

药用辅料中不同来源溶血磷脂酰胆碱含量限值的合理性分析

张媛, 纳涛, 吴彦霖, 高华* (中国食品药品检定研究院, 北京102629)

摘要 目的: 通过比较蛋黄来源及大豆来源溶血磷脂酰胆碱对红细胞影响的差异来评价目前药用辅料中不同来源溶血磷脂酰胆碱含量限值的合理性。方法: 采用体外红细胞溶血试验及红细胞渗透脆性试验考察两种不同来源溶血磷脂酰胆碱对红细胞的影响。结果: 蛋黄来源及大豆来源溶血磷脂酰胆碱红细胞溶血 IC_{50} 分别为 $0.0427\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.0801\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; 二者在0.65%、0.60%、0.55% NaCl低渗盐溶液中引起的溶血率亦具有显著性差异, 蛋黄来源溶血磷脂酰胆碱的溶血率明显高于大豆来源溶血磷脂酰胆碱。但红细胞凝聚试验结果表明, 二者均未见引起红细胞凝聚。结论: 两种不同来源的溶血磷脂酰胆碱致溶血能力具有显著性差异, 建议应分别制定不同来源磷脂类产品中溶血磷脂酰胆碱的含量限值, 以保证临床用药安全。

关键词: 溶血磷脂酰胆碱; 红细胞; 溶血; 渗透脆性

中图分类号: R965 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2019)05-0582-04

doi:10.16153/j.1002-7777.2019.05.014

Rationality Analysis of Limits on Lysophosphatidylcholine Content in Different Sources of Pharmaceutical Excipients

Zhang Yuan, Na Tao, Wu Yanlin, Gao Hua* (National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

Abstract Objective: To evaluate the rationality of the limits on lysophosphatidylcholine content in different sources of pharmaceutical excipients by comparing the different effects of lysophosphatidylcholine from egg yolk and soybean on erythrocyte. **Methods:** Erythrocyte hemolysis tests and erythrocyte osmotic fragility tests in vitro were conducted to investigate the effect of two different sources of lysophosphatidylcholine on erythrocyte. **Results:** The IC_{50} of hemolysis of lysophosphatidylcholines from egg yolk and soybean was 0.0427mg/ml and 0.0801mg/ml respectively. There was significant difference in the hemolysis rates between the two kinds of lysophosphatidylcholine in 0.65%, 0.60% and 0.55% low osmotic pressure sodium chloride solution. The hemolysis rate of lysophosphatidylcholines from egg yolk was significantly higher than that from soybean. However, the results of erythrocyte coagulation test showed that neither of them caused red blood cell condensation. **Conclusion:** There are significant differences in the hemolysis ability of lysophosphatidylcholines from soybean and egg yolk. It is suggested that the content of lysophosphatidylcholine in phospholipid products from different sources should be separately determined to ensure the safety of clinical medication.

Keywords: lysophosphatidylcholine; erythrocyte; hemolysis; osmotic fragility

磷脂是一种难溶于丙酮的含磷类脂物,广泛存在于自然界的动植物体内,主要分为甘油磷脂和鞘磷脂两大类。其中甘油磷脂以甘油为母体结构,一般常见的磷脂类化合物如磷脂酰胆碱(phosphatidylcholine, PC)、磷脂酰乙醇胺(phosphatidyl ethanolamine, PE)、磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine, PS)、磷脂酰肌醇(phosphatidylinositol, PI)等皆属于甘油磷脂,而鞘磷脂则以神经鞘氨醇为母体。在众多种类的磷脂类化合物中,最为常用的是卵磷脂。卵磷脂按照来源不同可分为蛋黄卵磷脂和大豆卵磷脂,其组成亦随来源和纯化程度的不同而不同。《中国药典》2015年版四部规定:蛋黄卵磷脂含磷脂酰胆碱不得少于68%,含磷脂酰乙醇胺不得过20%;大豆卵磷脂含磷脂酰胆碱不得少于45%,含磷脂酰乙醇胺不得过30%^[1-2]。卵磷脂具有乳化、分散、助渗等特性,并对皮肤和粘膜具有很强的亲和力。因此,常作为乳化剂、分散剂、稳定剂等广泛应用于包括注射液在内的液体制剂、半固体制剂、固体制剂和前体药物制剂的制造^[3]。

由于卵磷脂是最为常用的磷脂类化合物,因而溶血磷脂一般是指溶血卵磷脂,又称溶血磷脂酰胆碱(lysophosphatidylcholine, LPC),是卵磷脂在磷脂酶A作用下,1位或2位酯键水解或酶解产生的降解产物,在原料制备、纯化及储藏等过程中,部分卵磷脂会分解产生溶血磷脂酰胆碱^[4]。LPC具有较强表面活性,因此能使红细胞及其他细胞膜破裂,引起溶血或细胞坏死^[5]。LPC导致溶血后,使毛细血管通透性增加而引起出血,使组织释放组织胺、5-羟色胺、肾上腺素、缓动素等,间接影响

心血管及神经系统的功能,激发一系列复杂的病理反应。因此,LPC含量是药品,尤其是注射剂重要的质量控制指标,直接关联药品的临床用药安全,需对其含量进行严格控制^[6]。本试验根据溶血磷脂酰胆碱的致溶血特性,比较蛋黄来源及大豆来源LPC对红细胞产生的影响,通过评价二者的致溶血能力,以评估目前药用辅料中不同来源溶血磷脂酰胆碱含量限值的合理性。

1 仪器与试药

酶标仪,美国BioTeK,型号:synergyHT; CO₂培养箱,美国THERMO,型号:3141;高速冷冻离心机,美国Beckman,型号:J-25;电子分析天平,瑞士METTLER,型号:AE240。

大豆来源溶血磷脂酰胆碱购自Sigma,批号:SLBH5115V;蛋黄来源溶血磷脂酰胆碱购自Sigma,批号:SLBH3673V;Triton ×100购自Sigma,批号:SLBS6421;氯化钠注射液购自石家庄四药有限公司。

2 方法与结果

2.1 红细胞溶血试验

家兔心脏采血20 mL,3.8%枸橼酸钠抗凝。氯化钠注射液洗涤,约1200 g,离心10 min,收集红细胞,使用氯化钠注射液稀释成0.5%红细胞悬液。大豆来源溶血磷脂酰胆碱及蛋黄来源溶血磷脂酰胆碱采用倍比稀释,具体试验用浓度详见表1。96孔板中每孔加入200 μL 0.5%红细胞悬液,20 μL各浓度受试样品,另设阳性对照:1% Triton ×100,阴性对照:0.9%氯化钠注射液。37℃孵育2 h,约1200 g,离心10 min,取100 μL上清,405 nm下测定吸光度,计算溶血率^[7-8]。

表1 大豆来源及蛋黄来源溶血磷脂酰胆碱溶血试验剂量表

LPC剂量	蛋黄来源LPC	大豆来源LPC
最大剂量/(g·L ⁻¹)	0.5	1.0
剂量数	7	8
稀释倍数	1:2	1:2

红细胞溶血试验结果显示大豆及蛋黄来源溶血磷脂酰胆碱的红细胞溶血IC₅₀分别为0.0801 g·L⁻¹、0.0427 g·L⁻¹。大豆来源溶血磷脂酰胆

碱溶血IC₅₀高于蛋黄来源溶血磷脂酰胆碱,经配对t检验统计分析具有显著性差异($p < 0.05$, $n = 4$)。红细胞溶血率详见图1。

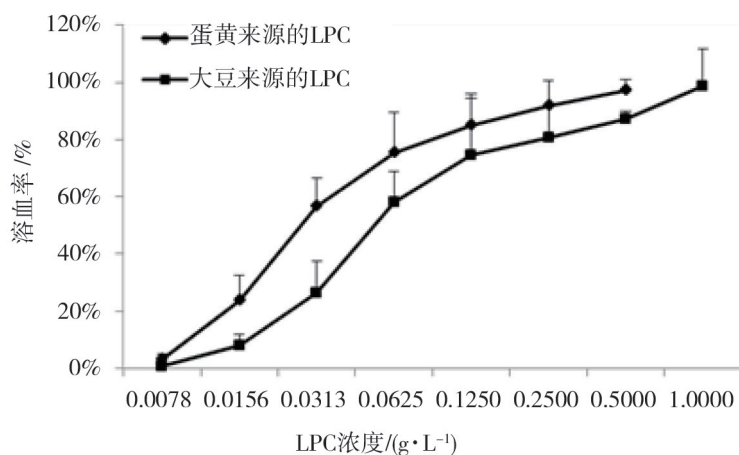


图1 大豆来源及蛋黄来源溶血磷脂酰胆碱溶血率 ($n=4, \bar{x} \pm sd$)

2.2 红细胞渗透脆性试验

新鲜家兔全血, 3.8%枸橼酸钠抗凝, 使用0.9%氯化钠注射液1:10稀释。将 $0.1\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 大豆来源溶血磷脂酰胆碱及蛋黄来源溶血磷脂酰胆碱加入稀释兔全血中, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育1 h。孵育结束后, 轻轻颠倒2~3次, 加入不同浓度低渗盐溶液。低渗盐溶液浓度: 0.9%、0.65%、0.6%、0.55%、0.5%、0.45%、0.4%、0.35%、0.3%、0.25%的NaCl溶液。混匀后室温静置1 h, 肉眼观察试管溶液的颜色及澄明度。约1200 g, 离心5 min, 取上清, 405 nm处测定吸光度。使用5%葡萄糖作为阴性对照^[9-10]。此

部分实验结果使用Graphpad统计软件处理, 采用t-test及ANOVA方差分析进行显著性差异检验。

红细胞渗透脆性实验结果显示: $0.1\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的大豆及蛋黄来源溶血磷脂酰胆碱在0.65%、0.60%、0.55%低渗NaCl盐溶液中, 引起的溶血率均具有显著性差异, 蛋黄来源溶血磷脂酰胆碱的溶血率明显高于大豆来源溶血磷脂酰胆碱。二者发生完全溶血所对应的NaCl溶液浓度分别0.50%、0.55%, 均明显高于阴性对照发生完全溶血的NaCl溶液浓度0.40%。

表2 大豆来源及蛋黄来源溶血磷脂酰胆碱红细胞渗透脆性试验结果 ($n=4, \bar{x} \pm sd$)

组别		氯化钠溶液浓度 /%							
		0.90	0.65	0.60	0.55	0.50	0.45	0.40	0.35
大豆 LPC	肉眼观察	-	+	+	++	+++	+++	+++	+++
	溶血率 /%	0 ± 0	$31 \pm 3^{**\#\#}$	$42 \pm 4^{**\#\#}$	$68 \pm 4^{**\#\#}$	$99 \pm 4^{**}$	$102 \pm 4^{**}$	99 ± 6	100 ± 3
蛋黄 LPC	肉眼观察	-	++	++	+++	+++	+++	+++	+++
	溶血率 /%	1 ± 1	$66 \pm 5^{**}$	$76 \pm 5^{**}$	$96 \pm 5^{**}$	$101 \pm 3^{**}$	$101 \pm 6^{\circ}$	99 ± 4	100 ± 2
阴性 对照	肉眼观察	-	-	-	-	+	++	+++	+++
	溶血率 /%	0 ± 1	1 ± 0	3 ± 1	9 ± 1	44 ± 4	87 ± 3	103 ± 5	101 ± 3

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 与阴性对照组比较; $\#\#P < 0.01$ 与蛋黄来源LPC组比较。

2.3 红细胞凝聚试验

家兔心脏穿刺取血大约20 mL, 放入加有玻璃珠的无菌三角瓶中, 通过玻璃珠搅动制成脱纤血。

加入约10倍量0.9%氯化钠溶液, 混匀, 约1200 g, 离心15 min。除去上清液, 沉淀的红细胞再用0.9%氯化钠溶液按上述方法洗涤3次, 直至上清液不显

红色为止。将所得红细胞用0.9%氯化钠溶液配成2%的红细混悬液，备用。参考《中国药典》2015年版四部通则方法，将 $0.1\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 大豆来源及蛋黄来源溶血磷脂酰胆碱分别加入红细胞悬液， $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育3 h后，观察红细胞聚集程度^[2]。

结果表明， $0.1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 大豆来源溶血磷脂酰胆碱及蛋黄来源溶血磷脂酰胆碱加入红细胞悬液， $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育后，轻轻颠倒2~3次后，红细胞聚集物皆可均匀分散，未见其凝聚沉淀。

3 讨论

溶血磷脂酰胆碱由于其自身具有的较强表面活性等特性，具有多种生物学效应，其中包括破裂红细胞膜引起溶血，改变细胞渗透性等^[11-12]。因而，应严格控制药品制剂中溶血磷脂酰胆碱的量，以保证临床用药的安全性。目前，《中国药典》2015年版四部收载的大豆磷脂（供注射用）和蛋黄卵磷脂（供注射用）各论中，二者溶血磷脂酰胆碱的含量均为不得过3.5%^[2]。而本研究通过红细胞溶血及红细胞渗透脆性试验证明蛋黄来源溶血磷脂酰胆碱对红细胞的影响作用明显高于大豆来源溶血磷脂酰胆碱。由此可见，这种不区分溶血磷脂酰胆碱具体来源而对其含量进行统一规定做法的科学性有待商榷。因而，建议不同来源磷脂类产品的质量应根据其所含溶血磷脂酰胆碱自身特性分别制定其含量限值，以保证相关注射剂产品的临床用药安全。

参考文献:

- [1] R.C.罗, P.J.舍斯基, P.J.韦勒. 药用辅料手册[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- [2] 中国药典: 四部[S]. 2015: 467-470, 577-580, 通则1148: 159.
- [3] 萧三贯. 最新国家药用辅料标准手册[M]. 北京: 中国医

药科技电子出版社, 2006.

- [4] Moog R, Brand M, Schubert R, et al. Effect of Nucleoside Analogues and Oligonucleotides on Hydrolysis of Liposomal Phospholipids [J]. Int J Pharm, 2000, 206 (1-2): 43-53.
- [5] 王国财, 袁诚, 唐顺之, 等. 蛋黄卵磷脂中两种溶血磷脂的分离与结构鉴定[J]. 中国油脂, 2019, 44 (3): 158-160.
- [6] 黄媛, 杨柳, 王雪彦, 等. 薄层色谱法检查脂肪乳注射液及卵磷脂中的溶血磷脂酰胆碱[J]. 药物分析杂志, 2010, 30 (12): 2334-2337.
- [7] 张锐, 王玉, 张少锋, 等. Tween-80的化学组分与其溶血作用的关系[J]. 中国医药工业杂质, 2015, 46 (7): 726-729.
- [8] 李畅, 涂家生. 聚山梨酯 80 组分与其溶血性的关系[J]. 中国药科大学学报, 2012, 43 (3): 231-235.
- [9] 王磊, 谭晓梅, 王莉, 等. 葛根岑连汤中黄连不同配伍对G6PD缺陷的痢疾杆菌感染大鼠红细胞渗透脆性的影响[J]. 中药药理与临床, 2009, 25 (2): 1-2.
- [10] 于佳斌, 卢悦, 张津松, 等. 氧化应激时Peroxiredoxin II 膜质转移对红细胞渗透脆性的影响[J]. 生命科学杂志, 2018, 22 (4): 271-276.
- [11] 张鹤. 氧化型低密度脂蛋白的致病性及检测方法研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2016, 24 (6): 633-638.
- [12] 王文高, 朱天仪, 王波. 不同形态大豆磷脂产品中溶血磷脂酰胆碱含量研究[J]. 粮食与油脂, 2016, 29 (2): 76-78.

(收稿日期 2018年11月23日 编辑 邹宇玲)