

附件：蛋黄卵磷脂（供注射用）药用辅料标准公示稿（第二次）

## 蛋黄卵磷脂(供注射用)

Danhuang Luanlinzhi(Gongzhusheyong)

### Egg Yolk Lecithin (For Injection)

[93685-90-6]

本品系以鸡蛋黄或蛋黄粉为原料，经适当溶剂提取精制而得的磷脂混合物。按无水物计算，含氮(N)应为1.75%~1.95%，磷(P)应为3.5%~4.1%，蛋黄磷脂酰胆碱不得少于~~68%~~65%，蛋黄磷脂酰乙醇胺不得过20%，蛋黄磷脂酰胆碱和蛋黄磷脂酰乙醇胺的总量不得少于80%。

**【性状】**本品为乳白色或淡黄色粉末状或蜡状固体，具有轻微的特臭。

本品在乙醇或乙醚、三氯甲烷或石油醚（沸程40~60℃）中溶解，在丙酮或水中几乎不溶。

**酸值** 本品的酸值（通则0713）应不大于20.0。

**碘值** 本品的碘值（通则0713）应为60~73。

**过氧化值** 取本品2.0g，精密称定，置250ml碘瓶中，依法测定（通则0713），过氧化值应不大于3.0。

**皂化值** 本品的皂化值（通则0713）应为195~212。

**【鉴别】**（1）取本品0.1g，置坩埚中，加碳酸钠-碳酸钾(2:1)3g，混匀，微火加热，产生的气体能使润湿的红色石蕊试纸变蓝。

（2）取鉴别(1)项下遗留的残渣约100mg，缓缓灼烧至炭化物全部消失，放冷，加水30ml，微热使残渣溶解，滤过，滤液置试管中，滴加硫酸至无气泡产生，再加硫酸4滴，加钼酸钾少许，加热，应呈黄绿色。

（1）在磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺含量测定项下记录的色谱图中，供试品溶液中蛋黄磷脂酰胆碱主峰的保留时间应与对照品溶液中蛋黄磷脂酰胆碱主峰的保留时间一致。

（2）在有关物质项下记录的色谱图中，供试品溶液中鞘磷脂色谱峰的保留时间应与对照品溶液中的鞘磷脂主峰保留时间一致。

（3）若鉴别（2）中鞘磷脂未检出，进行鉴别（3）。

取本品0.1g，置50ml烧瓶中，加0.5mol/L 氢氧化钠甲醇溶液4ml，置水浴上

加热回流20分钟，放冷，加14%三氟化硼甲醇溶液5ml，再置水浴上加热回流2分钟，放冷，加正庚烷4ml，继续置水浴上加热回流1分钟，放冷，加饱和氯化钠溶液10ml，摇匀，静置使分层，取上层液，经无水硫酸钠干燥，作为供试品溶液。

分别取肉豆蔻酸甲酯、亚油酸甲酯、油酸甲酯、花生四烯酸甲酯和二十二碳六烯酸甲酯对照品适量，加正庚烷溶解并制成每1ml中各含0.1mg的溶液，作为对照品溶液。

取1 $\mu$ l注入气相色谱仪，记录色谱图，理论板数按油酸甲酯峰计算不低于10000，肉豆蔻酸甲酯峰信噪比不低于10，各色谱峰的分离度应符合要求。

照气相色谱法（通则0521），以聚乙二醇（或极性相近）为固定液的石英毛细管柱为色谱柱（30m $\times$ 0.32mm，0.25 $\mu$ m或效能相当的色谱柱），柱流速每分钟0.9ml，起始温度为100 $^{\circ}$ C，以每分钟6 $^{\circ}$ C的速率升温至225 $^{\circ}$ C，维持25分钟；进样口温度为250 $^{\circ}$ C；氢火焰离子化检测器温度为250 $^{\circ}$ C。取供试品溶液1 $\mu$ l注入气相色谱仪，记录色谱图，按面积归一化法计算，油酸的量应大于亚油酸的量，并应检出花生四烯酸和二十二碳六烯酸。

#### 【检查】游离脂肪酸

**甘油三酸酯、胆固醇与棕榈酸** 取本品适量，加正己烷-异丙醇-水(40 : 50 : 8)混合溶液溶解并定量稀释制成每 1ml 中含 20mg 的溶液，作为供试品溶液。

另取甘油三酸酯、胆固醇与棕榈酸对照品各适量，精密称定，用上述混合溶液分别溶解并定量稀释制成每 1ml 中各含 0.6mg、0.4mg、0.2mg 的甘油三酸酯、胆固醇、棕榈酸的溶液，作为对照品溶液。

照薄层色谱法(通则 0502)试验，吸取上述供试品溶液、甘油三酸酯对照品溶液与胆固醇对照品溶液各 5 $\mu$ l,棕榈酸对照品溶液 1 $\mu$ l，分别点于同一硅胶 G 薄层板上，以正己烷-乙醚-冰醋酸(70 : 30 : 1)为展开剂，置内壁贴有展开剂湿润滤纸的层析缸中，展开后，取出，晾干，喷以 10%(W/V)硫酸铜稀磷酸(8%，W/V)溶液，热风吹干，在 170 $^{\circ}$ C 干燥 10 分钟，立即检视。

供试品溶液如显与对照品溶液相应位置的杂质斑点，其颜色与对照品溶液所显的主斑点比较，不得更深(即甘油三酸酯不得过 3%，胆固醇不得过 2%，棕榈酸不得过 0.2%)。

**有关物质** 取本品约 125mg，精密称定，置 25ml 量瓶中，加三氯甲烷二氯甲烷-甲醇（2 : 1）溶解并稀释至刻度，摇匀，作为供试品溶液。

另取溶血磷脂酰乙醇胺、鞘磷脂与溶血磷脂酰胆碱与磷脂酰肌醇对照品各适量，精密称定，加三氯甲烷二氯甲烷-甲醇（2：1）溶解并定量稀释制成每 1ml 约含溶血磷脂酰乙醇胺 10 $\mu$ g、20 $\mu$ g、40 $\mu$ g、60 $\mu$ g、100 $\mu$ g，约含鞘磷脂 50 $\mu$ g、100 $\mu$ g、200 $\mu$ g、300 $\mu$ g、400 $\mu$ g，约含溶血磷脂酰胆碱 50 $\mu$ g、100 $\mu$ g、200 $\mu$ g、300 $\mu$ g、400 $\mu$ g 的溶液，含磷脂酰肌醇 ~~10 $\mu$ g、20 $\mu$ g、60 $\mu$ g、100 $\mu$ g、200 $\mu$ g~~ 的溶液，作为对照品溶液。

照磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺含量测定项下的色谱条件，精密量取对照品溶液 20 $\mu$ l 注入液相色谱仪，以对照品溶液浓度的对数值与相应峰面积的对数值计算回归方程。精密量取供试品溶液 20 $\mu$ l 注入液相色谱仪，用回归方程计算有关物质的含量。含磷脂酰肌醇（PI）不得过 ~~5.0%~~，溶血磷脂酰乙醇胺（LPE）不得过 1%，鞘磷脂（SPM）不得过 3.0%，溶血磷脂酰胆碱（LPC）不得过 3.5%，溶血磷脂酰乙醇胺（LPE）和溶血磷脂酰胆碱（LPC）总量不得过 4.0%，上述有关物质总量不得过 ~~8.0%~~6.0%。

#### ~~残留溶剂~~

**水分** 取本品，照水分测定法(通则 0832 第一法 1)测定，含水分不得过 ~~3%~~4.0%。

**蛋白质** 取本品 1.0g,加正己烷 10ml,微温使溶解,溶液应澄明;如有不溶物,以 3000 转/分钟的速度离心 5 分钟,弃去上清液,残留物加正己烷 5ml,搅拌使溶解,同法操作 2 次,残留物经减压干燥除去正己烷后,加水 1ml,振摇使溶解,加缩二脲试液(取硫酸铜 1.5g 和酒石酸钾钠 6.0g,加水 500ml 使溶解,边搅拌边加入 10%氢氧化钠溶液 300ml,用水稀释至 1000ml,混匀)4ml,放置 30 分钟,溶液应不呈蓝紫色或红紫色。

#### ~~重金属~~

##### ~~砷盐~~

**细菌内毒素** 取本品，以无水乙醇充分溶解，进一步使用细菌内毒素检查用水稀释至实验所需浓度(该溶液中乙醇浓度应小于 20%)，依法检查(通则 1143)，~~每 1g 中含内毒素的量应小于 2.0EU。~~用助溶剂(按吐温 80 2.5g 与无水乙醇 2.7ml 的配比，充分混合后制备得到)溶解并制成 0.1g/ml 的溶液，再用内毒素检查用水至少稀释 20 倍后，依法检查(通则 1143)，每 1g 蛋黄卵磷脂(供注射用)中含内毒素的量应小于标示值。

**微生物限度** 取本品，依法检查(通则 1105 与通则 1106)，每 1g 供试品中需氧菌总数不得过  $10^2$ cfu,霉菌和酵母菌总数不得过  $10^2$ cfu,不得检出大肠埃希菌；每 10g 供试品中不得检出沙门菌。

### 【含量测定】—氮

#### 磷—

磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺 照高效液相色谱法（通则 0512）测定。

**色谱条件与系统适用性试验** 用硅胶为填充剂（色谱柱 Alltima Sillica，250mm × 4.6mm，5 $\mu$ m 或效能相当的色谱柱）；以甲醇-水-冰醋酸-三乙胺（85：15：0.45：0.05）为流动相 A，以正己烷-异丙醇-流动相 A（20：48：32）为流动相 B；流速为每分钟 1.0ml，按下表进行梯度洗脱；柱温为 40℃，用蒸发光散射检测器检测（参考条件：漂移管温度为 72℃；载气流量为每分钟 2.0L）。

时间（分钟）	流动相 A（%）	流动相 B（%）
0	10	90
20	30	70
35	95	5
36	10	90
41	10	90

取蛋黄磷脂酰乙醇胺、磷脂酰肌醇、溶血磷脂酰乙醇胺、蛋黄磷脂酰胆碱、鞘磷脂、溶血磷脂酰胆碱对照品各适量，用三氯甲烷二氯甲烷-甲醇(2：1)溶解并稀释制成每 1ml 中含上述对照品分别为 50 $\mu$ g、~~100 $\mu$ g~~、100 $\mu$ g、200 $\mu$ g、200 $\mu$ g、200 $\mu$ g 的混合溶液，作为系统适用性溶液，取 20 $\mu$ l 注入液相色谱仪，各成分按上述顺序依次洗脱，各成分分离度应符合要求，理论板数按蛋黄磷脂酰胆碱峰与蛋黄磷脂酰乙醇胺峰计算均不低于 1500。

**测定法** 取蛋黄磷脂酰胆碱和蛋黄磷脂酰乙醇胺对照品各适量，精密称定，加三氯甲烷二氯甲烷-甲醇(2:1)溶解并定量稀释制成含蛋黄磷脂酰胆碱和蛋黄磷脂酰乙醇胺 6 个不同浓度溶液作为对照品溶液，对照品溶液中蛋黄磷脂酰胆碱和蛋黄磷脂酰乙醇胺的浓度范围应涵盖供试品溶液中蛋黄磷脂酰胆碱和蛋黄磷脂酰乙醇胺含量的 ~~60%~140%~~80%~120%。精密量取上述对照品溶液各 20 $\mu$ l 注入液相色谱仪中，以对照品溶液浓度的对数值与相应的峰面积对数值计算回归方程。

另精密称取本品约 15mg，置 50ml 量瓶中，加三氯甲烷二氯甲烷-甲醇(2：1)

溶解并稀释至刻度，摇匀，作为供试品溶液。精密量取供试品溶液 20 $\mu$ l 注入液相色谱仪中，记录色谱图。用回归方程计算蛋黄磷脂酰胆碱、蛋黄磷脂酰乙醇胺的含量，即得。

【类别】药用辅料，乳化剂，增溶剂，脂质体膜材等。

【贮藏】密封、避光，低温(-18 $\square$ 以下)保存。

【标示】应标明每 1g 本品中含细菌内毒素的量应小于的标示值或每 1g 本品中含细菌内毒素的量。

注：①本品触摸时有轻微滑腻感。②本品在乙醇或乙醚中溶解，在丙酮或水中几乎不溶。③为满足制剂安全性和有效性要求，必要时，可对本品中的元素杂质锂进行控制。

起草单位：江苏省食品药品监督检验研究院 联系电话：025-86251150

中国食品药品检定研究院（细菌内毒素） 联系电话：010-53851592

复核单位：中国食品药品检定研究院，辽宁省药品检验检测院

积极参与单位：费森尤斯卡比华瑞制药有限公司、南京威尔药业集团股份有限公司、南京绿叶制药有限公司，艾伟拓（上海）医药科技有限公司、广州白云山汉方现代药业有限公司。

## 蛋黄卵磷脂（供注射用）药用辅料标准草案起草说明

- 性状** 根据编写细则要求，删去“具有轻微的特臭”。
- 溶解度** 将溶解度放在“注”中。
- 鉴别（1）** 原有的化学鉴别（1）和（2）专属性不强，现将其删除。在含量测定项下的鉴别中，仅保留蛋黄磷脂酰胆碱色谱峰的鉴别。确保符合性的判定。
- 鉴别（2）** 鞘磷脂（SPM）是蛋黄卵磷脂的特征性成分，故在鉴别项中增加用于对供试品中的 SPM 进行鉴别的项目。考虑到其在供试品中含量较低，在蛋黄卵磷脂（供注射用）标准中采用有关物质供试品浓度进行鉴别。但考虑到部分高纯度的蛋黄卵磷脂中 SPM 有可能未检出，故拟定了鉴别（3）脂肪酸组成，可在鞘磷脂无法检出时对蛋黄卵磷脂进行鉴别。
- 鉴别（3）** 考虑到脂肪酸组成是蛋黄卵磷脂结构上的重要组成部分，并具有一定的特征性，故将脂肪酸组成订入鉴别。
- 游离脂肪酸** 2020 版标准中采用容量分析法，以棕榈酸为对照品对游离脂

肪酸进行控制，限度规定为 1%。同时，该标准中的“甘油三酸酯、胆固醇与棕榈酸”项，采用薄层色谱法，以棕榈酸为对照品对棕榈酸进行控制，限度为 0.2%。两者重复，且限度要求不一致，故删除“游离脂肪酸”项。

**7. 有关物质** 针对前期企业对 2020 版标准的反馈意见，进行了系统的方法开发优化，建立了多种有关物质控制方法，并邀请相关企业对建立方法进行实验预复核，根据企业反馈意见对修订方案进行了多次调整，经专委会讨论，最终确定仍沿用 2020 版《中国药典》中的色谱系统，但考虑到环保问题，仅将溶剂由三氯甲烷修订为二氯甲烷。

由于 ChP2020 的色谱系统无法将供试品中的 PI 和 LPE 有效分离，无法准确测定二者含量，欧美药典现行版标准均未控制 PI 和 LPE，对征集到的来自 4 家企业 13 批样品中 PI 含量测定结果显示，PI 量均较小，综合平衡 PI“安全性、质量稳定性及检测成本”之间的关系，拟定标准拟删去对 PI 进行控制要求。

第一次公示稿限度是根据有关物质（未含 PI）实测结果并参考 3 $\sigma$  原则拟定的，公示期间，有企业提供给药典委的数百批次（在临床制剂中有使用）有关物质数据，根据统计分析结果，将有关物质总量控制限度调整为 6.0%。

**8. 残留溶剂** 针对企业提出的“样品在溶剂中溶解不好，基线不稳，生产过程中未涉及石油醚等溶剂”问题，标准拟定过程中，通过对溶剂、色谱柱、升温程序、顶空条件的考察，筛选出 6%氰丙基苯基-94%二甲基聚硅氧烷（或极性相近）为固定液的毛细管柱（DB-624UI，60m $\times$ 0.25mm，1.4 $\mu$ m），建立了新的 GC 方法，弥补了原标准方法的不足。

调研发现，蛋黄卵磷脂生产中大多使用了乙醇、丙酮、乙醚和正己烷等有机挥发性化合物（但未涉及石油醚），属于 2、3 类溶剂，参照《中国药典》药用辅料与 ICH Q3C 协调方案（2206 征求意见稿）中要求，未在正文中设置残留溶剂检查项，但无论《中国药典》药用辅料品种正文是否收载，药用辅料的残留溶剂均应符合要求。

**9. 水分** 参考 EP11.0“Egg Phospholipids For Injection”，并根据企业提供多批测定结果及稳定性数据，将原有的限度 3%修订为 4.0%。

**10. 重金属和砷盐** 根据《中国药典》药用辅料标准与 ICH Q3D 协调方案（230620 征求意见稿）的要求，进行了蛋黄卵磷脂元素风险评估，根据评估结果，删除重金属和砷盐检查项。

**11. 细菌内毒素** 蛋黄卵磷脂（供注射用）难溶于水，原方法为使用无水乙醇溶解，当使用检查用水稀释时，蛋黄卵磷脂会出现析出的情况。预先在蛋黄卵磷脂的无水乙醇溶液中添加标准内毒素，用检查用水稀释，样品析出会将内毒素包裹起来，导致内毒素检测的回收率小于 50%，不符合药典规定。通过实验研究，最终选择吐温 80 与无水乙醇混合配制后的溶剂作为助溶剂，将蛋黄卵磷脂完全溶解后，再用细菌内毒素检查用水稀释，无样品析出的情况，预先添加的标准内毒素回收率在 50%-200%之间，符合药典要求，故按此方法进行了修订。

本实验对试验所用试管、试剂和操作细节有较高要求，在实验室开始使用该方法前，需进行方法确认。

溶解样品时所用试管：建议称取样品时使用无热原离心管作为容器。因磷脂粘度较高，称重时会粘在离心管壁或管口处，加入助溶剂溶解时，可将离心管盖拧紧后将离心管倒置，让助溶剂没过样品，再旋涡混合使样品溶解。如溶解过程较长，可采用 37℃ 保温助溶，或混合后放置较长时间使溶解充分等方法，使样品完全溶解。

化学试剂：所用乙醇应为分析纯及以上级别的试剂；吐温 80 经实验比对，推荐使用国药集团生产的，货号为 30189828 的试剂。或使用辅料吐温 80 II 型（供注射用），也可得到理想结果。

鲎试剂：经过试验比对，凝胶法鲎试剂推荐湛江安度斯生物有限公司的产品；动态浊度法鲎试剂推荐湛江安度斯生物有限公司和 CHARLES RIVER ENDOSAFE 公司的产品。

凝胶法鲎试剂的最高灵敏度为 0.03EU/ml，动态浊度法鲎试剂的检测范围可达 0.01 甚至 0.001EU/ml，使用不同的方法，可检出的样品中内毒素的限度会有所不同。当使用凝胶法时，检测限可为 6EU/g（对应所用鲎试剂灵敏度为 0.03 EU/ml）；当使用动态浊度法时，检测限可为 2EU/g（对应所用鲎试剂检测范围为 0.01 EU/ml）或 0.2EU/g（对应所用鲎试剂检测范围为 0.001 EU/ml）。实验室可根据需要选择不同的方法和试剂。

实验室在首次使用该方法时，应采用预先添加内毒素的方法进行方法确认。采用动态浊度法时样品内毒素的回收率应在 50%-200%之间，凝胶法时供试品阳性对照应成立，方为确认成功。

操作举例如下：



#### a. 动态浊度法

##### 供试品回收溶液的制备

取 0.1g/ml 的供试品溶液 1ml 加入试管中，加入 1000EU/mL 的内毒素标准溶液 10 $\mu$ l，旋涡混合（4min），混合后取 0.1ml 加入到已含 0.9ml 检查用水的试管中，旋涡混合（4min），混合后取 0.5ml 加入到已含 0.5ml BET 水的试管中，旋涡混合（2min），此时即为含 0.5 EU/mL 标准内毒素的 20 倍供试品稀释液的回收溶液。

#### b. 凝胶法（灵敏度为 0.03EU/ml）

##### 供试品阳性对照的制备

取 0.1g/ml 的供试品溶液 1ml 加入试管中，加入 125EU/mL 的内毒素标准溶液 10 $\mu$ l，旋涡混合（4min），混合后取 0.1ml 加入到已含 0.9ml 检查用水的试管中，旋涡混合（4min），混合后取 0.5ml 加入到已含 0.5ml BET 水的试管中，旋涡混合（2min），此时即为供试品溶液稀释 20 倍，内毒素标准溶液浓度为 0.0625 EU/mL 的供试品阳性对照溶液。

### 12. 含量测定-氮和磷

考虑到磷和氮均为蛋黄卵磷脂结构中的所含元素，测定它们的含量无法对蛋黄卵磷脂的质量进行控制。同时参考 USP-NF2023 的“Egg Phospholipids”和 EP11.0 的“Egg Phospholipids For Injection”，两者均未对磷含量和氮含量进行控制，故本次修订，将 ChP2020 蛋黄卵磷脂及蛋黄卵磷脂（供注射用）中的氮、磷项删除。

**13. 含量测定-蛋黄磷脂酰胆碱和蛋黄磷脂酰乙醇胺** 拟定标准优化修订了原有标准中的含量测定方法：（1）考虑环境友好，将原标准中的溶剂由三氯甲烷修订为二氯甲烷；（2）将含量测定中 PC 和 PE 的随行标曲线性浓度范围由 60%~140%缩小至 80%~120%；（3）与有关物质修订呼应，将磷脂酰肌醇相关内容删除。（4）统计分析了由企业提供药典委的数千批次蛋黄卵磷脂中蛋黄磷脂酰胆碱的含量，并参考 3 $\sigma$  原则，将蛋黄磷脂酰胆碱含量修订为“不得少于 65%”。

**14. 注** 将溶解度相关内容移入“注”中，并根据《中国药典》药用辅料标准与 ICH Q3D 协调方案（230620 征求意见稿）的要求，进行了蛋黄卵磷脂元素风险评估，部分厂家样品中的锂元素超过注射用推荐控制阈值，故以“注”的形式给出锂元素的控制要求。