

HPLC法同时测定尼莫地平脂肪乳中溶血磷脂酰胆碱和溶血磷脂酰乙醇胺的含量^Δ

范凯燕*, 谢依侨, 夏自花, 杨帆[#](广东药科大学药学院, 广州 510006)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)24-3413-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.24.31

摘要 目的:建立同时测定尼莫地平脂肪乳中溶血磷脂酰胆碱(LPC)和溶血磷脂酰乙醇胺(LPE)含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Lichrospher Diol,检测器为蒸发光散射检测器,流动相A为正庚烷-异丙醇溶液(43:57, V/V),流动相B为正庚烷-异丙醇-水(29.5:59:11.5, V/V/V)(梯度洗脱),流速为1.5 ml/min,柱温为40 ℃,进样量为20 μl。结果:LPC和LPE的检测质量浓度线性范围为0.020 0~0.400 0 mg/ml($r=0.999\ 0$)、0.010 0~0.200 0 mg/ml($r=0.999\ 6$),LPC和LPE质量浓度的对数值与其峰面积的对数值线性关系良好;定量限分别为0.013 4、0.013 0 mg/ml,检测限分别为0.007 8、0.007 6 mg/ml;精密性、稳定性、重复性试验的RSD<2%;回收率分别为95.96%~100.63%(RSD=1.83%, $n=9$)、99.22%~101.76%(RSD=0.80%, $n=9$)。结论:该方法操作简便,可用于尼莫地平脂肪乳中有关物质的测定。

关键词 高效液相色谱法;尼莫地平脂肪乳;溶血磷脂酰胆碱;溶血磷脂酰乙醇胺;含量测定

Simultaneous Determination of Lysophosphatidyl Choline and Lysophosphatidyl Ethanolamine in Nimodipine Fat Emulsion by HPLC

FAN Kaiyan, XIE Yiqiao, XIA Zihua, YANG Fan (School of Pharmacy, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for simultaneous determination of lysophosphatidyl choline (LPC) and lysophosphatidyl ethanolamine (LPE) in Nimodipine fat emulsion. METHODS: HPLC was performed on the column of Lichrospher Diol with detector of evaporative light scattering detector with mobile phase A of heptane - isopropyl alcohol solution (43 : 57, V/V), mobile phase B n-heptane - isopropyl alcohol - water (29.5 : 59 : 11.5, V/V/V) (gradient elution) at a flow rate of 1.5 ml/min, column temperature was 40 ℃, and the injection volume was 20 μl. RESULTS: The linear range was 0.020 0-0.400 0 mg/ml for LPC ($r=0.999\ 0$) and 0.010 0-0.200 0 mg/ml for LPE ($r=0.999\ 6$), and the logarithm value of concentration and peak area showed good linear relationship; the limit of quantitation was 0.013 4 mg/ml for LPC and 0.013 0 mg/ml for LPE; the limit of detection was 0.007 8 mg/ml for LPC and 0.007 6 mg/ml for LPE; RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 2%; recoveries were 95.96%-100.63% (RSD=1.83%, $n=9$) and 99.22%-101.76% (RSD=0.80%, $n=9$). CONCLUSIONS: The method is simple, and can be used for the determination of related substance in Nimodipine fat emulsion.

KEYWORDS HPLC; Nimodipine fat emulsion; Lysophosphatidyl choline; Lysophosphatidyl ethanolamine; Content determination

尼莫地平(Nimodipine, NMP)系1,4-双氢吡啶衍生物,是继硝苯吡啶、维拉帕米之后的第二代钙离子通道拮抗药,该药对蛛网膜下腔出血、偏头痛、脑卒中以及由慢性脑血管疾患所致的脑功能紊乱具有良好疗效^[1-3]。其市售溶液型注射液在临床使用时需与葡萄糖或注射用氯化钠注射液混合滴注,易出现析晶现象;临床上多采用微量泵控制流速,但这不仅会吸附尼莫地平,导致药物损失^[4-5],而且微量泵给药时,一般会对患者进行留置穿刺,由此导致患者发生静脉硬化的危险性也更高^[6]。本课题组研制的尼莫地平脂肪乳,提高了药物溶解度并可减少静脉刺激性。但处方中使用了大豆磷脂作为乳化剂,经静脉注射后,会带入外源性溶血磷脂如溶血磷脂酰胆碱(LPC)和溶血磷脂酰乙醇胺(LPE),在机体内溶血磷脂酶D

(lysoLPD)的作用下产生溶血磷脂酸(LPA)^[7],可导致红细胞及其他细胞膜破裂,引起溶血或细胞坏死。因此,对尼莫地平脂肪乳中LPC和LPE的含量进行严格控制,是保证该类产品质量的关键。

现有文献^[8-9]多仅对LPC的检测方法进行了探讨,有关同时检测LPC和LPE的方法中存在溶血磷脂酰胆碱峰为分叉峰,并且色谱柱分离效能越高,分叉越明显,即使调整流动相比比例,峰形仍没有改善等问题^[10]。2015年版《中国药典》(四部)“大豆磷脂(供注射用)”中有关物质检查项增加了LPE的检测,建立LPE的测定方法及限度,将LPC与LPE均作为影响其质量的有关物质来控制^[11]。本课题组研制的尼莫地平脂肪乳使用了大豆磷脂作为乳化剂,属于磷脂类制剂,故需要检测溶血性物质LPC和LPE的含量来保证临床用药的安全性。因2015年版《中国药典》未收录脂肪乳中溶血磷脂的检测方法,故本试验初期按2015年版《中华人民共和国卫生部药品标准(二部)第六册》^[12]脂肪乳注射液中对溶血磷脂的检测方法检测,预试验分离效果不佳且分析时间长,后参照《中长链脂肪乳注射剂(C8-24)国家药品标准》中LPC和LPE的检查方法^[13],

^Δ 基金项目:广州市科技计划项目(No.201300000046);广州市科技计划项目(No.201508010036)

* 硕士研究生。研究方向:药物制剂新剂型与新技术。E-mail: 412787243@qq.com

[#] 通信作者:教授,博士。研究方向:药物制剂新剂型与新技术。电话:020-39352125。E-mail: zgyangfan@hotmail.com

对色谱条件进行综合与优化,调整流动相洗脱程序,缩短分析时间,建立了能同时分析尼莫地平脂肪乳中LPC和LPE的色谱条件,以便于更好地对尼莫地平脂肪乳进行质量控制,在该类制剂的研发中,这一指标将对乳化剂种类和用量的选取起到一定的指导作用。

1 材料

1.1 仪器

2695型HPLC仪,包括2420型蒸发光散射检测器、Empower色谱工作站(美国Waters公司);AUW220D型十万分之一电子天平(日本Shimadzu公司);MGG-33H型人工智能气候箱(成都一恒科技有限公司);AH-2010型纳米高压均质机(加拿大ATS工业系统有限公司);FJ200-S型数显高速分散均质机(上海标本模型厂);RET基本型加热磁力搅拌器(德国IKA公司);KQ5200DB型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司,功率:100 W,频率:40 kHz)。

1.2 药品与试剂

尼莫地平脂肪乳(广东药学院药科学院自制,编号:S1~S3,规格:5 ml/支);LPC对照品(批号:190025-201403,纯度:99.8%)、LPE对照品(批号:190024-201302,纯度:91.7%)均购自中国食品药品检定研究院;正庚烷和异丙醇为色谱纯,其余试剂均为分析纯,水为蒸馏水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Lichrospher Diol(25 mm×4 mm, 5 μm);检测器:蒸发光散射检测器;漂移管温度:70 ℃;柱温:40 ℃;雾化气:氮气;雾化器加热温度:54 ℃;气体压力:30 Psi;流动相A:正庚烷-异丙醇溶液(43:57, V/V),流动相B:正庚烷-异丙醇-水(29.5:59:11.5, V/V/V),梯度洗脱(洗脱程序见表1);流速:1.5 ml/min;进样量:20 μl。

表1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution program

时间, min	A, %	B, %
0	100	0
0.1	70	30
6	55	45
10	55	45
10.1	100	0
13	100	0

2.2 溶液的制备

2.2.1 混合对照品溶液 取LPC、LPE对照品适量,各分别置于10 ml量瓶中,用异丙醇-正庚烷溶液(2:1, V/V)制成LPC和LPE质量浓度均为1 mg/ml的单一对照品贮备液。精密量取上述单一对照品贮备液各适量,置于同一10 ml量瓶中,用异丙醇-正庚烷溶液(2:1, V/V)定容,制成每1 ml分别含LPC 0.1 mg和LPE 0.05 mg的混合对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液 精密移取样品1 ml,置于10 ml量瓶中,加异丙醇-正庚烷溶液(2:1, V/V)适量,超声处理5 min,再加异丙醇-正庚烷溶液(2:1, V/V)定容,上下翻转20次,充分混匀,即得供试品溶液。

2.2.3 阴性对照溶液 按尼莫地平脂肪乳的制备工艺和处方比例制备缺大豆卵磷脂的阴性样品,再按“2.2.2”项下方法制备阴性对照品溶液,即得。

2.3 系统适用性试验

精密量取“2.2”项下混合对照品溶液、供试品溶液、阴性对

照溶液各适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图1。由图1可知,各成分均能达到基线分离,分离度>1.5,理论板数以LPC峰计为6 916,保留时间分别为6.6。结果表明,其他成分对测定无干扰。

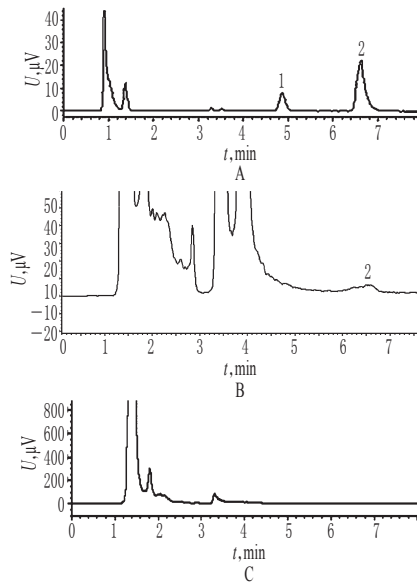


图1 高效液相色谱图

A.混合对照品;B供试品;C阴性对照;1.LPE;2.LPC

Fig 1 HPLC chromatograms

A. mixed reference substance; B. test sample; C. negative control; 1.lyso-phosphatidyl ethanolamine; 2.lysophosphatidyl choline

2.4 破坏性试验

本品经酸、碱、氧、光照、高温条件等强力破坏,并测定LPC和LPE的含量,判断在主药(尼莫地平)含量下降10%时即在药品有效期内LPC和LPE是否超标。

2.4.1 酸破坏试验溶液的制备 精密量取本品1 ml,置于10 ml量瓶中,加1 mol/L盐酸溶液1 ml,于90 ℃烘箱加热25 min,放冷至室温,加1 mol/L氢氧化钠溶液中和,再加适量异丙醇-正庚烷溶液(2:1, V/V),超声处理5 min,用异丙醇-正庚烷溶液(2:1, V/V)定容,上下翻转20次,充分混匀,即得。

2.4.2 碱破坏试验溶液的制备 精密量取样品1 ml,置于10 ml量瓶中,加1 mol/L氢氧化钠溶液1 ml,于90 ℃烘箱加热20 min,放冷至室温,加1 mol/L盐酸溶液中和,再加适量异丙醇-正庚烷溶液(2:1, V/V),超声处理5 min,加异丙醇-正庚烷溶液(2:1, V/V)定容,上下翻转20次,充分混匀,即得。

2.4.3 氧化破坏试验溶液的制备 精密量取样品1 ml,置于10 ml量瓶中,加3%双氧水1 ml,于90 ℃烘箱加热25 min,放冷至室温,加适量异丙醇-正庚烷溶液(2:1, V/V),超声处理5 min,用异丙醇-正庚烷溶液(2:1, V/V)定容,上下翻转20次,充分混匀,即得。

2.4.4 光照破坏试验溶液 取样品适量,置于4 500 lx强光下放置7 d,再精密量取1 ml,置于10 ml量瓶中,加适量异丙醇-正庚烷溶液(2:1, V/V),超声处理5 min,用异丙醇-正庚烷溶液(2:1, V/V)定容,上下翻转20次,充分混匀,即得。

2.4.5 高温破坏试验溶液的制备 取样品适量,置于120 ℃烘箱加热4 h,放冷至室温,精密量取1 ml,置于10 ml量瓶中,加适量异丙醇-正庚烷溶液(2:1, V/V),超声处理5 min,异丙醇-正庚烷溶液(2:1, V/V)定容,上下翻转20次,充分混匀,即得。

2.4.6 破坏性试验测定 取上述各破坏试验溶液适量,分别经0.22 μm微孔滤膜滤过,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录色谱,详见图2。结果,样品在酸、碱条件下会降解出较多的杂质峰,氧化以及高温的条件下能使LPC的含量增加,其他破坏则无明显变化。但样品经破坏试验后,LPC的含量均未超过2015年版《中华人民共和国卫生部药品标准(二部)第六册》项下相关杂质限度要求,且并未测出LPE。

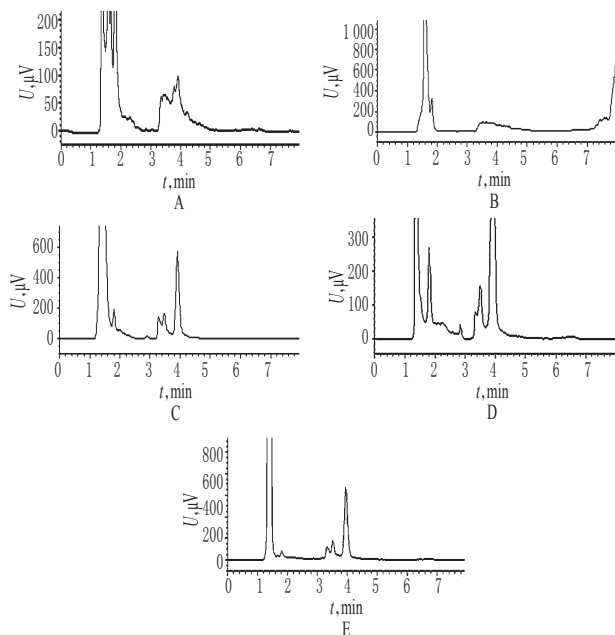


图2 破坏性试验高效液相色谱图

A.酸破坏的样品;B.碱破坏的样品;C.高温破坏的样品;D.氧化破坏的样品;E.光照破坏的样品

Fig 2 HPLC chromatograms of destructive test

A.sample destroyed by acid; B.sample destroyed by base; C.sample destroyed by heat; D.sample destroyed by oxidation; E.sample destroyed by light

2.5 线性关系考察

精密称取LPC、LPE对照品各适量,加异丙醇-正庚烷溶液(2:1, V/V)溶解,制成每1 ml分别含LPC 0.02、0.04、0.1、0.2、0.4 mg, LPE 0.01、0.02、0.05、0.1、0.2 mg的系列混合对照品溶液。精密量取上述系列混合对照品溶液各适量,分别经0.22 μm微孔滤膜滤过,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以LPC、LPE质量浓度的对数值(x)为横坐标,峰面积的对数值(y)为纵坐标进行线性回归,得LPC和LPE的回归方程分别为 $y=1.365 6x+7.098 4$ ($r=0.999 0$)、 $y=1.647 6x+7.000 1$ ($r=0.999 6$)。结果,LPC和LPE检测质量浓度线性范围分别为0.020 0~0.400 0、0.010 0~0.200 0 mg/ml。

2.6 检测限与定量限考察

取LPC对照品溶液(1 mg/ml)和LPE对照品溶液(1 mg/ml)各适量,倍比稀释,按“2.1”项下色谱条件连续进样测定6次,记录峰面积。当信噪比为10:1时,得LPC定量限为0.013 4 mg/ml、LPE定量限为0.013 0 mg/ml;当信噪比为3:1时,得LPC检测限为0.007 8 mg/ml、LPE检测限为0.007 6 mg/ml。

2.7 精密度试验

取“2.2.1”项下混合对照品溶液适量,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,LPC和LPE峰面积的RSD分别为1.38%、1.20% ($n=6$),表明仪器精密度良好。

2.8 稳定性试验

取同一供试品溶液(编号:S1)适量,分别于室温下放置0、1、2、3、5、8、10 h时按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,LPC峰面积的RSD=0.92% ($n=7$)。表明,供试品溶液在10 h内基本稳定。

2.9 重复性试验

取同一编号(编号:S1)样品适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,LPC峰面积的RSD=1.01% ($n=6$),表明本方法重复性良好。

2.10 回收率试验

精密量取“2.2.3”项下阴性对照溶液1 ml,分别加入LPC对照品溶液0.4、1、2 ml和LPE对照品溶液0.2、0.5、1 ml,加异丙醇-正庚烷溶液(2:1, V/V)稀释至10 ml,按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算回收率,结果见表2。

表2 回收率试验测定结果($n=9$)

Tab 2 Results of recovery tests ($n=9$)

待测成分	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	平均回收率,%	RSD,%			
LPC	0.4	0.402 5	100.63	98.87	1.83			
	0.4	0.399 0	99.75					
	0.4	0.401 2	100.30					
	1.0	0.957 9	96.79					
	1.0	0.959 6	95.96					
	1.0	0.967 8	96.78					
	2.0	1.996 6	99.83					
	2.0	2.000 3	100.01					
	2.0	1.994 8	99.74					
	LPE	0.2	0.199 9			99.95	100.30	0.81
		0.2	0.198 8			99.40		
		0.2	0.200 7			100.30		
0.5		0.506 3	101.26					
0.5		0.501 8	100.36					
0.5		0.501 4	100.28					
1.0		0.992 2	99.22					
1.0		1.001 8	100.18					
1.0		1.017 6	101.76					

2.11 样品含量测定

取3批样品各适量,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按“2.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积并计算各成分的含量,结果见表3。

表3 样品含量测定结果($n=3$)

Tab 3 Results of content determination of samples ($n=3$)

编号	溶血磷脂酰胆碱峰面积	RSD,%
S1	24 410	0.66
S2	24 054	0.65
S3	24 115	0.79

3 讨论

本课题组研制了尼莫地平脂肪乳属磷脂类产品的制剂并且采取静脉注射的方式给药,在溶液状态下卵磷脂可能会发生部分水解,并且在放置过程中溶血磷脂的量有可能增加,药品审评中心规定除溶血磷脂类产品(可制成脂质体,为活性成分,用于治疗动脉粥样硬化)外,磷脂类产品中皆要对其中溶血磷脂的量进行严格控制,当卵磷脂纯度级别较低时,其中的磷脂酰乙醇胺的含量较高时,还需要对其中LPE的量进行控制,以保证临床用药的安全性。

3.1 检测方法及限度确定

在方法学考察中无法同时利用LPC、LPE的RSD来评价方法的稳定性和重复性,是由于处方中大豆卵磷脂纯度级别高且使用量很少,由卵磷脂带入的LPE的量极少,在检测过程中其信噪比低于检测限的信噪比(10:1),只能以LPC的RSD来评价方法的稳定性和重复性。样品检测结果以及破坏试验结果显示LPC符合《中华人民共和国卫生部药品标准(二部)第六册》^[12]脂肪乳注射液中LPC的限度要求(≤ 2.0 mg/ml)。

3.2 样品检测及破坏试验结果分析

样品测定结果显示,本课题组制备的尼莫地平脂肪乳中LPC的含量极低,同时本研究针对尼莫地平脂肪乳进行了破坏性试验,在主药(尼莫地平)含量下降10%的情况下测定这两种物质,发现本品在酸、碱条件下会降解出较多的杂质峰,但是对应溶血性物质的出峰位置未见色谱峰,表明其含量未增多;在氧化以及高温的条件下都能使LPC的含量增加,其中氧化破坏LPC的含量为0.318 9 mg/ml、高温破坏LPC的含量为0.196 6 mg/ml,但仍然符合《中华人民共和国卫生部药品标准(二部)第六册》^[12]脂肪乳注射液中LPC的限度要求;光照破坏试验无明显变化,表明尼莫地平脂肪乳在有效期内LPC符合限度要求。经过上述测定均未检测出LPE,这可能与该制剂为本课题组自制,制备工艺等较为完备有关。

3.3 定量限检测分析

针对尼莫地平脂肪乳检测时LPC和LPE无法定量的原因作出如下两点分析。

3.3.1 处方分析 本课题组研制的尼莫地平脂肪乳注射剂中使用聚乙二醇十二羟基硬脂酸酯15(Solutol HS15)和大豆卵磷脂作为复合乳化剂,并且使用的卵磷脂纯度级别高,这可能是使得样品在含有卵磷脂的情况下,LPC和LPE无法定量以及样品经破坏后这两种溶血性成分含量仍未超标的主要原因。大豆卵磷脂是脂肪乳剂中引入LPC和LPE的主要途径,使用复合乳化剂的方式,可以在保证乳剂稳定性的同时,减少大豆卵磷脂的用量,从根源上减少引入的溶血性成分。

3.3.2 工艺分析 通过破坏试验可知,氧化和高温这两个条件会导致溶血性成分增加,所以本课题组在充盈氮气的条件下制备尼莫地平脂肪乳,尽可能减少氧气的干扰;在保证乳化效果的基础上,使用了较低的剪切温度,同时在均质过程中,使用循环冷凝水,减少机械作用力产热对脂肪乳剂的影响,从工艺的角度去控制溶血性成分的生成。

综上,本课题组制备的尼莫地平脂肪乳的处方工艺不仅

能保证乳剂的物理稳定性,而且在控制溶血性成分中也具有明显优势,可为同类制剂的研发提供借鉴,并且该检测方法操作简便,可用于尼莫地平脂肪乳中有关物质的测定。

参考文献

- [1] 李孟,张晓华.尼莫地平的药理作用及临床应用[J].中国实用医药,2013,8(19):201.
- [2] Villed S, Petr NK, Timo K, et al. A randomized outcome study of enteral versus intravenous nimodipine in 171 patients after acute aneurysmal subarachnoid hemorrhage[J]. *World Neurosurg*, 2012, 78 (1/2): 101.
- [3] 白向荣,李晓玲,王玉琴.尼莫地平治疗蛛网膜下腔出血的系统评价[J].中国药房,2012,23(48):4 543.
- [4] 祁金文,马珂,金戈,等.微泵给药时输液器对尼莫地平注射液的吸附作用[J].中国现代应用药学杂志,2003,20(5):389.
- [5] 韦曦,谭强,李慧.尼莫地平输液配伍稳定性及输液器对其吸附性实验[J].中国新药杂志,2002,11(1):80.
- [6] 詹玉珠.微量注射泵注射存在的问题与护理对策[J].中国现代药物应用,2008,2(24):148.
- [7] 刘慧华,王军.溶血磷脂酸对神经系统细胞的作用及与脑血管病的关系[J].医学综述,2006,12(22):1 350.
- [8] 谢俊,刘文一,周建平.HPLC-ELSD测定大豆磷脂中溶血磷脂酰胆碱的含量[J].中国新药杂志,2010,19(3):243.
- [9] 王全一,矫筱蔓.HPLC-ELSD法测定前列地尔注射液中溶血磷脂酰胆碱的方法改进[J].药物分析杂志,2014,34(7):1 291.
- [10] 陈华,于海洲,彭创业.HPLC-ELSD法同时测定丙泊酚注射液中溶血磷脂酰胆碱和溶血磷脂酰乙醇胺的含量[J].药物分析杂志,2014,34(3):442.
- [11] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:四部[S].2015年版.北京:中国医药科技出版社,2015:468.
- [12] 国家药典委员会.中华人民共和国卫生部药品标准:二部:第六册[S].北京:人民卫生出版社,2015:117.
- [13] 国家食品药品监督管理局.中长链脂肪乳注射剂(C8-24)国家药品标准[S].北京:人民卫生出版社,2006:84.

(收稿日期:2016-01-06 修回日期:2016-05-29)

(编辑:刘柳)

世界卫生组织总干事陈冯富珍女士在国家卫生计生委发表演讲

本刊讯 2016年7月26日,世界卫生组织总干事陈冯富珍女士在国家卫生计生委发表了题为“中国健康:挑战与机遇”的演讲。国家卫生计生委主任李斌主持演讲,国家卫生计生委副主任王国强、崔丽出席。

李斌主任在致辞中高度赞赏陈冯富珍女士担任世卫组织总干事以来,为维护全球卫生安全做出的贡献,感谢她对中国卫生事业发展和医改工作的关注和支持。

陈冯富珍女士高度评价中国在医改及公共卫生领域取得的成就,赞赏中国在应对全球新发疫情威胁过程中承担的国际义务,祝贺中国国际应急医疗队成为首批通过世界卫生组织

认证的国际应急医疗队。世界卫生组织愿积极参与中国“一带一路”战略的实施并发挥应有的作用。陈冯富珍表示,中国在实现千年发展目标中发挥了积极作用,要实现2030年可持续发展目标,需要中国在消除贫困、促进平等,应对非传染性疾病的挑战,以及与非洲等欠发达国家创新合作模式等多个领域发挥引领作用。

来自国家卫生计生委相关司局、直属和联系单位,国家中医药管理局,国家食品药品监管总局,在京医学院校等单位约400人参加了此次演讲。