

- [7] YAN, Y, CHAI C Z, WANG D W. Simultaneous determination of puerarin, daidzin, daidzein, paeoniflorin, albiflorin, liquiritin and liquiritigenin in rat plasma and its application to a pharmacokinetic study of Ge-Gen Decoction by aliquid chromatography-electrospray ionization-tandem massspectrometry [J]. J Pharm Biomed Anal, 2014(95): 76-84.
- [8] YANG W, LIU M, ZHANG J. Simultaneous and sensitive determination of xanthotoxin, psoralen, isoimipinellin and bergapten in rat plasma by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry [J]. J Chroma B, 2010(878): 575-582.
- [9] KUNO T, YOKOHIRA M, MATSUDA Y, et al. Lack of modifying potential of 8-methoxypsoralen in the promotion or progression stages of lung carcinogenesis in A/J female mice [J]. Oncol Rep, 2008, 20(4): 767-782.
- [10] 孙永林, 曹旸, 余海忠, 等. 囊麦冬中总黄酮超声波提取最佳工艺的研究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(12): 7066-7067.
- [11] 张利. 甘草的药理作用及现代研究进展[J]. 中医临床研究, 6(10): 147-148.

收稿日期: 2016-03-25

脂肪乳注射液中磷脂酰胆碱的稳定性测定

程伟青¹, 严拯宇^{2*} (1.福建生物工程职业技术学院, 福州 350002; 2.中国药科大学理学院药物质量与安全预警教育部重点实验室, 南京 211198)

摘要: 目的 采用高效液相色谱-蒸发光散射检测器法(HPLC-ELSD)测定脂肪乳注射液中溶血磷脂酰胆碱的含量变化。方法 以丙二醇键合硅胶柱, 正己烷:异丙醇(40:60)为流动相 A, 异丙醇:水(80:20)为流动相 B, 梯度洗脱, ELSD 检测。结果 温度对本品质量影响较大, 宜在 25℃条件下贮存。结论 脂肪乳注射液在加速试验和长期试验中溶血磷脂酰胆碱的限量符合相关药品标准。

关键词: 溶血磷脂酰胆碱; 脂肪乳注射液; 高效液相色谱法; 稳定性

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2016)11-1433-04

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.11.018

Stability Investigation on Lysophosphatidylcholine in the Fat Emulsion Injection

CHENG Weiqing¹, YAN Zhengyu^{2*} (1.Fujian Vocational College of Bioengineering, Fuzhou 350002, China; 2.School of Science, China Pharmaceutical University, Key Laboratory of Drug Quality Control and Pharmacovigilance, Ministry of Education, Nanjing 211198, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE An HPLC-ELSD method was applied to determine the content changes of lysophosphatidylcholine (LPC) in fat emulsion injections. **METHODS** A propylene glycol bonded silica gel column was used, with the mobile phase A of hexane: isopropyl alcohol (40:60) and B of isopropyl alcohol: water (80:20) by gradient elution and with the application of ELSD. **RESULTS** The fat emulsion injections were unstable at high temperatures and it should be stored at about 25℃. **CONCLUSION** The limited contents of LPC in fat emulsion injections could meet the related drug standard both in the accelerated test and long-term test.

KEY WORDS: lysophosphatidylcholine; fat emulsion injections; HPLC; stability

脂肪乳注射液为机体提供能量和必需脂肪酸, 是由注射用大豆油经注射用卵磷脂乳化并加注射用甘油制成灭菌乳状液体^[1]。乳化剂卵磷脂的主要成分磷脂酰胆碱(phosphatidyl choline, PC), 发生部分水解会产生溶血磷脂酰胆碱(lysophosphatidylcholine, LPC), 游离的 LPC 与红细胞膜结合导致

溶血, 主要造成心率失常、血管内皮细胞损害等不良反应^[2-3], 因此应对其限量进行严格控制, 同时严格控制贮藏条件。

药品的稳定性考察作为药品安全性和临床疗效的指标, 主要考察光线、湿度、温度等因素对药品质量的影响, 包括影响因素试验、加速试验和长

基金项目: 福建省科技平台建设(2014Y2008)

作者简介: 程伟青, 女, 硕士生, 讲师 Tel: (0591)83741930
(025)86185150 E-mail: yanzhengyujiang@hotmail.com

E-mail: cwqdog@126.com

*通信作者: 严拯宇, 女, 博士, 教授 Tel:

期留样试验,贯穿于药品研发、上市及上市后再评价的全过程,是评价药品质量的重要内容之一。本研究主要考察脂肪乳注射液中 LPC 在不同试验条件下的稳定性,关注其含量增长情况,以及影响其含量增长的主要因素,为本品及相关药物在生产、运输、贮存条件及有效期等方面提供参考。

1 仪器与试剂

SPD-10A 高效液相色谱仪(日本 Shimadzu); 蒸发光散射检测器(ELSD, 日本 Shimadzu)。

脂肪乳注射液(四川科伦药业,规格:20%,批号:F11051902-1、F11051902-2 和 F11052001-1,分别为第 1、2、3 批);大豆油(中国食品药品检定研究院,含量:100%,批号:100277-200301);LPC(含量:99%,批号:055K5201)和磷脂酰乙醇胺(含量:99%,批号:084K1169)均购自美国 Sigma;正庚烷和异丙醇为色谱纯;水为重蒸水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件与方法学验证

色谱柱:丙二醇键合硅胶柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm);流动相为正己烷-异丙醇(40:60, A)、异丙醇-水(80:20, B),梯度洗脱程序如下:0 min 80%A, 6 min 40%A, 8.5 min 0%A, 12 min 0%A, 12.6 min 80%A, 17.0 min 80%A;流速为 1 mL·min⁻¹;检测器为 ELSD;蒸发温度为 90℃;雾化温度为 50℃;氮气流速为 2.0 L·min⁻¹;进样量为 100 μL。

本法线性范围为 8.14~81.4 μg·mL⁻¹,线性方程为 $\lg A = 1.270 \lg C + 3.540$, $r = 0.9991$;定量限(LOQ)为 4.1 μg·mL⁻¹,检测限(LOD)为 2.0 μg·mL⁻¹。重复进样 6 次, RSD 为 1.2%。加样回收率为 101.7%, RSD 为 1.8%($n=9$);供试品溶液在 24 h(0, 2, 4, 8, 12, 24 h)内稳定(RSD 为 1.4%, $n=6$);对照品溶液在 24 h(0, 2, 4, 8, 12, 24 h)内稳定(RSD 为 0.9%, $n=6$)。

2.2 专属性实验

取脂肪乳注射液 5 mL,加流动相 A 稀释 20 倍,取稀释液 5 份,每份 5 mL,各置 10 mL 量瓶中,分别进行氧化、酸、碱、光照和高温破坏试验,酸、碱破坏样品须调至 pH 值中性,用流动相 A 溶解定容,分别进样测定。色谱图见图 1。

取对大豆油、磷脂酰乙醇胺和 LPC 对照品溶液适量,流动相 A 溶解,得混合对照品溶液。进样测定,色谱图见图 1。

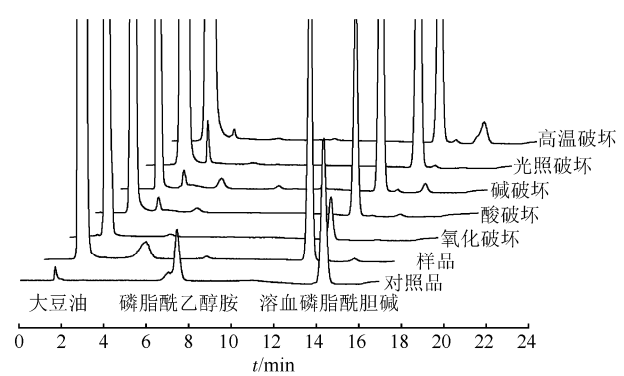


图 1 溶血磷脂酰胆碱专属性试验色谱图

Fig. 1 Specificity chromatograms of LPC for specificity test

由图 1 可见,脂肪乳注射液经酸、碱、氧化、光照和高温破坏后,降解产物与大豆油、磷脂酰乙醇胺和 LPC 均能完全分离。其中高温破坏样品的 LPC 含量急剧增加;经酸和碱破坏后, LPC 含量也有所增长。

2.3 LPC 的稳定性

2.3.1 对照品与供试品溶液的制备 对照品溶液:精密称取 LPC 对照品 20 mg,加流动相 A 为溶剂,制成浓度为 8, 16, 32, 48, 65 和 81 μg·mL⁻¹ 的 LPC 标准系列溶液。供试品溶液:取脂肪乳注射液 5 mL,置 100 mL 棕色量瓶中,加流动相 A 定容,摇匀,即得供试品溶液。精密量取对照品溶液与供试品溶液,分别进样,记录色谱图。以 $\lg C$ 为横坐标, $\lg A$ 为纵坐标,进行线性回归。每日试验时,分别代入当日工作曲线方程计算 LPC 含量。

2.3.2 影响因素试验 由于本脂肪乳注射液为密封包装,故未进行湿度影响因素试验。

取脂肪乳注射液除去外包装,置(4 500±500)lx 光照 5 和 10 d,进行强光照试验;取本品除去外包装,分别于 40 和 60℃放置 5, 10 d,进行高温试验。进样检测结果代入当日随行标准曲线,得 LPC 含量。结果见表 1。

表 1 影响因素试验结果

Tab. 1 Results of Influencing Factors ($n=2$)

时间/d	工作曲线/μg·mL ⁻¹	影响因素	LPC/mg·mL ⁻¹
0	$\lg A = 1.511 \times \lg C + 7.603$	—	0.327 7
5	$\lg A = 1.686 \times \lg C + 7.715$	40℃	0.337 4
		60℃	1.484 4
		光照	0.330 9
10	$\lg A = 1.509 \times \lg C + 7.620$	40℃	0.557 7
		光照	0.334 2

结果表明, 样品经 $(4\,500\pm500)\text{lx}$ 光照 5 和 10 d, 以及 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 5 d, LPC 含量均未见明显增加。 $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 10 d 时, LPC 含量有较大幅度增长; 而在 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 5 d, LPC 含量急剧升高; $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 10 d, 本品由白色乳状变为淡黄色, 呈水样, 破乳状, 因此未测定 LPC 含量。可见, 样品对高温不稳定。

2.3.3 加速试验 根据影响因素试验结果, 加速试验于 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下进行。取本品 3 批, 按上市包装, 分别于 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 1, 2, 3 和 6 个月。进样检测结果代入当日随行标准曲线, 得 LPC 含量, 并与 0 月结果比较。结果见表 2。

表 2 加速试验结果($n=2$)

Tab. 2 Results of accelerated tests($n=2$)

时间/ 月	工作曲线/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	第 1 批/ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	第 2 批/ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	第 3 批/ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$
0	$\lg A=1.511\times\lg C+7.603$	0.327 7	0.257 5	0.354 0
1	$\lg A=1.355\times\lg C+7.358$	0.364 9	0.254 3	0.364 3
2	$\lg A=1.719\times\lg C+7.842$	0.411 7	0.499 2	0.431 0
3	$\lg A=0.9297\times\lg C+6.470$	0.507 3	0.546 5	0.463 2
6	$\lg A=1.226\times\lg C+6.918$	0.566 6	0.545 3	0.620 0

表 2 结果表明, 样品在 $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下放置 6 个月, 3 批样品中的 LPC 含量均较 0 月有较大幅度增加, 但均未超过限度($2.0\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)^[4]。

2.3.4 长期试验 取 3 批样品, 按上市包装, 于 $(25\pm2)\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下放置 3 个月和 6 个月。进样检测结果代入当日随行标准曲线, 得 LPC 含量, 并与 0

月结果比较, 结果见表 3。

表 3 长期试验结果($n=2$)

Tab. 3 Results of long-term test($n=2$)

时间/ 月	工作曲线/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	第 1 批/ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	第 2 批/ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$	第 3 批/ $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$
0	$\lg A=1.511\times\lg C+7.603$	0.327 7	0.257 5	0.354 0
3	$\lg A=0.930\times\lg C+6.470$	0.480 6	0.447 5	0.451 8
6	$\lg A=1.226\times\lg C+6.918$	0.561 9	0.511 0	0.527 7

试验结果表明, 样品在 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 6 个月后, 3 批样品的 LPC 含量均有所增加, 且随放置时间的延长而增加, 但增加的量较加速试验($30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下放置)少, 故温度会使 LPC 在本品中的含量升高, 在生产、贮存过程中应注意控制温度。

3 讨论

根据影响因素试验、加速试验和长期试验结果可知, 温度对本品影响较大。本制剂为 O/W 型乳剂, 乳剂属于热力学不稳定的非均项体系, 总表面自由能很高。当温度超过其相转变温度时容易转相^[5], 因此在 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 放置 10 d 的条件下, 本品由白色乳状变为淡黄色, 呈水样, 破乳状。

卵磷脂作为乳化剂是一种两性化合物, 由脂肪酸甘油酯的亲油部分和亲水部分组成。在表面张力的作用下, 大量亲油部分向里, 亲水部分向外, 形成球状体。卵磷脂因含有易水解的酯键, 在溶液状态下发生部分水解产生 LPC, 反应方程式见图 2。

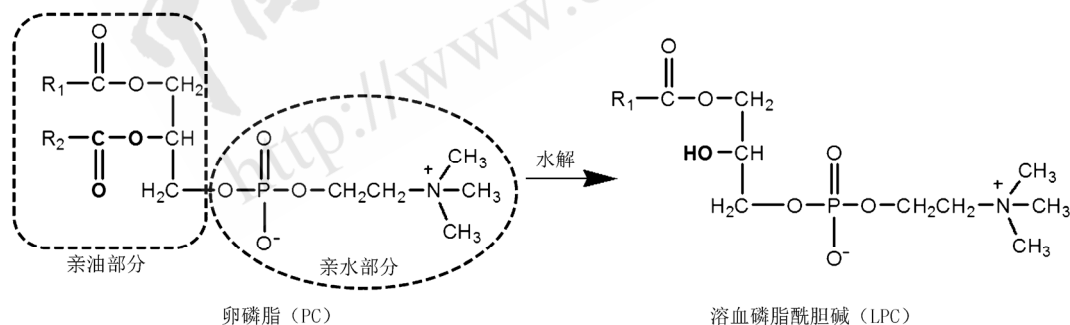


图 2 卵磷脂水解生成溶血磷脂酰胆碱的反应

Fig. 2 Hydrolysis Reaction of PC to LPC

温度对水解反应有较大影响。温度升高, 药物的水解反应速度加快, 因此该制剂在高温条件下可产生更多的 LPC。且由于温度升高导致的破乳, 使原本向里与油相接触的亲油部分的酯键暴露在水中, 水解反应更易进行, 这也是引起 LPC 含量升高的重要原因。据此, 建议贮藏条件应为 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 以下保存。但不得冰冻贮存, 以免破坏其 O/W 体系的

稳定性。

在影响因素试验中, 酸、碱破坏后 LPC 的含量也有所增加。酸、碱均可催化水解反应, 一般情况下溶液的 pH 值增大, 药物的水解反应速度加快, 即药物在碱性条件下的水解反应速度大于在酸性条件的水解速度, 因此, 在影响因素的结果中, 碱破坏后产生的 LPC 多于酸破坏的结果。

REFERENCES

- [1] ZHOU L M, ZENG S H, CHEN Y. Discussion on determination of anisidine value in fat emulsion injection [J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 2013, 44(2): 185-188.
- [2] LI L B, WANG H Y, MA L, et al. Inhibitory effect of fluvastatin on lysophosphatidylcholine-induced ventricular arrhythmias in rats [J]. J South Med Univ(南方医科大学学报), 2011, 31(4): 578-581.
- [3] SONG D J, PAN J Q, LI P X, et al. Research progress of lysophosphatidylcholines for liver diseases [J]. Chin Pharmacol Bull(中国药理学通报), 2014, 30(12): 1646-1650.
- [4] Chinese Pharmacopoeia Commission. Publicity of National Standard about Fat Emulsion Injection(C 14~24) [EB/OL] [2015-7-8]. <http://www.chp.org.cn/view/ff8080814e238d59014e6b3611c9206f?a=BZHXY>.
- [5] CHEN Y F, LU M, ZHANG B. Stability of etomidate fat emulsion injection [J]. Chin J Pharm(中国医药工业杂志), 2005, 36(5): 275-276.

收稿日期: 2016-01-30

LC-MS/MS 测定草酸右旋西酞普兰中对甲苯磺酸酯类基因毒性杂质的含量

梁键谋¹, 傅聪², 陈悦¹ (1.浙江省食品药品检验研究院, 杭州 310052; 2.宁波医药高等专科学校, 宁波 317503)

摘要: 目的 建立 LC-MS/MS 测定草酸右旋西酞普兰中对甲苯磺酸酯类基因毒性杂质的含量。方法 采用 Zorbax Eclipse XDB C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为 20 mmol·L⁻¹ 乙酸铵水溶液-乙腈, 梯度洗脱, 流速为 0.8 mL·min⁻¹; 柱温为 35 °C; 采用 Ultimate 3000 HPLC-AB Science 4000 QTrap 三重四极杆串联离子阱液质联用仪和多反应离子监测模式二级质谱 MS/MS(ESI 源)检测, 正离子模式采集数据。结果 基因毒性杂质对甲苯磺酸乙酯和对甲苯磺酸异丙酯均在 5~100 ng 内与峰面积呈良好的线性关系, 线性方程分别为 $y=1.19 \times 10^4 x - 140$ ($r=0.999\ 5$) 和 $y=1.27 \times 10^3 x - 156$ ($r=0.999\ 4$), 检测限分别为 1 ng 和 2 ng, 定量限分别为 2 ng 和 4 ng, 平均回收率分别为 99.0% 和 101.0%; RSD 分别为 3.5% 和 4.7% ($n=9$)。结论 方法简便准确, 可用于草酸右旋西酞普兰中对甲苯磺酸酯类基因毒性杂质的检测。

关键词: 草酸右旋西酞普兰; 对甲苯磺酸乙酯; 对甲苯磺酸异丙酯; 基因毒性; 液质联用

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2016)11-1436-05

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2016.11.019

Determination of Genotoxic Impurities in Escitalopram Oxalate by LC-MS/MS

LIANG Jianmou¹, FU Cong², CHEN Yue¹ (Zhejiang Institute for Food and Drug Control, Hangzhou 310052, China; 2.Zhejiang Pharmaceutical College, Ningbo 317503, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an LC-MS/MS analytical method for the determination of genotoxic impurities in escitalopram oxalate. **METHODS** The method was achieved on a Zorbax Eclipse XDB C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm) utilizing a mobile phase of 20 mmol·L⁻¹ ammonium acetate(A)-acetonitrile(B) with gradient elution at the flow rate of 0.8 mL·min⁻¹. The temperature of column was set at 35 °C. The Ultimate 3000 HPLC-AB Science 4000 QTrap Tripling Four bar LC-MS was used to detect ethyl p-toluenesulfonate and isopropyl p-toluenesulfonate(ESI source, in Multiple Reaction Monitoring positive mode). **RESULTS** Standard curve was linear in the range of 5–100 ng($r=0.999\ 9$). The limit of quantification of ethyl p-toluenesulfonate and isopropyl p-toluenesulfonate were separately 1 ng and 2 ng. The limit of detection were 2 ng and 4 ng, respectively. The average recovery of ethyl p-toluenesulfonate and isopropyl p-toluenesulfonate were 99.0% and 101.0%, RSD were 3.5% and 4.7% ($n=9$). **CONCLUSION** The method is convenient and sensitive for the determination of genotoxic impurities in escitalopram oxalate.

KEY WORDS: escitalopram oxalate; ethyl p-toluenesulfonate; isopropyl p-toluenesulfonate; genotoxic impurities; LC-MS

作者简介: 梁键谋, 男, 硕士, 主管药师

Tel: (0571)87180340

E-mail: dashi1982530@163.com