

多烯磷脂酰胆碱混合原料中 4 种磷脂的分离及溶血磷脂酰胆碱含量测定

宋玉娟¹, 韩春霞², 范慧红¹

(1. 中国药品生物制品检定所, 北京 100050 2 河南省药品检验所, 郑州 450003)

摘要 目的: 建立同时测定多烯磷脂酰胆碱混合原料中各磷脂的方法, 并用 3 种计算方法测定溶血磷脂酰胆碱 (LPC) 含量。**方法:** 采用 Lichrospher 100 Diol-5 色谱柱 (125 mm × 4.0 mm, 5 μm), 流动相 A 为正己烷-异丙醇-冰醋酸-三乙胺 (81.42: 17.00: 1.50: 0.08), 流动相 B 为异丙醇-纯水-冰醋酸-三乙胺 (84.42: 14.00: 1.50: 0.08), 梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 55℃, 用蒸发光散射检测器检测, 漂移管温度 80℃, 雾化气压力 525 Pa, 气体流速 2.0 L·min⁻¹。结果: 样品中的各磷脂均得到较好分离, 3 种数据处理方法测定的溶血磷脂酰胆碱含量结果相近。结论: 该方法简便准确, 重复性好, 可作为本品的质量控制方法。

关键词: 蒸发光散射检测器; 磷脂酰胆碱 (PC); 溶血磷脂酰胆碱 (LPC)

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)01-0070-03

Resolution of 4 lecithin from mixture of polyenephosphatidylcholine and determination of 3- sn- lysophosphatidylcholine

SONG Yu-juan¹, HAN Chun-xia², FAN Hui-hong¹

(1 National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products Beijing 100050, China

2 Henan Institute for Food and Drug Control Zhengzhou 450003 China)

Abstract Objective To establish a method to determine the four lecithin from mixture of polyenephosphatidylcholine and determine the content of 3- sn- lysophosphatidylcholine (LPC) with three calculation methods **Methods** Lichrospher 100 Diol-5 column (125 mm × 4.0 mm, 5 μm) was used. The gradient elution mobile phase consisted of two eluents: solvent A was n-hexane-2-propanol-glacial acetic acid-triethylamine (81.42: 17.00: 1.50: 0.08) and solvent B was 2-propanol-water-glacial acetic acid-triethylamine (84.42: 14.00: 1.50: 0.08). The flow rate was 1.0 mL·min⁻¹ and the column temperature was 55℃. The detector was evaporative light-scattering detector (ELSD) with temperature of drift tube for measurement 80℃, the flow rate of air 2.0 L·min⁻¹ and air carrier pressure 525 Pa. **Results** All of the lecithin were resolved well. The results of the three calculation methods of LPC had not much difference. **Conclusion** This method is simple, accurate and reproducible, can be used for the quality control of this kind of sample.

Key words ELSD; 3- sn- phosphatidylcholine (PC); 3- sn- lysophosphatidylcholine (LPC)

磷脂在临床上有多种用途, 主要作为脂肪乳的乳化剂、脂质体原料及食品添加剂, 可用于防治高胆固醇血症、动脉硬化, 治疗慢性肝炎、肝硬化, 能修复细胞、增强记忆力, 用于神经衰弱、消瘦、贫血等治疗^[1]。磷脂中磷脂酰胆碱含量的高低是判断磷脂质量好坏的主要指标, 而磷脂中的溶血磷脂酰胆碱 (LPC) 是表面活性较强的物质, LPC 含量增多, 致使红细胞发生进行性的变形和阳离子的通透增多, 最

后发生溶血。LPC 含量测定被列为磷脂有关物质检查的重要项目, 本文建立了同时测定多烯磷脂酰胆碱混合原料中各磷脂的方法, 并首次用 3 种数据处理方法测定了 LPC 含量。方法简便准确, 重复性好, 可作为本品的质量控制方法。

1 仪器与试剂

Waters 高效液相色谱仪 (含 1525 型泵及脱气装置、柱温箱、717 型进样器), Alltech ELSD 2000 蒸发

光散射检测器, AE240梅特勒电子天平, Millipore超纯水机。

对照品磷脂酰胆碱 (3-sn-phosphatidylcholine PC)、LPC、磷脂酰乙醇胺 (phosphatidylethanolamine PE)、磷脂酸 (phosphatidic acid PA) 均为 Sigma 公司产品; 正己烷、异丙醇均为色谱纯, 冰醋酸、三乙胺纯度均为 99.9%, 均为 J.T.Baker 公司产品。3 批多烯磷脂酰胆碱样品由某企业提供。

2 色谱条件

采用 LChrospher 100 Diol-5 色谱柱 (125 mm × 4.0 mm, 5 μm); 蒸发光散射检测器检测: 漂移管温度 80 °C, 雾化气压力 525 Pa 气体流速: 2.0 L·min⁻¹; 分析时间: 50 min 进样量: 10 μL; 柱温: 55 °C; 流速: 1.0 mL·min⁻¹, 流动相 A 为正己烷-异丙醇-冰醋酸-三乙胺 (81.42: 17.00: 1.50: 0.08), 流动相 B 为异丙醇-纯水-冰醋酸-三乙胺 (84.42: 14.00: 1.50: 0.08), 梯度洗脱, 详见表 1。

表 1 多烯磷脂酰胆碱混合原料的梯度洗脱条件

Tab 1 Gradient elution conditions of mixture of polyenephosphatidylcholine

时间 (time) / min	流速 (flow rate) / mL·min ⁻¹	流动相 A-B 比例 (rate of mobile phase A-B)
0	1.0	95:5
10.0	1.0	80:20
23.5	1.0	70:30
30.0	1.0	α 100
32.5	1.0	α 100
32.6	1.0	95:5
50.0	1.0	95:5

3 试液的配制

溶剂: 正己烷-异丙醇 (80:20); 磷脂储备液: 取对照品 LPC 75 mg PA 90 mg PE 50 mg 精密称定, 置 100 mL 量瓶中, 加溶剂溶解并稀释至刻度, 即得; 对照溶液 ① 精密称取对照品 PC 225 mg 加入磷脂储备液 5 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加溶剂溶解并稀释至刻度, 即得; 对照溶液 ② 精密称取对照品 PC 238 mg 加入磷脂储备液 15 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加溶剂溶解并稀释至刻度, 即得; 对照溶液 ③ 精密称取对照品 PC 251 mg 加入磷脂储备液 25 mL, 置 100 mL 量瓶中, 加溶剂溶解并稀释至刻度, 即得; 对照溶液 ④ 精密量取对照溶液 ② 和对照溶液 ③ 各 1 mL, 混匀, 即得; 对照溶液 ⑤ 精密量取对照溶液 ① 和对照溶液 ② 各 1 mL, 混匀, 即得。对照溶液 ⑥: 取对照溶液 ① 2 mL 与溶剂 1 mL 混匀, 即得; 对照溶

液 ⑦: 取对照溶液 ① 1 mL 与溶剂 2 mL, 混匀, 即得; 对照品 PC 溶液: 取对照品 PC 适量, 加溶剂 1 mL 溶解, 即得; 对照品 LPC 溶液: 取对照品 LPC 适量, 加溶剂 1 mL 溶解, 即得; 供试品溶液: 取多烯磷脂酰胆碱混合原料约 75 mg 置 25 mL 量瓶中, 加溶剂溶解并稀释至刻度, 即得。

4 多烯磷脂酰胆碱混合原料中各磷脂的分离

4.1 分离度试验 取对照溶液 ② 及供试品溶液, 分别按色谱条件测定, 结果各磷脂峰间最小分离度为 2.5。见图 1。

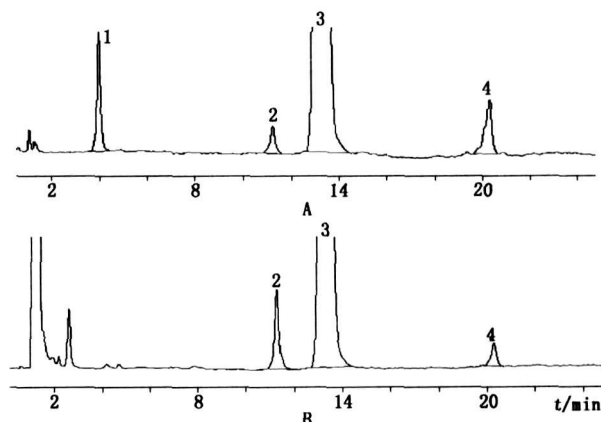


图 1 对照溶液 ② (A) 及供试品溶液 (B) 的色谱图

Fig 1 Chromatograms of standard solution ② (A) and sample solution (B)
1. PA 2. PE 3. PC 4. LPC

4.2 拖尾因子试验 取对照溶液 ②, 按色谱条件测定。结果 PA 峰、PE 峰、PC 峰、LPC 峰的拖尾因子分别为 1.07, 0.96, 0.97, 0.80。

4.3 精密度试验 取对照溶液 ②, 重复进样 7 次, 按色谱条件测定峰面积。结果 PC 及 LPC 峰面积的标准偏差均为 3%。

5 溶血磷脂酰胆碱含量测定

5.1 标准曲线的绘制 取对照溶液 ①~⑤ 分别按色谱条件测定, 并制作回归方程。采用 $\lg Y = a \lg X + b$ (Y 为响应值, X 为进样量或样品浓度, a b 为回归常数) 数学模型得:

$$\lg Y = 1.392 \lg X + 8.446 \quad r = 0.9970$$

采用二次曲线模型 ($Y = aX^2 + bX + c$) 得:

$$Y = -1 \times 10^{-13} X^2 + 5 \times 10^{-8} X + 0.0001 \quad r = 0.9979$$

进行线性回归得方程:

$$Y = 2.0 \times 10^7 X - 4.6 \times 10^3 \quad r = 0.9976$$

5.2 检测限试验 取对照溶液 ⑦, 按色谱条件测定, 测得 LPC 峰高约为基线噪音的 3 倍, 对应 LPC 的检测限为 0.125 μg。

5.3 定量限 取对照溶液 ①, 按色谱条件测定, 测

得 LPC 峰高约为基线噪音的 10 倍, 对应 LPC 的定量限为 0. 375 μg

5. 4 LPC 含量测定结果 取供试品溶液, 按色谱条件测定, 3 批样品用 3 种数据处理方法计算测定的结果见表 2。

表 2 3 批样品的 LPC 含量测定结果 (%)

Tab 2 The content results of LPC of three sample			
批号 (Lot No)	$\lg Y = a \lg X + b$	$Y = aX^2 + bX + c$	$Y = aX + b$
1	2	1. 8	1. 5
2	2. 1	1. 8	1. 6
3	1. 9	1. 8	1. 5

6 讨论

ELSD 检测最常采用的数学模型是 $\lg Y = a \lg X + b$ (Y 为响应值, X 为进样量或样品浓度, a 、 b 为回归常数)^[2], 2005 年版中国药典中所有品种均采用该模型, 也有的 ELSD 检测采用二次曲线模型 ($Y = aX^2 + bX + c$)^[3], 还有的甚至采用线性方程^[4]。模型的选择要根据样品的特性通过绘制物质的随行标准曲线来加以校正, 并且要经过方法学考察。本文用上述 3 种数据处理模型对 LPC 含量进行测定, 结果 3 种数学模型 r 值均大于 0. 99, 测定结果相近。

本文比较了不同数据处理模型对 LPC 含量测定的影响, 建立了使样品中的各磷脂均得到较好分离的方法, 该方法简便、准确, 可用于该产品的质量

参考文献

1 CHEN Miao-fen(陈妙芬), WAN Dan-jing(万丹晶), HUA Ying-xia(华瀛夏), *et al* Determination of the content of 6 components in lecithin by HPLC method(HPLC 法测定卵磷脂中六个成分的含量). *Pharm Care Res*(药学服务与研究), 2005, 5(3): 234

2 WANG Ming-juan(王明娟), HU Chang-qin(胡昌勤), JIN Shao-hong(金少鸿). Application of ELSD in pharmaceutical analysis and other fields(蒸发光散射检测器在药物分析及其它方面的应用). *Chin Pharm Aff*(中国药事), 2002, 16(7): 431

3 CAO Yu-zhen(曹雨震), DENG Hai-gen(邓海根), ZHU Hong(朱虬), *et al* Study on determination of the content of triglycerides in fat emulsions using ELSD(蒸发光散射检测器测定脂肪乳注射液中甘油三酯含量的研究). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 1995, 15(1): 38

4 GAO Qing(高青), ZHOU Li-chun(周立春), TIAN Jing(田静). Determination of mannitol and glucose in compound mannitol injection by HPLC-ELSD(HPLC-ELSD 法测定复方甘露醇注射液中甘露醇及葡萄糖的含量). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2005, 25(5): 579

(本文于 2008 年 1 月 8 日收到)