

HPLC 同时测定大豆磷脂中磷脂酰胆碱和溶血磷脂酰胆碱含量

王剑霞¹, 黄光亮¹, 陈禧翎¹, 段敏丽¹, 罗昕^{2*} (1. 广州白云山明兴制药有限公司, 广州 510250; 2. 中山大学药学院, 广州 510006)

摘要: 目的 建立同时测定大豆磷脂中磷脂酰胆碱(PC)和溶血磷脂酰胆碱(LPC)含量的方法。方法 采用高效液相色谱法, 色谱柱为 Phenomenex silica 柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm), 流动相为正己烷-异丙醇-水(5:80:20), 流速: 0.7 mL·min⁻¹, 检测波长: 206 nm, 柱温: 25 °C。结果 PC 在 0.4~2.4 mg·mL⁻¹ 内呈良好的线性关系, 平均回收率为 99.4%, RSD 为 0.40%(n=6); LPC 在 10~60 μg·mL⁻¹ 内呈良好的线性关系, 平均回收率为 98.0%, RSD 为 1.65%(n=6)。结论 本试验方法简便、重复性好、专属性强, 可作为大豆磷脂中 PC, LPC 的检测方法。

关键词: 大豆磷脂; 磷脂酰胆碱; 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(2011)06-0564-03

Determination of Phosphatidylcholine and Lysophosphatidylcholine in Soybean Phospholipids by HPLC

WANG Jianxia¹, HUANG Guangliang¹, CHEN Xiling¹, Duan Minli¹, LUO Xin^{2*} (1. Guangzhou Baiyunshan Mingxing Pharmaceutical Co., Ltd., Guangzhou 510250, China; 2. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for simultaneously determining phosphatidylcholine (PC), lysophosphatidylcholine (LPC) in soybean phospholipids. **METHODS** The HPLC system consisted of a Phenomenex silica column(4.6 mm×150 mm, 5 μm), a mobile phase of *n*-hexane-isopropanol-water(5:80:20). The flow rate was 0.7 mL·min⁻¹. Column temperature was set at 25 °C and the wavelength of detector was set at 206 nm. **RESULTS** The calibration curve was linear in the range of 0.4–2.4 mg·mL⁻¹ for PC and 10–60 μg·mL⁻¹ for LPC, respectively. The average recovery for PC was 99.4% and RSD was 0.40%(n=6). The average recovery for LPC was 98.0% and RSD was 1.65%(n=6). **CONCLUSION** The method is simple, rapid and specially. It can be used for the determination of PC and LPC in soybean phospholipids.

KEY WORDS: soybean phospholipids; phosphatidylcholine; lysophosphatidylcholine; determination

卵磷脂是静脉注射乳剂中常用的乳化剂, 根据来源可分为大豆卵磷脂和蛋黄卵磷脂。其中大豆卵磷脂的来源广泛、成本较低, 产量远大于蛋黄卵磷脂, 因此被广泛应用于静脉注射乳剂中作为乳化剂。大豆磷脂是一种混合磷脂, 主要含有磷脂酰胆碱(PC)、磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰丝氨酸(PS)、磷脂酰肌醇(PI)等成分^[1]。大豆磷脂在制备、贮藏期间均会有部分PC降解产生LPC, LPC具有溶血或改变细胞渗透性等作用, 故对大豆磷脂中LPC含量需进行严格控制。目前, 国内文献报道卵磷脂的含量测定方法有薄层扫描法、HPLC等^[2-4], 也有用HPLC-ELSD同时检测PC与LPC^[5]。其中薄层扫描法操作较繁琐, HPLC多采用含盐的流动相, 对色谱系统的寿命有一定影响, 而HPLC-ELSD要求较高, 不利于普通实验室的日常检测。本试验建立的HPLC, 可使用普通的紫外检测器同时测定大豆磷脂中PC与LPC的含量, 该方法简单、准确、

重复性好, 易于操作, 为大豆磷脂的质量控制提供了良好的定量检测方法。

1 仪器与试剂

LC-20AT型高效液相色谱仪(日本岛津公司), ER-180A型电子天平(日本A&D公司)。异丙醇、正己烷(色谱纯, 德国Merck公司), 大豆磷脂(注射用, 德国Lipoid公司), PC, LPC对照品(美国Sigma公司, 批号分别为068K5207, 106K5202, 纯度均>99%)。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为Phenomenex silica柱(4.6 mm×150 mm, 5 μm), 流动相为正己烷-异丙醇-水(5:80:20), 流速: 0.7 mL·min⁻¹, 检测波长: 206 nm, 进样量: 10 μL, 柱温: 25 °C。

2.2 溶液制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取PC, LPC对照品适量, 加溶剂正己烷-异丙醇(2:1)溶解制成含PC

作者简介: 王剑霞, 女, 硕士, 工程师 Tel: (020)84366526
Tel: (020) 39943118 E-mail: luoxin703@163.com

E-mail: wjx136@163.com

*通信作者: 罗昕, 男, 博士, 讲师

和LPC分别为 $4\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 精密量取大豆磷脂20 mg, 置10 mL量瓶中, 加溶剂正己烷-异丙醇(2:1)溶解, 稀释至刻度, 摇匀, $0.45\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜滤过, 滤液作为供试品溶液。

2.3 色谱的定性与分离

以正己烷-异丙醇-水(5:80:20)为流动相, 大豆磷脂中的PC, LPC能达到较好的分离效果。PC的理论板数为1 803, LPC的理论板数为2 233。PC的保留时间约为13 min, LPC的保留时间约为21 min。色谱图见图1。

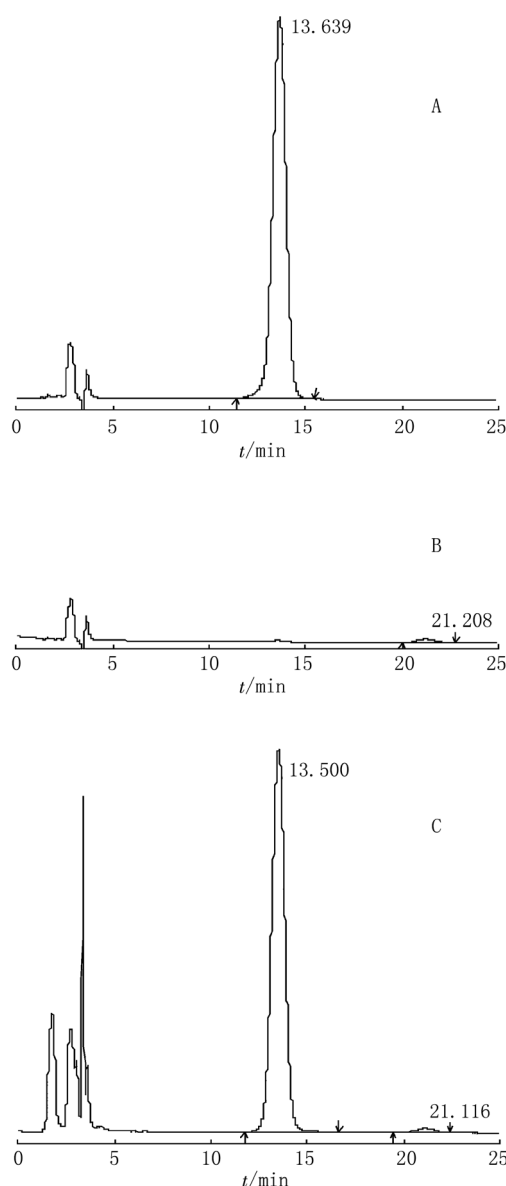


图1 高效液相色谱图

A-PC; B-LPC; C-样品

Fig 1 HPLC chromatograms

A-PC; B-LPC; C-sample

2.4 线性关系考察

分别精密吸取PC对照品($4\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)和LPC($100\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)1, 2, 3, 4, 5, 6 mL置于10 mL量瓶中, 加正己烷-异丙醇(2:1)至刻度, 进样测定, 以峰面积为纵坐标, 对照品浓度为横坐标, 进行线性回归。得PC回归方程为 $Y=9\,667\,728X-13\,280$, $r=0.999\,9$, 线性范围为 $0.4\sim 2.4\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$; LPC回归方程为 $Y=2\,962X-539$, $r=0.999\,9$, 线性范围为 $10\sim 60\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.5 最低检测限

取“2.4”项下的PC对照品溶液($0.4\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$)及LPC对照品溶液($10\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), 在“2.1”色谱条件下, 经多步稀释后进样, 记录色谱图, 信噪比约为3时, PC的最低检测限为20 ng, LPC的最低检测限为10 ng。

2.6 仪器精密度试验

精密吸取对照品溶液, 连续进样6次, 按峰面积计算, PC的RSD为0.56%, LPC的RSD为0.68%, 结果表明仪器精密度良好。

2.7 重复性试验

取同一批号供试品溶液, 按“2.2.2”项下方法平行制备6份, 按“2.1”项下色谱条件进行测定, 根据峰面积计算各成分的含量, 测得样品中PC, LPC含量的RSD分别为0.67%和0.73%。

2.8 稳定性试验

取同一批号供试品溶液, 分别于0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h进样, 根据峰面积计算PC、LPC的含量, RSD分别为0.69%和0.85%, 表明供试品溶液在12 h内比较稳定。

2.9 加样回收率试验

取已知含量的大豆磷脂(批号: 776115-2, PC含量70.8%, LPC含量1.6%)供试品, 精密称取10 mg, 6份, 分别置于10 mL量瓶中, 精密加入PC、LPC对照品溶液适量, 加正己烷-异丙醇(2:1)定容至10 mL, 摇匀, 即得。按上述色谱条件测定, 结果见表1。结果表明回收率符合规定。

2.10 样品测定

按上述方法对3批大豆磷脂样品进行含量测定, 结果见表2。

3 讨论

取PC, LPC对照品在200~400 nm内进行扫描, 发现在206 nm处, 两对照品有相对较好的紫外吸收, 因此确定检测波长为206 nm。

表 1 PC 和 LPC 的回收率($n=6$)

Tab 1 The recovery of PC and LPC($n=6$)

成分	已知量/ mg	加入量/ mg	测得总量/ mg	回收率/ %	平均 回收率/%	RSD/%
PC	7.08	7.0	14.05	99.8	99.4	0.40
	7.08	7.0	13.93	98.9		
	7.08	7.0	14.01	99.5		
	7.08	7.0	14.00	99.4		
	7.08	7.0	13.91	98.8		
	7.08	7.0	14.03	99.6		
LPC	0.16	0.15	0.298	96.1	98.0	1.65
	0.16	0.15	0.302	97.4		
	0.16	0.15	0.305	98.4		
	0.16	0.15	0.311	100.3		
	0.16	0.15	0.308	99.4		
	0.16	0.15	0.299	96.4		

表 2 样品含量测定结果($n=3$)

Tab 2 Results of sample determination ($n=3$)

批号	PC含量/ mg·mL ⁻¹	RSD/%	LPC含量/ mg·mL ⁻¹	RSD/%
776115-2	1.416	1.32	0.032	0.52
776121-1	1.424	0.84	0.030	0.92
776129-1	1.428	0.73	0.034	1.12

对流动相进行多种比例的测试,发现流动相中正己烷-异丙醇-水的比例从(5:70:30)到(5:90:10),PC的保留时间为12.2~15.3 min;流速从0.5~1.0 mL·min⁻¹,PC的保留时间为12.7~14.3 min;柱温从25℃升高到30℃、35℃,PC的保留时间提前至13.1 min和12.6 min;分离度均>1.5。在正己烷-异丙醇-水(5:80:20)这一配比情况下,PC峰与

LPC峰具有很好的分离度,且主峰与杂质峰能够有效分离。

有文献报道用不同比例的正己烷-异丙醇-醋酸盐的流动相系统可同时检测PE, PC, LPC, PI及磷脂酸等成分^[6],本试验使用的流动相以水代替醋酸盐,可延长色谱柱寿命,且使PC与LPC得到更好的分离效果,但缺点是不便于同时检测其他磷脂成分,且耗时稍长。

本试验建立的HPLC可使用普通的紫外检测器同时测定大豆磷脂中PC与LPC的含量,该方法具有良好的线性关系、准确度和精密度,为制药企业在大豆磷脂的质量控制方面提供方法简便、质量可靠的定量检测方法。

REFERENCES

[1] CAI Z, CHENG L J, JIANG C Y, et al. Recent development in soybean lecithin [J]. Technol Develop Chem Ind(化工技术与开发), 2008, 37(9): 34-37.

[2] SHAO R, WU L Q, YUN Z. Analysis of phosphatidylcholine content in soy lecithins with thin-layer chromatographic scanner [J]. Food Sci(食品科学), 2008, 29(12): 618-621.

[3] WU L Q, SHAO R, YUN Z. Analysis of phosphatidylcholine in soy lecithins by HPLC [J]. Chem Ind Times(化工时刊), 2008, 122(11): 35-37.

[4] HE X X, ZHENG X H, JIA H Y, et al. Analysis of lecithin in soybean phospholipids by HPLC [J]. Food Sci(食品科学), 2000, 21(2): 57-59.

[5] YUAN X R, QIU Z B, WANG D K. Content determination of 5 constituents in lecithin by HPLC-ELSD [J]. J China Pharm (中国药房), 2009, 20(31): 2465-2466.

[6] SUN X Y, ZHANG Y X, SU D S. HPLC determination of medicinal soybean phospholipids [J]. J Shenyang Coll Pharm (沈阳药学院学报), 1991, 8(3): 164-166.

收稿日期: 2010-07-23

本刊简介

《中国现代应用药学》创刊于 1984 年,是由中国科协主管,中国药学会主办,国内外公开发行的国家级综合性药学科期刊。本刊为中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)、《中文核心期刊要目总览》药学类核心期刊(全国中文核心期刊),并被美国国际药学文摘(IPA)、化学文摘(CA)等国际重要检索系统收录。读者、作者来源广泛,包括医院、药检部门、生产企业、学术和科研单位以及管理部门等各类医药卫生系统的单位。栏目涵概面广,包括有论著、综述、专栏,专栏包括药理、中药与天然药、药剂、药物化学、药物分析与检验、医院药学、临床、不良反应、药事管理等。

本刊能全方位多角度地反映国内药学领域的最新进展,是国内广大医药工作者发表科研成果、交流信息、更新知识的重要学术平台,也是发布药品及相关领域产品广告的重点专业期刊媒体。目前机构用户达 2693 个,国际个人读者分布在 31 个国家和地区。

为更好地服务读者,本刊可向全国各地邮局订阅,也可跨期、跨月向本刊发行部直接订阅。同时也欢迎大家踊跃投稿。