

顶空气相色谱法测定多烯磷脂酰胆碱注射液中的乙醇含量

赵璇*, 李群#, 白亦昊, 周长明(北京市药品检验所, 北京 100035)

中图分类号 R927.2; R977.6 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)45-4289-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.45.23

摘要 目的: 建立测定多烯磷脂酰胆碱注射液中助溶剂乙醇含量的方法。方法: 采用顶空气相色谱法。色谱柱为 DB-WAX 毛细管柱, 氢火焰离子化检测器, 程序升温, 进样口温度为 200 °C, 检测器温度为 220 °C, 顶空瓶平衡温度为 65 °C, 平衡时间为 7 min, 载气为氮气, 分流比为 5:1。以正丙醇为内标。结果: 乙醇和正丙醇的分离度符合要求, 乙醇检测质量浓度线性范围为 0.156 7~50.16 mg/ml ($r=0.999\ 9, n=9$), 平均回收率为 100.07%, $RSD=0.33\% (n=6)$, 定量限为 3.92 $\mu\text{g/ml}$ 。结论: 本方法操作简便, 结果准确可靠, 可用于多烯磷脂酰胆碱注射液中乙醇含量的控制。

关键词 顶空气相色谱法; 多烯磷脂酰胆碱注射液; 乙醇; 质量控制

Content Determination of Ethanol in Polyene Phosphatidycholine Injection by Headspace GC

ZHAO Xuan, LI Qun, BAI Yi-hao, ZHOU Chang-ming (Beijing Institute for Drug Control, Beijing 100035, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for the content determination of cosolvent ethanol in Polyene phosphatidycholine injection. METHODS: Headspace gas chromatogram (GC) was adopted. The determination was performed on DB-WAX capillary column. FID detector was used with injector temperature of 200 °C and detector temperature of 220 °C using nitrogen as carrier gas. The equilibrium temperature of headspace sampling was set at 65 °C with equilibrium time of 7 min by programmed temperature. The split ratio was 5:1, and *N*-propyl alcohol was used as internal standard. RESULTS: The separation of ethanol and *N*-propyl alcohol was in line with the standard. The linear range of ethanol were 0.156 7-50.16 mg/ml ($r=0.999\ 9, n=9$) with an average recovery rate of 100.07% ($RSD=0.33\%, n=6$). The detection limit was 3.92 $\mu\text{g/ml}$. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate, reliable and suitable for the content determination of ethanol in Polyene phosphatidycholine injection.

KEY WORDS Headspace gas chromatogram; Polyene phosphatidycholine injection; Ethanol; Quality control

多烯磷脂酰胆碱注射液的原料系从大豆中提取, 其中含有大量的不饱和脂肪酸, 在化学结构上与重要的内源性磷脂一致, 可通过直接影响膜结构使受损的肝功能和酶活力恢复正常, 调节肝脏的能量平衡, 促进肝组织再生, 将中性脂肪和胆固醇转化成容易代谢的形式, 因此具有改善脂质代谢、神经、肝脏、心血管系统功能及减缓记忆力衰退等保健功效^[1-3]。多烯磷脂酰胆碱静脉还可以与还原型谷胱甘肽联合, 有效治疗急性药物性肝损害^[4]。由于多烯磷脂酰胆碱是脂溶性物质, 国产注射液的处方规定 5 000 ml 中含 95% 乙醇 85 ml (乙醇含量为 12.7 mg/ml)。加入适量的乙醇可以提高药物在水中的溶解度, 但是乙醇属于中枢神经系统抑制剂, 摄入一定量后可抑制心肌细胞腺苷酸环化酶的活性, 引起心肌收缩力下降、心率改变, 并可导致心脏泵血功能降低、外周血管阻力下降, 导致血压降低^[5-6]。此外, 乙醇易透过人红细胞膜导致红细胞变性或溶血。该品种现行的质量标准中无乙醇检查项, 也未见相关文献报道。笔者经查阅资料^[7-8], 建立了相应的乙醇检测方法, 并进行了方法学验证。试验结果显示, 该方法操作简便、结果准确、重现性好, 可用于生产中的监控, 也可用于成品的质量检测。

1 材料

* 主管药师, 硕士。研究方向: 药品、生物制品检验分析。电话: 010-83222411。E-mail: xuanzhao117@163.com

通信作者: 副主任药师。研究方向: 药品、生物制品检验分析。电话: 010-83222411。E-mail: lmf1955@163.com

1.1 仪器

6890 型气相色谱仪、7694 型顶空进样器、氢火焰离子化检测器 (FID)、LC-solution 色谱工作站 (美国 Agilent 公司)。

1.2 药品与试剂

样品多烯磷脂酰胆碱注射液 [四川成都天台山制药有限公司, 批号: 101007、101008、090516; 赛诺菲安万特 (北京) 制药有限公司, 批号: 101580、101569、101572。两厂家规格均为: 5 ml: 232.5 mg]; 乙醇、正丙醇 (内标) 均为色谱标准物质。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: DB-WAX 毛细管柱 (30 m \times 0.32 mm, 0.25 μm); 柱温: 采用程序升温, 初始柱温 50 °C, 保持 6 min, 以 30 °C/min 的速率升温至 210 °C, 保持 2 min; 进样口温度: 200 °C; FID 温度: 220 °C; 顶空瓶平衡温度: 65 °C, 平衡时间: 7 min, 进样时间: 1.0 min; 载气: 氮气; 流速: 1 ml/min; 分流比: 5:1。

2.2 对照品贮备液及内标溶液的制备

取乙醇约 2.5 g, 精密称定, 置于 50 ml 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀, 制成质量浓度为 50.16 mg/ml 的溶液作为对照品贮备液。

取正丙醇约 0.5 g, 置于 200 ml 量瓶中, 加水溶解并稀释至刻度, 摇匀, 制成质量浓度为 2.5 mg/ml 的溶液作为内标溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取样品 5.0 ml, 置于 25 ml 量瓶中, 加水稀释至刻度, 摇匀; 取该溶液 2 ml, 置于顶空瓶中, 精密加入内标溶液 1 ml, 密

封,摇匀,即得。

2.4 系统适用性试验

将对照品贮备液稀释8倍后量取2 ml,置于顶空瓶中,精密加入内标溶液1 ml,密封进样,结果乙醇峰与内标峰的分度为5.67。对照品与供试品溶液进样后色谱图见图1。

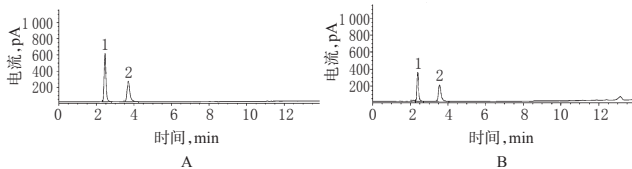


图1 气相色谱图

A.对照品溶液;B.供试品溶液;1.内标;2.乙醇

Fig 1 GC chromatograms

A. control solution; B. test sample solution; 1. internal standard; 2. ethanol

2.5 线性关系考察

精密量取对照品贮备液25 ml,置于50 ml量瓶中,加水逐级稀释,制成系列质量浓度的溶液,分别为50.16、25.08、12.54、6.27、3.135、1.567 5、0.470 2、0.313 5、0.156 7 mg/ml。分别精密量取上述对照品溶液各2.0 ml,置于顶空瓶中,精密加入内标溶液1.0 ml,密封,摇匀,依上述方法进行分析,记录峰面积,计算校正因子。以对照品溶液质量浓度(c)与相应的校正因子(f)计算回归方程。结果线性回归方程 $f=0.45c+0.066 8$ ($r=0.999 9$),表明乙醇的检测质量浓度线性范围为0.156 7~50.16 mg/ml ($n=9$)。

2.6 定量限考察

精密量取对照品贮备液适量,经系列稀释后进样测定,以信噪比10倍时的量为定量限,结果乙醇定量限约为3.92 $\mu\text{g/ml}$ 。

2.7 精密度试验

取质量浓度为12.54 mg/ml对照品溶液连续进样6次,结果乙醇与内标峰面积比值的RSD=3.2% ($n=6$)。

2.8 重复性试验

取样品(批号:101008)按“2.3”项下方法制备供试品溶液,平行试验6次,测定乙醇含量,得其RSD=2.6% ($n=6$)。

2.9 加样回收率试验

精密量取已知含量的样品(批号:101008)5 ml,置于50 ml量瓶中,加水稀释至刻度,摇匀,得乙醇质量浓度为1.130 mg/ml;取18份,各1 ml,分别加入高、中、低质量浓度的对照品溶液,各1 ml,再迅速加入1 ml内标溶液,密封,进样测定。根据校正因子计算加样回收率,结果见表1。

2.10 样品中乙醇含量测定结果

分别取2个厂家各3批样品,按“2.3”项下方法制备供试品并进样分析,计算含量,结果见表2。

3 讨论

磷脂含有亲水基团和亲油基团,是生物膜重要组成部分,也是天然乳化剂和表面活性剂,广泛应用于食品、医药、化工等行业^[9-10]。国产多烯磷脂酰胆碱注射液与进口同品种同为大豆提取物产品,但制剂处方与工艺不同,国产注射液的处方规定乙醇(含量为12.7 mg/ml)作为助溶剂。为控制助溶剂含量,笔者参考相关文献^[7-8],建立了乙醇含量的检测方法。国产多烯磷脂酰胆碱注射液由于生产工艺过程中有少量的挥发,实测3批样品中乙醇含量平均值为12.0 mg/ml;而进口3批样品中乙醇含量平均值为3.8 mg/ml。

表1 回收率试验结果($n=6$)

Tab 1 Results of recovery test ($n=6$)

水平	加入量, mg/ml	测得值, mg/ml	平均测得值, mg/ml	回收率, %	平均回收率, %	RSD, %
低	1.600 2	1.600 0	1.602 0	100.40		
	1.600 2	1.604 1				
	1.600 2	1.598 7	1.600 4	100.06		
	1.600 2	1.602 2				
	1.600 2	1.597 2	1.598 9	99.73		
	1.600 2	1.600 6				
中	2.383 9	2.392 2	2.387 3	100.27		
	2.383 9	2.382 5				
	2.383 9	2.394 0	2.389 5	100.45	100.07	0.33
	2.383 9	2.385 0				
	2.383 9	2.382 0	2.377 4	99.48		
	2.383 9	2.372 8				
高	3.167 7	3.169 1	3.166 1	99.92		
	3.167 7	3.163 0				
	3.167 7	3.164 0	3.166 4	99.94		
	3.167 7	3.168 8				
	3.167 7	3.169 5	3.175 1	100.36		
	3.167 7	3.180 6				

表2 样品中乙醇含量测定结果

Tab 2 Results of content determination of ethanol in samples

批号	乙醇含量, mg/ml
101007	12.2
101008	11.3
090516	12.6
101580	3.79
101569	3.81
101572	3.78

由于多烯磷脂酰胆碱的主要成分为磷脂酰胆碱、亚油酸、亚麻酸和油酸,若采用直接进样方式测定,大量不饱和脂肪酸易吸附于柱子内,而影响柱子使用寿命,并影响乙醇的洗脱,从而干扰了乙醇含量的测定。因乙醇及正丙醇的沸点较低,而亚油酸的沸点较高,故选用顶空进样法测定乙醇含量。内标法可在一定程度上消除操作条件(如进样量、色谱条件)的变化所引起的误差,故本方法采用正丙醇作为内标,在选定的色谱条件下能与待测成分及干扰成分达到很好的分离。

经方法学验证,表明该法可有效分离乙醇与正丙醇,且线性、精密度、回收率试验结果均较为理想。因此,本法的建立为多烯磷脂酰胆碱注射液生产过程中使用的助溶剂乙醇量的控制提供了可靠的方法,也为多烯磷脂酰胆碱注射液标准的提高奠定了方法学基础。

参考文献

- [1] 齐文娟,王伟.大豆磷脂的理化特性及其开发与应用[J]. 中国油脂,2005,30(8):35.
- [2] Zeisel SH. Choline: an important nutrient in brain development, liver function and carcinogenesis[J]. *J Am Coll Nutr*, 1992, 11(5): 473.
- [3] Canty DJ, Zeisel SH. Lecithin and choline in human health and disease[J]. *Nutr Rev*, 1994, 52(10): 327.
- [4] 安鼎伟,李静.还原型谷胱甘肽联合多烯磷脂酰胆碱治疗急性药物性肝损害的疗效观察[J]. 中国药房,2011,22(28):2 642.

HPLC法检查双氯芬酸钾原料药中的有关物质

李玮玲*(广州市药品检验所,广州 510160)

中图分类号 R927.2;R971*.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2013)45-4291-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2013.45.24

摘要 目的:建立检查双氯芬酸钾原料药中有关物质含量的方法。方法:采用高效液相色谱法。色谱柱为Ultimate C₁₈,流动相为甲醇-4%冰醋酸水溶液(65:35),流速为1 ml/min,检测波长为254 nm。结果:双氯芬酸钾检测质量浓度线性范围为0.205 3~51.335 0 μg/ml($r=0.999 9, n=5$),检测限为1.54 ng。结论:该方法简单、灵敏,可用于双氯芬酸钾原料药中有关物质的检查。

关键词 双氯芬酸钾原料药;高效液相色谱法;有关物质;检查

Determination of Related Substance in Diclofenac Potassium Raw Material by HPLC

LI Wei-ling(Guangzhou Institute for Drug Control, Guangzhou 510160, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To develop the method for the determination of related substance in diclofenac potassium raw material. METHODS: HPLC was adopted. The determination was performed on Ultimate C₁₈ column with mobile phase consisted of methanol-4% acetic acid solution (65:35) at the flow rate of 1 ml/min. The detection wavelength was set at 254 nm. RESULTS: The linear range of diclofenac potassium were 0.205 3-51.335 0 μg/ml ($r=0.999 9, n=5$). The lowest detection limit was 1.54 ng. CONCLUSIONS: The method is simple, sensitive and suitable for the determination of related substance in diclofenac potassium raw material.

KEY WORDS Diclofenac potassium raw material; HPLC; Related substance; Determination

双氯芬酸钾,化学名为邻-(2,6-二氯苯胺基)-苯乙酸钾,其主要药理作用是通过抑制环氧化酶而减少前列腺素的生物合成,而前列腺素在疼痛、炎症及发热过程中起重要作用^[1]。双氯芬酸钾目前的剂型有胶囊、片剂、凝胶^[2]等,目前载的检查方法存在于国家食品药品监督管理局药品标准(简称国家药品标准)^[3]、《英国药典》^[4]、《美国药典》^[5]和进口药品注册标准^[6]中。笔者对比各检查方法,并在此基础上拟定了新的较为简单合理的双氯芬酸钾有关物质检查方法,就双氯芬酸钾的几个已知有关物质在色谱系统中进行了有效分离,测定了已知杂质相对于双氯芬酸钾的相对响应因子,最终建立了双氯芬酸钾原料药有关物质的检查方法。

1 材料

1.1 仪器

1200型高效液相色谱仪、Chemstation色谱工作站(美国安捷伦科技有限公司);XS-204电子天平(瑞士Mettler Toledo公司)。

1.2 药品与试剂

双氯芬酸钾对照品(中国食品药品检定研究院,批号:

10080-200601,纯度:100.0%);样品双氯芬酸钾原料药(A,批号:C0147,纯度:100.0%;B,批号:100819-2,纯度:100.0%;C,批号无,纯度:99.8%);杂质I、II、III对照品(北京诺华制药有限公司,批号、纯度无);甲醇、乙腈为色谱纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Ultimate C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-4%冰醋酸水溶液(65:35),流动相使用前经0.45 μm有机滤膜抽滤并脱气,流速:1.0 ml/min;检测波长:254 nm;柱温:40 ℃。

2.2 系统适用性试验

取双氯芬酸钾对照品适量,用水制成1 mg/ml的溶液。取适量,置于石英吸收池中,在紫外光灯(254 nm)下照射15 min(使产生1个稳定的杂质峰,满足系统适用性的要求,在此后的试验中无需采用昂贵的杂质对照品),此溶液作为系统适用性试验溶液。精密量取此溶液20 μl,注入色谱仪,记录色谱图。结果在与双氯芬酸钾相对保留时间约0.77处出现1个杂质峰,杂质峰与双氯芬酸钾峰的分度应大于6.0,理论板数按双氯

[5] 赵善民,晋玲,黄丽娟.不同浓度乙醇对蟾蜍血压和心率的影响[J].生物学杂志,1996,71(3):16.

[6] Morvai V. Acute effects of low doses of alcohol on the cardiovascular system in young men[J]. Acta Med Hung, 1988, 45(3/4):339.

[7] Chen RN. Review on determination of residual organic so-

*副主任药师,硕士。研究方向:化学药品检验。电话:020-26282199。E-mail:llwlling@163.com

lvents in drugs[J]. Chin J Pharma, 1997, 28(6):275.

[8] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2010年版.北京:中国医药科技出版社,2010:附录VE、VII E.

[9] 殷涌光,陈玉江,刘瑜,等.磷脂功能性质及其生产应用的研究进展[J].食品与机械,2009,25(3):120.

[10] 胡兴中,徐振山.我国大豆磷脂的开发利用状况与产业发展设想[J].中国油脂,1999,24(3):54.

(收稿日期:2013-02-20 修回日期:2013-03-22)