

- J Shenyang Pharm Univ(沈阳药科大学学报), 2009, 26(7): 517-522.
- [5] QU J J, FENG S H, LI K Y. Preparation and quality evaluation of Artemisinin Liposomes [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药学), 2011, 28(3): 251-256.
- [6] TONG G H, LIU C M, LIU W, et al. Preparation and stability of folic acid liposomes [J]. Food Sci(食品科学), 2010, 31(20): 178-182.
- [7] YAN F. Oscillation and Gibbs-Donnan equilibrium of Na^+ and K^+ concentrations inside and outside the liposome [D]. Hangzhou: Zhejiang Gongshang University, 2008.
- 收稿日期: 2013-03-30

HPLC-ELSD 测定多西他赛注射用浓溶液中溶血磷脂酰乙醇胺、溶血磷脂酰胆碱的含量

杨俊, 谢俊* (金陵药业股份有限公司技术中心, 南京 210009)

摘要: 目的 建立同时测定多西他赛注射用浓溶液中的溶血磷脂酰乙醇胺(LPE)、溶血磷脂酰胆碱(LPC)含量的 HPLC-ELSD。方法 采用 YMC Pack PVA-Sil(150 mm×2 mm, 5 μm)色谱柱, 以三氯甲烷为流动相 A、甲醇-水(93.5:6.5)为流动相 B, 梯度洗脱, 流速为 0.4 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 柱温为 25 $^{\circ}\text{C}$, 蒸发光散射检测器检测, 检测器漂移管温度: 100 $^{\circ}\text{C}$, 雾化气: 空气, 气体流量为 2.0 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ 。结果 LPE 和 LPC 峰面积的对数与相应的浓度的对数呈良好的线性关系, 线性范围分别为 0.203~0.811 μg ($r=0.999\ 0$)和 0.407~6.102 μg ($r=0.999\ 6$), LPE 3 个浓度的平均加样回收率分别为 104.1%, 95.1%, 101.6%, RSD 分别为 3.8%, 0.3%, 2.4%, LPC 3 个浓度的平均回收率分别为 108.7%, 104.5%, 105.5%, RSD 分别为 1.0%, 3.0%, 2.6%。结论 该法简单、准确、重复性好, 可用于多西他赛注射用浓溶液中大豆磷脂分解产物的质量控制。

关键词: 多西他赛注射用浓溶液; 溶血磷脂酰乙醇胺; 溶血磷脂酰胆碱; 高效液相色谱-蒸发光散射法; 含量测定

中图分类号: R917.101 文献标志码: B 文章编号: 1007-7693(2013)11-1210-05

Determination of Lyso-phosphatidylethanolamine and Lyso-phosphatidylcholine in Docetaxel Concentrated Solution for Injection

YANG Jun, XIE Jun* (Research Institute of Jinling Pharmaceutical Co., Ltd., Nanjing 210009, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To develop an HPLC-ELSD method for the determination of lyso-phosphatidylcholine(LPC) and lyso-phosphatidylethanolamine(LPE) in Docetaxel Concentrated Solution for Injection. **METHODS** It was separated with YMC Pack PVA-Sil(150 mm×2 mm, 5 μm) by gradient elution with chloroform as mobile phase A and methanol-water (93.5:6.5) as mobile phase B at a flow rate of 0.4 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. The column temperature was kept at 25 $^{\circ}\text{C}$ for separation. The detector was ELSD, of which the drift tube temperature was maintained at 100 $^{\circ}\text{C}$ and the flow rate of carrier gas air was kept at 2.0 $\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. **RESULTS** The linear response was calculated by logarithm. The calibration curves were linear in the range of 0.203~0.811 μg ($r=0.999\ 0$) for LPE and 0.407~6.102 μg ($r=0.999\ 6$) for LPC. The average recovery for LPE was 104.1%, 95.1%, 101.6%, RSD=4.6%; and the average recovery for LPC was 108.7%, 104.5%, 105.5%, RSD=2.7%. **CONCLUSION** The established method is simple, accurate and reproducible, which can be used for the quality control of Docetaxel Concentrated Solution for Injection.

KEY WORDS: Docetaxel Concentrated Solution for Injection; lyso-phosphatidylethanolamine; lyso-phosphatidylcholine; HPLC-ELSD; content determination

多西他赛是临床现有药物中治疗转移乳腺癌(MBC)和非小细胞肺癌(NSCLC)最有效的首选化

疗药物。多西他赛脂溶性高, 几乎不溶于水, 目前多西他赛市售剂型(Taxotere[®])为普通注射液, 该

基金项目: 南京市科技发展计划(201103025)

作者简介: 杨俊, 女, 硕士, 主管药师 Tel: (025)83118526
主任药师 Tel: (025)83118529 E-mail: pisces314@sohu.com

E-mail: Cherry3359_cn@sina.com.cn *通信作者: 谢俊, 男, 博士, 副

制剂直接将药物溶解于吐温 80 中制得(药物:吐温 80=1:26),临用前用含乙醇为 13%的专用溶剂复溶。近年来,随着现代药剂学的发展和对肿瘤研究的不断深入,国内外学者研制了多种多西他赛的新型给药系统,如纳米粒、聚合物胶束、微乳、脂质体等。本实验室应用磷脂囊泡增溶特性设计了多西他赛新型药物给药系统。本品系遵照磷脂囊泡自发形成原理,通过两亲性表面活性剂(磷脂)和非离子型表面活性剂的复配方式实现本品在水性介质中快速形成纳米分散体系,故将其命名为多西他赛注射用浓溶液(2 mL:40 mg)。该给药体系属热力学稳定体系,可显著提高难溶性药物的有效载药量。

本品处方中有大量的大豆磷脂。由于大豆磷脂富含不饱和脂肪酸,在制剂制备、贮藏过程中易被氧化、水解,从而产生一系列过氧化脂质,影响其生理活性。溶血磷脂酰乙醇胺、溶血磷脂酰胆碱是大豆磷脂的主要分解产物。鉴于大豆磷脂分解产物的以上特性,且本品为注射剂,更应严格控制其分解产物的量。故笔者参考有关文献^[1-2],采用高效液相色谱-蒸发光散射检测器,对多西他赛注射用浓溶液中的溶血磷脂酰乙醇胺、溶血磷脂酰胆碱进行了检查。

1 仪器与试药

Waters 2690 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司),Alltech 2000 型蒸发光散射检测器;XWK-III 无油空气泵(天津市津分分析仪器制造有限公司)。

磷脂酰胆碱对照品(PC,含量 99%,批号:110M5210V),磷脂酰乙醇胺对照品(PE,含量 98%,批号:017K5205),磷脂酰肌醇对照品(PI,含量 99%,批号:BCBB4609),鞘磷脂对照品(SM,含量 98%,批号:BCBF4085V),溶血磷脂酰胆碱对照品(LPC,含量 99%,批号:011M5205V),溶血磷脂酰乙醇胺对照品(LPE,含量 99%,批号:120M1719V),均为 Sigma 公司产品。三氯甲烷、甲醇、甲酸及三乙胺均为色谱纯。

多西他赛注射用浓溶液(自制,批号:20120223,规格:2 mL:40 mg);大豆磷脂(上海太伟药业股份有限公司,批号:20110703)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:YMC Pack PVA-Sil(150 mm×2 mm,

5 μm);流动相:以三氯甲烷为流动相 A,以甲醇-水(93.5:6.5)为流动相 B,在两相中分别加入 0.5%的甲酸和等摩尔三乙胺的混合溶液;梯度洗脱,0 min,0%B;12 min,20%B;17 min,35%B;20 min,60%B;21~25 min,0%B;流速:0.4 mL·min⁻¹;柱温:25 $^{\circ}\text{C}$;进样量:20 μL ;蒸发光散射检测器的雾化气为空气,蒸发管温度为 100 $^{\circ}\text{C}$,气体流量为 2.0 L·min⁻¹。

2.2 系统适用性试验

取 PC、LPE、SM、LPC 各适量,用三氯甲烷-甲醇(2:1)溶解并定量稀释制成每 1 mL 分别含上述对照品 200,100,200,200 μg 的混合溶液,取上述溶液 20 μL 注入液相色谱仪,各成分按上述顺序依次洗脱,各成分峰之间的分离度均>1.5,理论板数按溶血磷脂酰乙醇胺及溶血磷脂酰胆碱计算分别为 6 083,6 476。色谱图见图 1。

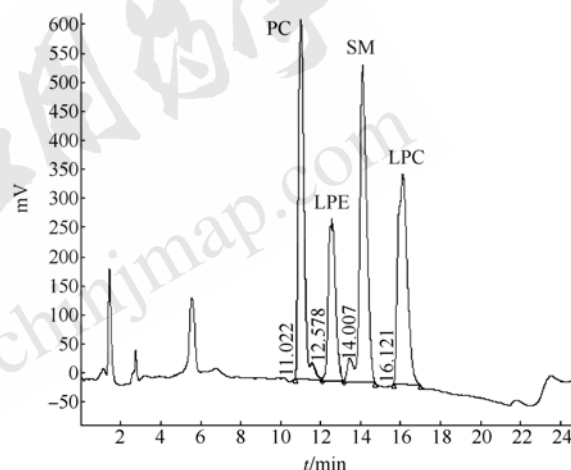


图 1 系统适用性图谱

Fig 1 Chromatogram of system suitability solution

2.3 供试品溶液的制备

精密量取本品 0.4 mL,置 25 mL 量瓶中,用三氯甲烷-甲醇(2:1)溶解并稀释至刻度,摇匀,作为供试品溶液。

2.4 专属性试验

本品中除大豆磷脂外的原辅料和酸、碱、氧化、高温、强光破坏试验中产生的其他杂质均不影响注射液中 LPE、LPC 的检测;本品易受碱破坏;本品经各种条件破坏试验后产生的杂质主要为 LPC,与大豆磷脂单独破坏结果相近。结果表明,拟定的方法专属性较强,适宜于本品中 LPC、LPE 的检查。结果见表 1、图 2、图 3。

表 1 样品和大豆磷脂破坏试验结果

Tab 1 Results of degradation tests for samples and soya lecithins

样品名称	其他杂质 (除 LPE、 LPC 外) 个数	其他杂质 (除 LPE、 LPC 外) 峰面积百 分比总和/%	LPE 峰面积 百分比/ %	LPC 峰面积 百分比/ %
未破坏样品	0	0.00	0.00	3.59
酸破坏样品	0	0.00	0.00	3.72
碱破坏样品	0	0.00	0.00	6.31
氧化破坏样品	1	1.15	0.00	3.73
高温破坏样品	0	0.00	0.00	4.08
强光破坏样品	0	0.00	0.00	3.66
大豆磷脂	0	0.00	0.00	6.18
酸破坏大豆磷脂	0	0.00	0.00	6.13
碱破坏大豆磷脂	0	0.00	0.00	10.69
氧化破坏大豆磷脂	2	3.22	0.00	7.72
高温破坏大豆磷脂	0	0.00	0.00	8.74
强光破坏大豆磷脂	0	0.00	0.00	6.26

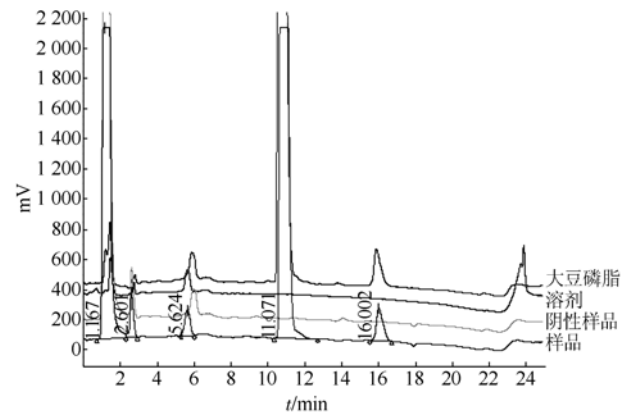


图 2 大豆磷脂、溶剂、阴性样品和样品的色谱图

Fig 2 Comparative chromatograms of soya lecithin, solvent, negative sample and sample

2.5 线性关系考察

取 LPE 与 LPC 对照品各适量, 用三氯甲烷-甲醇(2:1)溶解并定量稀释制成每 1 mL 含 LPE 分别为 10, 15, 20, 30, 40 μg , 含 LPC 分别为 20, 60, 100, 200, 300 μg 的溶液, 作为对照品溶液。

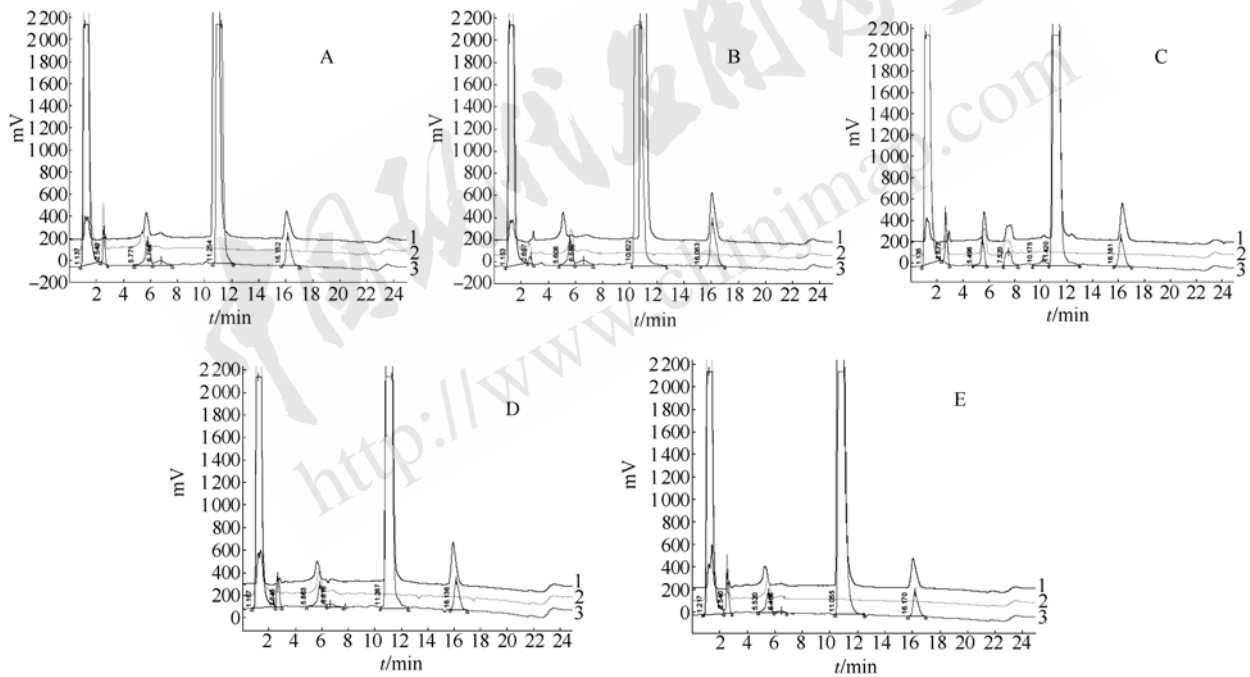


图 3 破坏性试验色谱图

A-酸破坏; B-碱破坏; C-氧化破坏; D-高温破坏; E-强光破坏; 1-大豆磷脂; 2-阴性样品; 3-样品

Fig 3 Chromatogram of stressing tests

A-acidic degradation; B-basic degradation; C-oxidative degradation; D-high temperature degradation; E-photolysis degradation; 1-soya lecithin; 2-negative; 3-sample

精密量取各对照品溶液 20 μL , 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 以对照品溶液浓度(C)的对数值与相应的峰面积(A)对数值计算回归方程, 结果 LPE 的线性方程为 $\ln C = 1.0093 \times \ln A - 10.8860$, $r = 0.9990$,

线性范围为 0.203~0.811 μg ; LPC 的线性方程为 $\ln C = 0.8313 \times \ln A - 8.0581$, $r = 0.9996$, 线性范围为 0.407~6.102 μg 。

2.6 重复性试验

由于样品中 LPE 的含量小于检测限, 为考察本法的精密度, 本试验采用样品加 LPE 对照品的方式配制供试品溶液进行测定。取同一批已知含量的样品 0.4 mL, 置 25 mL 量瓶中, 每份分别加入适量的 LPE 对照品溶液, 用三氯甲烷-甲醇(2:1)溶解并稀释至刻度摇匀, 制备供试品溶液 6 份, 分别进样测定。结果供试品溶液中 LPE、LPC 含量的 RSD 分别为 1.92%, 1.92%。

2.7 回收率试验

依据大豆磷脂质量标准(中国药典 2010 年版)中 LPE 的限度和多西他赛注射用浓溶液中大豆磷脂的处方用量, 确立了回收率试验中 100%LPE 测定浓度。分别精密量取已知含量的本品 0.4 mL、LPE 对照品溶液适量, 置 25 mL 量瓶中, 用三氯甲烷-甲醇(2:1)溶解并稀释至刻度, 制成样品中含 LPE 测定浓度 50%, 100%, 150%的溶液各 3 份, 进样测定, 计算回收率, 结果 LPE 的 3 个浓度见表 2。

表 2 溶血磷脂酰乙醇胺回收率试验结果

Tab 2 Results of recovery for LPE

试验水平	加入量/ mg	样品量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回收率/ %	RSD/ %
50%	0.251 4	0	0.258 9	103.0	104.1	3.8
	0.251 4	0	0.253 4	100.8		
	0.251 4	0	0.272 6	108.4		
100%	0.502 8	0	0.479 5	95.4	95.1	0.3
	0.502 8	0	0.477 2	94.9		
	0.502 8	0	0.477 7	95.0		
150%	0.754 2	0	0.744 8	98.8	101.6	2.4
	0.754 2	0	0.775 3	102.8		
	0.754 2	0	0.778 8	103.3		

分别精密量取已知含量的本品 0.2 mL、LPC 对照品溶液适量, 置 25 mL 量瓶中, 用三氯甲烷-甲醇(2:1)溶解并稀释至刻度, 制成样品中含 LPC 测定浓度 80%, 100%, 120%的溶液各 3 份, 进样测定, 计算回收率, 结果见表 3。

表 3 溶血磷脂酰胆碱回收率试验结果

Tab 3 Results of recovery for LPC

试验水平	加入量/ mg	样品量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回收率/ %	RSD/ %
80%	1.055 0	1.68	2.833 6	109.3	108.7	1.0
	1.055 0	1.68	2.814 3	107.5		
	1.055 0	1.68	2.833 2	109.3		
100%	1.793 5	1.68	3.583 5	106.1	104.5	3.0
	1.793 5	1.68	3.5908	106.5		
	1.7935	1.68	3.490 8	101.0		
120%	2.532 0	1.68	4.274 5	102.5	105.5	2.6
	2.532 0	1.68	4.368 7	106.2		
	2.532 0	1.68	4.410 7	107.8		

2.8 溶液稳定性

分别精密量取已知含量的本品 0.4 mL 及 101.38 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPE 对照品溶液适量, 置 25 mL 量瓶中, 用三氯甲烷-甲醇(2:1)溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 8, 12 h 进样。结果, 供试品溶液中 LPE、LPC 峰面积值的 RSD 分别为 1.7%、1.0%, 表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.9 定量限和检测限

将 202.75 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPE 和 1.017 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ LPC 的对照品溶液逐步稀释, 按“2.1”项下色谱条件测得 LPE 和 LPC 的定量限(S/N 约为 10)分别为 0.203 μg ($n=6$, RSD=3.3%)和 0.407 μg ($n=6$, RSD=4.7%), 最低检测限(S/N 约为 3)分别为 0.142, 0.162 μg 。

2.10 样品含量测定

精密量取各对照品溶液 20 μL , 分别注入液相色谱仪, 记录色谱图, 以对照品溶液浓度的对数值与相应的峰面积对数值计算回归方程; 另精密量取供试品溶液 20 μL , 注入液相色谱仪, 记录色谱图, 由回归方程计算 LPE 与 LPC 的含量, 结果 LPE 含量小于检测限, LPC 含量为 0.84%。

3 讨论

3.1 色谱条件筛选

在液相条件筛选过程中, 选用大豆磷脂质量标准(中国药典 2010 年版)中有关物质的色谱条件^[1]正相硅胶柱分离本品, 结果显示本品中的辅料 A 干扰了 LPE 的检测, 且 LPE 的平均回收率 >120%, 无法满足药品质量标准要求; 以三氯甲烷-甲醇-氨水-水体系正相硅胶柱分离本品^[3], 各磷脂对照品组分之间的分离度良好, 溶剂及本品中除大豆磷脂外的原辅料对检测无干扰, 但由于磷脂对照品多为从天然产物中提取的混合物, 在色谱图中 LPE、LPC 色谱峰分叉, 不利于色谱峰准确积分定量, 故不予以采用; 参考文献方法^[4], 采用氨基键合硅胶柱分离本品, 经色谱条件优化后仍无法将 LPE 和 LPC 完全分离; 参考文献方法^[2]的色谱条件并对其调整后, 各磷脂对照品组分之间的分离度均符合规定, 且溶剂、本品中除大豆磷脂外的原辅料及破坏产生的其他杂质均不干扰 LPE 和 LPC 的检测; 通过以上液相条件筛选结果显示, 采用 YMC Pack PVA-Sil 柱, 以三氯甲烷-甲醇-水为流动相, 更适合本品 LPE 和 LPC 的同时检测。

由于 YMC-Pack PVA-Sil 色谱柱的聚乙烯醇硅胶体的表面活力较强, 不易受水相的影响, 故在流动相中增加水相比比例, 可以提高各磷脂成分的洗脱能力, 缩短分析时间。研究结果显示, 随着水相比比例增加, PC 与 LPE 分离度逐步提高而 LPE 与 SM 的分离度却随之降低, 当采用甲醇-水比例为 93.5 : 6.5、低流速洗脱及柱温 25 ℃时, 各磷脂成分峰的分离效果良好且各峰理论板数均 >3 000; 试验了 0.25%, 0.5%, 1.0% 的甲酸溶液, 结果随着甲酸浓度的增加, 各个色谱峰峰形改善但分离效果变差, 因此选择 0.5% 甲酸溶液; 试验了 0.5, 0.4, 0.3 mL·min⁻¹ 的流速, 结果随着流速的降低, 峰形变差、保留时间延长、各磷脂成分峰的分离度增加、灵敏度降低, 因此选择流速 0.4 mL·min⁻¹。

参考大豆磷脂(中国药典 2010 年版)质量标准, 选用其有关物质检查项下的系统适用性溶液, 注入液相色谱仪, 结果 PI、PE、PC、LPE、SM、LPC

各成分依次洗脱, 且各成分峰之间的分离度均 >1.5, PI、PE 色谱峰与 LPE、LPC 色谱峰不相邻, 故选取 PC、SM 与 LPE、LPC 组成本法的系统适用性溶液, 以保证系统运行正常。在本色谱条件下, 重复性试验色谱图中 PC 色谱峰与 LPE 色谱峰达到基线分离, 分离度 >1.5, 表明此系统适用性溶液适合于本法。

3.2 专属性试验

本法专属性试验结果表明, 本品更易受碱、高温、氧破坏, 提示本品需充氮密封低温保存。

3.3 测定结果比较

分别采用本色谱条件及大豆磷脂质量标准(中国药典 2010 年版)有关物质测定方法, 测定本品、大豆磷脂中的 LPE 和 LPC, 结果见表 4。结果显示, 2 种方法的测定结果差异不大, 且本法明显缩短了样品的分析时间, 并能同时测定本品中的 LPE、LPC 含量, 表明本法测定结果准确可靠、更适合本品及大豆磷脂中 LPE 和 LPC 的检测。

表 4 不同色谱条件分析结果

Tab 4 Results of different chromatographic conditions for samples and soya lecithins

分离条件	色谱柱	分析时间/ min	大豆磷脂/%		样品(批号: 20120223)/%	
			LPE	LPC	LPE	LPC
本色谱条件	YMC Pack PVA-Sil 柱(150 mm×2 mm, 5 μm)	25	小于检测限	3.44	小于检测限	0.84
中国药典 2010 年版	Alltech 硅胶柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)	41	小于检测限	3.08	辅料 A 干扰, 无法测定	0.82

中国药典 2010 年版首次收录了大豆磷脂的质量标准, 规定含 PC 应 ≥45.0%, 含 PE 应 ≤30.0%, 含 LPC ≤3.5%, 含 LPE ≤0.5%。大豆磷脂按中国药典 2010 年版质量标准检验, PC 含量为 86.2%, PE 未检出; LPE 是 PE 的酯键水解或酶解产生的化合物, 故 LPE 在大豆磷脂和制剂均未检出, 破坏未见有变化。大豆磷脂的主要成分为 PC, 但当大豆磷脂纯度级别较低时, 其中的 PE 含量会较高, 所以除了 LPC, 还需要对其中的 LPE 的量进行控制。为保证制剂的安全可靠, 本实验还需要采用多个批次的原辅料制备样品以便积累更多的数据指导本品大豆磷脂分解产品的质量控制。

REFERENCES

- [1] Ch.P(2010)Vol II (中国药典 2010 年版. 二部) [S]. 2010: 1183-1184.
- [2] LAURA R G, CATHERINE D, KAREN G, et al. Phospholipid hydrolysis in a pharmaceutical emulsion assessed by physicochemical parameters and a new analytical method [J]. Eur J Pharm Biopharm, 2005, 61(1/2): 69-76.
- [3] YE X M, TIAN S J, LI H Y, et al. Determination of seven phospholipid components in porcine pulmonary surfactant and its lyophilized powder by HPLC-ELSD method [J]. Chin Pharm J(中国药学杂志), 2007, 42(12): 938-942.
- [4] LIU W Y, XIE J, ZHOU J P, et al. An HPLC-ELSD method for assay of impurity in HCPT liposome for injection [J]. Strait Pharm J(海峡药学), 2009, 21(8): 38-40.

收稿日期: 2013-04-25