

HPLC-ELSD 法同时测定生物转化样品中牛磺熊去氧胆酸等 5 种成分的含量

赵 静^{1*}, 管璐晗^{1#}, 祝连彩²(1.重庆华邦制药有限公司, 重庆 401121; 2.重庆大学生物医学工程联合学院, 重庆 400044)

中图分类号 R927 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)45-4291-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.45.21

摘要 目的:建立同时测定生物转化样品中牛磺熊去氧胆酸、牛磺鹅去氧胆酸、熊去氧胆酸、鹅去氧胆酸、牛磺 7-酮石胆酸 5 种成分含量的方法。方法:采用高效液相色谱法,检测器为蒸发光散射检测器。色谱柱为 Agilent XBD-C₁₈,流动相为 0.05% 三氟乙酸-乙腈,梯度洗脱,流速为 1.0 ml/min;漂移管温度为 80 ℃,N₂流量为 3.0 ml/min,柱温为 40 ℃。结果:牛磺熊去氧胆酸、牛磺鹅去氧胆酸、熊去氧胆酸、鹅去氧胆酸、牛磺 7-酮石胆酸检测质量浓度线性范围分别为 10.00~200.08、10.22~204.32、10.00~199.92、9.85~197.08、10.25~204.92 μg/ml($r=0.999\ 5\sim 0.999\ 8$);精密性、稳定性、重复性试验的 RSD 均不大于 2.0%。5 种成分的平均回收率分别为 97.9%、98.4%、97.9%、98.1%、98.3%,RSD 分别为 0.49%、0.63%、0.81%、0.72%、0.78%($n=3$)。结论:该方法快速、准确、重复性好,可用于生物转化样品中牛磺熊去氧胆酸等 5 种成分的定量测定。

关键词 牛磺熊去氧胆酸;牛磺鹅去氧胆酸;鹅去氧胆酸;熊去氧胆酸;牛磺 7-酮石胆酸;高效液相色谱法;蒸发光散射检测器;含量测定

Simultaneous Content Determination of 5 Components as Tauroursodeoxycholic Acid in Biotransformation Samples by HPLC-ELSD

ZHAO Jing¹, GUAN Lu-han¹, ZHU Lian-cai² (1.Chongqing Huapont Pharmaceutical Co., Ltd., Chongqing 401121, China; 2.Biomedical Engineering Union College, Chongqing University, Chongqing 400044, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To develop a method for the content determination of tauroursodeoxycholic acid (TUDCA), taurochenodeoxycholic acid (TCDCA), ursodeoxycholic acid (UDCA), chenodeoxycholic acid (CDCA) and tauro-7-keto lithocholic acid (T-7-KLCA) in biotransformation samples. METHODS: HPLC method was adopted. ELSD was used as detector. The determination was performed on Agilent XBD-C₁₈ column with mobile phase consisted of 0.05% TFA-acetonitrile (gradient elution) at the flow rate of 1.0 ml/min. The drift tube temperature was set at 80 ℃, and N₂ flow was 3.0 ml/min. The column temperature was 40 ℃. RESULTS: The linear ranges of TUDCA, TCDCA, UDCA, CDCA and T-7-KLCA were 10.00-200.08, 10.22-204.32, 10.00-199.92, 9.85-197.08, 10.25-204.92 μg/ml ($r=0.999\ 5\sim 0.999\ 8$), respectively. RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all lower than 2.0%. The average recoveries of 5 components were 97.9% (RSD=0.49%, $n=3$), 98.4% (RSD=0.63%, $n=3$), 97.9% (RSD=0.81%, $n=3$), 98.1% (RSD=0.72%, $n=3$) and 98.3% (RSD=0.78%, $n=3$), respectively. CONCLUSIONS: The method is rapid, accurate and repeatable, which can be used for the quantitative determination of 5 components as TUDCA in biotransformation samples.

KEYWORDS Tauroursodeoxycholic acid; Taurochenodeoxycholic acid; Ursodeoxycholic acid; Chenodeoxycholic acid; Tauro-7-keto lithocholic acid; HPLC; ELSD; Content determination

动物胆汁如鸡胆汁、鸭胆汁或者鹅胆汁中含有丰富的牛磺鹅去氧胆酸,少量的鹅去氧胆酸、熊去氧胆酸、7-酮石胆酸以及甘氨酸鹅去氧胆酸等成分。而牛磺熊去氧胆酸是熊胆的特有成分,资源有限;熊去氧胆酸在临床上主要用于原发性胆汁性肝硬化、溶石和预防胆结石^[1]。

有研究报道,可以通过化学合成方法^[2-4]或者生物转化方法^[5-6]将鸡胆汁、鸭胆汁或者鹅胆汁中的鹅去氧胆酸转化成更有临床价值的熊去氧胆酸。笔者研究采用生物转化法中的酶转化方法,在 7 α -羟基类固醇脱氢酶(7 α -HSDH)和 7 β -羟基类

固醇脱氢酶(7 β -HSDH)存在下将水溶液中的结合态鹅去氧胆酸直接转化为结合态的熊去氧胆酸,该方法简单、易行。目前熊去氧胆酸的检测方法有酸碱滴定法^[7]、高效液相色谱(HPLC)法^[8-9]、薄层色谱(TLC)法以及 HPLC 联用蒸发光散射检测器法(HPLC-ELSD)^[10-11]等,但同时牛磺熊去氧胆酸、牛磺鹅去氧胆酸、熊去氧胆酸、鹅去氧胆酸、牛磺 7-酮石胆酸、7-酮石胆酸及甘氨酸鹅去氧胆酸等 7 种成分的分离检测方法未见文献报道。笔者采用 HPLC-ELSD 法对上述 7 种成分进行了分离,并对前 5 种成分进行了定量测定,结果表明该方法专属性好,测定结果准确可靠。

1 材料

1.1 仪器

2010AHT 型液相色谱仪(日本岛津公司);2000ES ELSD

* 工程师,硕士。研究方向:药物分析及质量标准。电话:023-67886981。E-mail:clary@126.com

通信作者:工程师,硕士。研究方向:药物分析及质量标准。电话:023-67886982。E-mail:glhmail2000@aliyun.com

(美国奥泰公司)。

1.2 药品与试剂

牛磺熊去氧胆酸对照品(批号:110816-200406,纯度:99%)、牛磺鹅去氧胆酸对照品(批号:110846-200405,纯度:98%)、熊去氧胆酸对照品(批号:110755-9003,纯度:99%)、鹅去氧胆酸对照品(批号:11806-200403,纯度:99%)均由中国食品药品检定研究院提供;鸡、鸭、鹅混合胆粉粗品(批号:12001-1、12001-2、12001-3,含量:牛磺熊去氧胆酸百分含量约60%、牛磺鹅去氧胆酸百分含量约5%)均由上海凯宝药业有限公司提供;甘氨酸鹅去氧胆酸(纯度:98%)、牛磺-7-酮石胆酸(纯度:98.5%)、7-酮石胆酸(纯度:97%)系由重庆大学生物医学工程联合学院分离纯化后精制得到的原料药;生物转化样品(批号:1202001、1202002、1202003)及生物转化空白均来源于重庆大学生物医学工程联合学院;水为超纯水,乙腈、三氟乙酸(TFA)均为色谱纯。

生物转化样品:取试管,加入 pH 8.5 的磷酸盐缓冲液 10 ml,加入 50 mg/ml 的混合胆汁粉水溶液 200 μ l,混匀。分别加入 0.1 mol/L 的氧化型辅酶(NADP⁺)50 μ l 和适量的 7 α -HSDH(酶总量为 100 μ g),置于 30 $^{\circ}$ C 水浴中反应 2 h;反应完的系统置于沸水浴中 5 min,灭活 7 α -HSDH,将反应系统冷却至室温。再向反应系统中加入 0.1 mol/L 的还原型辅酶(NADPH)50 μ l 和适量的 7 β -HSDH(酶总量为 100 μ g),置于 30 $^{\circ}$ C 水浴中反应 2 h;反应完的系统置于沸水浴中 5 min,灭活 7 β -HSDH,将反应系统冷却至室温,得到的溶液即为生物转化样品。

生物转化空白:取试管,加入 pH 8.5 的磷酸盐缓冲液 10 ml,照生物转化样品制备方法,自“分别加入 0.1 mol/L 的氧化型辅酶(NADP⁺)50 μ l”起,同法操作,即得。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Agilent XBD-C₁₈(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m);流动相:流动相 A 为 0.05% 三氟乙酸水溶液,流动相 B 为乙腈,梯度洗脱,流速:1.0 ml/min;柱温:40 $^{\circ}$ C;进样量:10 μ l。检测器:ELSD;撞击器模式:关;漂移管温度:80 $^{\circ}$ C;N₂流量:3.0 ml/min。梯度洗脱程序见表 1。

表 1 梯度洗脱程序

Tab 1 Gradient elution procedure

时间,min	流动相A,%	流动相B,%
0	60	40
15	10	90
16	60	40
25	60	40

2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液。分别称取牛磺熊去氧胆酸、牛磺鹅去氧胆酸、熊去氧胆酸、鹅去氧胆酸对照品以及牛磺-7-酮石胆酸原料药各约 50 mg,精密称定,置于 50 ml 量瓶中,加甲醇适量超声使溶解,用甲醇稀释至刻度,摇匀,得到混合溶液,作为线性贮备液。分别精密量取上述贮备液 0.5、1.0、2.5、5、10 ml,置于 50 ml 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.2 供试品溶液。(1)供试品溶液 S1:称取混合胆粉粗品约 10 mg,精密称定,置于 50 ml 量瓶中,加甲醇适量超声 10 min 使溶解,放冷,用甲醇稀释至刻度,摇匀,滤过,取续滤液作为供试品溶液 S1。(2)供试品溶液 S2:取生物转化样品,加入适量

无水乙醇超声使溶解后,14 000 r/min 离心 15 min(离心半径 11.5 cm),取全部上清液,沉淀用无水乙醇洗涤 3 次,合并洗液,蒸干,加甲醇定容至 50 ml,摇匀,作为供试品溶液 S2。

2.2.3 定性混合溶液。分别取牛磺熊去氧胆酸、牛磺鹅去氧胆酸、熊去氧胆酸、鹅去氧胆酸、甘氨酸鹅去氧胆酸、牛磺-7-酮石胆酸、7-酮石胆酸各适量,置于 50 ml 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

2.2.4 阴性对照溶液。取试管,加入 pH 8.5 磷酸盐缓冲液 10 ml,照生物转化样品制备方法,自“分别加入 0.1 mol/L 的氧化型辅酶(NADP⁺)50 μ l”步骤起以及供试品溶液 S2 的制备方法,同法操作,即得。

2.3 专属性试验

分别取定性混合溶液、供试品溶液 S1、供试品溶液 S2 以及阴性对照溶液各 10 μ l,照“2.1”项下色谱条件进样,记录色谱图。结果表明,阴性对照色谱图在定性混合溶液色谱图相应出峰处未见吸收峰,表明阴性对照溶液不干扰本品主要成分的测定,该试验专属性强。色谱图见图 1。

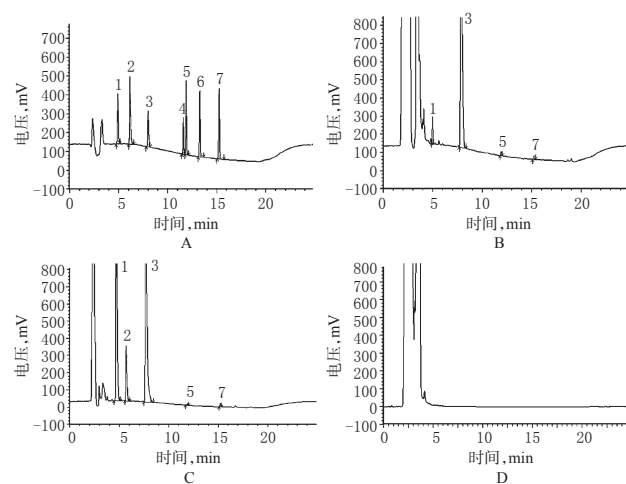


图 1 高效液相色谱图

A. 定性混合溶液; B. 供试品溶液 S1; C. 供试品溶液 S2; D. 阴性对照溶液; 1. 牛磺熊去氧胆酸; 2. 牛磺-7-酮石胆酸; 3. 牛磺鹅去氧胆酸; 4. 甘氨酸鹅去氧胆酸; 5. 熊去氧胆酸; 6. 7-酮石胆酸; 7. 鹅去氧胆酸

Fig 1 HPLC chromatograms

A. qualitative mixed solution; B. test sample S1; C. test sample S2; D. negative control solution; 1. TUDCA; 2. T-7-KLCA; 3. TCDCa; 4. glycine chenodeoxycholic acid; 5. UDCA; 6. 7-KLCA; 7. CDCA

2.4 线性关系考察

照“2.2.1”项下对照品溶液制备方法制备溶液,按质量浓度由低到高分别进样 10 μ l,记录峰面积。以质量浓度的 ln 对数值(x)为横坐标、峰面积的 ln 对数值(y)为纵坐标,进行线性回归分析,其线性范围和线性方程见表 2。

表 2 5 种成分线性关系结果

Tab 2 Results of linear range of 5 components

成分	线性范围, μ g/ml	回归方程	r
牛磺熊去氧胆酸	10.00~200.08	$y=1.656x+2.457$	0.999 8
牛磺鹅去氧胆酸	10.22~204.32	$y=2.681x+0.365$	0.999 8
熊去氧胆酸	10.00~199.92	$y=1.489x+3.391$	0.999 6
鹅去氧胆酸	9.85~197.08	$y=1.439x+3.569$	0.999 7
牛磺-7-酮石胆酸	10.25~204.92	$y=1.891x+2.145$	0.999 5

2.5 精密度试验

取质量浓度约为 10 $\mu\text{g/ml}$ 的对照品溶液,重复进样 6 次,结果牛磺熊去氧胆酸、牛磺鹅去氧胆酸、熊去氧胆酸、鹅去氧胆酸、牛磺 7-酮石胆酸平均峰面积的 RSD 分别为 0.67%、0.82%、0.18%、0.11%、0.47% ($n=6$)。

2.6 稳定性试验

取“2.2.2”项下的供试品溶液 S2,分别在 0、4、8、12 h 注入色谱仪,记录色谱图,计算峰面积的 RSD。结果牛磺熊去氧胆酸、牛磺鹅去氧胆酸、熊去氧胆酸、鹅去氧胆酸以及牛磺 7-酮石胆酸峰面积的 RSD 分别为 0.53%、0.42%、1.04%、0.92% 和 0.88% ($n=6$)。表明供试品溶液在 12 h 内稳定。

2.7 重复性试验

照“2.2.2”项下供试品溶液 S2 制备方法,分别制备 6 份样品,各进样 10 μl ,记录峰面积。结果牛磺熊去氧胆酸、牛磺鹅去氧胆酸、熊去氧胆酸、鹅去氧胆酸、牛磺 7-酮石胆酸平均峰面积的 RSD 分别为 0.10%、0.15%、0.57%、0.71%、0.33% ($n=6$)。表明本方法重复性良好。

2.8 回收率试验

取生物转化空白适量共 9 份,分别置于 9 个试管中,分别精密加入“2.1”项下的线性贮备液 0.5、5.0、10 ml 各 3 份,照“2.2.2”项下供试品溶液 S2 制备方法,同法操作。进样,记录色谱图,计算,结果见表 3。

表 3 回收率试验结果 ($n=3$)

Tab 3 Results of recovery tests ($n=3$)

成分	测得量, μg	加入量, μg	回收率, %	平均回收率, %	RSD, %
牛磺熊去氧胆酸	487.4	500.2	97.4	97.9	0.49
	4 888.7	5 002.0	97.7		
	9 843.9	10 004.0	98.4		
牛磺鹅去氧胆酸	499.9	510.8	97.9	98.4	0.63
	5 043.3	5 108.0	98.7		
	10 086.3	10 216.0	98.7		
熊去氧胆酸	484.7	499.8	97.0	97.9	0.81
	4 901.5	4 998.0	98.1		
	9 859.0	9 996.0	98.6		
鹅去氧胆酸	479.5	492.7	97.3	98.1	0.72
	4 843.2	4 927.0	98.3		
	9 725.9	9 854.0	98.7		
牛磺 7-酮石胆酸	500.9	512.3	97.8	98.3	0.78
	5 035.9	5 123.0	98.3		
	10 123.0	10 246.0	98.8		

2.9 样品含量测定

取样品照“2.2.2”项下方法制备成供试品溶液 S1 和 S2,各 3 份,分别进样 10 μl ,记录色谱图。照标准曲线法计算样品中 5 种成分的含量,结果见表 4。

表 4 样品含量测定结果 ($\mu\text{g/ml}$)

Tab 4 Results of content determination of sample ($\mu\text{g/ml}$)

样品 批号	牛磺熊去氧胆酸	牛磺鹅去氧胆酸	熊去氧胆酸	鹅去氧胆酸	牛磺 7-酮石胆酸	
S1	12001-1	10.55	139.14	3.34	4.43	未检出
	12001-2	9.27	128.06	2.88	3.23	未检出
	12001-3	12.51	135.84	3.56	4.07	未检出
S2	1202001	71.88	57.78	3.71	1.93	15.32
	1202002	70.16	50.84	3.38	1.55	13.28
	1202003	74.34	55.02	3.77	1.86	14.72

由表 4 可以看出,样品 S1 经生物转化后,牛磺鹅去氧胆酸含量明显下降,牛磺熊去氧胆酸、牛磺 7-酮石胆酸含量明显增

加,熊去氧胆酸含量无明显变化,鹅去氧胆酸的含量略有降低,表明牛磺鹅去氧胆酸经生物转化后直接生成了牛磺熊去氧胆酸。

3 讨论

对生物转化样品中可能存在的 7 种胆酸成分分离的研究目前未见文献报道,笔者参考相关文献^[1],选择乙腈、三氟乙酸水溶液作为流动相;为改善甘氨酸鹅去氧胆酸与熊去氧胆酸峰的分离,采用线性梯度洗脱。熊去氧胆酸、牛磺熊去氧胆酸等胆酸类成分紫外吸收较弱,最大吸收波长均处于末端吸收,采用梯度洗脱时基线漂移严重、基线噪音大,会干扰检测,故本研究采用 ELSD 进行检测。前期试验中对 ELSD 中撞击器的模式、漂移管温度以及 N_2 流量等参数进行了优化,结果当撞击器模式为关、漂移管温度设置为 80 $^\circ\text{C}$ 、 N_2 流量为 3 ml/min 时,检测器灵敏度最优。

样品含量测定结果表明,在 7 α -HSDH 和 7 β -HSDH 的作用下,牛磺鹅去氧胆酸直接转化为了牛磺熊去氧胆酸。该生物转化的过程可能为:牛磺鹅去氧胆酸水溶液在 7 α -HSDH 以及一些辅酶作用下,7 位 α -羟基氧化成羰基,形成中间产物牛磺 7-酮石胆酸;后者在 7 β -HSDH 及一些辅酶作用下,7 位羰基还原成 β -羟基,得到牛磺熊去氧胆酸。该生物转化方法,无需分离纯化结合态的鹅去氧胆酸,操作方便易行,为结合态的熊去氧胆酸提供了新的简便的制备方法。

参考文献

- [1] 傅贤波,林三仁,范竹萍,等.牛磺熊去氧胆酸溶解胆囊胆固醇结石有效性和安全性:随机、双盲、对照、多中心临床研究[J].中国微创外科杂志,2007,7(12):1 159.
- [2] 赵红宾.还原 7-酮石胆酸制备熊去氧胆酸的绿色合成方法[D].上海:华东理工大学,2008:23.
- [3] 曹俊山,郝秀丽,王淑华.一种熊去氧胆酸的制备方法 CA:201010545058 [P].2012-05-23.
- [4] 田禾.从鹅去氧胆酸制备熊去氧胆酸的方法研究[D].上海:华东理工大学,2010:24.
- [5] 熊安明,法幼华.熊去氧胆酸的微生物转化及其制备[J].微生物学报,1995,35(3):204.
- [6] 孙黎,法幼华.转化石胆酸为熊去氧胆酸的菌种筛选和产物鉴定[J].微生物学报,1995,35(3):197.
- [7] 国家药典委员会.中华人民共和国药典:二部[S].2010 年版.北京:中国医药科技出版社,2010:1 105-1 106.
- [8] 宋志伟,吴艳玲,朴惠善,等.高效液相色谱法测定熊胆粉中牛磺熊去氧胆酸含量[J].延边大学医学学报,2007,30(1):22.
- [9] 曹淑玲,郭秋云.HPLC 法同时测定熊去氧胆酸片中有关物质的研究[J].江西中医学院学报,2012,24(5):491.
- [10] 赵勇,咎丽霞,孙文基.HPLC-ELSD 测定熊胆粉中牛磺熊去氧胆酸和牛磺鹅去氧胆酸的含量[J].药物分析杂志,2006,26(1):127.
- [11] 李丽敏,钱大公,王柯,等.熊胆粉提取物中熊去氧胆酸和鹅去氧胆酸的 HPLC-ELSD 测定[J].中国医药工业杂志,2009,40(1):39.

(收稿日期:2014-01-21 修回日期:2014-02-28)