HPLC 法测定 11 种 PC 和 PE 类合成磷脂

刘翠平，张程程，贾幼智*，潘红娟*

（中国医药工业研究总院上海医药工业研究院有限公司，先导物成药性研究全国重点实验室，上海 201203）

摘要：建立了 HPLC 法测定 11 种磷脂酰胆碱（PC）和磷脂酰乙醇胺（PE）类合成磷脂。结合 11 种合成磷脂的结构特点和在色谱中的保留行为，首次将孔径为 12 和 15 nm（120 和 150 Å）的 C_8 色谱柱串联，串联顺序为 Welch-Topsil -C_8 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm，15 nm）在前，Ultimate XB- C_8 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm，12 nm）在后，以水 - 甲醇 - 乙酸 - 三乙胺为流动相 A，以甲醇 - 异丙醇 - 乙酸 - 三乙胺为流动相 B，梯度洗脱。结果显示，11 种 PC 和 PE 类合成磷脂的最小分离度为 1.0，7 种 PC 类合成磷脂在质量浓度 0.1 ～ 1.0 mg/mL 内线性关系良好，4 种 PC 类合成磷脂在质量浓度 0.03 ～ 0.30 mg/mL 内线性关系良好，精密度 RSD 均小于 2.5%。并且，此分离方法被成功应用于 2 种脂质体注射液和 1 种辅料中合成磷脂的测定。

关键词：合成磷脂；磷脂酰胆碱；磷脂酰乙醇胺；色谱柱串联；脂质体

中图分类号：R917；Q545　　**文献标志码**：A　　文章编号：1001-8255(2024)11-1539-11

引用：刘翠平 , 张程程 , 贾幼智 , 等．HPLC 法测定 11 种 PC 和 PE 类合成磷脂 [J]．中国医药工业杂志 , 2024, 55(11): 1539-1549．DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2024.11.011

Determination of Eleven Synthetic PC and PE Phospholipids by HPLC

LIU Cuiping, ZHANG Chengcheng, JIA Youzhi*, PAN Hongjuan*

(*State Key Lab. of New Drug and Pharmaceutical Process, Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, China State Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203*)

ABSTRACT: An HPLC method was established to determine eleven synthetic phosphatidylcholine (PC) and phosphatidylethanolamine (PE) phospholipids. Consideration of the structural characteristics and retention behaviors in chromatography of the phospholipids, C_8 chromatography columns with pore sizes of 12 and 15 nm (120 and 150 Å) were connected in series for the first time. The serial sequence was Welch Topsil C_8 column (4.6 mm×250 mm, 5 μm, 15 nm) at front and Ultimate XB C_8 column (4.6 mm×250 mm, 5 μm, 12 nm) at back. The analysis was carried out in the gradient elution mode with water-methanol-acetic acid-triethylamine as mobile phase A, and methanol-isopropanol-acetic acid-triethylamine as mobile phase B. The results showed that the minimum separation degree of eleven synthetic PC and PE was 1.0. It was linear for seven synthetic PC phospholipids in the concentration of 0.1 − 1.0 mg/mL, and it was linear for four synthetic PC phospholipids in the concentration of 0.03 − 0.30 mg/mL. RSDs of precision were all less than 2.5 % . And this separation method was successfully applied to the determination of synthesized phospholipids in two types of liposome injections and one excipient.

Key Words: synthetic phospholipid; phosphatidylcholine; phosphatidylethanolamine; series connection of chromatographic columns; liposome

磷脂在药物递送系统中的应用日益受到关注，如在复杂制剂脂质体中常被用来充当脂质体的膜材。磷脂根据来源途径的不同，可分为天然来源和人工合成[1]。由于当前的分离和纯化技术很难获得任何单一分子的天然磷脂，为满足制剂的需求，很多合成磷脂相继出现。合成磷脂在生物学性质和结构上与天然脂质相似，具有良好的生物相容性和可降解性，并且纯度较高，在原辅料中的使用越来越多[2—6]，可作为药物递送系统的载体、赋型剂和乳化剂。根据目前在研和上市药物的处方统计[7—9]，合成磷脂占据了脂质类辅料的重要地位。

根据结构中含有的醇类，磷脂可分为2种类型，即甘油磷脂和鞘氨醇。而作为药用辅料的磷脂，主要为甘油磷脂类。甘油磷脂是由sn-甘油-3-磷酸衍生而来，种类复杂、多样。根据甘油磷脂结构通式中X基团的不同，可以把甘油磷脂分为6类，分别是磷脂酰胆碱（phosphatidylcholine，PC）、磷脂酰乙醇胺（phosphatidylethanolamine，PE）、磷脂酰丝氨酸（phosphatidylserine，PS）、磷脂酰甘油（phosphatidylglycerol，PG）、磷脂酰肌醇（phosphatidylinositol，PI）和磷脂酸（phosphatidic acid，PA），其中PC和PE的结构如图1所示。结构中的R_1和R_2基团代表饱和或不饱和脂肪酸，其中饱和脂肪酸有棕榈酸、硬脂酸、肉豆蔻酸等；不饱和脂肪酸有油酸、亚麻酸、花生四烯酸等[2]。本研究将甘油磷脂通式中X基团不同的磷脂定义为类间，将X基团相同、但R_1和R_2基团不同的磷脂定义为类内。目前市售和制剂处方中常用的磷脂为PC和PE类，其结构如表1所示。

磷脂类化合物的测定方法主要为TLC法、GC法、核磁共振磷谱（^{31}P nuclear magnetic resonance，^{31}P NMR）法和HPLC法等。郑巧[10]采用TLC法测定了DEPC中溶血磷脂（也统称为脂质）酰胆碱和芥酸杂质，操作简单、快速，但灵敏度低，在试验过程中易引起磷脂的氧化和分解，目前少有研究采用此法。衍生化GC法是通过对样品进行前处理得到挥发性的脂肪酸甲酯（fatty acid methyl ester，FAME），然后用GC-氢火焰离子化检测器（hydrogen flame ionization detector，FID）[11]对FAME进行分离和分析。GC法能够提供单一物质的确切脂肪酸组成信息，但该法前处理步骤烦琐且结果计算较为复杂，当配方中含有多个组分磷脂时无法对每种磷脂进行区分，因此不适用于质量控制和过程监控。^{31}P NMR是利用核磁共振信号与相应的共振核数成比例的关系，实现同时定性和定量分析磷脂。^{31}P NMR有许多优势，检测速度快、准确性较高和不破坏待测物结构，但仅适用于分析成分单一的磷脂[12]，对于头部化学环境相同的类内差异磷脂（如DPPE和DOPE），无法准确区分定量；并且，NMR仪器价格昂贵，维护费用高。合成磷脂的相对分子质量在500～1 000，为两性物质，长烃基链使磷脂具有强疏水性，磷酸-头部基团具有极性和亲水性；因结构中仅脂肪酸链可能存在不饱和键，故磷脂的紫外吸收强度很弱。采用正相（normal phase，NP）HPLC-蒸发光散射检测器（evaporative light-scattering detector，ELSD）法是当前测定磷脂类化合物最常用的分析方法，该法的原理是将经色谱分离后的洗脱液雾化形成气溶胶，然后在加热的漂移管中将溶剂蒸发，余下的不挥发性溶质颗粒在光散射检测池中进行检测[13]。ChP 2020年版、USP 47版和EP 11.0版中均采用NP-HPLC-ELSD法，由于在正相色谱系统会使用大量正己烷和异丙醇作为洗脱溶剂，这些溶剂对环境和操作人员的身体健康危害较大。国内外文献报道的磷脂检测研究多集中在类间分离[14—15]且分离的组分较为单一，王智华等[16]和TAKED等[15]虽然对不同种类的磷脂进行了反相液相色谱分离方法的开发，但均未提及色谱柱孔径对磷脂色谱峰形的影响。

本研究结合目前上市的脂质体药物处方和市售

收稿日期：2024-02-29

作者简介：刘翠平（1992—），女，硕士研究生，专业方向：药品质量控制研究。

通信作者：贾幼智（1978—），女，副研究员，硕士生导师，从事药品质量研究与开发。

E-mail：jiayouzhi@sinopharm.com

潘红娟（1976—），女，研究员，硕士生导师，从事药品质量控制研究及新技术和新方法在药物分析上的应用研究。

E-mail：panhongjuan@sinopharm.com

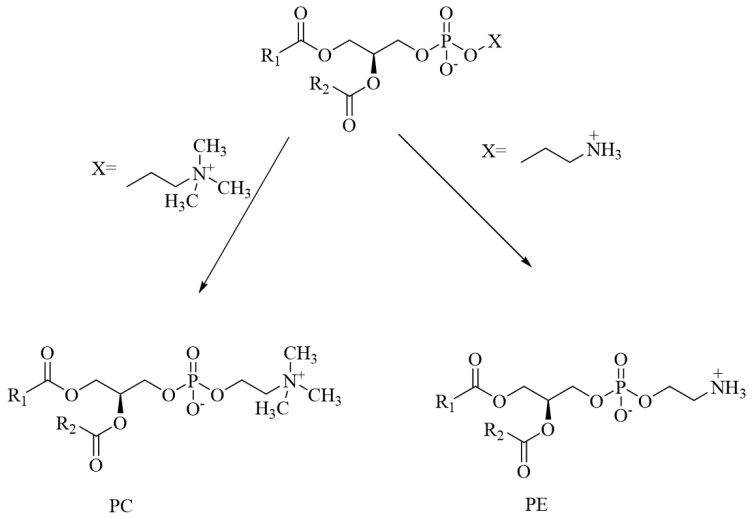


图 1 PC 和 PE 结构

Fig.1 Structures of Phosphatidylcholine and Phosphatidylethanolamine

情况，以 7 种 PC 类和 4 种 PE 类常见的合成磷脂为研究对象，选择 15 nm(150Å)C_8 色谱柱改善了 PC 类合成磷脂色谱峰拖尾情况，讨论了 11 磷脂在不同种类 C_8 色谱柱分离情况，最终通过串联不同孔径 C_8 色谱柱完成了 11 种磷脂的反相液相色谱分离，并对 2 种脂质体药物和 1 种辅料中的磷脂进行了分离并定性，旨在以操作简便、普及性好为目标，建立一种能同时完成磷脂类内和类间分离的通用检测方法，为合成磷脂辅料质量标准的制定和含磷脂辅料药物（如脂质体）的质量控制提供借鉴。

1 仪器与试药

Ultimate U3000 型液相色谱仪（美国 Thermo 公司，配备 ELSD)；XS205 型十万分之一电子天平和 XPR2 型百万分之一电子天平（瑞士 Mettler Toledo 公司）。

1 对照品（含量≥ 99%，批号 C14419796)、**3** 对照品（含量≥ 99%，批号 D832790) 和胆固醇 (CHOL，**12**，含量≥ 99%，批号 C12398352)（上海麦克林生化科技有限公司）；**2** 对照品（含量≥ 97%，批号 D4249)、**4** 对照品（含量≥ 97%，批号 D4213)、**5** 对照品（含量≥ 98%，批号 01395488)、**6** 对照品（含量≥ 98%，批号 D4251)、**7** 对照品（含量≥ 99%，批号 C14481567)、**8** 对照品（含量≥ 97%，批号 01381760) 和 **10** 对照品（含量≥ 98%，批号 01397902)（日本 TCI 公司）；**9** 对照品（北京伊诺凯科技有限公司，含量≥ 99%，批号 KYGG916)；**11** 对照品（含量≥ 99%，批号 557109-2150001-01/101)、三辛酸甘油酯 (TG，**15**，含量≥ 99%，批号 58509-21800021064) 和氢化大豆磷脂酰胆碱 (HSPC，hydrogenated soy phosphatidylcholine，批号 557109-2150001-011101)（德国 Lipoid 公司）；二硬脂酰基磷脂酰乙醇胺－聚乙二醇 2000[DSPE-MPEG2000，**13**，艾伟拓（上海）医药科技有限公司，含量≥ 95%，批号 F01008]；二棕榈酰磷脂酰甘油 (DPPG，**14**，日本精化 NFC 公司，含量≥ 97.3%，批号 RCS20330)。盐酸多柔比星脂质体注射液（上海复旦张江生物医药股份有限公司，批号 L210301，脂质成分：DSPE-MPEG2000、HSPC、胆固醇）；空载阿霉素脂质体（批号 20221101，脂质成分：DSPE-MPEG2000、HSPC、胆固醇）、布比卡因多囊脂质体（批号 ZX2-IM4-18589-69，脂质成分：TG、DPPG、DEPC)（上海现代药物制剂工程研究中心新型注射剂研究室）。

甲醇、异丙醇和氯仿均为 HPLC 级，乙酸和三乙胺为 AR 级，水为纯化水。

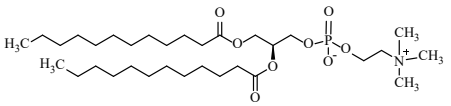
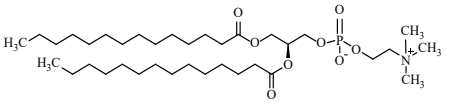
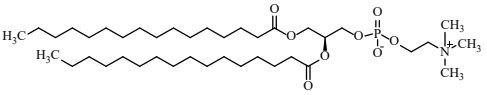
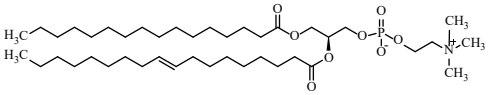
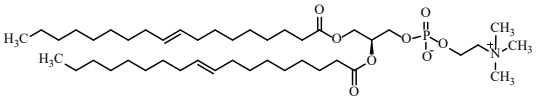
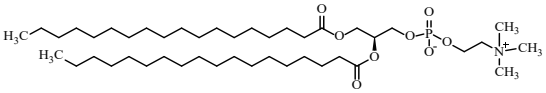
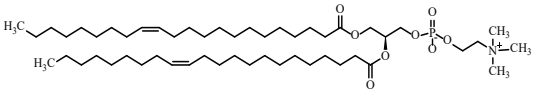
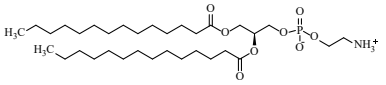
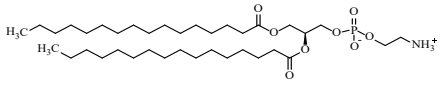
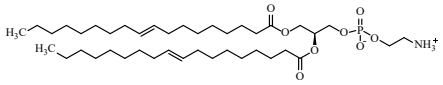
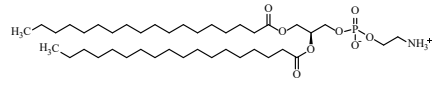
2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱 柱①为 Welch-Topsil-C_8 柱 (4.6 mm×250 mm，5 μm，15 nm)， 柱 ② 为 Ultimate XB-C_8 柱 (4.6 mm×250mm，5 μm，12 nm)，串联，顺序为先柱①后柱②；流动相 A 为水、甲醇、乙酸和三乙胺（体积比 65 ∶ 35 ∶ 1.0 ∶ 0.1)，B 为甲醇、异丙醇、乙酸和三乙胺（体积比 85 ∶ 15 ∶ 1.0 ∶ 0.1)，梯度洗脱 (0—

表 1　11 种 PC 和 PE 类合成磷脂的结构

Tab.1　Structures of Eleven Synthetic PC and PE Phospholipids

类别	化合物名称	化合物缩写	编号	结构式
PC 类	二月桂酰磷脂酰胆碱（1,2-dilauroyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine）	DLPC	**1**	
	二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱（1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphocholine）	DMPC	**2**	
	二棕榈酰磷脂酰胆碱（1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine）	DPPC	**3**	
	1- 棕榈酰 -2- 油酰磷脂酰胆碱（1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine）	POPC	**4**	
	二油酰磷脂酰胆碱（dioleoyl Phosphatidylcholine）	DOPC	**5**	
	二硬质酰磷脂酰胆碱（1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphorylcholine）	DSPC	**6**	
	二芥酰磷脂酰胆碱（1,2-dierucoyl-sn-glycero-3-phosphocholine）	DEPC	**7**	
PE 类	二肉豆蔻酰磷脂酰乙醇胺（dimyristoylphosphatidylethanolamine）	DMPE	**8**	
	二棕榈酰磷脂酰乙醇胺（dipalmitoylPhosphoethanolamine）	DPPE	**9**	
	二油酰磷脂酰乙醇胺（dioleoylphosphatidylethanolamine）	DOPE	**10**	
	二硬脂酰磷脂酰乙醇胺（1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphorylethanolamine）	DSPE	**11**	

8 min，B 70％—90％；8—34 min，B 90％—100％；34—45 min，B 100%；45—45.1 min，B 100%—70%；45.1—50 min，B 70%）；柱温 30 ℃，流速 0.8 mL/min，进样量 5 μL。

ELSD 运行参数：气体流速 2 L/min，漂移管温度 72 ℃；增益值 2。

2.2　溶液配制

空白溶剂：20％甲醇氯仿溶液。

11 种 PC 和 PE 混合对照品贮备液：精密称取 7 种 PC 对照品各约 20 mg，4 种 PE 对照品各约 5 mg，

置同一20 mL量瓶中，加空白溶剂溶解并定容，摇匀，即得7种PC对照品质量浓度为1 mg/mL、4种PE对照品质量浓度为0.25 mg/mL的混合对照品贮备液。

11种PC和PE混合对照品溶液①：精密量取上述混合对照品贮备液1 mL，置2 mL量瓶中，加空白溶剂定容，摇匀即得7种PC对照品质量浓度为0.5 mg/mL、4种PE对照品质量浓度为0.125 mg/mL的11种PC和PE混合对照品溶液①。

11种PC和PE混合对照品溶液②：精密称取11种PC和PE对照品各12.5 mg，置25 mL量瓶中，加空白溶剂定容，摇匀，即得11种对照品质量浓度均为0.5 mg/mL的混合对照品溶液②。

11种PC和PE混合对照品溶液③：精密称取11种PC和PE对照品各10 mg，置20 mL量瓶中，加空白溶剂定容，摇匀，即得11种对照品质量浓度均为0.5 mg/mL的混合对照品溶液③，与混合对照品溶液②为不同天配制所得。

7种PC混合对照品溶液：精密称取7种PC对照品各5 mg，置10 mL量瓶中，加空白溶剂定容，摇匀，即得7种PC对照品质量浓度均为0.5 mg/mL的PC混合对照品溶液。

4种PE混合对照品溶液：精密称取4种PE各4 mg，置20 mL量瓶中，加空白溶剂定容，摇匀，即得质量浓度均为0.2 mg/mL的4种PE混合对照品溶液。

DEPC对照品溶液：精密称取DEPC 10 mg，置20 mL量瓶中，加空白溶剂定容，摇匀，即得质量浓度为0.5 mg/mL的DEPC对照品溶液。

CHOL对照品溶液：精密称取CHOL 5 mg，置10 mL量瓶中，加空白溶剂定容，摇匀，即得质量浓度为0.5 mg/mL的CHOL对照品溶液。

DSPE-MPEG2000对照品溶液：精密称取DSPE-MPEG2000 10 mg，置10 mL量瓶中，加空白溶剂定容，摇匀，即得质量浓度为1.0 mg/mL的DSPE-MPEG2000对照品溶液。

DPPG对照品溶液：精密称取DPPG 5 mg，置10 mL量瓶中，加空白溶剂定容，摇匀，即得质量浓度为0.5 mg/mL的DPPG对照品溶液。

TG对照品溶液：精密称取TG 7 mg，置10 mL量瓶中，加空白溶剂定容，摇匀，即得质量浓度为0.7 mg/mL的TG对照品溶液。

供试品溶液①：精密量取盐酸多柔比星脂质体注射液2 mL，置10 mL量瓶中，加入异丙醇5 mL破乳后，再加入空白溶剂解并定容，摇匀即得。

供试品溶液②：精密量取空载阿霉素脂质体1 mL，置10 mL量瓶中，加入异丙醇5 mL破乳后，用空白溶剂溶解并定容，摇匀；精密量取上述溶液5 mL，置50 mL量瓶中，加入空白溶剂定容，摇匀即得。

供试品溶液③：精密量取布比卡因多囊脂质体注射液1 mL，置10 mL量瓶中，加入异丙醇5 mL破乳后，再加入空白溶剂稀释，摇匀即得。

供试品溶液④：取氢化大豆磷脂酰胆碱8 mg，精密称定，置10 mL量瓶中，加入空白溶剂溶解并定容，摇匀即得。

2.3 方法学考察

2.3.1 系统适用性试验

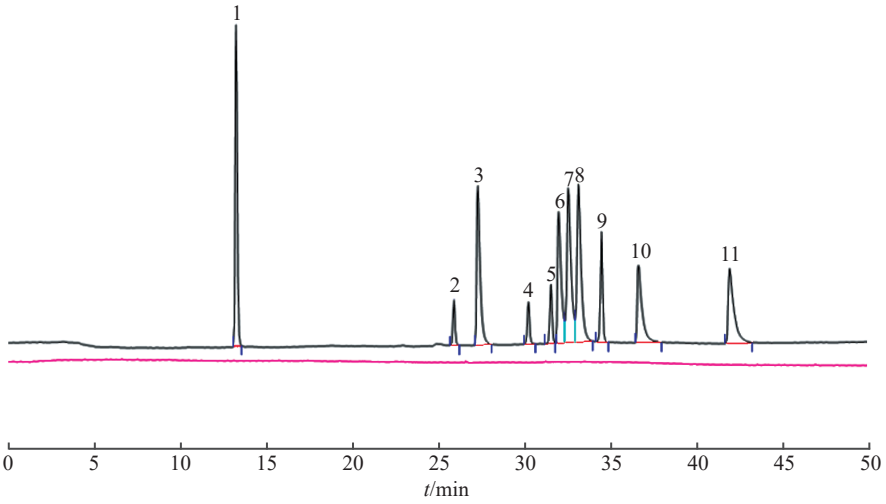
分别取“**2.2**”项下空白溶剂、11种PC和PE混合对照品贮备液，按“**2.1**”项下色谱条件进行测定，记录色谱图。结果如图2所示，11种磷脂各色谱峰间的最小分离度为1.0（除DPPC、POPC、DOPC）；空白溶剂无干扰，11种磷脂的理论塔板数均大于20 000，其中DLPC的理论塔板数为26 816。

2.3.2 线性试验

取“**2.2**”项下11种PC和PE混合对照品贮备液为线性母液，加入空白溶剂定量稀释制成6个不同质量浓度的系列对照品溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进行测定，记录色谱图，以峰面积的对数值（y）为纵坐标、质量浓度的对数值（x）为横坐标进行线性回归，所得标准曲线方程如表2所示，各方程的相关系数r^2均大于0.990 0，说明11种合成磷脂在相应的质量浓度范围内线性关系良好。

2.3.3 检测限和定量限

取“**2.2**”项下11种PC和PE混合对照品贮备液适量，加入空白溶剂溶解并逐步稀释，按“**2.1**”项下色谱条件进行测定，记录色谱图。



1—DLPC；2—DMPE；3—DMPC；4—DPPE；5—DOPE；6—DPPC；7—POPC；8—DOPC；9—DSPE；10—DSPC；11—DEPC。

图 2　11 种 PC 和 PE 类合成磷脂液相色谱图

Fig.2　Chromatogram of 11 Synthetic PC and PE Phospholipids

以信噪比 *S*/*N* ≥ 3 计算 LOD；以信噪比 *S*/*N* ≥ 10 计算 LOQ。结果如表 2 所示。将 LOQ 溶液连续进样 5 次，11 种磷脂峰面积 RSD（*n*=5）均小于 2.5%。

2.3.4　精密度试验

取“**2.2**”项下 11 种 PC 和 PE 混合对照品溶液①，按“**2.1**”项下色谱条件重复进样 6 次，记录色谱图，计算得 11 种磷脂峰面积 RSD（*n*=6）均小于 1.5%，表明系统精密度良好。

2.4　样品测定

分别取“**2.2**”项下 4 种供试品溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进行，分别记录样品色谱图（图 3）。可见，4 种供试品溶液中的多组分脂质和磷脂均得到有效分离，结合制剂处方和单个对照品在色谱图上的保留时间对供试品的各组分进行定性分析，结果证明该法的通用性较好。

3　讨论

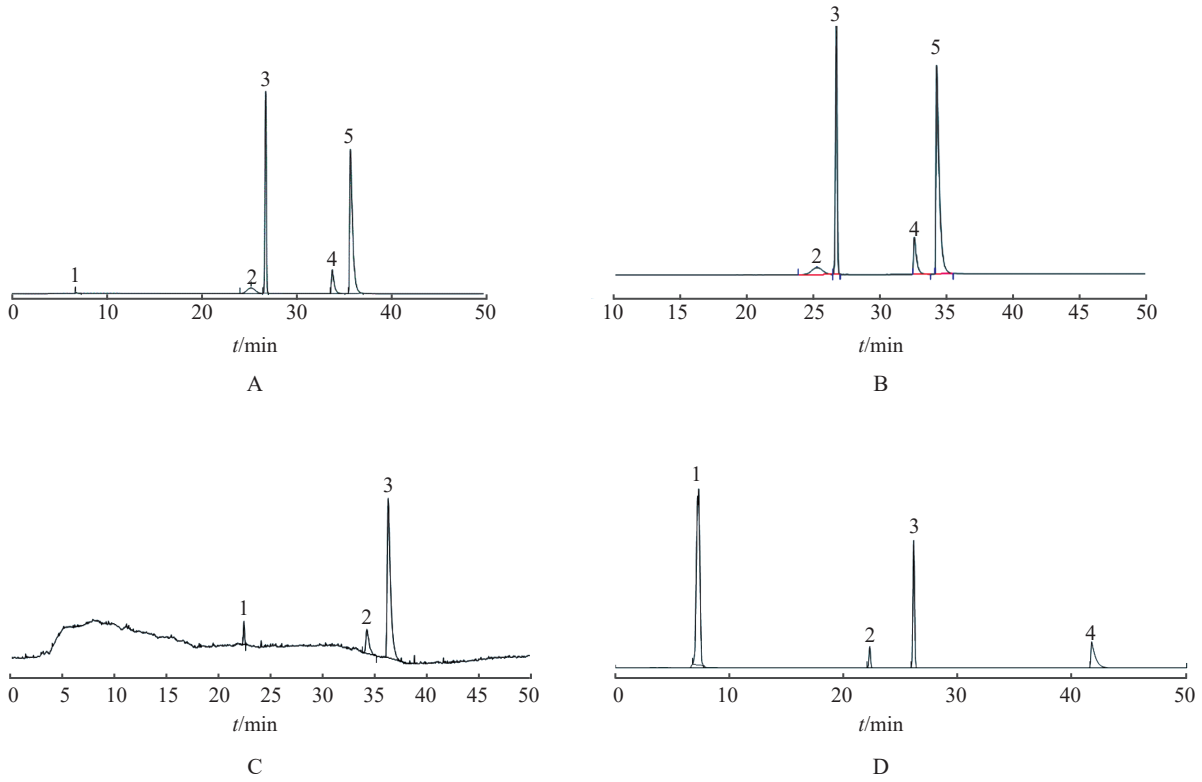
3.1　氢化大豆磷脂酰胆碱的组成

已知盐酸多柔比星脂质体注射液和空载阿霉素脂质体的制剂处方中均含有 HSPC；而图 3 显示，供试品①、②和④都出现 HSPC 峰。图 3C 谱图中显示，HSPC 包括 HSPC-1 和 HSPC-2 两个组分。其中 HSPC-2 的保留时间为 36.4 min，与对照品中 DSPC 保留时间一致，同时采用质谱检测器测得 HSPC-2 ESI^+ 的相对分子质量为 790.63，因此推测 HSPC-2 可

表 2　线性试验、LOD 和 LOQ 结果

Tab.2　Results of Linearity Test, LODs and LOQs

化合物	浓度范围 /(mg·mL^{-1})	标准曲线方程	相关系数 r^2	LOD/(mg·mL^{-1})	LOQ/(mg·mL^{-1})
DLPC	0.099 ～ 0.993	y=1.607 4x+1.798 5	0.999 6	0.05	0.099
DMPE	0.025 ～ 0.250	y=1.657 3x+1.998 2	0.997 7	0.01	0.025
DMPC	0.097 ～ 0.971	y=1.766 1x+1.811 3	0.999 9	0.05	0.097
DPPE	0.026 ～ 0.261	y=1.683 3x+1.99 7	0.999 5	0.01	0.026
DPPC	0.101 ～ 1.013	y=1.813 6x+1.723 6	0.999 9	0.05	0.101
DOPE	0.031 ～ 0.308	y=1.710 3x+2.037 2	0.998 9	0.02	0.101
POPC	0.099 ～ 0.988	y=1.726 9x+1.841 9	0.999 1	0.05	0.099
DOPC	0.113 ～ 1.126	y=1.827 2x+1.765 9	0.999 2	0.06	0.113
DSPE	0.031 ～ 0.308	y=2.474 5x+2.904 2	0.996 4	0.02	0.031
DSPC	0.101 ～ 1.010	y=1.728 5x+1.586 7	0.999 9	0.05	0.101
DEPC	0.104 ～ 1.036	y=1.836 7x+1.662 3	0.999 7	0.05	0.104



A—供试品溶液①（峰 1—未知；峰 2—DSPE-MPEG2000；峰 3—CHOL；峰 4—HSPC；峰 5—DSPC）；B—供试品溶液②（峰 1—未知；峰 2—DSPE-MPEG200；峰 3—CHOL；峰 4—HSPC；峰 5—DSPC）；C—供试品溶液④（峰 1—未知；峰 2—HSPC-1；峰 3—HSPC-2）；D—供试品溶液③（峰 1—未知；峰 2—三辛酸甘油酯；峰 3—DPPG；峰 4—DEPC）。

图 3 供试品溶液色谱图

Fig.3 Chromatograms of Test Solution

能为 DSPC。测得 HSPC-1 ESI^+ 的相对分子质量为 763.6，根据相对分子质量和色谱峰形推测 HSPC-1 为 1- 棕榈酰 -2- 硬脂酰磷脂酰胆碱（1-palmitoyl-2-stearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine，PSPC）[17]。

3.2 基于反相液相色谱法分离 11 种合成磷脂的开发思路

3.2.1 流动相的选择

11 种 PC 和 PE 合成磷脂都具有较强疏水性，PC 和 PE 在甲醇、乙醇、异丙醇和氯仿中有较好的溶解度。预试验中观察到当有机相为 100% 甲醇时，大部分化合物会在 100% 甲醇等度洗脱下共流出，分离效果差，因此考虑加入一定比例的异丙醇增加对 11 种磷脂的选择性。

3.2.2 色谱柱的选择

本试验筛选了不同填料色谱柱，发现保留能力如下：C_{18}>C_8 ≈苯基柱 > 氨基柱≈氰基柱。C_{18} 柱保留能力强，需要使用异丙醇、四氢呋喃等强洗脱溶剂，在 100% 的条件下长时间洗脱；苯基柱、氰基柱和氨基柱的选择性均较差，通过调节流动相可实现 PC 和 PE 的类间分离，但难以实现类内分离；相较于 C_{18} 柱，C_8 柱的保留能力较弱，但对于磷脂仍具有较强的保留，通过调节流动相与梯度条件可能实现有效分离，故本试验初步选择 C_8 柱。分离条件如下：色谱柱 Ultimate XB-C_8 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm，12 nm）；流动相 A 为水、甲醇、乙酸和三乙胺（体积比 65 ∶ 35 ∶ 0.5 ∶ 0.05），B 为甲醇和异丙醇（体积比 85 ∶ 15），梯度洗脱条件和 ELSD 运行参数同“**2.1**”项；柱温 30 ℃；流速 1.0 mL/min；进样量 20 μL；取 11 种 PC 和 PE 混合对照品溶液 3 进样，结果如图 4 所示。

由图 4 可知，4 种 PE 类磷脂的色谱峰无明显拖尾情况，拖尾因子在 0.8 ～ 1.0；但 7 种 PC 类磷脂的色谱峰拖尾严重，不对称因子均大于 2.0，DPPC、POPC 和 DOPC 无法达到基线分离。

从图 4 中 11 种磷脂的色谱峰可知，4 种 PE 类磷脂的色谱峰对称性良好，而 7 种 PC 类磷脂的色谱峰拖尾严重，分析原因如下。①从化合物结构上分析，PC 类磷脂和 PE 类磷脂的碱性大小不同，胆碱的碱性大于乙醇胺，因此 PC 类磷脂更易与 C_8 色谱柱表面裸露的大量硅羟基（Si-OH）发生作用，形成拖尾。②从化合物的空间结构分析，PC 类磷脂中的胆碱基团（false）空间结构大于 PE 类磷脂中的乙醇胺基团（false），同时 PC 与 C_8 色谱柱表面裸露的硅羟基发生作用的概率较大，因此形成拖尾。PE 类磷脂和 PC 类磷脂与 C_8 色谱柱的相互作用如图 5 所示。

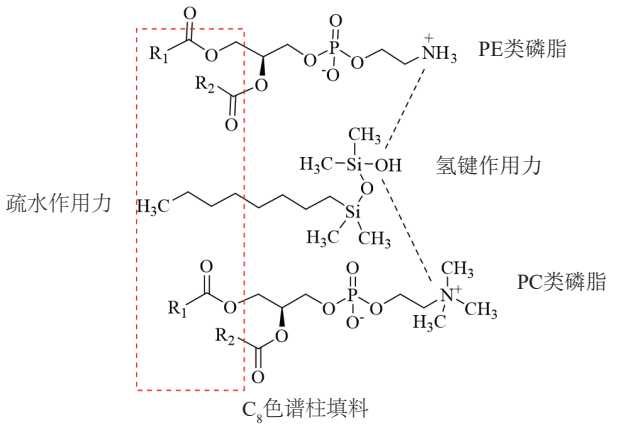


图 5　PC 和 PE 类合成磷脂与 C_8 色谱柱固定相的相互作用

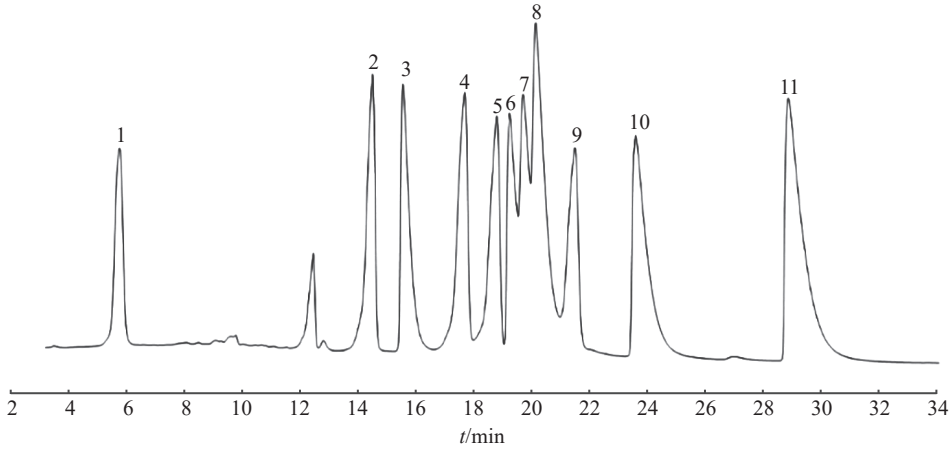
Fig.5　Interaction between Synthetic PC and PE Phospholipids and C_8 Chromatographic Column Stationary Phase

3.2.3　流动相中添加剂的选择

根据上述对 7 种 PC 类磷脂色谱峰拖尾的原因①分析，尝试在流动相中加入不同的添加剂来改善 PC 类磷脂色谱峰的拖尾情况。取 DEPC 对照品溶液，按“**2.1**”项下色谱条件进样分析，并结合检测器的特点考察了部分可挥发性的添加剂，如 0.1%三氟乙酸溶液、10 mmol/L 甲酸铵溶液、20 mmol/L 甲酸铵溶液、0.5%～ 0.8%甲酸的三乙胺缓冲溶液、0.2%～ 1.0%乙酸的三乙胺缓冲溶液。结果显示，DEPC 色谱峰的不对称因子均在 3.5 ～ 4.5，表明在流动相中加入上述添加剂均未改善 PC 类磷脂色谱峰的拖尾情况。

3.2.4　色谱柱孔径的选择

根据上述对 7 种 PC 类磷脂色谱峰拖尾的原因②分析，同时考虑到蛋白质在进行一级结构表征时所使用到的反相色谱柱的孔径较大［一般大于 30 nm（300 Å）］以及磷脂化合物的相对分子质量在小分子化合物和多肽之间的性质，考察了色谱柱孔径对改善 PC 类磷脂色谱峰拖尾的可行性。本试验选择了孔径分别为 10、11、12、12.5、13 和 15 nm（100、



1—DLPC；2—DMPE；3—DMPC；4—DPPE；5—DOPE；6—DPPC；7—POPC；8—DOPC；9—DSPE；10—DSPC；11—DEPC。

图 4　11 种 PC 和 PE 类合成磷脂液相色谱图

Fig.4　Chromatogram of 11 Synthetic PC and PE Phospholipids

110、120、125、130 和 150 Å）的 C_8 或 C_{18} 色谱柱，取 DEPC 对照品溶液，按“2.1”项下色谱条件进样分析。结果如图 6 所示，当色谱柱孔径为 15 nm 时，DEPC 的不对称因子在 0.95 ～ 1.15。

3.2.5 单根色谱柱分离 11 种 PC 和 PE 类合成磷脂

取 7 种 PC 混合对照品溶液和 4 种 PE 混合对照品溶液进样分析：色谱柱 Welch-Topsil-C_8 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm，15 nm）；流动相 A 为水和甲醇（体积比 65 ∶ 35），B 为甲醇和异丙醇（体积比 85 ∶ 15），梯度洗脱（0—8 min，B 70 %—90 %；8—28 min，B 90%—100%；28—45 min，B 100%；45—45.1 min，B 100 % —70 %；45.1—50 min，B 70%）；柱温 30 ℃，流速 0.8 mL/min，进样量 5 μL；ELSD 检测器运行参数同“**2.1**”项，结果如图 7 所示。

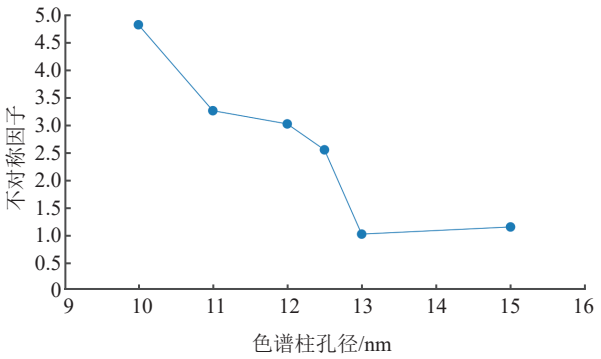


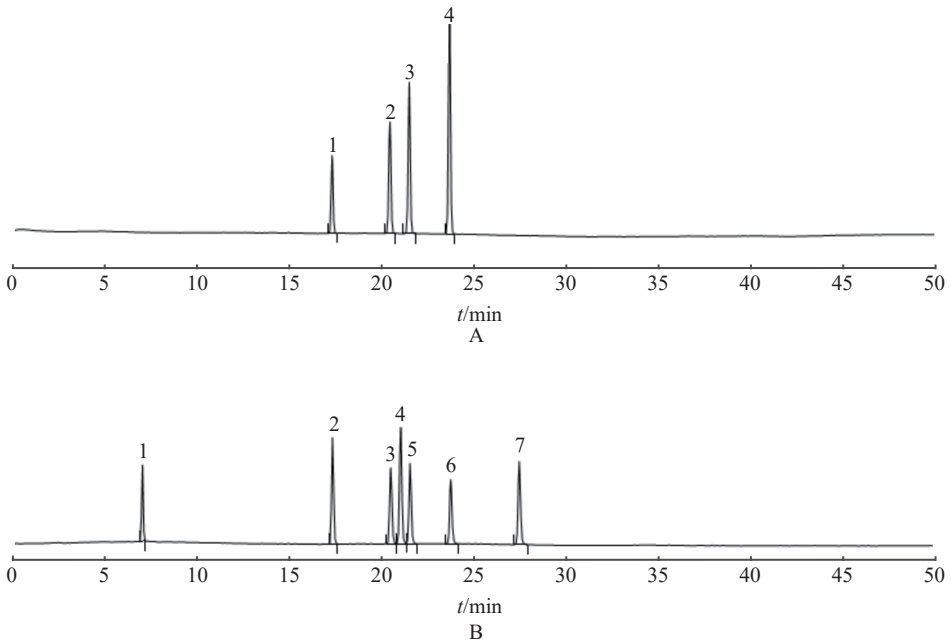
图 6 DEPC 在不同色谱柱孔径中的不对称因子

Fig.6 Asymmetric Factors of DEPC in Different Chromatographic Column Apertures

由图 7 可见，C_8 色谱柱孔径为 15 nm 时，PC 类和 PE 类磷脂均可实现各自的类内分离，同时改善了 PC 类合成磷脂色谱峰拖尾情况；但 DMPC 和 DMPE、DPPC 和 DPPE、DSPC 和 DSPE、DOPE 和 DOPC 保留时间几乎完全相同，不能完成 PC 和 PE 的类间分离。而图 4 显示，当 C_8 色谱柱的孔径为 12 nm 时，PC 类磷脂和 PE 类磷脂可实现类间分离。结合 11 种磷脂在 2 根不同孔径的 C_8 色谱柱中分离的正交性，后续试验尝试将 2 根色谱柱串联对 11 种磷脂进行分离。

3.2.6 串联色谱柱分离 11 种合成磷脂

2 个色谱柱的串联增加了色谱柱长度，所以“**3.2.5**”



A—PE 类磷脂（1—DMPE；2—DPPE；3—DOPE；4—DSPE）；B—PC 类磷脂（1—DLPC；2—DMPC；3—DPPC；4—POPC；5—DOPC；6—DSPC；7—DEPC）。

图 7 7 种 PC 类合成磷脂和 4 种 PE 类合成磷脂的液相色谱层叠图

Fig.7 Stacked Chromatogram of Seven Synthetic PC Phospholipids and Four Synthetic PE Phospholipids

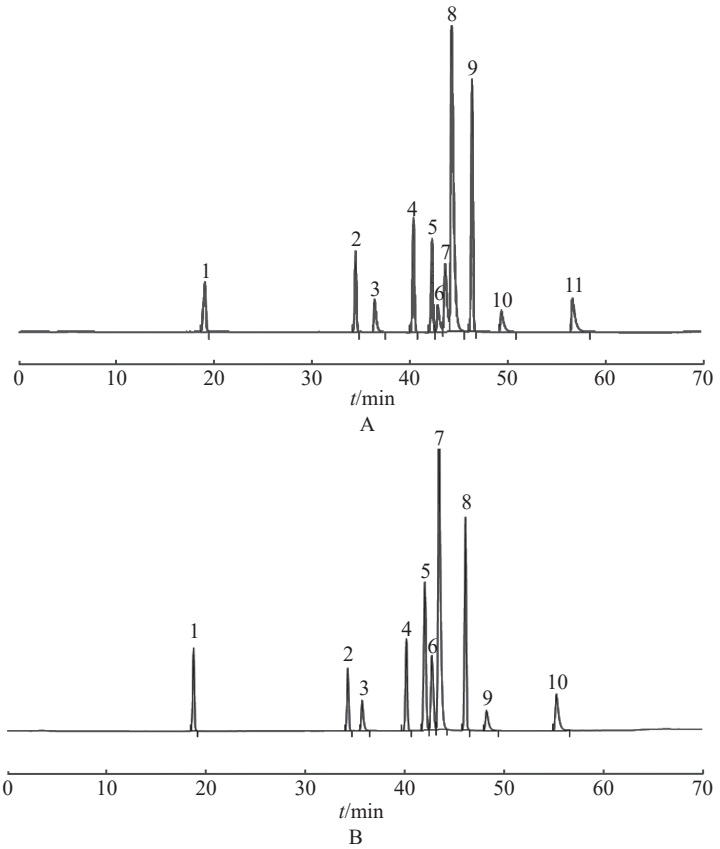
的色谱条件不再适用。本试验通过改变流速、流动相洗脱梯度等关键因素，最终确定了以下色谱条件：色谱柱①为 Welch-Topsil-C_8 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm，15 nm），色谱柱②为 Ultimate XB-C_8 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm，12 nm）。取 11 种 PC 和 PE 混合对照品溶液②进样检测，以水、甲醇、乙酸和三乙胺（体积比 65 ∶ 35 ∶ 1.0 ∶ 0.1）为流动相 A，甲醇、异丙醇、乙酸和三乙胺（体积比 85 ∶ 15 ∶ 1.0 ∶ 0.1）为流动相 B，梯度洗脱（0—8 min，B 70 %—90 %；8—38 min，B 90 %—100 %；38—60 min，B 100 %；60—60.1 min，B 100 %—70 %；60.1—70 min，B 70 %）；柱温 35 ℃；流速 0.5 mL/min；进样量 5 μL；ELSD 检测器运行参数同“**2.1**”项。调换 2 根色谱柱的串联顺序，所得色谱图如图 8 所示。

对比 2 根色谱柱不同串联顺序所得的色谱图可知，图 8A 的串联方式完成了 11 种 PC 和 PE 合成磷脂的分离，图 8B 的串联方式会导致 DOPE 和 DPPC 共流，但可以完成其余 PC 和 PE 合成磷脂的分离。

本研究在改变流动相流速和洗脱梯度的过程中观察到，“**2.1**”项下色谱条件测得的结果与图 8 相似，同时将分析时间由 70 min 缩短为 50 min，因此最终选择“**2.1**”项下的色谱条件对该方法进行了验证和样品测定。

4　总结与展望

在当前磷脂分离方法的研究中，主要集中于磷脂的类间分离（例如 PC 和 PG），而对于同一类磷脂类内分离的研究较少（例如 PC 类中 DPPC、DSPC 或更多 PC 类化合物）。本研究通过串联 2 根不同孔径 C_8 色谱柱，同时分离了 11 种 PC 和 PE 合成磷脂，建立了对 11 种合成磷脂定性的通用方法，



A—先色谱柱①后色谱柱②（1—DLPC；2—DMPE；3—DMPC；4—DPPE；5—DOPE；6—DPPC；7—POPC；8—DOPC；9—DSPE；10—DSPC；11—DEPC）；B—先色谱柱②后色谱柱①（1—DLPC；2—DMPE；3—DMPC；4—DPPE；5—DOPE 和 DPPC；6—POPC；7—DOPC；8—DSPE；9—DSPC；10—DEPC）。

图 8　11 种 PC 和 PE 类合成磷脂液相色谱图

Fig.8　Chromatogram of 11 Synthetic PC and PE Phospholipids

同时使用孔径 15 nm 的 C_8 色谱柱改善了 PC 类合成磷脂色谱峰拖尾情况。未来，随着制剂工艺的发展，将有更多类型的合成磷脂出现，以及多种类型的合成磷脂配伍共同组成载体并调节其功能，因此本试验中的方法开发思路可为甘油磷脂中的其他磷脂比如 PA、PG、PI 及 PS 分离方法的研究提供一定的参考价值。

参考文献：

[1] SINGH R P, GANGADHARAPPA H V, MRUTHUNJAYA K. Phospholipids: unique carriers for drug delivery systems [J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2017, **39**: 166-179.

[2] 高正松 , 王保成 , 徐松泉 , 等. 磷脂的合成研究进展 [J]. 广州化工 , 2020, **48**(19): 1-6.

[3] 吴立红 , 史 颖 , 郑立刚 , 等. 二脂肪酰磷脂酰乙醇胺的制备方法 : 中国 , 102770130A [P]. 2008-09-24.

[4] ODA Y, SUZUKI R, MORI T, *et al*. Development of fluorous lipid-based nanobubbles for efficiently containing perfluoropropane [J]. *Int J Pharm*, 2015, **487**(1/2): 64-71.

[5] MARRAPU B, MALLAMPALLI L K, KAKI S S, *et al*. A novel method to synthesize 1-acyl-sn-glycero-3-phosphocholine and 1,2-diacyl-sn-glycero-3-phosphocholine [J]. *Eur J Lipid Sci Technol*, 2015, **116**: 1-12.

[6] XIA J, HUI Y Z. Synthesis of a small library of mixed-acid phoepholipids from D-mannitol as a homochiral starting material [J]. *Chem Pharm Bull*, 1999, **47**(11): 1659-1663.

[7] AGHDAM M A, Bagheri R, Mosafer J, *et al*. Recent advances on thermosensitive and pH-sensitive liposomes employed in controlled release [J]. *J Control Release*, 2019, **10**: 1-22.

[8] SHAH S, DHAWAN V, HOLM R, *et al*. Liposomes: advancements and innovation in the manufacturing process [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2020, 154: 102-122.

[9] MEHTA P P, GHOSHAL D, PAWAR A P, *et al*. Recent advances in inhalable liposomes for treatment of pulmonarydiseases: concept to clinical stance [J]. *J Drug Deliv Sci Technol*, 2020, **56**: 101509.

[10] 郑 巧. 二芥酰磷脂酰胆碱的质量研究 [D]. 南京 : 东南大学硕士学位论文 , 2019.

[11] YAN R W, ZHAO L L, LI Y F, *et al*. Simultaneous determination of tricaprylin, DPPG and DEPC in propofol liposomes by a methyl esterification method and GC-FID analysis [J]. *Anal Methods*, 2017, **9**: 5101-5107.

[12] DIEHL B. 31P-NMR in phospholipid analysis [J]. *Lipid Technol*, 2002, **14**: 62-65.

[13] TRETTENES U B, STEIN P C, BEATE KLÖSGEN B, *et al*. A method for simultaneous quantification of phospholipid species by routine 31P NMR [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, **70**: 708-712.

[14] WEBER F, RAHNFELD L, LUCIANI P. Analytical profiling and stability evaluation of liposomal drug delivery systems: a rapid UHPLC-CAD-based approach for phospholipids in research and quality control [J]. *Talanta*, 2020, **1**: 121320.

[15] TAKEDA H , TAKAHASHI M , HARA T , *et al*. Improved quantitation of lipid classes using supercritical fluid chromatography with a charged aerosol detector [J]. *J Lipid Res*, 2019, **60**(8): 1465-1474.

[16] 王智华 , 卢学清 , 洪筱坤. 反相离子对高效液相色谱法分离不同种类的磷脂酰胆碱 [J]. 色谱 , 2002, (3): 249-252.

[17] 曹 栋 , 裘爱泳 , 王兴国. 大豆磷脂酰胆碱分子类型的研究 [J]. 中国油脂 , 2003, **28**(12): 49-52.