

HPLC-ELSD 测定肠外营养用海豹油脂肪乳中溶血磷脂酰胆碱的含量

江桂生^{1,2}, 苏健芬¹, 付寒^{1,2}, 邢静娴¹, 董怡萱¹, 吴传斌^{1,2*} (1.中山大学药学院, 广州 510006; 2.广东省创新药物制剂工程技术研究中心, 广州 510006)

摘要: 目的 建立 HPLC-ELSD 测定肠外营养用海豹油脂肪乳中溶血磷脂酰胆碱的含量。方法 采用硅胶色谱柱 (MZ-ANALYTICAL Spherisorb, 250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相 A 为甲醇-水-冰醋酸-三乙胺(850:150:4.5:0.5), 流动相 B 为甲醇-水-冰醋酸-三乙胺-正己烷-异丙醇(385:68:2:0.23:160:384), 等度洗脱, A:B=30:70, 流速为 1.0

基金项目: 科技部国际科技合作与交流专项项目(2008DFA31080)

作者简介: 江桂生, 男, 实验员 Tel: 13760708285 E-mail: zhenrui903@163.com *通信作者: 吴传斌, 男, 博士, 教授, 博导 Tel: (020)39943117 E-mail: cbwu2000@yahoo.com

• 440 • Chin JMAP, 2012 May, Vol.29 No.5

中国现代应用药学 2012 年 5 月第 29 卷第 5 期

mL·min⁻¹;进样体积为 20 μL,柱温为 40 ℃;蒸发光散射检测器,漂移管温度为 70 ℃,雾化气为氮气,气体流量为 2 L·min⁻¹。结果 线性范围为 0.02~0.4 mg·mL⁻¹($r=0.999\ 4$),检测限为 0.12 μg(S/N=3),定量限为 0.40 μg(S/N=10, $n=3$),平均回收率为 100.3%,RSD 为 0.54%($n=9$)。结论 该方法灵敏、快速、准确、重复性好、专属性强,可用于本制剂的质量控制。关键词:高效液相色谱法;蒸发光散射检测器;海豹油;脂肪乳;溶血磷脂酰胆碱;含量测定
中图分类号: R917.101 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2012)05-0440-05

Content Determination of Lysophosphatidylcholine in Seal Oil Based Lipid Emulsion for Parenteral Nutrition by HPLC-ELSD

JIANG Guisheng^{1,2}, SU Jianfen¹, FU Han^{1,2}, XING Jingxian¹, DONG Yixuan¹, WU Chuanbin^{1,2*} (1.School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China; 2.Guangdong Research Center for Drug Delivery Systems, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for determining the content of lysophosphatidylcholine in seal oil based lipid emulsion for parenteral nutrition. **METHODS** Using a silicone column (MZ-ANALYTICAL Spherisorb, 250 mm×4.6 mm, 5 μm) as the stationary phase, the mobile phase A was: methanol-water-glacial acetic acid-triethylamine (850 : 150 : 4.5 : 0.5), and the mobile phase B was: methanol-water-glacial acetic acid-triethylamine-n-hexane-isopropanol (385 : 68 : 2 : 0.23 : 160 : 384), and the ratio of A and B was 30 : 70 with isocratic elution. The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹. The injection volume was 20 μL. The column temperature was set at 40 ℃. The detector was evaporative light-scattering detector (ELSD). The drift tube temperature of the ELSD was set at 70 ℃, and the nitrogen flow rate of the ELSD was 2 L·min⁻¹. **RESULTS** The linear concentration range of lysophosphatidylcholine was 0.02–0.4 mg·mL⁻¹($r=0.999\ 4$), and the average recovery was 100.3% with the RSD of 0.54%($n=9$). The limit of detection was 0.12 μg(S/N=3), and the limit of quantitation was 0.40 μg(S/N=10, $n=3$). **CONCLUSION** This method is rapid, accurate, reliable and reproducible. It is suitable for the quality control of seal oil based lipid emulsion for parenteral nutrition. **KEY WORDS:** HPLC; ELSD; seal oil; lipid emulsion; lysophosphatidylcholine; content determination

肠外营养用海豹油脂肪乳是以精制卵磷脂作为乳化剂,用甘油作为等渗剂,经高压均质而成的 O/W 型静脉注射用营养乳剂。在乳剂的制备和贮藏过程中,卵磷脂水解脱去脂肪酸即生成溶血磷脂,其化学结构通式如图 1 所示,溶血磷脂的主要成分为溶血磷脂酰胆碱^[1]。乳剂中的溶血磷脂酰胆碱经注射进入人体后,可能产生严重的危害,能够产生与动脉粥样硬化时相似的血管内皮依赖性舒张功能的损害,能使红细胞及其他细胞膜破裂,引起溶血或细胞坏死^[2]。因此,有必要对脂肪乳注射剂中的溶血磷脂酰胆碱进行准确测定,以严格控制其限量,保证临床用药安全。

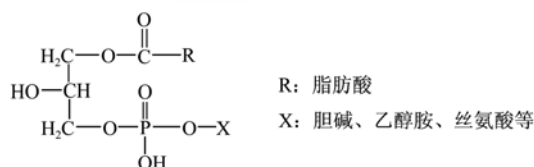


图 1 溶血磷脂化学结构通式

Fig 1 The general chemical structure of lysophosphatidylcholine

已有文献报道,测定溶血磷脂酰胆碱的方法有 HPLC、TLC 和 ³¹P-NMR 等^[2]。在综合考虑各

种方法的适用范围和本制剂的特点后,本实验室选定高效液相色谱-蒸发光散射检测法(HPLC-ELSD)测定本制剂中溶血磷脂酰胆碱的含量。

1 仪器与试剂

岛津 LC-20AT 型高效液相色谱仪(日本岛津);LCsolution 色谱工作站;Alltech 3300 型蒸发光散射检测器;XS205 型分析天平(瑞士 METTLER TOLEDO)。

溶血磷脂酰胆碱(美国 Sigma,批号:089K5205);海豹油脂肪乳(自制,批号:12042,12052,12053);甲醇、正己烷、异丙醇为色谱纯;液相用水为超纯水;冰醋酸、三乙胺为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为硅胶色谱柱(MZ-ANALYTICAL Spherisorb, 250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相 A 为甲醇-水-冰醋酸-三乙胺(850 : 150 : 4.5 : 0.5),流动相 B 为甲醇-水-冰醋酸-三乙胺-正己烷-异丙醇(385 : 68 : 2 : 0.23 : 160 : 384),等度洗脱,A : B= 30 : 70,流速为 1.0 mL·min⁻¹;进样体积为 20 μL,柱温为 40 ℃;蒸发光散射检测器,漂移

管温度为 70 ℃, 雾化气为氮气, 气体流量为 2 L·min⁻¹, 增益倍数为 4 倍。

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液 取溶血磷脂酰胆碱对照品约 40 mg, 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加稀释剂异丙醇-正己烷(5:2)定容, 摇匀, 作为对照品储备液。

2.2.2 供试品溶液 精密量取样品 5 mL, 置 50 mL 量瓶中, 加稀释剂异丙醇-正己烷(5:2)定容, 摇

匀, 作为供试品溶液。

2.3 系统适用性试验

按“2.1”项下色谱条件, 精密量取对照品溶液和供试品溶液各 20 μL, 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图, 对照品溶液中溶血磷脂酰胆碱的保留时间为 9.123 min, 结果见图 2; 供试品溶液中溶血磷脂酰胆碱的保留时间为 9.243 min, 与相邻的保留时间为 6.217 min 的磷脂酰胆碱的分离度为 5.434, 理论板数为 3 336, 结果见图 2。

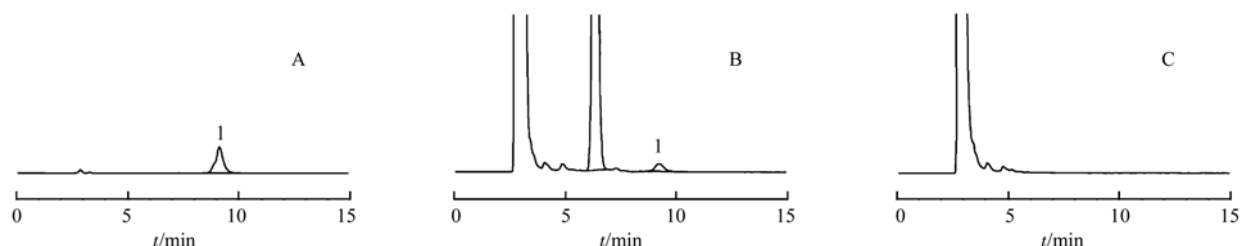


图 2 高相液相色谱图

A-对照品; B-供试品; C-空白溶液; 1-溶血磷脂酰胆碱

Fig 2 HPLC chromatograms

A-control; B-sample; C-blank; 1-lysophosphatidylcholine

2.4 专属性试验

根据本制剂处方, 制备辅料空白溶液(不含卵磷脂), 按“2.1”项下色谱条件, 进样 20 μL, 记录色谱图, 在 9 min 处没有色谱峰出现, 结果见图 2, 表明在该色谱条件下辅料不干扰溶血磷脂酰胆碱的测定。

取供试品溶液, 分别进行酸化、碱化、高温

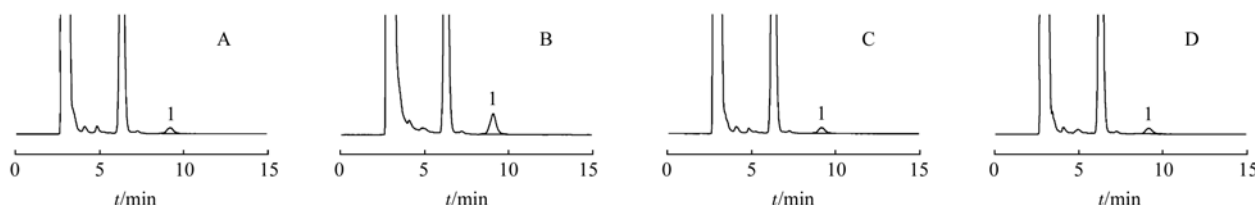


图 3 样品破坏性试验色谱图

A-酸化; B-碱化; C-高温; D-氧化; 1-溶血磷脂酰胆碱

Fig 3 HPLC chromatograms of stressing test

A-degradation by acid; B-degradation by base; C-degradation by heat; D-degradation by oxidation; 1-lysophosphatidylcholine

2.5 线性关系考察

精密量取不同体积的溶血磷脂酰胆碱对照品储备液 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 5.0, 6.0, 8.0 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加稀释剂异丙醇-正己烷(5:2)定容, 摇匀。分别精密量取上述各溶液和对照品储备液 20 μL, 注入液相色谱仪, 测定峰面积 A。以峰面积的对数(lgA)为横坐标, 进样溶液浓度的对数(lgC)为纵坐标, 得回归方程: $\lg C = 0.7014 \lg A -$

及氧化处理, 按“2.1”项下色谱条件, 分别进样 20 μL, 记录色谱图, 结果见图 3, 碱化可使溶血磷脂酰胆碱增加, 而其他条件则无明显变化, 溶血磷脂酰胆碱可与其他成分达到良好的基线分离。

实验结果表明, 在该色谱条件下, 本制剂中的溶血磷脂酰胆碱不受其他成分的干扰, 能够很好地分离检出。

5.233 5, $r=0.9994$; 结果表明, 溶血磷脂酰胆碱在 0.02~0.40 mg·mL⁻¹ 浓度内呈良好线性关系。

2.6 仪器精密度试验

取“2.5”项下浓度为 0.206 9 mg·mL⁻¹ 的溶血磷脂酰胆碱对照品溶液, 精密量取 20 μL, 连续进样 6 次, 测定峰面积, 计算得 RSD 为 0.36%, 说明仪器精密度良好, 能满足溶血磷脂酰胆碱测定的要求。

2.7 稳定性试验

在供试品溶液配制后的 0, 1, 2, 3, 5, 8, 12, 18 h 各精密量取 20 μL , 注入液相色谱仪, 测定峰面积, 计算得 RSD 为 0.26%, 说明本供试品溶液在室温条件下放置 18 h 内是稳定的。

2.8 重复性试验

取同一批样品(批号: 12042)6 份, 按“2.2.2”项下方法制备, 分别进样 20 μL , 测定峰面积, 按回归方程计算得到该批样品中溶血磷脂酰胆碱的含量为 0.89 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, RSD 为 0.27%($n=6$), 说明样品测定重复性良好。

2.9 回收率试验

精密量取样品(批号: 12042, 溶血磷脂酰胆碱含量为 0.89 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)5 mL, 置 25 mL 量瓶中, 加稀释剂异丙醇-正己烷(5:2)定容, 摇匀, 精密量取 5 mL, 置 10 mL 量瓶中, 分别精密量取 2, 3, 4 mL 溶血磷脂酰胆碱对照品储备液, 加入上述 10 mL 量瓶中, 制备低(80%)、中(100%)、高(120%) 3 个浓度的溶液, 加稀释剂异丙醇-正己烷(5:2)定容, 摇匀, 每个浓度制备 3 份, 分别进样 20 μL , 测定峰面积, 按回归方程计算溶血磷脂酰胆碱的浓度, 根据样品中溶血磷脂酰胆碱的含量和加入的溶血磷脂酰胆碱的量, 计算平均回收率为 100.3%, RSD 为 0.54%($n=9$), 结果见表 1, 表明本方法能够准确测定制剂中溶血磷脂酰胆碱的含量。

表 1 回收率试验结果

Tab 1 The recovery of lysophosphatidylcholine

原有量/ mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
0.89	0.827 6	1.721 5	100.5		
0.89	0.827 6	1.725 0	100.9		
0.89	0.827 6	1.712 7	99.4		
0.89	1.241 4	2.141 9	100.8		
0.89	1.241 4	2.134 7	100.3	100.3	0.54
0.89	1.241 4	2.133 7	100.2		
0.89	1.655 2	2.539 5	99.7		
0.89	1.655 2	2.547 2	100.1		
0.89	1.655 2	2.561 1	101.0		

2.10 检测限和定量限

取“2.5”项下浓度为 0.020 69 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液, 精密量取 20 μL 进样, 记录色谱图, 按信噪比 3:1, 计算得其检测限为 0.12 μg , 按信噪比 10:1, 计算得其定量限为 0.40 μg ($n=3$)。

2.11 样品中溶血磷脂酰胆碱的测定

按照拟定的色谱条件和测定方法, 测得本实

验室自制 3 批样品中溶血磷脂酰胆碱的含量分别为 0.89, 0.81, 0.79 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

3 讨论

3.1 检测方法的选择

文献报道, 测定溶血磷脂酰胆碱的方法有 HPLC、TLC 和 ^{31}P -NMR 等^[2]。其中, TLC 法设备简单、结果直观、价格低廉, 但操作繁琐, 测定重复性和准确度较差; ^{31}P -NMR 分辨率高, 定性鉴别和定量测定能力强, 但测试费用高昂, 难以广泛应用; HPLC 操作方便, 结果准确, 仪器及方法易于推广, 是当前测定溶血磷脂酰胆碱最常用的方法。

在参考和比较相关文献^[3-6, 8-13]的基础上, 结合本制剂的特点, 经过摸索和优化, 本实验室最终选择 HPLC-ELSD 测定本乳剂中溶血磷脂酰胆碱的含量。

3.2 液相条件的确定

英国药典(2010)Propofol Injection 药品标准中测定溶血磷脂酰胆碱的液相条件如下: 紫外检测器(检测波长 210 nm), 十八烷基键合硅胶色谱柱(Nucleosil C_{18}), 流动相为磷酸-水-乙腈(7:200:300)^[4]。本实验室曾经采用该方法, 但由于溶血磷脂酰胆碱的紫外吸收弱, 属末端吸收, 且本制剂成分复杂, 溶血磷脂酰胆碱与其他成分分离效果不理想, 造成检测灵敏度低, 结果不准确, 重复性差。

美国药典(USP 34-NF 29)Egg Phospholipids 药品标准的液相条件如下: 蒸发光散射检测器, 丙二醇键合硅胶色谱柱(125 mm $\times$ 4 mm, 5 μm), 流动相 A 为正己烷-异丙醇-醋酸-三乙胺(1 341.6:334.1:39.4:1.45), 流动相 B 为异丙醇-水-醋酸-三乙胺(663.5:140.0:15.8:0.58), 梯度洗脱^[5]; 中国药典(2010 年版)蛋黄卵磷脂^[6]药品标准的液相条件如下: 蒸发光散射检测器, 硅胶色谱柱(250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm), 流动相 A 为甲醇-水-冰醋酸-三乙胺(85:15:0.45:0.05), 流动相 B 为正己烷-异丙醇-流动相 A(20:48:32), 梯度洗脱^[6]。两种方法的流动相成分较为接近, 且梯度洗脱程序均比较复杂。实验过程中发现, 流动相中甲醇和水的比例增大, 且正己烷和异丙醇的比例减少, 磷脂酰胆碱和溶血磷脂酰胆碱的出峰时间均提前。通过不断调节流动相中各成分的比例, 使溶血磷脂酰胆碱与制剂中其他成分得以分离。最终

确定流动相 A 为甲醇-水-冰醋酸-三乙胺(850 : 150 : 4.5 : 0.5), 流动相 B 为甲醇-水-冰醋酸-三乙胺-正己烷-异丙醇(385 : 68 : 2 : 0.23 : 160 : 384), 等度洗脱, A : B = 30 : 70。在本液相条件下, 溶血磷脂酰胆碱峰形良好, 与其他成分的分度度高, 检测时间短。

3.3 乳剂中溶血磷脂酰胆碱的限度

对于含磷脂类的脂肪乳注射剂中溶血磷脂酰胆碱的限度控制, 目前国内外尚未有统一的标准。

《脂肪乳注射液(C14~24)国家药典委员会修订征求意见稿》中规定溶血磷脂酰胆碱限度不得大于 $1.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。而英国药典(2010)Propofol Injection 药品标准中则规定溶血磷脂酰胆碱限度不得大于 $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ^[4]。鉴于溶血磷脂酰胆碱可能对人体造成的巨大危害, 且考虑到溶液状态下的卵磷脂可能会发生部分水解, 在贮藏过程中溶血磷脂酰胆碱的含量有可能增加^[2-3], 为保证临床用药的安全, 本实验室拟采用严格的质量标准, 规定本制剂中溶血磷脂酰胆碱限度不得大于 $1.2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

3.4 本测定方法在其他脂肪乳注射剂的应用

本实验室曾经将本测定方法应用于其他自制的含磷脂类的脂肪乳注射液中溶血磷脂酰胆碱的检测, 结果表明, 只要对流动相 A 和流动相 B 的比例进行适当调节, 使溶血磷脂酰胆碱与其他成分分离, 即可准确测定制剂中溶血磷脂酰胆碱的含量。说明本测定方法不仅灵敏准确, 专属性强, 而且通用性好, 可用于含磷脂类的脂肪乳注射液的质量控制。

REFERENCES

- [1] LI Y D, GU K N. Properties and application of lysophospholipids [J]. Cereals and Oils Processing(粮油加工), 2007(4): 55-57.
- [2] ZHANG Z, CHEN H F. Control of Lysophospholipids in the lipid products [J/OL]. <http://www.cde.org.cn/dzkw.do?method=largePage&id=1521>
- [3] XIE J, LIU W Y, ZHOU J P. Determination of lysophosphatidylcholine in soybean phospholipid by HPLC-ELSD assay [J]. Chin J New Drugs(中国新药杂志), 2010, 19(3): 243-245
- [4] BP 2010 [S]. Propofol Injection.
- [5] USP 34-NF 29(2011) [S]. Egg Phospholipids.
- [6] Ch.P(2010)Vol II (中国药典 2010 年版. 二部) [S]. 2010: 1228-1230.
- [7] HUANG Y, YANG L, WANG X Y, et al. TLC building of lysophosphatidyl choline in fat emulsion injection and phospholipids [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2010, 30(12): 2334-2337.
- [8] JIANG L, CHEN L, LIU Y X, et al. Determination of related substances in soybean phosphatidylcholine injection by HPLC-ELSD [J]. Prog Pharm Sci(药学进展), 2007, 31(8): 366-369.
- [9] LING L X, YANG S J, LANG T. Determination of lysophosphatidylcholine in soybean phospholipid [J]. Asia-Pacific Tradit Med(亚太传统医药), 2009, 5(1): 35-36.
- [10] WANG W, ZHANG T, ZHOU L C. Determination of several components in the soybean phospholipid by HPLC-ELSD [J]. Cap Med(首都医药), 2002(8): 49-50.
- [11] ZENG W S. HPLC-ELSD determination of phosphatidylcholine in phospholipid cholesterol complex lipids [J]. Chin J Pharm Anal(药物分析杂志), 2007, 27(5): 700-702.
- [12] ZENG L G. Determination of lysophosphatidyl choline in Polyene phosphatidylcholine capsule by HPLC [J]. West Chin J Pharm Sci(华西药学杂志). 2010, 25(2): 215-216.
- [13] WANG J X, HUANG G L, CHEN X L, et al. Determination of phosphatidylcholine and lysophosphatidylcholine in soybean phospholipids by HPLC [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2011, 28(6): 564-566.