

HPLC法测定分泌性中耳炎患者咽鼓管灌洗液中磷脂酰胆碱的含量^Δ

谢玲^{1*}, 谢华², 刘代华¹, 覃禹¹, 梁健成¹(1.广西科技大学附属柳州市人民医院药剂科, 广西柳州 545006; 2.广西科技大学附属柳州市人民医院耳鼻咽喉科, 广西柳州 545006)

中图分类号 R446.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)21-2989-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.21.39

摘要 目的:建立测定分泌性中耳炎患者咽鼓管灌洗液中磷脂酰胆碱含量的方法。方法:采用高效液相色谱法,以液-液萃取法对样品进行预处理。色谱柱为Hypersil CN,流动相为乙腈-甲醇-磷酸(100:10:0.6, V/V/V),流速为1.8 ml/min,测定波长为205 nm,柱温为30 ℃,进样量为20 μl。结果:磷脂酰胆碱质量浓度在11.99~119.9 μg/ml范围内与其峰面积呈良好的线性关系($r=0.9996$);日内和日间精密度的RSD≤15%;平均回收率为97.54%,RSD为9.36%($n=9$);患者咽鼓管灌洗液中磷脂酰胆碱的平均含量为(24.43±3.61)μg/ml。结论:本方法可操作性强、结果准确,可用于分泌性中耳炎患者咽鼓管灌洗液中磷脂酰胆碱的含量测定。

关键词 分泌性中耳炎;咽鼓管灌洗液;磷脂酰胆碱;含量测定

Content Determination of Phosphatidylcholine in Eustachian Tube Lavage Fluid of Patients with Secretory Otitis Media by HPLC

XIE Ling¹, XIE Hua², LIU Dai-hua¹, QIN Yu¹, LIANG Jian-cheng¹(1.Dept. of Pharmacy, Liuzhou People's Hospital Affiliated to Guangxi University of Science and Technology, Guangxi Liuzhou 545006, China; 2.Dept. of Otolaryngology, Liuzhou People's Hospital Affiliated to Guangxi University of Science and Technology, Guangxi Liuzhou 545006, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for content determination of phosphatidylcholine in eustachian tube lavage fluid of patients with secretory otitis media. METHODS: HPLC was used. The samples were pretreated by liquid-liquid extraction. It was performed on the column of Hypersil CN with mobile phase of acetonitril-methanol-phosphoric acid (100:10:0.6, V/V/V) at the flow rate of 1.8 ml/min, the detection wavelength was 205 nm, temperature was 30 ℃ and volume was 20 μl. RESULTS: The linear range of phosphatidylcholine was 11.99-119.9 μg/ml($r=0.9996$); RSDs of precision tests of intra-day and inter-day were no more than 15%; average recovery was 97.54% (RSD=9.36%, $n=9$); the average content of phosphatidylcholine in eustachian tube lavage fluid of patients was (24.43±3.61) μg/ml. CONCLUSIONS: The method is simple and accurate, and can be used for the content determination of phosphatidylcholine in eustachian tube lavage fluid of patients with secretory otitis media.

KEYWORDS Secretory otitis media; Eustachian tube lavage fluid; Phosphatidylcholine; Content determination

磷脂酰胆碱是一种表面活性物质,是构成细胞膜的主要物质之一,广泛存在于机体的肺部、鼻咽部及咽鼓管的细胞膜外质膜上。通过测定咽鼓管灌洗液中磷脂酰胆碱的含量,可以反映咽鼓管中表面活性物质水平的变化。为此,本试验建立了测定分泌性中耳炎患者咽鼓管灌洗液中磷脂酰胆碱含量的高效液相色谱(HPLC)法。

1 材料

1.1 仪器

LC-10ATVP型HPLC仪,包括SPD-10A型UV-VIS检测器、CTO-10AS型自动进样器(日本岛津公司);80-2ELECTRIC CENTRIFUGE型离心沉淀机(上海吉众仪器有限公司);XW-80A旋涡混合器(上海医大仪器有限公司);BP211D型电

子天平(德国赛多利斯公司);BCD-168A型冰箱(海信容声冰箱有限公司)。

1.2 药品与试剂

磷脂酰胆碱标准品(中国食品药品检定研究院,批号:190002-201001,纯度:94.6%);咽鼓管灌洗液(我院耳鼻咽喉科提供);地塞米松磷酸钠注射液(河南润弘制药股份有限公司,批号:1312241);乙醚、三氯甲烷和磷酸为分析纯,甲醇、乙腈为色谱纯,水为自制纯化水。

2 方法与结果

2.1 咽鼓管灌洗液的采集

2.1.1 采集对象 分泌性中耳炎患者5例,其中男性4例、女性1例,年龄18~60岁。

2.1.2 采集方法 用1 ml针筒配以5号针头,抽取地塞米松磷酸钠注射液0.8 ml,另抽少量空气,总量达1.0~1.2 ml,常规清洁外耳道,明视下经鼓膜后下或前下边缘刺入鼓室,使针筒内气体在前、药液在后,稍用力一气注入,稍作停留后抽取鼓室内积液于试管内,置于避光密封盒内,立即送检。

^Δ基金项目:广西壮族自治区中医药民族医药自筹经费科研课题(No.GZZC13-31)

* 主管药师。研究方向:临床药学。电话:0772-2662950。E-mail:xceiling@163.com

2.2 色谱条件

色谱柱: Hypersil CN短柱(150 mm×4.6 mm, 10 μm); 流动相: 乙腈-甲醇-磷酸(100:10:0.6, V/V/V); 流速: 1.8 ml/min; 柱温: 30 °C; 检测波长: 205 nm; 进样量: 20 μl。

2.3 溶液的制备

2.3.1 标准品溶液 精密称取磷脂酰胆碱标准品0.1199 g, 置于50 ml棕色量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 混匀, 得浓度为2398 μg/ml的标准品贮备液, 于4 °C下避光保存。分别精密量取标准品贮备液0.25、0.5、1.0、2.0、2.5 ml, 置于10 ml棕色量瓶中, 用甲醇稀释至刻度, 分别得质量浓度为59.95、119.9、239.8、479.6、599.5 μg/ml的标准品溶液。

2.3.2 空白溶液 取纯化水0.2 ml, 加入地塞米松磷酸钠注射液0.8 ml, 即得空白溶液。

2.3.3 供试品溶液 取咽鼓管灌洗液1 ml, 加入乙醚4 ml, 涡旋震荡2 min, 以1000 r/min(1800×g)离心3 min, 取上清液3 ml, 置于10 ml离心管中, 氮气吹干, 加入100 μl甲醇复溶, 即得。

2.4 专属性试验

分别取“2.3”项下标准品溶液(479.6 μg/ml)、空白溶液、供试品溶液各适量, 按“2.2”项下色谱条件进样分析, 记录色谱, 详见图1。由图1可见, 在该色谱条件下, 磷脂酰胆碱峰形较好, 杂质对其测定无干扰。

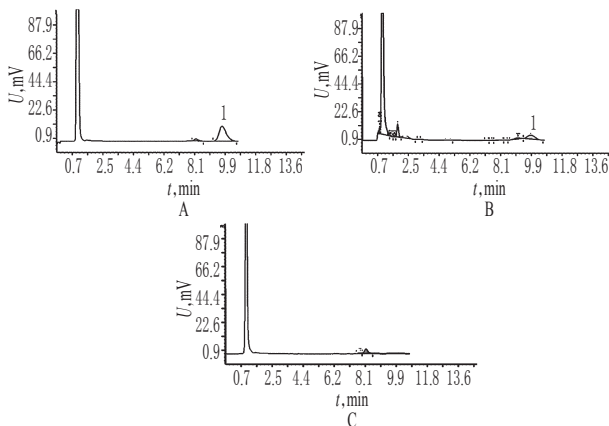


图1 高效液相色谱图

A. 标准品; B. 供试品; C. 空白; 1. 磷脂酰胆碱

Fig 1 HPLC chromatograms

A. standards; B. test sample; C. blank; 1. phosphatidylcholine

2.5 线性关系考察

取“2.3.1”项下5种质量浓度的标准品溶液各0.2 ml, 加入地塞米松磷酸钠注射液0.8 ml, 混匀得磷脂酰胆碱质量浓度分别为11.99、23.98、47.96、95.92、119.9 μg/ml的线性关系溶液, 按“2.3.3”项下方法处理, 按“2.2”项下色谱条件进样分析。以质量浓度(x, μg/ml)为横坐标、峰面积(y)为纵坐标进行线性回归, 得回归方程为 $y=9.99 \times 10^{-5}x+3.36$ ($r=0.9996$)。结果表明, 磷脂酰胆碱质量浓度在11.99~119.9 μg/ml范围内与其峰面积呈良好的线性关系。

2.6 精密度试验

按相关指导原则要求^[1], 分别制备高、中、低质量浓度(95.92、287.76、539.55 μg/ml)的标准品溶液各0.2 ml, 加入0.8 ml地塞米松磷酸钠注射液, 按“2.3.3”项下方法处理, 每一个质量浓度在同日内连续测定5次, 并连续测定3 d。结果, 日内RSD分别为8.04%、5.21%、4.56% ($n=5$), 日间RSD分别为14.47%、13.03%、5.71% ($n=15$), 均小于15%, 符合生物样品

分析的基本要求, 表明方法精密度较好。

2.7 稳定性试验

分别制备高、中、低质量浓度(95.92、287.76、539.55 μg/ml)的标准品溶液, 按“2.3.3”项下方法进行处理后, 在室温下放置0、4、12、24 h时测定其质量浓度; 另分别取上述高、中、低质量浓度的标准品溶液适量, 按“2.3.3”项下方法操作进行到氮气吹干后置于-4 °C冰箱中放置0、24、48、72 h, 在各时间点取出复溶, 测定其质量浓度。结果, 在室温下放置12 h后的质量浓度明显下降, 而在-4 °C冰箱中放置72 h的样本与0 h的样本比较, 质量浓度无明显变化, 详见表1。

表1 稳定性试验结果($n=3$)

Tab 1 Results of stability tests($n=3$)

理论质量浓度, μg/ml	室温下各时间点质量浓度, μg/ml				-4 °C下各时间点质量浓度, μg/ml			
	0 h	4 h	12 h	24 h	0 h	24 h	48 h	72 h
19.18	17.28	17.06	14.26	8.65	17.05	17.12	16.89	16.96
57.55	58.69	55.36	42.35	26.98	60.56	59.66	60.15	58.21
107.91	100.78	93.44	78.23	59.56	103.48	100.56	102.24	101.88

2.8 回收率试验

分别制备高、中、低质量浓度(95.92、287.76、539.55 μg/ml)的标准品溶液各0.2 ml, 各3份, 加入地塞米松磷酸钠注射液0.8 ml, 按“2.3.3”项下方法进行处理, 再按“2.2”项下色谱条件进样测定, 计算回收率, 结果详见表2。

表2 回收率试验结果($n=9$)

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

加入质量浓度, μg/ml	测得质量浓度, μg/ml	回收率, %	平均回收率, %	RSD, %
19.18	16.56	86.34		
19.18	17.43	90.88		
19.18	17.24	89.90		
57.55	62.45	108.51		
57.55	63.64	110.58	97.54	9.36
57.55	50.99	88.60		
107.91	107.04	99.19		
107.91	113.97	105.62		
107.91	106.01	98.24		

2.9 样品含量测定

取每位患者的咽鼓管灌洗液各1 ml, 按“2.3.3”项下方法制备供试品溶液, 再按“2.2”项下色谱条件进样测定。结果, 磷脂酰胆碱的平均含量为 $(24.43 \pm 3.61) \mu\text{g/ml}$ ($n=5$)。

3 讨论

3.1 萃取剂的选择

将磷脂酰胆碱从咽鼓管灌洗液中提取出来是其中一个关键的步骤, 需要选择合适的萃取剂。经查文献, 多使用氯仿-甲醇(2:1, V/V)作萃取剂^[2-4]。本试验分别用氯仿-甲醇(2:1, V/V)、氯仿、乙醚作萃取剂, 结果乙醚能更好地把磷脂酰胆碱从样品中萃取出来, 并且氮气吹干乙醚所用的时间更短, 因此选用乙醚作为萃取剂。

3.2 线性关系溶液的制备

地塞米松是治疗慢性中耳炎的药物之一, 在患者的咽鼓管灌洗液中会有此成分。因此, 本试验在标准品溶液中加入地塞米松以保证标准品溶液与灌洗液样品中有相同的溶质。地塞米松溶于水, 在萃取磷脂酰胆碱的时候留在水相中, 不会干扰磷脂酰胆碱含量的测定。

3.3 回收率试验方法的选择

GC法测定浙江蜡梅中桉油精的含量^Δ

吕 兰^{1*}, 王伟影²(1.浙江中医药大学附属广兴医院/杭州市中医院中药房, 杭州 310007; 2.丽水市食品药品检验所, 浙江 丽水 323000)

中图分类号 R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)21-2991-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.21.40

摘要 目的:建立测定浙江蜡梅中桉油精含量的方法。方法:采用气相色谱法。色谱柱为Zebron ZB-WAX毛细管柱,采用程序升温;检测器为氢火焰离子化检测器,检测器温度为250℃,进样口温度为220℃,高纯氮气作载气。结果:桉油精质量浓度在0.017 69~1.415 mg/ml范围内与其峰面积呈良好的线性关系($r=0.999 1$);精密性、稳定性、重复性试验的RSD $\leq 1.87\%$;平均加样回收率为99.72%,RSD为0.65%($n=6$)。相同月份不同地区采集的浙江蜡梅中的桉油精含量存在较大差异,最大可差1倍以上(1.064%~0.450%),同一地区不同月份采集的也存在较大差异(0.633%~1.064%)。结论:本方法简便、准确、快速、重复性好,适用于浙江蜡梅的质量控制。

关键词 浙江蜡梅;桉油精;气相色谱法;含量测定

Content Determination of the Eucalyptol in *Chimonanthus Zhejiangensis* by GC

LYU Lan¹, WANG Wei-ying² (1. Dept. of Chinese Medicine, Guangxing Hospital Affiliated to Zhejiang Chinese Medical University/Hangzhou Hospital of TCM, Hangzhou 310007, China; 2. Lishui Institute for Food and Drug Control, Zhejiang Lishui 323000, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for content determination of eucalyptol in *Chimonanthus Zhejiangensis*. METHODS: GC was conducted with Zebron ZB-WAX capillary column with temperature programmed; FID detector was used with the temperature of 250 °C; the volume temperature was 220 °C and the carrier gas was nitrogen with high purity. RESULTS: Eucalyptol had a good linear relationship in the range of 0.017 69-1.415 mg/ml($r=0.999 1$); the RSDs of precisions, stability and reproducibility tests were no more than 1.87% and the average recovery was 99.72% (RSD=0.65%, $n=6$). There were big differences in different areas of the same month and the maximum was more than one time (1.064%-0.450%); there were also big differences in the same area of different months (0.633%-1.064%). CONCLUSIONS: The method is simple, accurate, fast and reproducible and suitable for the quality control of *Chimonanthus Zhejiangensis*.

KEYWORDS *Chimonanthus Zhejiangensis*; Eucalyptol; GC; Content determination

磷脂酰胆碱本身存在于咽鼓管的细胞膜外质膜上,无论是患者还是健康人的咽鼓管灌洗液中均含有磷脂酰胆碱,其含量因人而异,且一位患者每次咽鼓管灌洗液所能获取的量很少。所以,本试验不同于测定药品中某一成分的含量,也不同于测定血清中某药物的含量,在进行回收率试验时只能用空白溶液作基础溶液计算回收率。

3.4 磷脂酰胆碱的稳定性

磷脂酰胆碱性质不稳定,其含有的不饱和脂肪酸结构使其易发生氧化^[5-9]。氮气是惰性气体,不会与磷脂酰胆碱产生反应,也不会催化其反应,用氮气吹干磷脂酰胆碱能避免磷脂酰胆碱在室温下长时间放置而发生分解和氧化。磷脂酰胆碱贮备液需放置于冰箱内避光保存,且应定期重新配制,在样本处理过程中应尽可能减少操作时间。

综上所述,本方法可操作性强、结果准确,可用于分泌性

中耳炎患者咽鼓管灌洗液中磷脂酰胆碱的含量测定。

参考文献

- [1] 《化学药物临床药代动力学研究技术指导原则》课题组. 化学药物临床药代动力学研究技术指导原则[S]. 2005-03-18.
- [2] 冯立宁, 陈文弦, 张晓楠, 等. β -受体激动剂对咽鼓管表面活性物质分泌的影响[J]. 中华航空航天医学杂志, 2000, 11(4): 225.
- [3] 吉晓滨, 王群芳, 廖军, 等. 健康人鼻咽部表面活性物质的测定[J]. 中国耳鼻咽喉头颈外科, 2007, 14(3): 169.
- [4] 叶人涌, 沈惠风, 许以平, 等. 哮喘豚鼠肺泡表面活性物质分泌的实验研究[J]. 实用预防医学, 2009, 16(3): 666.
- [5] 李卫, 邵友元, 黄光斗, 等. 卵磷脂的提取及热稳定性研究[J]. 甘肃化工, 2001(2): 71.
- [6] 何新霞, 徐丽珊, 杨玲. 大豆磷脂胶丸稳定性的初步考察[J]. 中国药学杂志, 1999, 34(8): 538.

(收稿日期: 2014-12-19 修回日期: 2015-06-22)

(编辑: 周 管)

^Δ 基金项目: 丽水市科学技术局项目(No.2012cxtd09-05; No.2012cxtd11-03)

* 主管中药师, 硕士研究生。研究方向: 中成药、中药材(饮片)的质量分析。电话: 0571-86728851。E-mail: 45585781@qq.com