) approach to investigate the molecular weight distribution and  $n$  value of nonoxynol oligomers, and to study several batches of samples produced domestically or abroad.

**Methods:** The mobile phase was 0.1% trifluoroacetic acid aqueous solution (A) - 0.1% trifluoroacetic acid in acetonitrile (B) with linear gradient elution at a flow rate of  $0.3 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ . The column was Techmate STV SUNSHELL Peptide  $C_{18}$  ( $100 \text{ mm} \times 2.1 \text{ mm}$ ,  $2.6 \mu\text{m}$ ,  $300 \text{ \AA}$ ) and installed in a  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  column oven. Injection volume was  $5 \mu\text{L}$ . A tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometer with Dual ESI as ion source and argon as collision gas were used for detection in positive ion mode with a collection range of  $m/z$  50 - 3 000. ChemDraw 19.0 software was used to draw the relevant structure, and MassHunter PCDL Manager software was used to build the database and edit the calculation formula. **Results:** The weight average molecular weight and number average molecular weight of 6 batches nonoxynol drug substance produced domestically or abroad were determined by the newly established method, and the range of  $n$  average value in the structure was obtained. The results showed that the weight average molecular weight and number average molecular weight were different between domestic and foreign products and also between different batches produced by same manufacturer. The  $n$  value of structure basis also varies. The weight average molecular weight ranges were 664.6 to 686.8 ( $n$  value was about 10), and number average molecular weight ranges were 677.1 to 715.5 ( $n$  value was about 11). **Conclusion:** The molecular weight distribution and  $n$  value of such oligomer drugs need to be controlled in the production process and quality specifications. The newly established method has high sensitivity, precision and reproducibility, can be qualified for the needs of determining molecular weight distribution and  $n$  value of nonoxynol, and provides insight in determination of molecular weight distribution of such oligomers. This study also provides a data supplement for the improvement and revision of the standards of Chinese Pharmacopoeia.

**Keywords:** UPLC-Q TOF MS; MALDI-TOF MS; nonoxynol; oligomer; database; molecular weight distribution;  $n$  value

分子量分布 (molecular weight distribution, MWD) 是表征聚合分子特征非常重要的指标之一, 与聚合产物的物理化学性质乃至生物学特性密切相关, 是聚合物类药物物质控的重要项目, 可直接影响药物的安全性与有效性。壬苯醇醚 (nonoxynol-9) 是一种非离子型表面活性剂, 作为杀精剂在世界范围内使用已有 60 多年, 2020 年版《中华人民共和国药典》(以下简称《中国药典》)、USP 43 以及 EP 10.0 均有收载<sup>[1]</sup>。工业中, 壬苯醇醚是通过壬基苯酚和环氧乙烷在碱性条件下缩聚而成的无水低聚化合物<sup>[2]</sup>, 结构式见图 1。

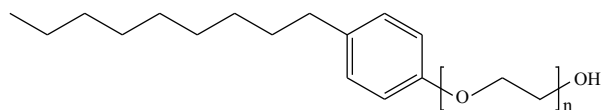


图 1 壬苯醇醚结构式

Fig. 1 Structural formula of nonoxynol

壬苯醇醚的分子式为  $C_9H_{19}C_6H_4(OCH_2CH_2)_nOH$ , 结构中具有乙二醇重复性结构, 中美两国药典壬苯醇醚各论中均描述本品为  $n$  平均值为  $9^{[3-5]}$  的混合物, 但质量标准中对具体  $n$  值却是未做控制。这势必造成各生产企业产品之间, 甚至每个企业各批产品之间的物质组成不尽相同, 从而导致作为同种药品, 理化性质甚至生物学性质存在差异, 使用同一规格同一剂量的药品可能在临床上存在有效性或安全性不同的现象。事实上, 当壬苯醇醚的  $n$  值为 4、9、10、15 或 30 时, 随着聚合度的增加, 其性状就会由无色液体 → 无色至淡黄色粘稠液体 → 乳白色油状物 → 乳白色固体不断变化。据一项体外活性研究<sup>[6]</sup>, 在不同的壬基苯氧基衍生物 ( $n$  值在 11 ~ 15) 中, 对壬基苯氧基聚乙二醇醚, 即壬苯醇醚-9 ( $n$  平均值为 9) 才是最有效的杀精剂。因此, 有理由推断, 作为一种药物在临床使用, 该类聚合物的聚合程度 (分子量分布或  $n$  值) 在不同企业或不同批次产品间的不同, 可直接影响着临床用药的安全与有效<sup>[7]</sup>。

近年来,测定聚合物分子量的新技术、新方法层出不穷,凝胶色谱法(GPC)与多种检测器联用,如示差折光检测器(RID)、多角度激光光散射检测器(MALLSD)等,用于高分子聚合物的分子量分布研究与控制已经常见<sup>[8-10]</sup>,另外,作为进一步发展的基质辅助激光解析串联飞行时间质谱(MALDI-TOF MS)技术可测定难挥发,高极性,热不稳定分子,特别是生物大分子的分子量也有文献报道<sup>[11-12]</sup>。但对于测定壬苯醇醚这类结构中具有重复结构但聚合度较低的化合物分子量,上述方法均存在缺陷,测定结果会有一定误差,这将在文末讨论中详细介绍。另外,对于此类低聚物分子量的相关研究相对文献报道较少,中美两国药典收录的此类品种也基本未对聚合度进行控制。药检药监相关部门已经认识到这类药物的这一质控漏洞,正在力图尽早完善质量标准。

本研究就是以《中国药典》和 USP 收录的壬苯醇醚为研究对象,建立了超高效液相色谱-串联四极杆飞行时间质谱法(UPLC-Q TOF MS 法)测定壬苯醇醚分子量分布及  $n$  值,研究过程中采用 ChemDraw19.0 软件绘制相关化合物结构,通过 MassHunter PCDL Manager 软件建立数据库,并编辑计算公式。方法中以聚乙二醇(PEG)系列对照品对新方法测定出的分子量分布及  $n$  值进行了结果验证,并与基质辅助激光解析串联飞行时间质谱法(MALDI-TOF MS 法)进行对比分析,同时用建立的新方法对国内外壬苯醇醚原料药进行考察。本文最后还对几种测定分子量的方法进行探讨。本研究为低聚物分子量分布的测定提供了解决方案,同时为《中国药典》标准提高及修订提供了数据依据。

## 1 仪器与试剂

Agilent 1260 超高效液相色谱 - Agilent 6230 TOF 飞行时间质谱串联系统(Agilent 公司),用于方法的建立;MassHunter PCDL Manager 建库软件和 MassHunter Qualitative Analysis 分析软件(Agilent 公司);Waters Acquity I - Class 超高效液相色谱 - Waters Synapt G2 - Si 飞行时间质谱串联系统(Waters 公司),用于中间精密度考察;UNIFI 分析软件(Waters 公司);Autoflex max 基质辅助激光解析串联飞行时间质谱仪(Bruker 公司);Polytools 分析软件(Bruker 公司);ChemDraw19.0 (CambridgeSoft 公司);METTLER AG245 十万分之一电子天平(Mettler Toledo 公司);Milli-Q 超纯水仪(Millipore 公司);

Techmate STV SUNSHELL Peptide C<sub>18</sub> (100 mm × 2.1 mm, 300 Å, 2.6 μm) (Techmate 公司)。

壬苯醇醚对照品(批号 100112 - 201603, 含量 99.3%),中国食品药品检定研究院;壬苯醇醚对照品(批号 R06910, 含量 99.3%), USP;苯醇醚对照品(EP, 批号 1.0);壬苯醇醚原料药均来自药大制药有限公司;PEG 300 (批号 BCBZ5867, GPC 级)、PEG 400 (批号 BCCB9061, GPC 级)、PEG 600 (批号 BCCB4732, GPC 级)、PEG 1000 (批号 BCBZ5870, GPC 级)、PEG 1500 (批号 BCCC7318, GPC 级)、PEG 2000 (批号 BCCC7307, GPC 级),均购自 Sigma 公司;Peptide Calibration Standard II (批号 0000386956, 相对分子质量范围 700 ~ 3 500), Bruker 公司;α-氰基-4-羟基肉桂酸(HCCA, 批号 10222613, 10 mg · 支<sup>-1</sup>), Sigma 公司;乙腈(质谱级), Merck 公司;三氟乙酸(TFA, 质谱级), Merck 公司;试验所用溶液均用电阻率为 18.2 MΩ · cm 的去离子水配制。

## 2 方法与结果

### 2.1 UPLC-Q TOF MS 法测定壬苯醇醚分子量分布及 $n$ 值

#### 2.1.1 溶液的配制

**2.1.1.1 PEG 对照品溶液** 分别称取 PEG 400、PEG 600、PEG 1000、PEG 2000 的对照品适量,分别加水溶解并稀释制成每 1 mL 中约含 0.5 mg 的溶液,即得。

**2.1.1.2 壬苯醇醚供试品溶液** 分别称取壬苯醇醚对照品及原料药适量,分别加水溶解并稀释制成每 1 mL 中约含 0.5 mg 的溶液,即得。

#### 2.1.2 色谱-质谱条件

采用 Techmate STV SUNSHELL Peptide C<sub>18</sub> (100 mm × 2.1 mm, 300 Å, 2.6 μm) 色谱柱,柱温 60 °C,以 0.1% TFA 水溶液(A) - 0.1% TFA 乙腈(B)为流动相,线性梯度洗脱(0 ~ 1 min, 95% A; 1 ~ 7 min, 95% A → 60% A; 7 ~ 8 min, 60% A → 5% A; 8 ~ 9 min, 5% A; 9 ~ 9.5 min, 5% A → 95% A; 9.5 ~ 11 min, 95% A),流速 0.3 mL · min<sup>-1</sup>,进样量 5 μL。

采用飞行时间质谱检测器,Agilent 6230 TOF:离子源为 Dual ESI;脱溶剂气温度 300 °C;脱溶剂气流速 8 L · min<sup>-1</sup>;雾化器压力 276 kPa;毛细管电压 3 800 V;碎裂电压 125 V;正离子模式;采集范围 MS Scan  $m/z$  50 ~ 3 000。Waters Synapt G2 - Si:离子源为 ESI;脱溶剂气温度 300 °C;脱溶剂气流速 800 L · h<sup>-1</sup>;

雾化器压力 500 kPa;毛细管电压 3 000 V;碰撞能 30 V;正离子模式;采集范围 MS Scan  $m/z$  50 ~ 3 000。

### 2.1.3 数据库的建立及计算公式编辑

采用 ChemDraw19.0 软件绘制 PEG 系列结构、壬苯醇醚系列结构,见图 2,命名为 PEG(1)、PEG(2) ~ PEG(60),RBCM(1)、RBCM(2) ~ RBCM(30),并将所有结构文件及分子量通过 MassHunter PCDL Manager 和 UNIFI 软件分别建立数据库。

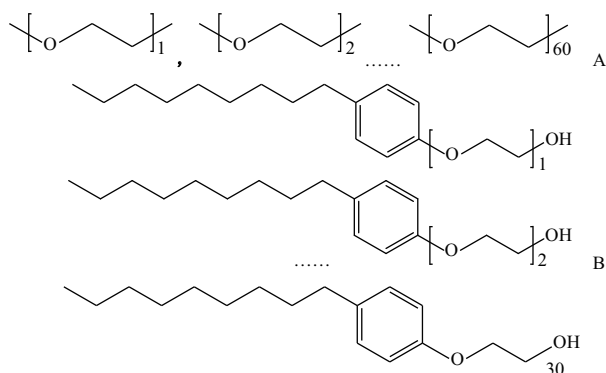


图 2 PEG (A) 及壬苯醇醚 (B) 的系列结构

Fig. 2 Series of structural formulas of PEG (A), and nonoxynol (B)

通过 MassHunter Qualitative Analysis 分析软件进行数均分子量 ( $M_n$ ) 及重均分子量 ( $M_w$ ) 计算公式的编辑,公式(1)、公式(2); $n$  值计算见公式(3);其中,Mass 代表质荷比,Strength 代表离子强度,220.35 为壬基苯酚相对分子质量。

$$M_n = \frac{\sum_{i=1}^n (\text{Mass} \times \text{Strength})}{\sum_{i=1}^n \text{Strength}} \quad (1)$$

$$M_w = \frac{\sum_{i=1}^n (\text{Mass} \times \text{Mass} \times \text{Strength})}{\sum_{i=1}^n \text{Mass} \times \text{Strength}} \quad (2)$$

$$n_{\text{壬基醇醚}} = (M_n - 220.35) \quad (3)$$

### 2.1.4 PEG 对照品溶液测定

取“2.1.1”项下 PEG 对照品溶液 (PEG 400、PEG 600、PEG 1000、PEG 1500、PEG 2000),按“2.1.2”项下色谱-质谱条件进行分析,通过“2.1.3”项下分析软件计算公式进行计算,与对照品附带检测报告(采用 SEC/GPC 法,通过 PSS WINGPC 软件进行数据分析得到的分析报告)分子量分布结果进行对比。典型图谱见图 3,测定结果见表 1,计算结果见表 2。

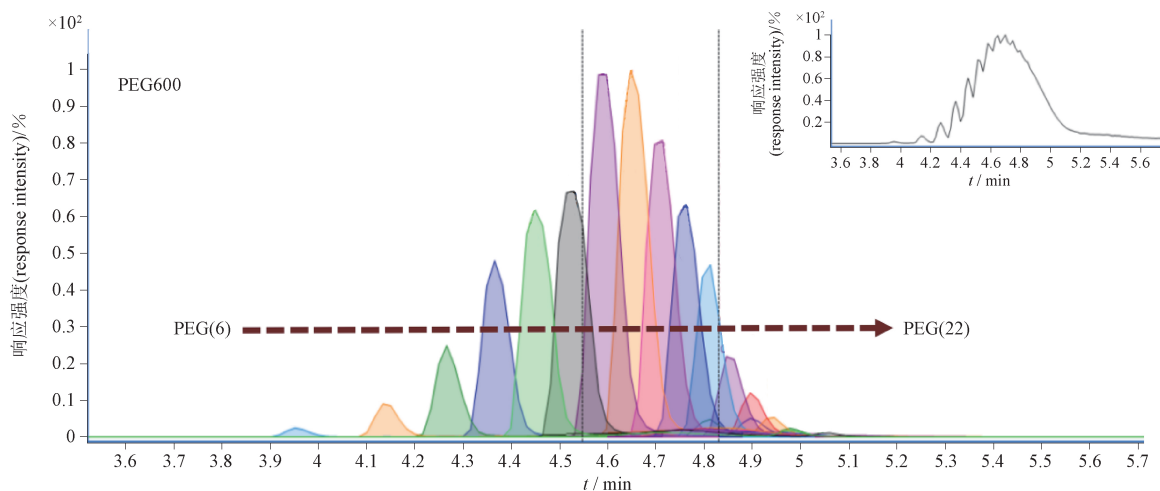


图 3 PEG 600 总离子流图

Fig. 3 TIC of PEG 600

### 2.1.5 重复性

取 PEG 600 对照品,按“2.1.1.1”项下方法平行配制 6 份对照品溶液,按“2.1.2”项下色谱-质谱条件进行分析,通过“2.1.3”项下分析软件计算公式进行计算。结果 6 份 PEG 600 对照品溶液的  $M_n$  平均值为 573.3, RSD 为 0.19%;  $M_w$  平均值为 594.2, RSD 为 0.18%,说明新建的方法具有较好的重复性。

### 2.1.6 中间精密度

取 PEG 600 对照品,按“2.1.1”项下方法平行配制 6 份对照品溶液,按“2.1.2”项下色谱-质谱条件,用不同品牌型号仪器(安捷伦公司 Agilent 1260 超高效液相色谱 - Agilent 6230 TOF 飞行时间质谱串联系统;沃特世公司 Waters Acquity I - Class 超高效液相色谱 - Waters Synapt G2 - Si 飞行时间质谱

表 1 PEG 600 分子量分布测定结果

Tab. 1 MWD test results of PEG 600

名称 (name)	分子式 (molecular formula)	相对保留时间 (relative retention time)	相对分子质量 (relative molecular mass)	$m/z$	偏差 (deviation) / $\times 10^{-6}$	离子强度 (ion strength)
PEG(6)	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub> O <sub>7</sub>	3.951	282.167 4	305.157 9	-1.72	265 076
PEG(7)	C <sub>14</sub> H <sub>30</sub> O <sub>8</sub>	4.133	326.191 4	327.200 5	-8.13	1 031 691
PEG(8)	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub> O <sub>9</sub>	4.266	370.218 9	388.253 5	-3.79	2 793 332
PEG(9)	C <sub>18</sub> H <sub>38</sub> O <sub>10</sub>	4.365	414.244 5	432.279 6	-4.73	5 900 306
PEG(10)	C <sub>20</sub> H <sub>42</sub> O <sub>11</sub>	4.448	458.270 1	476.306 7	-5.7	8 381 981
PEG(11)	C <sub>22</sub> H <sub>46</sub> O <sub>12</sub>	4.531	502.295 1	503.305 7	-7.57	9 140 633
PEG(12)	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub> O <sub>13</sub>	4.597	546.320 5	569.314 2	-8.54	13 520 815
PEG(13)	C <sub>26</sub> H <sub>54</sub> O <sub>14</sub>	4.647	590.347 4	591.357 8	-6.68	12 948 868
PEG(14)	C <sub>28</sub> H <sub>58</sub> O <sub>15</sub>	4.713	634.373 3	652.408 1	-6.75	10 620 204
PEG(15)	C <sub>30</sub> H <sub>62</sub> O <sub>16</sub>	4.763	678.399 6	701.392 2	-6.13	8 000 700
PEG(16)	C <sub>32</sub> H <sub>66</sub> O <sub>17</sub>	4.813	722.426 1	740.462	-5.34	5 693 092
PEG(17)	C <sub>34</sub> H <sub>70</sub> O <sub>18</sub>	4.846	766.452 6	784.485 4	-4.74	2 649 212
PEG(18)	C <sub>36</sub> H <sub>74</sub> O <sub>19</sub>	4.895	810.479 2	828.514 5	-4.01	1 397 847
PEG(19)	C <sub>38</sub> H <sub>78</sub> O <sub>20</sub>	4.945	854.502 3	855.508 6	-7.38	644 256
PEG(20)	C <sub>40</sub> H <sub>82</sub> O <sub>21</sub>	4.978	898.529 3	916.561 6	-6.16	282 195
PEG(21)	C <sub>42</sub> H <sub>86</sub> O <sub>22</sub>	5.011	942.558	965.549 8	-3.21	103 608
PEG(22)	C <sub>44</sub> H <sub>90</sub> O <sub>23</sub>	5.045	986.581 5	1 004.613 3	-5.87	42 453

表 2 PEG 分子量分布计算结果

Tab. 2 MWD calculated results of PEG

名称(name)	$M_n$ 测定值(measured $M_n$ )	$M_n$ 报告值(COA $M_n$ )	$M_w$ 测定值(measured $M_w$ )	$M_w$ 报告值(COA $M_w$ )
PEG 400	403.4	397	409.1	434
PEG 600	572.3	560	594.4	601
PEG 1000	1 030.5	976	1 061.2	1 010
PEG 1500	1 503.6	1 480	1 522.8	1 530
PEG 2000	2 009.0	2 050	2 057.1	2 110

串联系统)分别进行分析,通过“2.1.3”项下分析软件计算公式进行计算。结果 12 份 PEG 600 对照品溶液的  $M_n$  平均值为 572.2, RSD 为 0.66%;  $M_w$  平均值为 595.0, RSD 为 0.57%, 说明新建的方法具有较好的精密度。

### 2.1.7 壬苯醇醚供试品溶液测定

取“2.1.1”项下壬苯醇醚供试品溶液,按“2.1.2”项下色谱-质谱条件进行分析,通过“2.1.3”项下分析软件计算公式进行计算,典型图谱见图 4, 计算结果见表 3。

## 2.2 MALDI-TOF-MS 测定壬苯醇醚分子量分布及 $n$ 值

### 2.2.1 溶液的配制

**2.2.1.1 基质溶液** 取 HCCA 1 支,加乙腈-水-三氟乙酸(50:47.5:2.5)1 mL 使溶解,摇匀,即得。

**2.2.1.2 PEG 对照品溶液** 称取 PEG 300、PEG 400、PEG 600、PEG 1000、PEG 1500、PEG 2000 各约 0.01 mg,分别加基质溶液 10  $\mu$ L 使溶解,混匀,即得。

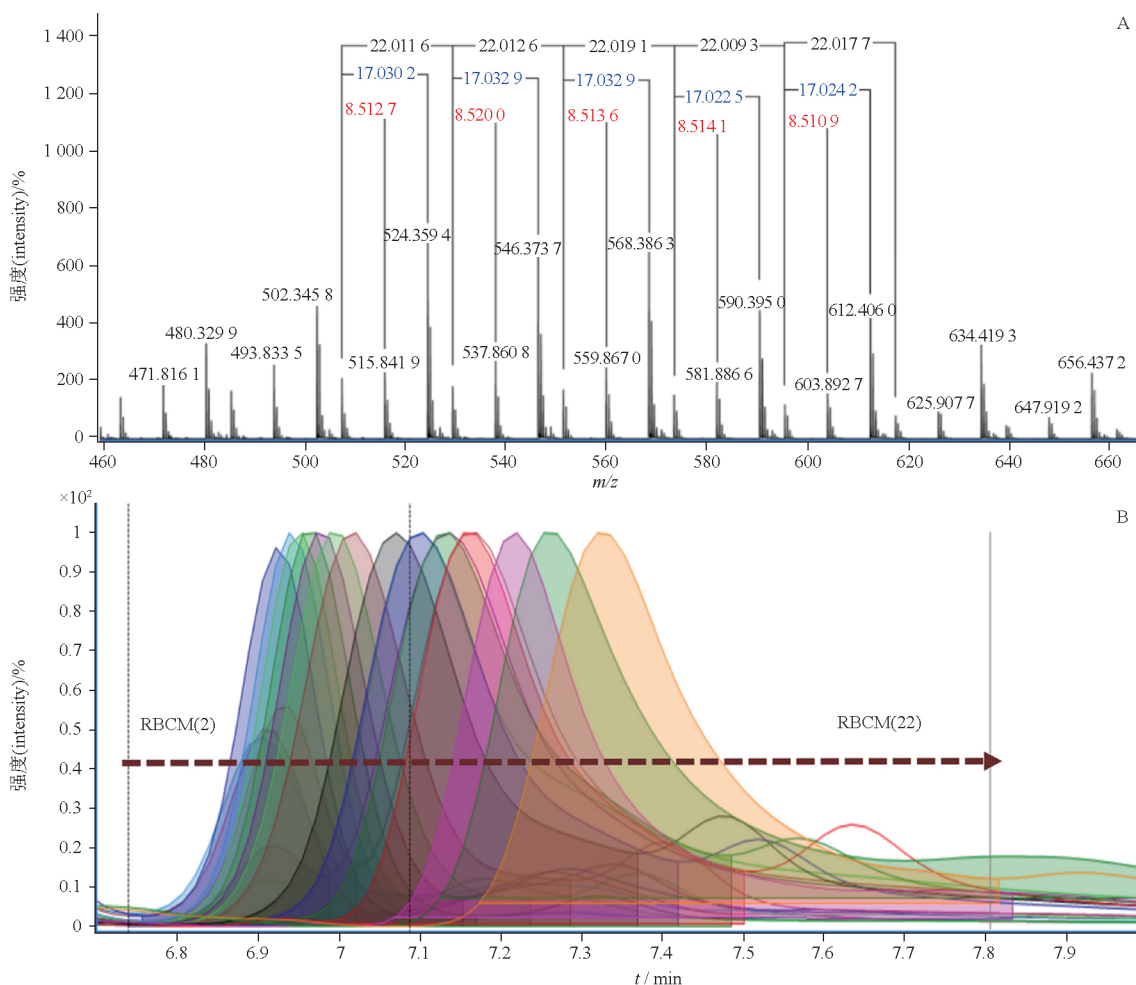
**2.2.1.3 壬苯醇醚供试品溶液** 称取壬苯醇醚对照品及原料药各约 0.01 mg,分别加基质溶液 10  $\mu$ L 使溶解,混匀,即得。

### 2.2.2 质谱条件

采用反射模式;电压极性为正极;扫描范围  $m/z$  50 ~ 3 500;离子源 1 电压 19.7 kV;离子源 2 电压 18.44 kV;单次扫描信号累加 500 次。

### 2.2.3 样品测定

取“2.2.1.3”项下壬苯醇醚供试品溶液 5  $\mu$ L,按“2.2.2”项下条件测定,采用 Polytools 软件进行分析计算,通过公式(3)计算  $n$  值,典型图谱见图 5,计算结果见表 4、5。



A. 一级质谱图 (MS) B. 总离子流图 (TIC)

图 4 壬苯醇醚 (批号 100112-201603) UPLC-Q TOF MS 图

Fig. 4 UPLC-Q TOF MS of nonoxynol (batch No. 100112-201603)

表 3 壬苯醇醚分子量分布及  $n$  值计算结果  
Tab. 3 MWD and  $n$  value Results of nonoxynol

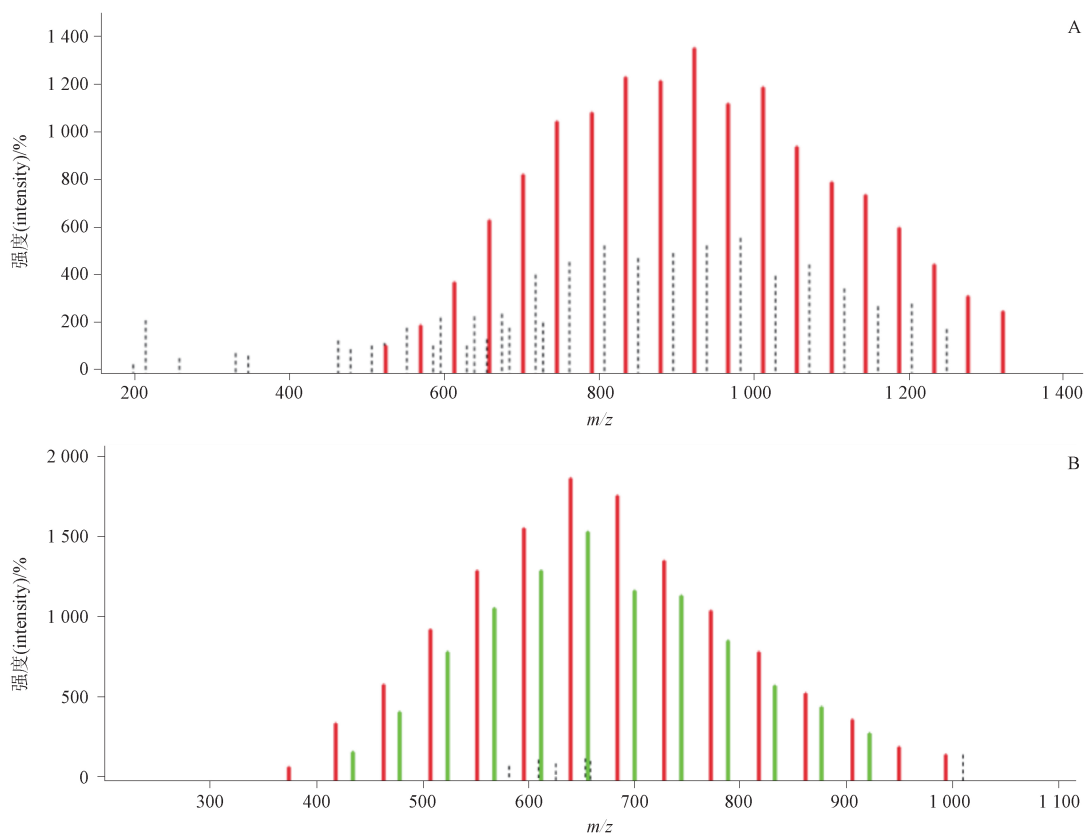
批号 (batch No.)	$M_n$ 测定值 (measured $M_n$ )	$n$ 值 ( $n$ value)	$M_w$ 测定值 (measured $M_w$ )	$n$ 值 ( $n$ value)
100112-201603	672.6	10.3	715.2	11.2
R06910	670.4	10.2	703.8	11.0
1.0	664.6	10.1	677.1	10.4
190801	668.2	10.2	704.1	11.0
190905	686.8	10.6	715.5	11.3
191101	680.2	10.5	713.9	11.2

### 3 讨论

#### 3.1 示差折光检测器测定

本研究选用凝胶色谱法 (GPC) 串联示差折光检测器测定 PEG 混合对照品溶液 (取 PEG 400、PEG 600、PEG 1000 适量, 加水配制成含各组分均为 0.5

mg · mL<sup>-1</sup> 的溶液), 选取 TSKgel G2000SW<sub>xl</sub> 色谱柱对 PEG 混合对照品溶液进行分离, 发现由于 PEG 分子量差异较小, 各组分无法有效分离, 且灵敏度较低, 见图 6, 因此该方法不适于测定此类低聚物的分子量。



A. PEG 1000(PEG 1000) B. 壬苯醇醚(nonoxynol, batch No. 190801)

图5 MALDI-TOF MS图

Fig. 5 MALDI-TOF MS data

表4 PEG分子量分布计算结果

Tab. 4 MWD results of PEG

名称(name)	$M_n$ 测定值(measured $M_n$ )	$M_n$ 报告值(COA $M_n$ )	$M_w$ 测定值(measured $M_w$ )	$M_w$ 报告值(COA $M_w$ )
PEG 300	427.92	269	439.88	330
PEG 400	481.82	397	504.04	434
PEG 600	669.85	560	698.39	601
PEG 1000	1 009.28	976	1 047.24	1 010
PEG 1500	1 485.56	1 480	1 529.81	1 530
PEG 2000	1 748.02	2 050	1 841.85	2 110

表5 壬苯醇醚分子量分布计算结果

Tab. 5 NWD results of nonoxynol

批号(batch No.)	$M_n$ 测定值(measured $M_n$ )	$n$ 值( $n$ value)	$M_w$ 测定值(measured $M_w$ )	$n$ 值( $n$ value)
100112-201603	698.60	10.9	728.51	11.5
R06910	690.84	10.7	714.95	11.2
1.0	732.29	11.6	764.40	12.4
190801	699.23	10.9	733.16	11.7
190905	674.80	10.3	701.55	10.9
191101	677.00	10.4	704.92	11.0

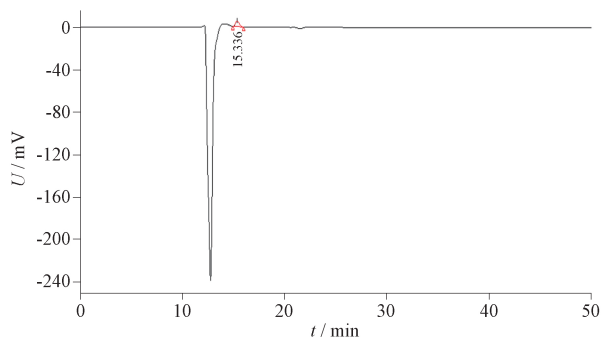
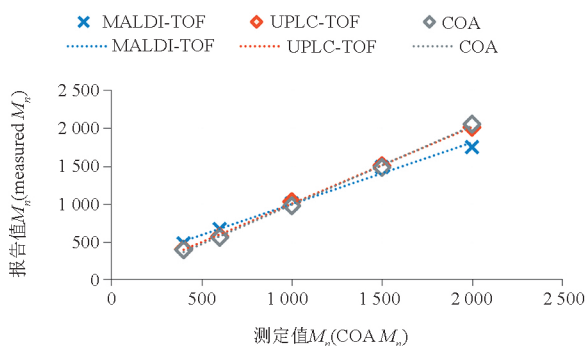


图6 PEG混合对照品溶液色谱图

Fig. 6 Chromatogram of PEG mixed reference solution

### 3.2 多角度激光检测器测定

跟据仪器企业介绍, MALLS 检测器测定分子量时, 该仪器自身具有 5% 的误差, 也不能准确测定低聚物的分子量分布以及  $n$  值。



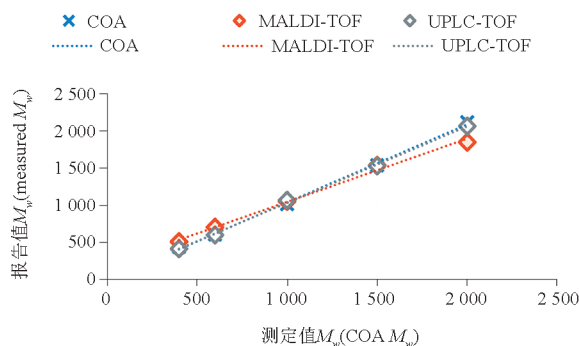
A. PEG  $M_n$  B. PEG  $M_w$

图7 PEG分子量测定结果比较图

Fig. 7 Comparison of PEG molecular weight determination results

### 3.3 2种质谱检测器的差异

采用 MALDI - TOF MS 技术, 在测定低聚化合物 PEG 时, 在低分子量和高分子量端测定值会偏离报告值, 见图 7, 本研究建立方法测定结果与 PEG 的 COA 结果基本一致, 分析原因主要是由于离子源对待测样品的离子化原理不同导致<sup>[13]</sup>。MALDI 是一种软电离技术, 用激光照射样品与基质形成的共结晶薄膜, 基质吸收能量电离, 将质子转移到样品上, 从而使样品发生电离的过程。样品的电离程度取决于基质的选择、待测样品的物理化学特性以及分子量大小, 该技术具有一定的质量歧视效应<sup>[14]</sup>; UPLC - TOF MS 常被用于 PEG 修饰的生物大分子聚合度检测<sup>[15]</sup>, 本研究采用 ESI 源, 液相中的待测分子变成气相离子(气溶胶)时不会受到外部能量的激发而发生裂解, 适用于极性、大分子有机物, 待测分子离子化程度高。



MALDI - TOF MS 法与 UPLC - TOF MS 法测定的壬苯醇醚  $n$  值结果见表 6。

表 6 不同方法测定壬苯醇醚  $n$  值结果比较

Tab. 6 Comparison of the results of determination of  $n$  value of nonoxynol by different methods

批号 (batch No)	$n$ 值 ( $n$ value)			
	MALDI - TOF MS		UPLC - TOF MS	
	$M_n$	$M_w$	$M_n$	$M_w$
100112 - 201603	10.9	11.5	10.3	11.2
R06910	10.7	11.2	10.2	11.0
1.0	11.6	12.4	10.1	10.4
190801	10.9	11.7	10.2	11.0
190905	10.3	10.9	10.6	11.3
191101	10.4	11.0	10.5	11.2

通过表 6 数据对比可知, 2 种方法测定的壬苯醇醚  $n$  值在 10.1 ~ 11.6 (按  $M_n$  计算) 和 10.4 ~ 12.4 范围内 (按  $M_w$  计算), 这与中美两国药典标准对壬苯醇醚的定义描述  $n$  的平均值为 9 有一些差异, 原因应该与不同的测定方法、原理以及仪器设备的分辨率、精密度有关。

本研究为此类分子中具有重复结构的低聚物分子量分布的测定提供了解决方案, 同时为药典标准提高及修订提供依据。

### 参考文献

[ 1 ] XU M, ZHAO M, LI RHW, et al. Effects of nonoxynol - 9 (N - 9) on sperm functions: systematic review and meta - analysis[J]. Reprod Fertil, 2022, 3(1): R19

- [ 2 ] 王举波. 一种制备不含环氧乙烷的壬苯醇醚的方法: 中国, CN109627149A[P]. 2019-04-16  
WANG JB. The Invention Relates to a Method for Preparing Non-oxynol without Ethylene Oxide; China, CN109627149A [P]. 2019-04-16
- [ 3 ] 中华人民共和国药典 2020 年版. 二部[S]. 2020: 90  
ChP 2020. Vol II [S]. 2020: 90
- [ 4 ] EP 10.0[S]. 2020: 3381
- [ 5 ] USP 43[S]. 2021: 4071
- [ 6 ] ANUJA MM, NITHYA RS, SWATHY SS, *et al.* Spermicidal action of a protein isolated from ethanolic root extracts of *Achyranthes aspera*; an *in vitro* study[J]. *Phytomedicine*, 2011, 18: 776
- [ 7 ] 史子谨. 聚合反应工程基础[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008: 5  
SHI ZJ. Fundamentals Polymerization Engineering[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2008: 5
- [ 8 ] 张朝阳, 刘海涛, 许凯, 等. 聚乙二醇 400 分子量测定方法比较[J]. 中国药事, 2018, 32(8): 1102  
ZHANG CY, LIU HT, XU K, *et al.* Comparative study on the methods of molecular weight determination of polyethylene glycol 400[J]. *Chin Pharm Aff*, 2018, 32(8): 1102
- [ 9 ] 刘红妮, 陈曼, 杨彩宁, 等. GPC-MALLS 技术测定 PAMMO 的分子量及分子量分布[J]. 分析测试技术与仪器, 2010, 16(1): 27  
LIU HN, CHEN M, YANG CN, *et al.* Determination of PAMMO molecular weight and its distribution by GPC-MALLS technique [J]. *Anal Test Technol Instrum*, 2010, 16(1): 27
- [ 10 ] 徐煜琪. 采用高效液相色谱仪串联示差折光检测器分析原料糖浆中低聚麦芽糖组分方法的探讨[J]. 工业微生物, 2022, 52(6): 32
- XU YQ. Method for analysis of malt oligosaccharide components in raw syrup by high performance liquid chromatography with tandem differential refractive index detector[J]. *Ind Microbiol*, 2022, 52(6): 32
- [ 11 ] 马庆伟. MALDI-TOF 质谱双内标及其定量检测方法: 中国. CN102337341B[P]. 2014-01-08  
MA QW. MALDI-TOF Mass Spectrometry Double Internal Standard and Its Quantitative Detection Method; China, CN102337341B[P]. 2014-01-08
- [ 12 ] 徐昕荣, 朱斌, 马瑜璐. 基质辅助激光解析飞行时间质谱快速测定水解胶原蛋白粉分子量[J]. 分析科学学报, 2011, 27(3): 397  
XU XR, ZHU B, MA YL. Rapid determination of molecular weight of hydrolyzed collagen by MALDI-TOF-MS[J]. *J Anal Sci*, 2011, 27(3): 397
- [ 13 ] ESRA A, ANDREAS K, ANJA B, *et al.* ESI, APCI, and MALDI tandem mass spectrometry of poly(methyl acrylate)s: a comparison study for the structural characterization of polymers synthesized via CRP techniques and the software application to analyze MS/MS data [J]. *J Polym Chem*, 2013, 51(7): 1595
- [ 14 ] 何美玉, 何江涛. MALDI-TOF MS 分析研究合成高分子的综述[J]. 质谱学报, 2002, 23(1): 43  
HE MY, HE JT. Review of analysis of synthetic polymers by MALDI-TOF MS [J]. *J Chin Mass Spectrom Soc*, 2002, 23(1): 43
- [ 15 ] HUANG L, GOUGH PC. Characterization of PEGylated biopharmaceutical products by LC/MS and LC/MS/MS[J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 899: 351

(本文于 2024 年 2 月 29 日收到)