

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.15.014

高效液相色谱-蒸发光散射法测定鹅去氧胆酸及杂质熊去氧胆酸含量*

蔡明^{1,2}, 徐倩¹, 乔金为¹, 鲍学梅¹, 韩岚², 彭代银^{2△}

(1. 安徽中医药大学第二附属医院药学部, 安徽 合肥 230001; 2. 安徽中医药大学药学院, 安徽 合肥 230012)

摘要:目的 建立测定鹅去氧胆酸原料药含量的高效液相色谱-蒸发光散射(HPLC-ELSD)法。方法 采用十八烷基硅烷键合硅胶填充C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-甲醇-0.10%甲酸溶液(58:10:32, V/V/V), 流速为1.0 mL/min, 等度洗脱, 柱温为30℃, 380-ELSD检测器, 漂移管温度为90℃, N₂流速为2.6 L/min。结果 鹅去氧胆酸质量浓度在1.0~100.5 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好, R²=0.989 6(n=7); 检测限(LOD, S/N=3)、定量限(LOQ, S/N=10)分别为0.45 μg/mL, 1.52 μg/mL; 平均回收率为99.22%, RSD为1.29%(n=9); 熊去氧胆酸质量浓度在1.0~103.2 μg/mL范围内与峰面积线性关系良好, R²=0.994 4(n=7); LOD(S/N=3)和LOQ(S/N=10)分别为1.14 μg/mL和3.79 μg/mL; 平均加样回收率为96.72%, RSD为3.97%(n=9)。结论 该方法操作方便, 重复性好, 精密度高, 准确性强, 可有效控制鹅去氧胆酸原料药的质量。

关键词: 鹅去氧胆酸; 熊去氧胆酸; 高效液相色谱-蒸发光散射法; 含量测定

中图分类号: R932; R284.1; R286.0

文献标识码: A

文章编号: 1006-4931(2020)15-0055-03

Content Determination of Chenodeoxycholic Acid and Ursodeoxycholic Acid by HPLC-ELSD

CAI Ming^{1,2}, XU Qian¹, QIAO Jinwei¹, BAO Xuemei¹, HAN Lan², PENG Daiyin²

(1. Department of Pharmacy, The Second Affiliated Hospital, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei, Anhui, China 230001; 2. School of Pharmacy, Anhui University of Chinese Medicine, Hefei, Anhui, China 230012)

Abstract: Objective To establish a high performance liquid chromatography-evaporative light scattering detection(HPLC-ELSD) method for the content determination of chenodeoxycholic acid drugs. **Methods** The C₁₈ column(250 mm×4.6 mm, 5 μm) was filled with octadecylsilane chemically bonded silica. The mobile phase was acetonitrile-methanol-0.1% formic acid(58:10:32, V/V/V), the flow rate was 1.0 mL/min(isocratic elution), the column temperature was 30℃, the detector was 380-ELSD, the temperature of drift tube was 90℃, the flow rate of N₂ was 2.6 L/min. **Results** Chenodeoxycholic acid showed a good linear relationship within the range of 1.0-100.5 μg/mL with the peak area, R²=0.989 6(n=7); the detection limit(LOD, S/N=3) and the quantitative limit(LOQ, S/N=10) were 0.45 μg/mL, 1.52 μg/mL respectively; the average recovery rate was 99.22%, the RSD was 1.29%(n=9). Ursodeoxycholic acid showed a good linear relationship within the range of 1.0-103.2 μg/mL with the peak area, R²=0.994 4(n=7); LOD(S/N=3) and LOQ(S/N=10) were 1.14 μg/mL and 3.79 μg/mL respectively; the average recovery rate was 96.72%, the RSD was 3.97%(n=9). **Conclusion** The method is convenient, reproducible, precise and accurate, which can effectively control the quality of chenodeoxycholic acid.

Key words: chenodeoxycholic acid; ursodeoxycholic acid; high performance liquid chromatography-evaporative light scattering detection; content determination

鹅去氧胆酸(CDCA)又称3α, 7α-二羟基-5-β-胆烷酸, 是从胆汁中提取的一种天然产物, 具有降低胆固醇分泌、增加胆汁分泌、平喘、抗炎、免疫调节等功效^[1-3]。目前, 其临床主要用于胆固醇型结石的治疗^[4-5]。其主要杂质为熊去氧胆酸(UDCA)。2015年版《中国药典(一部)》中, 以酚酞为指示剂, 以氢氧化钠为滴定液的酸碱滴定法可用于测定CDCA或UDCA原料药含量, 操作简单, 对仪器要求低, 分析快捷, 但专一性差, 精密度低^[6]。薄层扫描法也是CDCA和UDCA原料药含量测定的常用方法, 进样量在0.598~3.588 μg范围内与峰面积线性关系良好, 操作简单、专属性强, 但精密度

低^[7-8]。由于CDCA和UDCA结构中共轭体系少, 仅末端有紫外吸收, 故不能采用常规的高效液相色谱(HPLC)法检测器测定CDCA或UDCA的含量^[9-11], 需通过柱前衍生引入紫外吸收基团, 该方法衍生物稳定, 灵敏度高, 但操作烦琐^[12]。本研究中建立了测定CDCA原料药含量及杂质UDCA的高效液相色谱-蒸发光散射(HPLC-ELSD)法, 现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Agilent 1260型高效液相色谱仪, 包括自动进样器、柱温箱、UV检测器等(安捷伦科技<中国>有限公司);

*基金项目: 安徽省教育厅高校自然科学研究重点项目[KJ2017A277]。

第一作者: 蔡明, 男, 在读博士研究生, 主管药师, 研究方向为药品质量控制的应用, (电子信箱)caiming@ahtcm.edu.cn。

△通信作者: 彭代银, 男, 硕士研究生, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为药品质量分析, (电子信箱)pengdaiyin@163.com。

ELSD-UM-3000 型蒸发光散射检测器(徐州华纳精密仪器有限公司);AUW120D 型分析天平(岛津企业管理(中国)有限公司,精度为十万分之一)。

1.2 试药

鹅去氧胆酸原料药(佛山信航生物科技有限公司,批号分别为 CDCA-170402, CDCA-170404, CDCA-170406, 纯度为 95.0%);鹅去氧胆酸对照品(批号为 110806-201708, 纯度为 97.0%),熊去氧胆酸对照品(批号为 110755-201704, 纯度为 98.0%),均购自中国食品药品检定研究院;水为双蒸水,乙腈为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:十八烷基硅烷键合硅胶填充 C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相:乙腈-甲醇-0.10% 甲酸溶液(58:10:32, V/V/V);流速:1.0 mL/min;柱温:30℃;ELSD 漂移管温度:90℃;载气(N₂)流速:2.6 L/min;进样量:30 μL。

2.2 溶液制备

取鹅去氧胆酸原料药 50 mg,精密称定,置 50 mL 容量瓶中,加稀释剂乙腈-水(40:60, V/V)至刻度,摇匀,即得供试品溶液。取 20 mg CDCA 或 20 mg UDCA 对照品,精密称定,分别置 10 mL 容量瓶中,分别加乙腈-水(40:60, V/V)稀释至刻度,摇匀,即得 CDCA 对照品溶液或 UDCA 对照品溶液。

2.3 方法学考察

系统适用性试验:取供试品溶液、CDCA 对照品溶液、UDCA 对照品溶液、空白溶剂,按拟订色谱条件进样测定。结果,空白溶剂无干扰,各成分的分度度均不小于 1.5,理论板数不小于 15 000,原料 CDCA、杂质 UDCA 等分离度均良好,拖尾因子均小于 1.10。色谱图见图 1。

线性关系考察:精密量取 2.2 项下 CDCA 或 UDCA 对照品溶液 0.5, 0.25, 0.1, 0.05, 0.025, 0.01, 0.005 mL, 分别置 1 mL 棕色容量瓶中,加乙腈-水(40:60, V/V)稀释至刻度,摇匀,得系列标准液。按拟订色谱条件对系列标准液进样,得 HPLC-ELSD 图谱,测定峰面积。分

别以 CDCA 或 UDCA 的进样质量浓度的对数值(X)为横坐标、峰面积的对数值(Y)为纵坐标进行线性回归,得鹅去氧胆酸线性回归方程为 $Y_{\text{鹅}} = 1.4158X_{\text{鹅}} + 3.5519$, $R^2 = 0.9896$, 线性范围为 1.0 ~ 100.5 μg/mL;熊去氧胆酸线性回归方程为 $Y_{\text{熊}} = 1.3636X_{\text{熊}} + 3.5044$, $R^2 = 0.9944$, 线性范围 1.0 ~ 103.2 μg/mL。

检测限(LOD)、定量限(LOQ)确定:精密量取 2.2 项下 CDCA 或 UDCA 对照品溶液适量,配比稀释,按拟订色谱条件进样,分别以信噪比(S/N)为 3:1 和 10:1 计算 LOD 和 LOQ。结果鹅去氧胆酸的 LOD 为 0.45 μg/mL, LOQ 为 1.52 μg/mL;熊去氧胆酸的 LOD 为 1.14 μg/mL, LOQ 为 3.79 μg/mL。

精密性试验:按拟订色谱条件,在标准曲线浓度范围内,取同一批号的 CDCA 对照品溶液与 UDCA 对照溶液,重复进样 6 次,测定,记录峰面积。结果 UDCA 峰面积的 RSD 为 0.27% ($n=6$), UDCA 峰面积的 RSD 为 1.13% ($n=6$),表明仪器精密性良好。

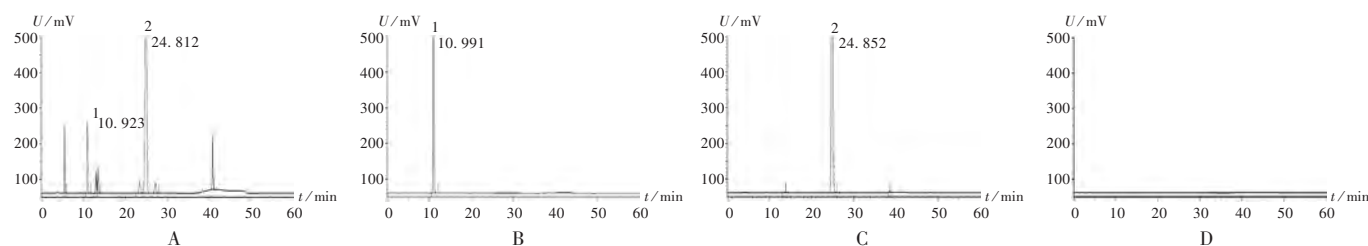
稳定性试验:取鹅去氧胆酸原料药(批号为 CDCA-170402),依法制备 CDCA 供试品溶液,于 0, 2, 4, 6, 8, 10 h 时进样测定。结果 CDCA 和 UDCA 的峰面积积分值的 RSD 分别为 1.05% 和 1.98% ($n=6$),表明供试品溶液在 10 h 内稳定。

重复性试验:取鹅去氧胆酸原料药(批号为 CDCA-170402)6 份,依法制备供试品溶液,重复进样 6 次,测定。结果 CDCA 平均质量含量和 RSD 分别为 97.47% 和 0.12% ($n=6$), UDCA 平均质量含量和 RSD 分别为 0.16% 和 1.57% ($n=6$),表明方法重复性良好。

加样回收试验:取同一批已知含量的 CDCA 和 UDCA 鹅去氧胆酸原料药(批号为 CDCA-170402)各 9 份。分别加入 CDCA 和 UDCA 对照品适量,用乙腈溶解,加乙腈-水(40:60, V/V)稀释成 25 mL,按拟订色谱条件进样测定,记录图谱,以外标法测定物质含量,计算回收率。结果见表 1。

2.4 样品含量测定

精密量取 2.2 项下供试品溶液、CDCA 对照品溶液、UDCA 对照品溶液各 10 μL,按拟订色谱条件进样测定,采用外标法测定物质含量及其他杂质峰,结果见表 2。



1. 熊去氧胆酸 2. 鹅去氧胆酸

A. 供试品溶液 B. 熊去氧胆酸对照品溶液 C. 鹅去氧胆酸对照品溶液 D. 空白溶剂

图 1 高效液相色谱-蒸发光散射图谱

表1 加样回收试验结果($n=9$)

样品含量(μg)		加入量(μg)		测得量(μg)		回收率(%)		$\bar{X}$ (%)		RSD(%)	
CDCA	UDCA	CDCA	UDCA	CDCA	UDCA	CDCA	UDCA	CDCA	UDCA	CDCA	UDCA
29.14	9.71	16.35	8.20	45.50	17.18	100.06	91.10				
29.32	10.16	16.51	8.22	45.68	17.89	99.09	94.04				
29.44	10.22	16.25	5.61	45.82	15.33	100.80	91.09				
29.14	9.71	20.50	10.33	49.33	20.16	98.49	101.16				
29.32	10.16	20.53	10.20	49.65	20.36	99.03	100.00	99.22	96.72	1.29	3.97
29.44	10.22	21.20	10.71	50.75	20.83	100.52	99.07				
29.14	9.71	24.85	12.51	53.11	21.95	96.46	97.84				
29.32	10.16	25.05	12.35	54.15	22.05	99.12	96.28				
29.44	10.22	25.58	12.80	54.86	23.01	99.37	99.92				

表2 样品含量测定结果(%, $n=6$)

批号	CDCA	UDCA	总杂质
CDCA-170402	97.47	0.16	3.44
CDCA-170404	97.60	0.14	3.32
CDCA-170406	97.37	0.14	3.51

3 讨论

鹅去氧胆酸胶囊为临床常用利胆药,主要用于治疗胆固醇性胆结石,其主要成分为鹅去氧胆酸。鹅去氧胆酸结构较复杂,合成步骤较多。因此,鹅去氧胆酸胶囊中难免会引入微量杂质,如熊去氧胆酸、胆石酸等。胆石酸等杂质可能会引发不良反应^[13]。因此,控制鹅去氧胆酸胶囊的质量对于减少因临床用药导致的不良反应具有重要意义。

与薄层色谱法、酸碱滴定法相比,HPLC法准确度和精密度较高,但目前常用的HPLC法均需柱前衍生处理,操作复杂^[14]。RP-HPLC法可用于熊去氧胆酸胶囊中各成分的含量测定^[15]。考虑到去氧胆酸为甾体化合物,无明显的紫外吸收,故HPLC检测时无法采用常规的紫外检测器。本研究中采用了HPLC-ELSD法测定鹅去氧胆酸原料药中主成分CDCA及杂质UDCA含量。

因CDCA及杂质UDCA等分子结构中含有羧基,分子极性较强,且能发生电离,为保证待测组分有足够的 C_{18} 保留能力,需在流动相中加入一定浓度的改良剂,使所有组分处于游离状态。本研究中考察了不同甲酸体积分数对分析的影响,发现甲酸体积分数在0.05%以上时,对CDCA和UDCA峰的保留和各杂质的分离基本无影响,在考察到高酸度对 C_{18} 色谱柱潜在的影响后,最终选择0.1%甲酸作为本方法的pH改良剂。进一步考察了水、乙腈、甲醇、乙腈-水、甲醇-水、甲醇-乙腈-水等极性相对较大溶液与0.1%甲酸混合为流动相对CDCA原料药各成分的洗脱效果,最终选择乙腈-甲醇-0.10%甲酸溶液(58:10:32, V/V/V)体系洗脱,效果好,且噪音小。方法学考察结果显示,该方法系统适用性、重复性均较好,精密度、准确性高,可用于鹅去氧胆酸的质量控制。

参考文献:

- [1] 朱 晗,周 瑾,邢发萍,等. 鹅去氧胆酸抗脂多糖诱导的BV2小胶质细胞炎症反应作用及机制[J]. 中国药理学与毒理学杂志,2019,33(8):561-568.
- [2] 钱桂敏,齐莉莉,范哲予. 鹅去氧胆酸对大鼠肠道菌群结构及肠道功能的影响[J]. 核农学报,2018,32(11):2267-2273.
- [3] 李 磊,图门巴雅尔,李培锋,等. 牛磺鹅去氧胆酸抗炎作用机制的网络药理学研究[J]. 药学报,2018,53(12):127-138.
- [4] 张 文. 牛磺鹅去氧胆酸对小鼠免疫器官居及RAW264.7细胞系的增殖和凋亡作用研究[D]. 济南:山东农业大学,2012.
- [5] 石有斐,李培锋,李金莲,等. 牛磺鹅去氧胆酸对小鼠免疫功能的调节作用[J]. 中国药理学通报,2007,23(7):24-30.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京:中国医药科技出版社,2015:1511.
- [7] 吴玉强. 薄层荧光扫描法测定利肝片中猪去氧胆酸及鹅去氧胆酸含量[J]. 中国医院药学杂志,2003,23(11):651-652.
- [8] 江 靖,尹蓉莉,胡又丹,等. 薄层扫描法测定藿胆片中鹅去氧胆酸的含量[J]. 中成药,2005,27(7):854-856.
- [9] 董 莉,鲁 军,窦 佳. 高效液相色谱法测定原料药中溴芬酸钠及其杂质A含量[J]. 中国药业,2018,27(22):49-52.
- [10] 朱梦婕,毛白杨,李 博,等. 高效液相色谱法测定头孢地尼薄膜衣片中的特定杂质[J]. 中南药学,2019,17(5):80-85.
- [11] 林 华,许蓉蓉,闭秋华,等. 高效液相色谱法测定鱼油软胶囊中维生素D₃含量的不确定度评定[J]. 食品安全质量检测学报,2018(12):3177-3182.
- [12] 郑 兴,金东日. 柱前衍生反相高效液相色谱法测定鹅去氧胆酸的含量[J]. 延边大学学报(自然科学版),2008,34(4):39-42.
- [13] 余继英,边 原,何 林,等. 国产与进口熊去氧胆酸胶囊在健康人体的生物等效性[J]. 中国临床药理学杂志,2010,26(6):37-41.
- [14] 张晓艳,崔 蕊,贾建静,等. HPLC测定牛磺熊去氧胆酸胶囊中的有关物质[J]. 华西药学杂志,2012,27(5):116-118.
- [15] 金 玉,郑长青. RP-HPLC法测定熊去氧胆酸胶囊中熊去氧胆酸及有关物质的含量[J]. 沈阳药科大学学报,2014,31(4):288-292.

(稿日期:2020-04-01)