HPLC-ELSD 法测定卵磷脂片中的磷脂酰乙醇胺和蛋黄磷脂酰胆碱

吴盼盼，王春贺，姜晓菊，岳云飞，王常禹*
（黑龙江省药品检验研究院，黑龙江哈尔滨 150088）

摘要：建立了 HPLC-ELSD 法测定卵磷脂（**1**）片中的磷脂酰乙醇胺（**2**）和蛋黄磷脂酰胆碱（**3**）。采用 CAPCELL PAK C_{18} 色谱柱（4.6 mm×250 mm，5 μm），以甲醇、水、冰乙酸和三乙胺（体积比 85 ∶ 15 ∶ 0.45 ∶ 0.05）为流动相 A，以正己烷、异丙醇和流动相 A（体积比 20 ∶ 48 ∶ 32）为流动相 B，梯度洗脱。结果显示，**2**、**3** 分别在 2 ～ 50 和 20 ～ 400 μg/mL 内线性关系良好，平均加样回收率（*n*=6）分别为 102.9%和 106.6%，RSD 分别为 2.6%和 1.4%。含量测定结果显示，6 批 **1** 片中，**2** 和 **3** 的含量分别为每片 1.5 ～ 5.0 和 40.0 ～ 65.0 mg。建立的方法具有良好的专属性、准确性，可用于 **1** 片中 **2** 和 **3** 的测定。

关键词：卵磷脂片；磷脂酰乙醇胺；蛋黄磷脂酰胆碱；HPLC-ELSD；含量测定
中图分类号：R917　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1001-8255(2024)-02-0271-05
DOI：10.16522/j.cnki.cjph.2024.02.014

Determination of Phosphatidyl Ethanolamine and Egg Yolk Phosphatidylcholine in Lecithin Tablets by HPLC-ELSD

WU Panpan, WANG Chunhe, JIANG Xiaoju, YUE Yunfei, WANG Changyu*
(*Heilongjiang Institute for Drug Control, Harbin 150088*)

ABSTRACT: An HPLC-ELSD method was established to determine the contents of phosphatidyl ethanolamine (**2**) and egg yolk phosphatidylcholine (**3**) in lecithin (**1**) tablets. The CAPCELL PAK C_{18} column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used, and the analysis was carried out in the gradient elution mode with methanol-water-glacial acetic acid-triethylamine (85∶15∶0.45∶0.05) as mobile phase A, and n-hexane-isopropanol-mobile phase A (20∶48∶32) as mobile phase B. The results showed that it was linear for **2** and **3** in the ranges of 2 - 50 and 20 - 400 μg/mL, respectively. The average recoveries (*n*=6) of **2** and **3** were 102.9% and 106.6%, respectively, with RSDs of 2.6% and 1.4%. The content determination results showed that in six batches of **1** tablets, the contents of **2** and **3** were 1.5 - 5.0 and 40.0 - 65.0 mg per tablet, respectively. The established method has good specificity and accuracy, which can be used for the determination of **2** and **3** in **1** tablets.

Key Words: lecithin tablet; phosphatidyl ethanolamine; egg yolk phosphatidylcholine; HPLC-ELSD; content determination

卵磷脂（lecithin，**1**）是 19 世纪中叶由法国人 GOHLEY 首次从蛋黄中发现的；它是生命的基础物质，存在于每个细胞中，在脑及神经系统、血液循环系统、免疫系统以及肝、心、肾等重要器官部位更集中。按照来源不同，**1** 分为大豆卵磷脂、蛋黄卵磷脂和菜籽卵磷脂。蛋黄卵磷脂是从鸡蛋黄中提取、精制而得的一种复合磷脂，包括磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇、鞘磷脂、溶血磷脂酰胆碱和溶血磷脂酰乙醇胺[1—3]。蛋黄卵磷脂中磷脂酰胆碱的含量高，且富含饱和脂肪酸和多种不饱和脂肪酸及奇数碳脂肪酸[4]，具有更强的氧化稳定性[5]、抗菌[6]、抗炎[7]、提高人体记忆功能[8]、

收稿日期：2023-02-14
基金项目：2017年度国家药典委员会药品标准提高项目（食药监办药化管[2017]139号）
作者简介：吴盼盼（1985—），女，硕士，从事药品检验研究。
通信作者：王常禹（1973—），女，主任药师，从事药品质量标准研究。
E-mail：Wangyangchangyu@126.com

降低血压[9]等重要的生理功能，备受关注，因此科研工作者对蛋黄卵磷脂的研究也越来越多[10—15]。

目前，蛋黄卵磷脂已被应用于化妆品、医药和营养领域，《中华人民共和国药典》（ChP）2020年版四部收载了辅料蛋黄卵磷脂的质量标准，但没有对制剂中的有效成分磷脂酰乙醇胺（phosphatidylethanolamine，**2**）和蛋黄磷脂酰胆碱（egg yolk phosphatidylcholine，**3**）进行质量控制。**1**片系蛋黄卵磷脂加适量辅料制成的薄膜衣片。目前**1**片质量标准收载于《国家药品标准》（化学药品地方标准上升国家标准 第九册）WS-10001-（HD-0817）-2002中，该质量标准只对**1**片中磷的含量进行了测定，专属性差，亟待提高。**2**和**3**是**1**片的主要成分，且**3**含量较高、性质较稳定，可作为**1**片的质量控制指标。

本研究采用高效液相色谱-蒸发光检测器（HPLC-ELSD）法，对**1**片中**2**和**3**的含量进行测定，同时进行方法学验证，考察方法的科学性、准确性和适用性，以期建立精准、方便、快捷的**1**片含量测定方法。

1　仪器与试药

UltiMate 3000型高效液相色谱仪和Alltech 6000型蒸发光散射检测器（美国Thermo Fisher Scientific公司）；XS205型十万分之一电子天平［梅特勒-托利多（上海）仪器公司］。

2（含量99.5%，批号190006-201503）、**3**（含量90.6%，批号190005-201602）、磷脂酰肌醇（含量50.1%，批号190004-201502）、溶血磷脂酰乙醇胺（含量99.2%，批号190024-201603）、鞘磷脂（含量94.8%，批号190023-201603）、溶血磷脂酰胆碱（含量99.2%，批号190025-201704），以上物质的对照品均购于中国食品药品检定研究院；**1**片（来自2个生产企业，共6批，规格为每片0.5 g，批号分别为20201218、20201219、20201220，200408、201108、20181107）。

甲醇、正己烷、异丙醇、三乙胺、冰乙酸、三氯甲烷均为分析纯，水为纯化水。

2　方法与结果

2.1　色谱条件

色谱柱　以硅胶为填充剂的CAPCELL PAK C_{18}柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）；流动相A为甲醇、水、冰乙酸、三乙胺（体积比85 ∶ 15 ∶ 0.45 ∶ 0.05），B为正己烷、异丙醇、流动相A（体积比20 ∶ 48 ∶ 32），梯度洗脱（0—10 min，A 0；10—20 min，A 0—30%；20—35 min，A 30%—95%；35—36 min，A 95%—0；36—45 min，A 0）；柱温40 ℃；检测器　蒸发光散射检测器；漂移管温度80 ℃；载气流量2.0 mL/min；进样量20 μL。

2.2　溶液配制

对照品溶液：精密称取**2**、**3**对照品各约20、50 mg，分别置25 mL量瓶中，用三氯甲烷和甲醇（体积比2 ∶ 1，以下简称“溶剂”）溶解并定容，分别作为**2**、**3**对照品贮备液；再分别精密量取**2**、**3**对照品贮备液3、10 mL，置同一20 mL量瓶中，摇匀，作为对照品混合溶液；取对照品混合溶液逐级稀释，制成不同质量浓度的对照品溶液。

供试品溶液：取**1**片20片，除去薄膜衣，精密称定，研细；精密称取上述细粉适量，置50 mL量瓶中，用溶剂溶解并定容，摇匀，作为供试品溶液。

2.3　方法学考察

2.3.1　系统适用性试验

精密称取**2**对照品10 mg，溶血磷脂酰乙醇胺对照品约20 mg，磷脂酰肌醇、**3**、鞘磷脂、溶血磷脂酰胆碱对照品各约40 mg，分别置20 mL量瓶中，用溶剂溶解并定容，分别作为各对照品贮备液；再分别精密量取各对照品贮备液1 mL，置同一10 mL量瓶中，用溶剂定容，摇匀，作为系统适用性溶液。按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，结果如图1所示，各峰的理论塔板数均大于1 500，各峰之间的分离度均大于1.5，空白无干扰，专属性良好。

2.3.2　线性试验

分别精密称取**2**、**3**对照品适量，用溶剂溶解并稀释，配制成**2**质量浓度分别约为2、5、10、20、30、50 μg/mL的标准曲线溶液，**3**质量浓度分别约为20、50、100、200、300、400 μg/mL的标准曲线溶液，以对照品溶液质量浓度的对数值（y）为横坐标、相应峰面积的对数值（x）为纵坐标，进行线性回归，分别得**2**、**3**的回归方程为

y=1.411 4x+0.149 4、y=1.330 3x+0.183 1，r^2 分别为 0.996 6、0.996 8，说明 **2**、**3** 在相应浓度范围内线性关系良好。

2.3.3 重复性试验

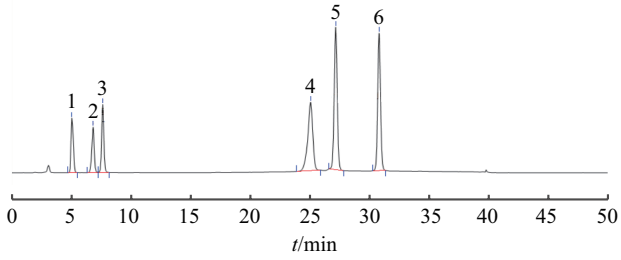
精密称取 **1** 片（批号 181107）6 份，按“**2.2**”项下方法制备供试品溶液，并按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，色谱图如图 2 所示。结果显示，**2** 和 **3** 含量的 RSD（n=6）分别为 2.7%、2.4%，表明该方法重复性良好。

2.3.4 稳定性试验

精密称取 **1** 片（批号 181107），按“**2.2**”项下方法制备供试品溶液，分别于室温放置 0、2、4、8、12、24 h 时取样，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定。结果显示，样品中 **2** 和 **3** 的含量基本无变化，**2** 和 **3** 含量的 RSD（n=6）分别为 0.8%、0.5%。说明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.3.5 破坏性试验

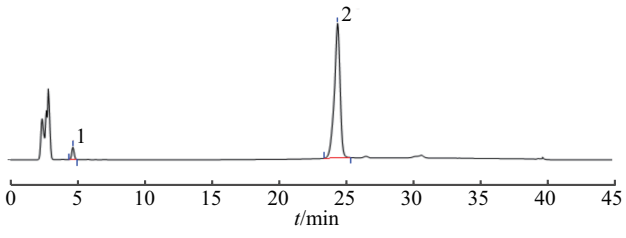
精密称取 **1** 片（批号 181107）6 份，分别进行高温破坏（70 ℃水浴加热 5 h）、光照破坏（3 000 lx 下放置 24 h），以及酸破坏［加入少量溶剂溶解，加入甲酸 1 mL，室温放置 24 h，加入三乙胺 1 mL 调至 pH 中性］、碱破坏［加入少量溶剂溶解，加入三乙胺 1 mL，室温放置 24 h，加入甲酸 1 mL 调至 pH 中性］、氧化破坏［加入少量溶剂溶解，加入 30%过氧化氢溶液 1 mL，常温放置 24 h］，按“**2.2**”项下方法制成供试溶液后，再按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，记录峰面积，并与未破坏的供试品溶液进行对比。结果表明，**2** 和 **3** 在不同的破坏条件下均比较稳定，未产生明显的降解产物。



1—2；2—磷脂酰肌醇；3—溶血磷脂酰乙醇胺；4—3；5—鞘磷脂；6—溶血磷脂酰胆碱。

图 1 系统适用性溶液的色谱图

Fig.1 Chromatogram of System Suitability Solution



1—**2**；2—**3**。

图 2 1 片剂的典型色谱图

Fig.2 Typical Chromatogram of **1** Tablets

2.3.6 加标回收率试验

精密称取 **2**、**3** 对照品各约 20、150 mg，分别置 25、10 mL 量瓶中，用溶剂溶解并定容，分别作为 **2**、**3** 对照品贮备液。

取已知含量的 **1** 片（批号 181107）6 份，按“**2.2**”项下方法制成供试溶液，精密加入上述 **2**、**3** 对照品贮备液适量，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，计算平均回收率（n=6）和 RSD。结果显示，**2** 和 **3** 的平均回收率分别为 102.9%和 106.6%，RSD 分别为 2.6%和 1.4%。

2.3.7 检测限和定量限

分别精密量取“**2.3.6**”项下的 **2**、**3** 对照品贮备液适量，置同一量瓶中，用溶剂稀释并定容，按“**2.1**”项下色谱条件进样测定。以信噪比分别为 3 和 10 时作为检测限和定量限。结果显示，**2**、**3** 的检测限分别为 2、10 μg/mL，定量限分别为 5、20 μg/mL。

2.3.8 耐用性试验

取 **1** 片（批号 181107），按“**2.2**”项下方法制备供试品溶液，分别在色谱柱温为 35 和 40 ℃时测定 **2**、**3** 峰面积，结果显示，**2**、**3** 峰面积几乎不变；调整流动相在 0 ～ 10 min 阶段的比例，即 V（A）∶V（B）为 0 ∶ 100、5 ∶ 95、10 ∶ 90，结果显示，**2**、**3** 峰面积几乎不变，**2**、**3** 分离度均大于 30，理论塔板数均大于 3 000；考察不同品牌的色谱柱，结果显示，**2**、**3** 的峰面积几乎不变，系统适用性溶液中各组分的分离度均符合要求。综上所述，色谱柱柱温、流动相比例、不同品牌色谱柱对 **2**、

3 的测定影响不大，说明建立的方法耐用性良好。

2.4 样品测定

取 2 家企业提供的 6 批 **1** 片（平均片重以 0.5 g 计），按“**2.2**”项下方法制成供试品溶液，再按“**2.1**”项下色谱条件进样测定，记录峰面积，并以对照品溶液质量浓度的对数值与相应峰面积的对数值计算回归方程，用回归方程计算 **2**、**3** 的含量，结果如表 1 所示。

表 1　1 片的含量测定结果（*n*=2）

Tab.1　Determination Results of **1** Tablets (*n*=2)

批号	**2**		**3**	
	平均含量/mg	RSD/%	平均含量/mg	RSD/%
20201218	2.5	0.3	43.0	0.2
20201219	2.7	2.3	45.3	2.6
20201220	1.6	2.3	41.7	1.4
181107	3.6	0.3	47.9	0.4
200408	3.7	0.1	54.6	1.0
201108	4.2	2.4	61.3	2.6

3　讨论

3.1 色谱条件

本研究以甲醇、水、冰乙酸和三乙胺（85 ∶ 15 ∶ 0.45 ∶ 0.05）为流动相 A，以正己烷、异丙醇和流动相 A（20 ∶ 48 ∶ 32）为流动相 B，进行梯度洗脱，结果在不同柱温（40、35 ℃）条件下，**2** 和 **3** 峰的保留时间、峰形及分离效果几乎不变；比较流动相的不同初始比例［*V*（A）∶ *V*（B）= 0 ∶ 100、5 ∶ 95 或 10 ∶ 90］，以及不同色谱柱［资生堂 CAPCELL PAK C_{18} 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）和太玮科技 JADE-PAK Silica C_{18} 柱（4.6 mm×250 mm，5 μm）］的结果显示，目标组分的分离度均大于 30，理论塔板数均大于 3 000，表明本法的适用性良好、可操作性强。

3.2 破坏试验结果分析

在酸、碱破坏性试验中，由于本试验的稀释剂为溶剂，而盐酸和氢氧化钠与其相容性不好，因此本研究选择甲酸和三乙胺作为酸、碱破坏溶剂，而没有使用常用的盐酸、氢氧化钠等条件。从结果看，破坏性试验未产生明显的降解产物，说明试验条件太温和。

3.3 样品含量结果分析

从表 3 结果可知，2 个生产企业生产的 6 批 **1** 片中 **2** 的含量在每片 1.5 ～ 5.0 mg，3 的含量在每片 40.0 ～ 65.0 mg。检验结果表明，不同生产企业的产品质量差异比较明显，同一生产企业不同批次的 **2** 和 **3** 含量具有一定的波动性。这说明不同生产企业的原料来源不同、工艺差异较大，而现行质量标准无法客观地反映产品内在质量，缺少有效质控指标。本方法能够准确地测定蛋黄卵磷脂制剂中 **2** 和 **3** 的含量，对企业的原料质控和生产工艺改进具有指导意义，提高了蛋黄卵磷脂制剂的质量可控性。

4　小结

本研究建立了 HPLC-ELSD 法测定 **1** 片中的 **2** 和 **3**。该方法的系统适应性、线性关系、稳定性及回收率均能达到方法学相关要求，与原 **1** 片的检验方法《国家药品标准》（化学药品地方标准上升国家标准 第九册）WS-10001-（HD-0817）-2002 相比，首先样品处理过程简便，同时减少了紫外检测过程中溶剂等因素对最大吸收波长的影响，专属性、准确性好；其次本方法补充了 **1** 片中有效成分 **2** 和 **3** 的质量控制，为评价蛋黄卵磷脂制剂的内在质量提供了可靠的技术支持，确保了药品的安全性和有效性。

参考文献：

[1] 袁昕蓉, 邱志斌, 王东凯. HPLC-ELSD法测定卵磷脂中5种主成分的含量[J]. 中国药房, 2009, **20**(31): 2465-2466.

[2] 常　皓, 王二雷, 宫新统, 等. 蛋黄卵磷脂研究概况[J]. 食品工业科技, 2010, **31**(5): 414-416.

[3] 陈妙芬, 万丹晶, 华瀛夏, 等. HPLC法测定卵磷脂中6个成分的含量[J]. 药学服务与研究, 2005, **5**(3): 234-236.

[4] 朱　帅, 黄梦玲, 吴倩倩, 等. 蛋黄卵磷脂的结构、提取、功能与脂质体研究进展[J]. 粮油食品科技, 2020, **28**(3): 18-23.

[5] KING M F, BOYD L C, SHELDON B W. Antioxidant properties of individual phospholipids in a salmon oil model system [J]. *J Am Oil Chem Soc*, 1992, **69**(6): 545-551.

（下转第 282 页）

参考文献：

[1] 张 权. 正确认识帕金森[J]. 开卷有益: 求医问药, 2022, (4): 32-33.

[2] 朱艳霞, 王雪笠, 吕冬芳, 等. 生物反馈法治疗帕金森病患者睡眠障碍的效果观察[J]. 山东医药, 2018, **58**(37): 69-71.

[3] 许玉珉, 黑赏艳, 章时杰, 等. 中西医结合治疗帕金森病睡眠障碍随机对照试验的Meta分析[J]. 广州中医药大学学报, 2018, **35**(3): 540-548.

[4] LIU C F, WANG T, ZHAN S Q, *et al*. Management recommendations on sleep disturbance of patients with Parkinson's disease [J]. *Chin Med J*, 2018, **131**(24): 2976-2985.

[5] 陈 彪. 左旋多巴在帕金森病治疗中的地位及进展[J]. 中国临床神经科学, 2017, **25**(5): 546-550.

[6] 梁金花. 卡比多巴-左旋多巴控释片治疗帕金森病合并睡眠障碍患者的疗效观察[J]. 中国实用医药, 2016, **11**(7): 204-205.

[7] 高 方. 卡比多巴-左旋多巴控释片治疗帕金森病合并睡眠障碍的临床效果观察[J]. 首都食品与医药, 2019, **26**(5): 60.

[8] VÉRONNEAU V, ROBAEY P, URSINO M, *et al*. An integrative model of Parkinson's disease treatment including levodopa pharmacokinetics, dopamine kinetics, basal ganglia neurotransmission and motor action throughout disease progression [J]. *J Pharmacokinet Pharmacodyn*, 2021, **48**(1): 133-148.

（上接第 274 页）

[6] WANG D Y, MEI H C V D, REN Y, *et al*. Lipid-based antimicrobial delivery-systems for the treatment of bacterial infections [J]. *Front Chem*, 2020, **7**(872): 1-12.

[7] TREEDE I, BRAUN A, SPARLA R, *et al*. Anti-inflammatory effects of phosphatidylcholine [J]. *J Biol Chem*, 2007, **282**(37): 27155-27164.

[8] CHE H, FU X, ZHANG L, *et al*. Neuroprotective effects of n-3 polyunsaturated fatty acid-enriched phosphatidylserine against oxidative damage in PC12 cells [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2018, **741**(38): 657-668.

[9] NOWACKI D, MARTYNOWICZ H, SKOCZYŃSKA A, *et al*. Lecithin derived from ω-3 PUFA fortified eggs decreases blood pressure in spontaneously hypertensive rats [J]. *Sci Rep*, 2017, **7**(1): 12373-12375.

[10] 吴 昊. 7XAW大孔吸附树脂纯化蛋黄卵磷脂的工艺研究[J]. 中国油脂, 2018, **43**(12): 79-83.

[11] 何仙玉, 黄 祎, 教小磐. 超声辅助提取蛋黄卵磷脂工艺优化及其理化特性研究[J]. 食品工业科技, 2019, **40**(3): 185-190.

[12] 贺 茜, 吕 卓, 史朝烨, 等. 高效液相色谱法测定大豆磷脂类保健食品中的磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, **11**(19): 6793-6796.

[13] 李和平, 魏建春, 付 丽, 等. 水相体系磷脂酶A1改性蛋黄卵磷脂的研究[J]. 食品科技, 2018, **43**(10): 66-71.

[14] 徐明明, 吕 晶, 方欣欣, 等. 蛋黄卵磷脂和蛋黄磷脂酰胆碱的组成与结构分析[J]. 中国药师, 2014, **17**(10): 1669-1671.

[15] 孔凡华, 王 轩, 于连洋, 等. 高效液相色谱-蒸发光检测器法测定鸡蛋中卵磷脂的含量[J]. 食品工业科技, 2021, **42**(13): 299-303.