

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2023.14.024

HPLC-CAD 法测定两性霉素 B 脂质体中 HSPC、DSPG 含量分析 *

王 松¹ 武亚光² 刘洪峰^{1Δ} 冯 玘³ 范秀英¹

(1 安徽医科大学附属宿州医院 药剂科 安徽 宿州 234000; 2 安徽医科大学附属宿州医院 重症医学科 安徽 宿州 234000;
3 皖北卫生职业学院药理学系 安徽 宿州 234000)

摘要 目的:建立高效液相色谱(HPLC)-电喷雾检测器(CAD)法测定两性霉素 B 脂质体(L-AMB)中氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC)和磷脂二硬酯酰磷脂酰甘油(DSPG)含量的方法。**方法:**采用 Venusil XBP C 8(4.6 mm× 250 mm, 5 μm)色谱柱,柱温:30℃;以甲醇-水作为流动相;喷雾压力:56.4 psi,喷雾温度:55℃;梯度洗脱,流速 1.0 mL·min⁻¹。**结果:**L-AMB 各磷脂在 5~60 mg·mL⁻¹ 内与峰面积呈良好的线性关系。HSPC 平均回收率为 100.06%,平均 RSD 为 0.42;DSPG 平均回收率 100.03%,平均 RSD 为 0.55。按 HPLC-CAD 色谱条件测定 L-AMB 中 HSPC、DSPG 含量分别为 1497.66 mg·L⁻¹、4710.93 mg·L⁻¹,且无溶血磷脂检出。采用 HPLC-ELSD 法验证,HSPC、DSPG 含量分别为 1495.28 mg·L⁻¹、4712.71 mg·L⁻¹,两种方法测定 HSPC、DSPG 含量基本一致。**结论:**HPLC-CAD 测定 L-AMB 中 HSPC、DSPG 含量操作简单、准确,可准确测定 L-AMB 中脂质体的质量。

关键词:HPLC-CAD;两性霉素 B 脂质体;HSPC;DSPG;含量

中图分类号:R27 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2023)14-2728-04

Determination of HSPC and DSPG in Amphotericin B Liposomes by HPLC-CAD*

WANG Song¹, WU Ya-guang², LIU Hong-feng^{1Δ}, FENG Qi³, FAN Xiu-ying¹

(1 Suzhou Hospital Affiliated to Anhui Medical University Pharmacy department, Suzhou, Anhui, 234000, China;

2 Suzhou Hospital Affiliated to Anhui Medical University Critical care medicine Department, Suzhou, Anhui, 234000, China;

3 Department of Pharmacy, North Anhui Health Vocational College, Suzhou, Anhui, 234000, China)

ABSTRACT Objective: To establish a method for the determination of hydrogenated soybean phosphatidylcholine (HSPC) and phosphatidylglycerol (DSPG) in amphotericin B liposomes (L-AMB) by HPLC and electrospray detector (CAD). **Methods:** Venusil XBP C 8 (4.6 mm× 250 mm, 5 μm) column was used. The column temperature was 30℃. Using methanol-water as mobile phase; Spray pressure: 56.4 psi, spray temperature: 55℃; Gradient elution at flow rate of 1.0 mL·min⁻¹. **Results:** L-AMB phospholipids had a good linear relationship with peak area in 5~60 mg·mL⁻¹. The average recovery of HSPC was 100.06%, and the average RSDs were 0.42. The average recovery of DSPG was 100.03%, and the average RSDs were 0.55. HSPC and DSPG contents in L-AMB were 1497.66 mg·L⁻¹ and 4710.93 mg·L⁻¹, respectively, and no lysophospholipids were detected by HPLC-CAD. HSPC and DSPG contents were 1495.28 mg·L⁻¹ and 4712.71 mg·L⁻¹, respectively. HSPC and DSPG contents by HPLC-ELSD method were consistent. **Conclusion:** Determination of HSPC and DSPG in L-AMB by HPLC-CAD is simple and accurate, and can accurately determine the quality of liposome in L-AMB.

Key words: HPLC-CAD; Amphotericin B liposome; HSPC; DSPG; Content

Chinese Library Classification(CLC): R27 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2023)14-2728-04

前言

近年来,我国真菌感染的发病率呈逐年上升趋势,两性霉素 B(amphotericin B, AMB)是一种大环七烯类抗真菌药物,可有效控制真菌,主要用于深部真菌的治疗。但注射用两性霉素 B 毒性较大,患者如果长时间使用会造成循环系统及肾损害,限制了 AMB 的临床应用^[1]。1991 年 AMB 的新制剂-两性霉素 B 脂质体(liposomal amphotericin B, L-AMB)在英国上市,可改

变 AMB 在体内的分布降低毒性^[2]。L-AMB 是 AMB 和脂质体的复合体,其中后者为两层磷脂结构,AMB 渗入其中复合而成。由于脂质体不仅可减少 AMB 毒性,提高药物的安全性,还会降低胆固醇亲和力,增加宿主细胞膜对真菌细胞膜麦角固醇的亲和力,提高抗真菌的活性。但由于 AMB 是发酵产物,多次提取精制后产品中仍存在部分杂质;再加之 L-AMB 溶解性差,国内研发的处方中添加了一定量的去胆酸盐增溶^[3-6]。且磷脂酰胆碱水解可能产生溶血磷脂酰胆碱等有害杂质,会增加血栓

* 基金项目:安徽省教育厅 2019 年省级质量工程重点项目(2019xqszx98)

作者简介:王松(1985-),男,本科,主管药师,研究方向:临床药学及静配中心

Δ 通讯作者:刘洪峰,硕士研究生,副主任药师

(收稿日期:2023-02-28 接受日期:2023-03-23)

形成及动脉粥样硬化发生的风险。因此,准确测定 L-AMB 中脂质体含量,对质量控制十分重要。本研究建立 HPLC-CAD 测定 L-AMB 冻干粉中氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC)和磷脂二硬酰磷脂酰甘油(DSPG)含量及 HSPC 降解产物溶血磷脂(MSPC)含量,为 L-AMB 质量控制提供准确的检测方法。

1 仪器与材料

1.1 仪器

高效液相色谱仪 Ultimate 3000 (美国热电公司);CoronaVeo CAD 检测器(美国 Dionex 公司);电子天平 XS205(瑞士 Mettler 公司)。

1.2 材料

DSPG(纯度 > 99%)、HSPC(纯度 > 99%)、MSPC(纯度 > 99%)对照品(lipoid 公司);甲醇(德国 MERCK 公司)色谱纯;二甲基亚砜;氯仿(分析纯);注射用水。注射用两性霉素 B 脂质体(上海新亚药业有限公司,批准文号:国药准字 H20030892)。

2 方法和结果

2.1 色谱条件

采用 Venusil XBP C 8(4.6 mm× 250 mm, 5 μm)色谱柱,柱温:30℃;以甲醇-水作为流动相;喷雾压力:56.4 psi,喷雾温度:55℃;进样量 10 μL;梯度洗脱,流速 1.0 mL·min⁻¹。梯度洗脱方法如下:洗脱时间 0.0 min 时,流动相 A 和 B 分别为 95%、5%;洗脱时间 5.0 min 时,流动相 A 和 B 分别为 100%、0%;洗脱时间 15.0 min 时,流动相 A 和 B 分别为 85%、15%;洗脱时间 20.0 min 时,流动相 A 和 B 分别为 95%、5%。

2.2 溶液制备

2.2.1 系统适用性溶液制备 分别精密称取 L-AMB 对照品 HSPC 5.38 mg, DSPG 5.14 mg, MSPC 5.39 mg 分别置于 10 mL 量瓶中;加入甲醇溶解定容作为储备液,然后精密吸取 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6 mL HSPC、DSPG、MSPC 储备液于 5 mL 量瓶,加入甲醇稀释至刻度并混合均匀后,在各量瓶上分别按各储备液浓度贴上 1~6 号标签。

2.2.2 对照品和供试品溶液 将精密称取的 L-AMB 对照品 HSPC、DSPG、MSPC 适量,加注射用水溶解并稀释配制浓度为 1 g·L⁻¹ 的溶液后,精密吸取 100 μL 于 5 mL 量瓶中,作为对照品;精密称取的 L-AMB 适量,甲醇稀释定容为 1 g·L⁻¹ 的溶液后,精密吸取 100 μL 于 5 mL 量瓶中,作为供试品。

2.2.3 系统适用性试验 分别取 HSPC、DSPG、MSPC 标准品适量,配成 10 μg·mL⁻¹ 的混合溶液,作为系统适用性溶液。

2.2.4 破坏试验 取 L-AMB 样品,分别进行高温、氧化、酸、碱、强光破坏试验,具体如下:(1)高温破坏:将 L-AMB 用水稀释成 2 mg/mL 的溶液,100℃水浴加热 15 h,作为热破坏溶液;(2)氧化破坏:将 1 mL 30%过氧化氢加入 L-AMB 中,用水稀释成 2 mg/mL 的 L-AMB 溶液,放置 50 h,作为氧化破坏溶液;(3)酸破坏:将 1 mL 10 mol/L 盐酸溶液加入 L-AMB 中,放置 7 h,再用 1 mL 10 mol/L 氢氧化钠中和至中性,用水稀释成 2 mg/mL 的 L-AMB 溶液,作为酸破坏溶液;(4)碱破坏:将 1 mL 10 mol/L 氢氧化钠溶液加入 L-AMB 中,放置 7 h,用 1 mL 10 mol/L 盐酸中和至中性,用水稀释成 2 mg/mL 的 L-AMB 溶液,作为碱破

坏溶液;(5)强光破坏:将 L-AMB 用水稀释成 2 mg/mL 的溶液,于 4500Lx 照度下放置 21 d,作为光破坏溶液。分别取以上五种破坏溶液,按 2.1 色谱条件分析,结果显示,L-AMB 在高温、氧化、酸、碱、强光破坏后杂质均能实现满意分离,分离度均 > 1.5。

2.3 方法学验证

2.3.1 线性范围 按 HPLC-CAD 色谱条件,以峰面积(Y)为纵坐标,浓度(X, μg·mL⁻¹)为横坐标,绘制标准曲线,记录色谱峰面积。HSPC、DSPG、MSPC 标准曲线方程分别为 Y=262797X+11190, r=0.9997; Y=31872X+55038, r=0.9993; Y=28196X+28692, r=0.9991;结果显示,L-AMB 各磷脂在 5~60 mg·mL⁻¹ 内与峰面积呈良好的线性关系。

2.3.2 精密度试验 精密称取 L-AMB 处方原料与辅料,将 HSPC、DSPG 标准品配成主药含量为 1 g·L⁻¹ 的溶液后抽取 100 μL 置于 5 mL 量瓶中,甲醇稀释至刻度。重复进样 6 次,按 2.1 色谱条件测定,计算 6 次平均含量。结果显示,HSPC、DSPG 的平均含量分别为 1162.83 mg·L⁻¹, 4319.26 mg·L⁻¹;RSD 分别为 0.06%, 0.11%,提示 HPLC-CAD 精密度良好。

2.3.3 回收率试验 精密称取 L-AMB 处方 HSPC、DSPG 与辅料分别置于 10 mL 量瓶中,加入适量二甲基亚砜(DMSO),超声 10 min 溶解磷脂,甲醇定容,分别配成 80%、100%、120% 的磷脂溶液,精密加入低、中、高三种对照品,每个浓度制备三份溶液,2.1 色谱条件进行测定,计算回收率,结果显示,HSPC 平均回收率为 100.06%,平均 RSD 为 0.42;DSPG 平均回收率 100.03%,平均 RSD 为 0.55。提示 HSPC、DSPG 与辅料回收率良好,证明 HPLC-CAD 法测定 L-AMB 中 HSPC、DSPG 准确度高,符合验证要求。见表 1、表 2。

2.3.4 样品测定 将 L-AMB 样品甲醇稀释定容为 1 g·L⁻¹ 的溶液后,精密吸取 100 μL 于 5 mL 量瓶中,按 HPLC-CAD 色谱条件测定,用外标法计算 HSPC、DSPG 含量。结果显示,HSPC 为 1497.66 mg·L⁻¹, DSPG 为 4710.93 mg·L⁻¹,且无溶血磷脂检出;提示 L-AMB 中 HSPC、DSPG 含量稳定。同时采用 HPLC-ELSD 法进行验证,两种方法测定 HSPC、DSPG 含量基本一致。详见表 3。

3 讨论

HSPC 和 DSPG 是 L-AMB 中的主要成分,其稳定性直接影响 L-AMB 的渗漏率、包封率及脂质体在体内的行为^[7,8]。目前常用的测定磷脂组成的 HPLC 法、SFC 技术等多为紫外检测器^[9-11],其中 HPLC 是一种检测速度快、选择性好、检测效率高、操作智能等特点且优点,是药物分析上应用最广泛的分析技术之一。但由于其检测波长约为 205 nm,灵敏度较低,干扰严重,波长短,限制此波长上有吸收部分溶剂的流动相,达不到经流动相改变来提高磷脂分离的手段。随着检测器与色谱模块联用的色谱联用技术的出现,大大提高了待测样品分离分析的灵敏度,为药品质量分析提供了广阔空间^[12-15]。作为色谱联用技术之一的重要组成部分,各种类型的检测器在 HPLC 系统中相当于"眼睛",而对于不同的药物或不同种类的化合物,需要在众多检测器中选择一种合适的"眼睛"对待测品检测的准确性尤为关键。

表 1 HSPC 回收率
Table1 HSPC recovery rate

Mass concentration($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	Detection mass concentration($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	Recovery rate(%)	Average recovery rate(%)	Mean RSD(%)
983	985.14	99.71	100.06	0.42
997	1004.29	100.52		
958	960.18	100.04		
1197	1183.57	99.73		
1218	1221.85	99.67		
1189	1193.57	99.92		
1098	1102.74	100.49		
1098	1105.35	100.27		
1057	1069.37	99.93		

表 2 DSPG 回收率
Table 2 DSPG recovery rate

Mass concentration ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	Detection mass concentration($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	Recovery rate(%)	Average recovery rate(%)	Mean RSD(%)
522	520.38	99.98	100.06	0.55
531	532.43	100.72		
528	529.06	100.24		
507	509.25	100.18		
442	438.62	99.57		
452	453.81	100.33		
352	350.92	100.03		
355	356.47	99.78		
349	350.76	99.68		

表 3 两种方法测定 HSPC、DSPG 含量比较
Table 3 Comparison of HSPC and DSPG content determined by two methods

Method	HSPC($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	DSPG($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)
HPLC-CAD	1497.66	4710.93
HPLC-ELSD	1495.28	4712.71

目前色谱联用技术中常用的检测器有电喷雾检测器(CAD)、荧光检测器、紫外(UV)检测器、质谱(MS)检测器、示差折光检测器、等离子发射检测器(PED)、蒸发光散射检测器(ELSD)等^[16-19]。其中 UV 具有梯度洗脱适用性强、环境适应性强、灵敏度高的特点,是目前 HPLC 应用最广泛的检测器,不足之处是待测物的化学结构有较强的依赖性,不适合 L-AMB 的检测。而 MS 虽可提供待测物准确的结构信息和分子量,是一种常规化、高度自动化的分析手段,但 MS 检测的前提是需将被测物电离,对于难电离或无法电离的化合物则无法进行检测。CAD 是美国 ESA Biosciences 公司 2004 年 10 月推出的新型通用型检测器,具有独特的检测原理,即待测物在打碎时会形成中性颗粒,而只有在这些中性颗粒表面才有电荷附着,所

以 CAD 检测器可对阴阳离子和中性的检测一次性完成,特别适合如脂类、皂苷类、糖类等弱紫外或无紫外吸收药物成分的检测。另外,大多数 CAD 检测器的参数在出厂时设定好,安装、操作简单方便,灵敏度高,平衡时间短,重现性良好。与上述其它检测器比较,CAD 灵敏度更高,且化合物的结构不会影响响应值,类似质量化合物的响应值基本一致,检出限更低^[20-22]。同时在 CAD 检测中,低浓度范围内浓度与响应值线性相关,含量可用外标法直接测定,后续无需求导后线性回归等繁琐操作^[12,13]。CAD 检测器的不足之处是流动相中的有机相会影响响应信号,且无法检测挥发性的化合物。

目前 HPLC-CAD 已用于硫酸卡那霉素等西药及牛黄解毒片等中成药含量的测定^[23-25]。HPLC-CAD 分析中对结果的影响

因素众多,包括分析参数、色谱柱及仪器等均易对分析结果造成影响,致图谱重复性差等问题。而实验方案的设计应充分考虑多个分析参数间的交互作用,寻找最佳测定条件,对提高检测准确性和有效性十分重要,可显著提高检测效率,减少检测次数。本研究采用 HPLC-CAD 法,采用梯度洗脱,以甲醇-水作流动相,测定 L-AMB 中 HSPC、DSPG 含量,结果显示, L-AMB 各磷脂在 5~60 mg·mL⁻¹ 内与峰面积呈良好的线性关系。HSPC 平均回收率为 100.06%,平均 RSD 为 0.42; DSPG 平均回收率 100.03%,平均 RSD 为 0.55。按 HPLC-CAD 色谱条件测定 L-AMB 中 HSPC、DSPG 含量分别为 1497.66 mg·L⁻¹、4710.93 mg·L⁻¹,且无溶血磷脂检出。CAD 信号响应的影响因素包括样品和溶剂的雾化程度。其喷雾压力主要由喷雾口径等硬件决定,默认值为 56.4 psi,且说明书显示此喷雾压力为最佳喷雾压力。本实验中使用 CAD 喷雾压力为 56.4 psi,未对默认值进行调节。同时本实验进一步采用 HPLC-ELSD 法验证, HSPC、DSPG 含量分别为 1495.28 mg·L⁻¹、4712.71 mg·L⁻¹,结果显示,两种方法测定 HSPC、DSPG 含量基本一致。

综上所述, HPLC-CAD 测定 L-AMB 中 HSPC、DSPG 含量操作简单、准确, C 8 色谱柱极性适中,具有检测快速、高效分离的特性,可准确测定 L-AMB 中脂质体的含量。但由于 DSPG 对流动相的水分较敏感,因此在实验中要严格控制水分含量,以确保磷脂的有效分离。

参考文献(References)

- [1] 贾佩,刘小静,樊万虎,等.两性霉素 B 脂质体成功治疗 1 例以肾损害为突出表现的黑热病[J].中华地方病学杂志,2022,41(9):761-765
- [2] 王曼曼,张雪媛,祁欢欢,等.注射用两性霉素 B 脂质体临床药理学研究[J].中国感染与化疗杂志,2021,21(3):362-368
- [3] Tu Y, Li L, Wang Z, et al. Advances in analytical techniques and quality control of traditional Chinese medicine injections [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2021, 206(30): 114353
- [4] 简娟,蔡阳,常艳.注射用两性霉素 B 脂质体效价测定法的改进[J].中国抗生素杂志,2020,45(11):1133-1138
- [5] 任丹凤,韩群英,樊万虎,等.两性霉素 B 脂质体梯形方案成功治疗复发性黑热病一例[J].中华实验和临床感染病杂志(电子版),2020,14(6):523-527
- [6] 王琨,罗婷,林玲. HPLC 法测定两性霉素 B 中乙二胺四乙酸二钠含量[J].中国药师,2016,19(2):379-381
- [7] 简娟,蔡阳,常艳.注射用两性霉素 B 脂质体效价测定法的改进[J].中国抗生素杂志,2020,45(11):1133-1138
- [8] 颜喜亚,李增民,王爱军,等.高效液相色谱法测定两性霉素 B 含量和相关物质[J].中国抗生素杂志,2006,31(9):551-554
- [9] 江峥,朱利平,于存静,等.高效液相色谱法测定隐球菌性脑膜炎患者脑脊液中两性霉素 B 和伊曲康唑含量[J].复旦学报(医学版),2008,35(6):866-872
- [10] 王瑞,段旭林,张琦弦,等.氨基柱高效液相色谱法检测大豆提取物中的磷脂酰胆碱[J].中国测试,2022,48(4):68-72
- [11] 李蔷薇,雷莹,刘婧,等.高效液相色谱法测定磷脂复合物中硫酸特布他林的含量[J].理化检验(化学分册),2021,57(10):928-932
- [12] 郭永辉,李香荷. HPLC-CAD 法同时测定硫酸卡那霉素注射液中的卡那霉素和卡那霉素 B 的含量[J].中国药师,2018,21(6):1090-1092
- [13] 林楚慧,柴瑞平,张璐,等.高效液相色谱-电雾式检测器测定牛黄解毒片中的 6 种胆汁酸[J].分析化学,2022,50(5):764-771
- [14] Jun H, Lei Y, Lin D, et al. Quality evaluation for Radix Astragali based on fingerprint, indicative components selection and QAMS[J]. Biomedical Chromatography, 2018, 32(11): e4343s
- [15] 卢彭信,李港,郑伟,等.超高效液相色谱-电雾式检测器测定福建产绞股蓝中绞股蓝皂苷 XLVI 和 LVI [J]. 色谱,2022,40(9):833-842
- [16] 柳冬梅,赵慧.高效液相色谱-电雾式检测器法测定尿素乳膏含量[J].安徽医药,2022,26(10):1929-1932
- [17] 王一博,王春雨,曲范娜,等.高效液相色谱-电雾式检测器同时测定猪、牛、羊、熊胆粉中 5 种胆汁酸的含量[J].分析化学,2014,42(1):109-112
- [18] 任霞,胡冲,张亚中.高效液相色谱-电雾式检测法测定甘草中 4 种有效成分的含量[J].安徽医药,2020,24(7):1304-1308
- [19] 曹海龙,朱豫,李曙光,等.高效液相色谱法-电雾式检测器测定酒酵母发酵液中甘油的含量[J].分析仪器,2009,(1):27-29
- [20] 刘丽娜,金红宇,潘媛媛,等.高效液相色谱-电雾式检测器法测定银杏叶提取物中萜类内酯含量[J].药物分析杂志,2018,38(7):1269-1274
- [21] 方灵芝,吴雪松,张玥.高效液相色谱-电雾式检测器法同时测定小儿解感片中 7 种黄酮类成分的含量[J].中国医院药学杂志,2019,39(23):2402-2406
- [22] 高陆,彭志元,冯永怀,等.泊沙康唑联合两性霉素 B 脂质体治疗鼻-眼-脑型毛霉菌病 1 例并文献复习[J].中国感染控制杂志,2021,20(7):663-667
- [23] Zheng Y, Fan C, Liu M, et al. Overall quality control of the chemical and bioactive consistency of Sheng Mai Formula[J]. J Pharm Biomed Anal, 2020, 189(9): 113411
- [24] Yu Y, Yao C, Guo D A. Insight into chemical basis of traditional Chinese medicine based on the state-of-the-art techniques of liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Acta Pharmaceutica Sinica B, 2021, 11(6): 1469-1492
- [25] 李珉,侯金凤,陆岩,等. HPLC-CAD 法测定硫酸卡那霉素及注射液含量及有关物质[J].中国抗生素杂志,2018,43(3):341-347