

• 药品检验 •

HPLC 法测定胆酸- HP- β- CD 包合物中胆酸的含量

张永, 孟祥学

(鲁南制药集团股份有限公司, 山东 临沂 276400)

摘要:目的 建立胆酸- HP- β- CD 包合物中胆酸的含量测定方法,为胆酸- HP- β- CD 包合物的制备工艺参数优化试验提供含量测定方法。方法 采用高效液相色谱法: Welchrom- C₁₈ 色谱柱(5μm, 4.6×250mm); 流动相为乙腈- 水- 磷酸(60: 40: 0.06); 流速 1.0 mL·min⁻¹; 柱温 40℃; 检测波长 192nm。结果 胆酸在 0.0625~1 mg·mL⁻¹ 范围内线性关系良好($r = 0.999$); 平均回收率为 99.33%, RSD 为 0.66%。结论 该方法简便, 准确, 重复性好, 适宜作为胆酸- HP- β- CD 包合物中胆酸的含量测定方法。

关键词: 胆酸- HP- β- CD 包合物 胆酸 HP- β- CD 高效液相色谱法

中图分类号: R927.2 文献标识码: A 文章编号: 1672-7738(2008)09-0528-02

Determination of CA in CA- HP- β- CD with HPLC

ZHANG Yong, MENG Xiang-xue

(Lunan Pharmaceutical Share Limited Company, Linyi 276400)

ABSTRACT: OBJECTIVE Set up CA's assaying method to offer assaying method for optimizing technology parameter of CA- HP- β- CD preparation. **METHODS** HPLC: Chromatographic column: Welchrom- C₁₈ (5μm, 4.6×250mm); Mobile phase: acetonitrile- water- phosphoric acid(60: 40: 0.06); Flow rate: 1.0 mL·min⁻¹; Column temperature: 40℃; Detector wavelength: 192nm. **RESULTS** Linear relationship is fine from 0.0625~1 mg·mL⁻¹ ($r = 0.999$); Average recovery was 99.33%, RSD = 0.66%. **CONCLUSION** The method is convenient and accurate. It also has fine reproducibility. It's so fit as CA's assaying method.

KEY WORDS: CA- HP- β- CD Clathrate; CA; HP- β- CD; HPLC

胆酸(Cholic acid, CA)具有解热、抗炎、抗过敏、抗病毒等作用。临床多用于治疗热病神昏、中风痰迷、咽喉肿痛、口舌生疮等^[1]。胆酸类物质凭其良好的抗炎作用,在治疗鼻炎的口服制剂中得到了较广泛的应用,但是因为胆酸类物质对鼻粘膜有一定刺激性,不适宜于鼻腔给药,这限制了其临床应用。胆酸- HP- β- CD 包合物是以 HP- β- CD(羟丙基-β-环糊精)的水溶液和胆酸的乙醇溶液在一定条件下通过搅拌包合法制备而得,HP- β- CD 可以降低药物刺激性,通过包合可以降低胆酸对鼻粘膜的刺激性,为胆酸在鼻腔给药制剂中的应用提供了一条途径。为了进一步考察胆酸- HP- β- CD 包合物的最佳制备工艺参数,本文对测定胆酸- HP- β- CD 包合物中胆酸含量方法进行了研究。胆酸的含量测定方法很多,有紫外分光光度法,薄层扫描法, HPLC 和 HPLC/ELSD 法等。其中紫外分光光度法,薄层扫描法误差较大^[2]。本文通过对 HPLC 法测定胆酸- HP- β- CD 包合物中胆酸的含量方法的研究,得到了稳定性好,精密度高,

重现性良好,回收率高的胆酸- HP- β- CD 包合物中胆酸的含量测定方法。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 高效液相色谱仪(LC-10ATvp), 紫外检测器(SPD-10Avp), 柱温箱(CT-10ASvp), 色谱工作站(浙江智达 N2000)。

1.2 试剂 胆酸- HP- β- CD 包合物溶液(自制); 胆酸对照品(中国药品生物制品检定所, 批号 100078-200714); 乙腈为色谱纯, 磷酸为分析纯, 水为重蒸水。

2 方法与结果^[3]

2.1 色谱条件 色谱柱: Welchrom- C₁₈ 色谱柱(5μm, 4.6×250mm), 流动相: 乙腈- 水- 磷酸(60: 40: 0.06), 流速: 1 mL·min⁻¹, 柱温: 40℃, 检测波长: 192nm, 进样量: 10μL。

理论塔板数按照胆酸峰计算, 不得低于 8000。胆酸对照品色谱峰保留时间约为 5.2min, RS 大于 1.5。

2.2 对照品溶液制备 精密称取胆酸对照品适量, 加 60% 乙

腈,制成每 1mL 含 1mg 的溶液,即得。

2.3 供试品溶液制备 精密吸取胆酸-HP-β-CD 包合物溶液 4mL,置于 10mL 量瓶中,加入适量乙腈,超声处理 20min,用乙腈稀释至刻度,摇匀,用 0.45μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.4 空白试验 称取 HP-β-CD 适量,溶于 60% 乙腈溶液,制得空白溶液。精密吸取上述供试品溶液、对照品溶液及空白溶液各 10μL,按上述色谱条件进样测定,结果空白溶液在胆酸对照品相同保留时间处未显色谱峰,故认为无干扰(见图 1、图 2、图 3)。



图 1 HP-β-CD

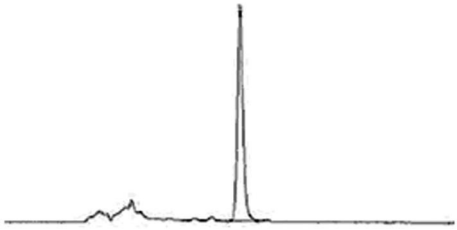


图 2 胆碱对照品

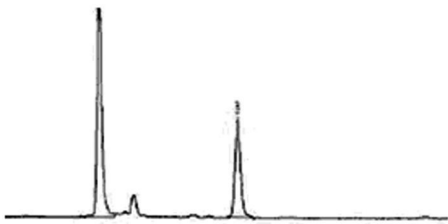


图 3 胆碱-HP-β-CD 结合物

2.5 线性关系考察 精密吸取胆酸对照品溶液(浓度分别为 1、0.75、0.5、0.25、0.125、0.0625mg·mL⁻¹)各 10μL,按上述色谱条件进样测定,以峰面积积分值 Y 为纵坐标,对照品量 X(μg)为横坐标,绘制标准曲线,计算回归方程。回归方程为 Y = 20074 X - 829.11 (r = 0.999),胆酸在 0.0625~1mg·mL⁻¹ 范围内呈良好线性关系。

2.6 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液 10μL,分别于配制后 0、2、4、6、8h,按上述色谱条件进样测定 5 次,结果 RSD = 0.53%,表明供试品溶液在 8h 内基本稳定。

2.7 精密度试验 精密吸取同一胆酸对照品溶液 10μL,按上述色谱条件重复进样测定 6 次,结果 RSD = 0.65%,表明精密度良好。

2.8 重复性试验 取同一批自制胆酸-HP-β-CD 包合物溶液,按供试品溶液制备项下平行制备 6 份供试品溶液,分

别精密吸取 10μL,按上述色谱条件进样测定,结果胆酸平均含量为 0.726mg·mL⁻¹, RSD = 0.41%。表明重复性良好。

2.9 回收率试验 精密量取已知胆酸含量为 0.73mg·mL⁻¹的胆酸-HP-β-CD 包合物溶液 4mL,置于 10mL 量瓶中,再精密加入 6mL 胆酸对照品溶液(用乙腈溶解 0.73mg·mL⁻¹),超声处理 20min,用 0.45μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,按上述色谱条件进样测定,结果平均回收率 99.33%, RSD = 0.66%。表明回收率较好。

表 1 回收率测定结果(n = 6)

胆碱-HP-β-CD 包合物含量(mg)	加入胆碱对照品含量(mg)	测得含量(mg)	回收率(%)	平均回收率(%)	RSD(%)
2.92	4.38	7.253	99.37	99.33	0.66
2.92	4.38	7.334	100.47		
2.92	4.38	7.261	99.47		
2.92	4.38	7.201	98.64		
2.92	4.38	7.233	99.08		
2.92	4.38	7.220	98.91		

2.10 样品含量测定 根据上述色谱条件,测定三批自制胆酸-HP-β-CD 包合物溶液中胆酸的含量,其含量分别为:0.726、0.733、0.720mg·mL⁻¹。

3 讨论

3.1 HPLC 法与紫外分光光度法和薄层扫描法比较,灵敏度更高,精确度更好。结果表明,该方法线性关系好,结果准确,重现性好,适用于胆酸-HP-β-CD 包合物溶液中胆酸的含量测定。

3.2《中国药典》2005 版(一部)记载的各种制剂中胆酸的含量测定方法都不适用于胆酸-HP-β-CD 包合物中胆酸含量测定,例如:牛黄中用薄层扫描法测定有效成分胆酸含量,方法不够灵敏,准确;清开灵注射液中用 HPLC 法测定有效成分胆酸含量,由于乙腈比例是 35%,所以其胆酸峰的保留时间太长,供试样品处理方法也不够简便。所以本方法的建立,可以作为药典方法在这一方面的补充。

3.3 胆酸-HP-β-CD 包合物有广阔的应用前景。本文对胆酸-HP-β-CD 包合物溶液中胆酸的含量测定方法研究,为胆酸-HP-β-CD 包合物制备工艺参数优化试验提供含量测定方法,同时为下一步开发胆酸-HP-β-CD 包合物鼻腔给药制剂的质量控制方法提供参考。

参考文献

[1] 刘长河. 胆酸及其复方制剂含量测定方法研究概况. 时珍国医国药, 1999, 10(4): 306~307.
 [2] 曹进,徐燕,王义明,等. 清开灵注射液中三种胆酸含量测定方法比较. 中成药, 2003, 25(9): 705~708
 [3] 常增荣,张小茜. HPLC 测定清开灵注射液中胆酸含量. 中国药理学杂志, 2003, 38(2): 155