

CAD检测器在奥贝胆酸质量控制中的应用研究

冷泽山 沈国滨 金燕

赛默飞世尔科技(中国)有限公司

关键词

奥贝胆酸, 二聚体, CAD检测器, 高效液相色谱

摘要

本文结合质量通用型检测器-电雾式检测器(CAD)建立一种简单、快速的HPLC方法,对奥贝胆酸及有关物质的分离与检测进行了初步研究。通过优化梯度洗脱程序,可实现奥贝胆酸与多种有关物质的有效分离。在此方法下,多种不同批次的奥贝胆酸样品均得到了理想的检测结果。本方法检出效果好、灵敏度高、重复性好、线性范围宽广,对奥贝胆酸的质量控制研究具有一定指导意义。

1. 前言

奥贝胆酸(Obeticholic acid, OCA, 商品名Ocaliva)由Intercept公司研发,是一种法尼醇X受体激动剂^[1],通过活化法尼醇X受体间接抑制细胞色素7A1(CYP7A1)的基因表达。由于CYP7A1是胆酸生物合成的限速酶,因此奥贝胆酸可以抑制胆酸合成,用于治疗原发性胆汁性肝硬化(PBC)和非酒精性脂肪性肝炎(NASH)。美国FDA于2016年5月27日加速批准其用于治疗原发性胆汁性胆管炎,是近20年来首个研发用于治疗胆汁淤积性肝病的药物,可显著改善对熊去氧胆酸(UDCA)治疗反应不佳的PBC患者的生化指标。另外,奥贝胆酸已被证明对治疗非酒精性脂肪性肝炎有效,美国FDA已授予其突破性疗法认定。

奥贝胆酸的合成过程中有大量杂质产生(奥贝胆酸专利记录杂质26个,已知结构杂质7个,对含量有明确限度要求的5个),在储存过程中还有可能产生一些降解产物,从而影响药物的质量和安全性。杂质组成和含量测定是奥贝胆酸质量控制的重要环节,对提高奥贝胆酸原料及制剂的质量具有重大意义。然而,奥贝胆酸的紫外吸收极弱^[2],常规的紫外检测器(UV)无法提供足够的灵敏度。奥贝胆酸与去氧胆酸结构类似,美国药典(USP)已经收录相应的CAD检测器方法为去氧胆酸含量和杂质检测的技术手段^[3]。CAD检测器为赛默飞独有,其响应不受化合物紫外吸收基团的影响,适用于弱紫外吸收化合物的检测。与蒸发光散射检测器(ELSD)或示

差折光检测器(RI)相比,CAD可兼容梯度洗脱,具有更高的灵敏度,更好的日内重复性和日间重复性,更宽的动态范围。本文使用CAD检测器,实现了对奥贝胆酸及其有关物质的检测研究。结果显示,通过CAD检测器,奥贝胆酸及主要杂质均可有效检出,且灵敏度高、重复性好,线性范围广。



图1 CAD检测器(上: Corona Veo系列;下: Vanquish CAD系列)

2. 实验部分

2.1 仪器与试剂

2.1.1 仪器型号: Thermo UltiMate3000 高效液相色谱仪, 泵: LPG-3400SD, 自动进样器: WPS-3000TRS (100 μ L定量环), 柱温箱: TCC-3000RS, CAD检测器: Corona Veo RS, 色谱软件: 变色龙Chromeleon 7.2.8

2.1.2 试剂：乙腈（色谱级，Fisher公司），去离子水（18.2M Ω ，Millipore纯水机），三氟乙酸（TFA，色谱级，DIKMA公司）。

2.1.3 样品信息：奥贝胆酸样品、奥贝胆酸二聚体均由客户公司提供。

2.2 样品溶液制备：

奥贝胆酸样品：称取奥贝胆酸适量，用50%乙腈水（含0.05%TFA）溶解并配制成浓度约为1mg/mL的供试品溶液。另取供试品溶液，用50%乙腈水（含0.05%TFA）稀释并配制成一系列不同浓度的线性溶液。

二聚体：称取适量奥贝胆酸二聚体适量，用甲醇溶解并配制成浓度约为1mg/mL的供试品溶液。

2.3 色谱条件

色谱柱：Acclaim™ 120 C18（250×4.6 mm，5 μ m）P/N：059149

流动相：A为水（含0.05%TFA），B为乙腈，梯度洗脱程序见表1：

：

柱温：30℃，流速：1.0mL/min，进样体积：10 μ L

CAD 检测器：采集频率5Hz，Filter：3.6s，干燥管温度：35℃

表1. 梯度洗脱程序

时间 (min)	A%	B%
0	60	40
30	20	80
30.1	100	0
45	100	0
50	60	40
60	60	40

3. 实验结果和讨论

实验所用奥贝胆酸样品均由不同客户公司提供。为保证奥贝胆酸与杂质的最佳分离效果，根据样品中杂质的种类和数量，在有关物质，灵敏度，重现性实验中分别优化不同梯度洗脱程序。

3.1 有关物质（色谱条件见2.3）

使用C18色谱柱，以乙腈和三氟乙酸体系为流动相，采用梯度洗脱对浓度为1mg/mL的奥贝胆酸样品进行分析，CAD检测器可以检测到共计31个组分峰（见图2和图3），且响应高、峰型优异，获得比UV或者ELSD检测器更好的检测效果。因此，从可检出峰数量上看，CAD检测器可以得到更多的样品有关物质信息。除此之外，在三氟乙酸（截止波长230nm）体系下进行梯度洗脱，使用UV检测会有较大的基线漂移，而CAD检测器可以得到更平稳的基线和极小的基线波动，这有利于奥贝胆酸样品的定量分析。

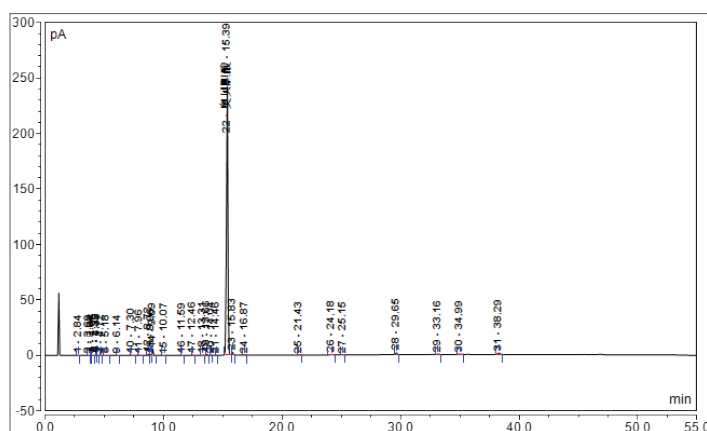


图2 浓度1 mg/mL奥贝胆酸样品CAD分析图谱

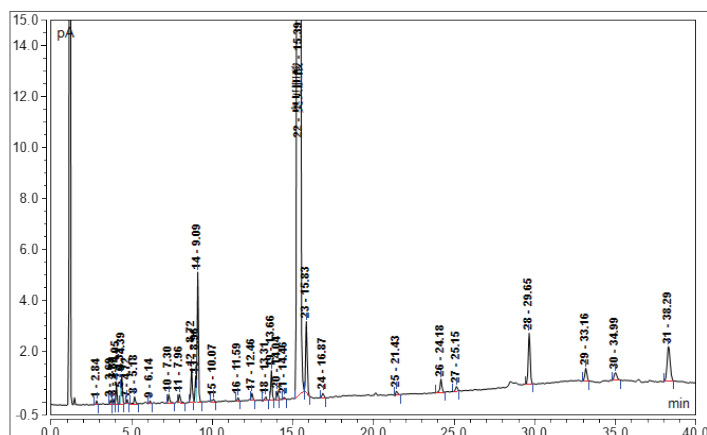


图3 奥贝胆酸样品CAD分析局部放大图谱

奥贝胆酸二聚体是奥贝胆酸合成过程中产生的杂质，也是奥贝胆酸原料药及成品存储过程中产生的重要杂质，因此二聚体的质量检测对提高药品的安全性具有重要意义。利用CAD检测器可以有效检测奥贝胆酸二聚体（见图4），且响应较高，在本方法下二聚体（RT=41.19min）和奥贝胆酸（RT=15.53min）能够达到满意的分离度。

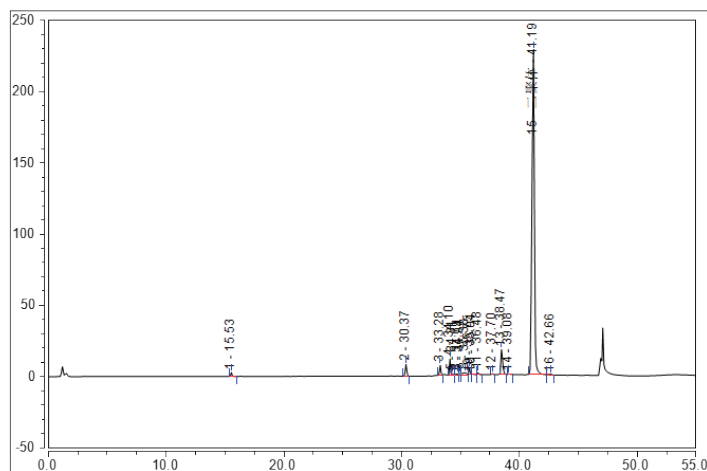


图4 奥贝胆酸二聚体CAD分析图谱

3.2 灵敏度 (色谱条件略)

不断稀释供试品溶液并进行检测, 通过S/N值考察CAD检测器对奥贝胆酸的灵敏度。如图5所示, 浓度为0.244 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 奥贝胆酸溶液进样量10 μL 得到的S/N值为16.5, 结果优于UV或ELSD检测器的定量限结果^[4,5]。说明CAD检测器可为奥贝胆酸样品提供更高的灵敏度。

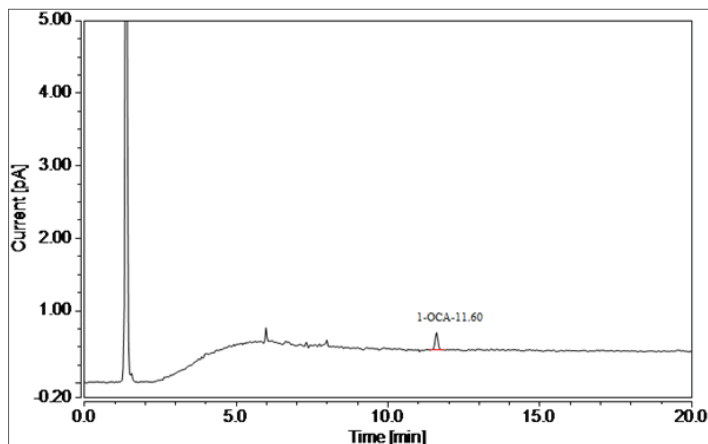


图5 浓度0.244 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 奥贝胆酸样品色谱图

3.3 重复性 (色谱条件略)

浓度1 mg/mL 的奥贝胆酸供试品溶液连续进样6针考察重复性, 结果如图6和表2所示。奥贝胆酸保留时间RSD为0.05%, 峰面积RSD为0.61%, 说明重复性良好。

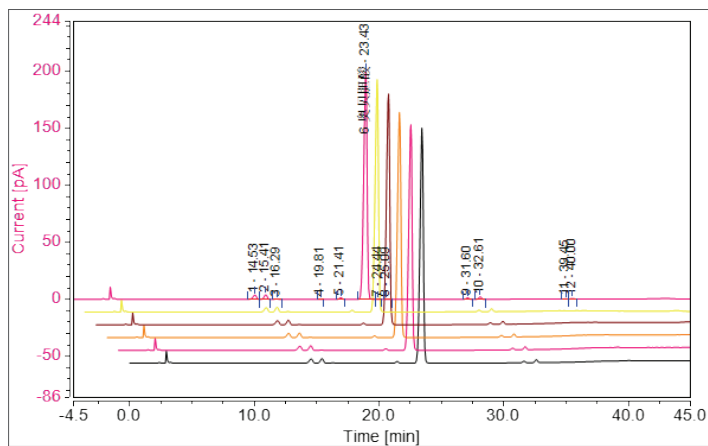


图6 浓度1 mg/mL 奥贝胆酸样品CAD响应重复性

表2 1 mg/mL 奥贝胆酸样品CAD分析重复性结果 (n=6)

奥贝胆酸	保留时间, min	相对峰面积, %	峰面积, $\text{pA}\cdot\text{min}$	峰高, pA
1	23.418	93.73	64.3143	206.30
2	23.443	93.64	63.4827	197.95
3	23.422	93.71	63.8881	197.68
4	23.448	93.74	63.8541	202.59
5	23.434	93.69	63.5225	203.96
6	23.432	94.15	63.2067	199.67
平均	23.433	93.78	63.7114	201.36
RSD, %	0.05	0.20	0.61	1.73

3.4 线性范围

通过稀释得到一系列不同浓度的奥贝胆酸供试品溶液, 并考察线性情况。在较窄的浓度范围内, 奥贝胆酸的工作曲线可用一次线性拟合得到较好的线性结果。浓度范围从0.122到15.625 $\mu\text{g}/\text{mL}$, R^2 为0.996。如果需要获得更宽的线性范围, 则通过二次线性拟合也可得到理想的线性结果。如图7所示, 浓度0.122到62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内, 通过二次线性拟合得到的 $R^2 > 0.999$ 。两种线性拟合方式均可得到较好的线性结果, 并且比ELSD检测器的双对数拟合方式更简单、准确。这是由于雾化类检测器的响应受待测物颗粒直径的变化影响。ELSD检测器的散射光更依赖于待测物的颗粒大小, 尤其是直径越小其响应下降越剧烈, 因此更宽的粒径范围导致ELSD检测器较差的灵敏度和更复杂的响应曲线。而CAD检测器的电信号响应变化受待测物颗粒直径变化的影响较小, 尤其是在低含量检测时可以得到更高的响应信号。因此, CAD检测器具有更高的灵敏度、更佳的线性结果和更宽的响应范围。此外, 通过优化CAD检测器的Power Function参数可以将二次线性方程经过数据校正后转化为一次线性方程, 从而使宽浓度范围内的样品定量分析更简单、方便。

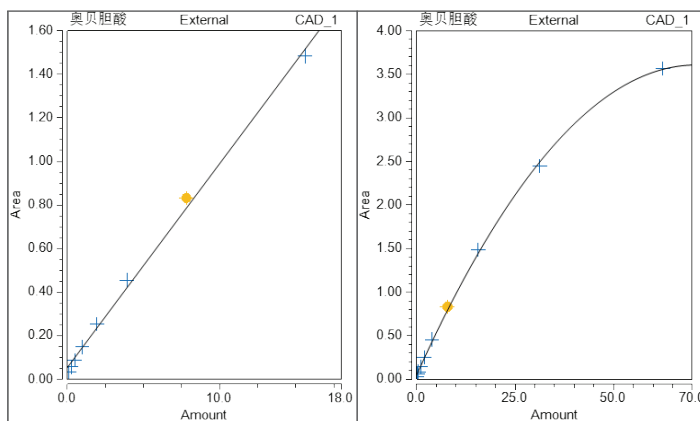


图7 一元线性模拟结果 (左) 和二次线性 (右) 模拟结果

4. 结论

本文结合CAD检测器，在三氟乙酸-乙腈体系下采用梯度洗脱的方式实现奥贝胆酸及有关物质的分离检测。其中奥贝胆酸样品中共检出31个组分，满足相关专利的杂质检测要求。CAD检测器可为奥贝胆酸的检测提供较为平整的基线背景和较高的灵敏度，有助于奥贝胆酸的定量分析和质量控制研究。方法重复性良好，连续进样6针峰面积RSD为0.61%。奥贝胆酸在CAD检测器上呈现出宽广的动态响应范围，在浓度0.122-62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的范围内呈现良好线性且 $R^2 > 0.999$ 。本方法简单、高效，为奥贝胆酸原料和制剂的质量研究提供有力的支持。

参考文献

- [1] 朱士超, 郑学敏, 张玥, 等. 法尼醇X受体激动剂奥贝胆酸[J]. 现代药物与临床, 2016, 31(3): 396-400.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- [3] The United States Pharmacopoeia[M]. The United States Pharmacopoeial Convention, 2016.
- [4] 唐元军, 陈育琳, 陈庆辉. HPLC-ELSD法同时测定猪胆粉中猪去氧胆酸和鹅去氧胆酸的含量[J]. 中药新药与临床药理, 2011, 21(6): 651-653.
- [5] 陈悦, 王静, 陈剑锋. HPLC同时测定猪胆汁水解产物中猪去氧胆酸、鹅去氧胆酸的含量[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(19): 61-63.



赛默飞
官方微信

热线 800 810 5118
电话 400 650 5118
www.thermofisher.com

Thermo Fisher
SCIENTIFIC