

HPLC 法分离测定蟾酥脂质体中三种蟾毒内酯成分

周学敏 程培元 许美娟 翁帼英 王玲玲

(南京药物研究所, 210009)

关键词 反相高效液相色谱法; 脂质体; 蟾毒内酯

脂质体(Liposome)作为药物载体可提高药物的疗效和降低其毒付作用。近年来脂质体药物的研究越来越受到人们重视。脂质体药物的含量可采用同位素标记法或通过层析方法分离后进行测定,也有用表面活性剂破坏脂质体双分子层,使药物释放后再测定^[1]。茅勤等^[2]采用正交函数分光光度法测定了蟾酥脂质体中总蟾毒内酯成分含量。本文制备了脂蟾毒配基(resibufogenin)、华蟾毒精(cinobufagin)和蟾毒灵(bufalin)为对照品,并采用RP-HPLC法分离和测定了蟾酥脂质体中上述三种主要蟾毒内酯成分。色谱系统可使所测色谱峰均达基线分离。方法简单、快速和准确。

1 实验部分

1.1 仪器与试药

岛津LC-5 A 高效液相色谱仪,C-R 3 A 数据处理机,SZL-1 A 进样器,SPD-2 AM 紫外检测器。

甲醇、乙腈为分析纯,乙腈和重蒸馏水用前分别用 HA 型(0.45 μm)和 FH 型(0.5 μm)薄膜过滤。

脂蟾毒配基、华蟾毒精和蟾毒灵对照品均经 IR、UV、MS 和 NMR 鉴定,mp 分别为 120-121℃(丙酮)、215-217℃(丙酮)和 240-242℃(乙醇)。TLC(100 μg)三个展开系统中均为单一斑点,HPLC 法测得含量均大于 99%。

蟾酥脂质体由南京药物研究所提供(由蟾酥氯仿提取物、天然磷脂等制成)。

1.2 色谱条件及色谱系统的适应性

1.2.1 色谱条件 色谱柱 ZORBAX ODS (4.6×250 mm, 5 μm),流动相乙腈-水(53:47),流速 1 ml/min,紫外检测波长 295 nm, ATTEN 4,SPEED 3。对照品及样品 HPLC 色谱见图 1,2。

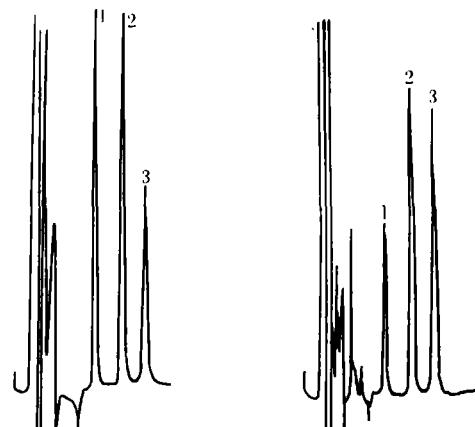


Fig 1. Chromatogram of standard bufadienolides

Fig 2. Chromatogram of bufadienolides in the Liposome-Ch'an su

1. bufalin (t_R 8.2); 2. cinobufagin (t_R 11.1); 3. resibufogenin (t_R 13.5)

1.2.2 色谱柱的理论板数(n) 在本试验条件下,将脂蟾毒配基的保留时间(t_R)和半高峰宽($W_{h/2}$)代入 $n = 5.54(t_R/W_{h/2})^2$ 计算色谱柱的理论板数为 9770。

1.2.3 分离度 将蟾毒灵和华蟾毒精、华蟾

毒精和脂蟾毒配基的保留时间和峰宽代入

$$R = 2(t_{R2} - t_{R1})(W_1 + W_2)^{-1}$$

计算分离度:
 $R_{BC} = 2, R_{cr} = 1.5$ (以上 t_R 按长度计算)。

1.2.4 色谱峰的重现性 进样对照品溶液 5 次, 根据各成分峰面积计算变异系数。脂蟾毒配基、华蟾毒精和蟾毒灵的变异系数依次为 1.15、1.04 和 0.97。

Tab 1. Calibration curves for bufadienolide

Constituent	n	Linear range, μg	Regression equations	r
Resibufogenin	5	1.1~7.2	26844.5X - 2895.7	0.9993
Cinobufagin	5	1.7~11.2	29983.8X + 7498.8	0.9992
Buflin	5	1.4~9.2	35216.5X - 12280.9	0.9998

1.4 回收率测定

取空白脂质体 2 ml, 加甲醇溶解至澄清, 定容。分别进样 50、100 μl , 高效液相色谱分析结果表明, 在等测峰区无甚干扰。脂质体溶液色谱见图 3。

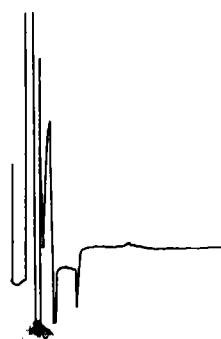


Fig 3. Chromatogram of the liposome's solution.

精密称取用本法测知脂蟾毒配基、华蟾毒精和蟾毒灵含量的蟾酥氯仿提取物适量, 按蟾酥脂质体处方配制模拟样品, 取 2 ml 置 25 ml 量瓶中, 用甲醇溶解至澄清, 定容。取适量进行高效液相色谱法测定。回收率计算结果见表 2。

Tab 2. Recovery of bufadienolide in the liposome-Ch'an su ($n=3, \bar{x} \pm SD$)

Constituent	Average recovery, %	CV, %
Resibufogenin	100.6 ± 1.2	1.19
Cinobufagin	98.4 ± 0.9	0.92
Buflin	98.9 ± 0.8	0.81

1.5 样品测定

精密量取蟾酥脂质体 2 ml, 置 25 ml 量

1.3 线性关系和回归方程 精密称取干燥脂蟾毒配基、华蟾毒精和蟾毒灵对照品各约 6 mg, 置 25 ml 量瓶中, 加甲醇溶解, 定容。分别准确吸取上述对照品溶液 5、10、20、30 和 40 μl 进样, 以峰面积 Y 为纵座标, 进样量 X (μg) 为横座标回归处理, 结果见表 1。

瓶中, 加甲醇溶解至刻度, 可获得澄明溶液。取适量进样, 结果见表 3。

Tab 3. The cont. of bufadienolide in the liposome-Ch'an su ($n=3, \bar{x} \pm SD$)

Constituent	Average cont. $\text{mg}/\text{ml}, \%$	CV, %
Resibufogenin	0.82 ± 0.012	1.51
Cinobufagin	0.59 ± 0.010	1.73
Buflin	0.26 ± 0.007	2.58

2 讨论

2.1 采用 RP-HPLC 法测定蟾酥脂质体中蟾毒内酯成分含量, 方法简单、快速和准确。脂质体膜材无明显干扰。

2.2 经岛津 MPS-2000 型紫外分光光度计扫描, 蟾酥氯仿总提物的紫外最大吸收波长为 295 nm。另发现在 295 nm 比 280 nm 波长时的基线稳定性更好, 所以选择 295 nm 作为检测波长。

2.3 在所测三种蟾毒内酯成分中, 脂蟾毒配基和华蟾毒精的分离是分析测试的关键。常用反相流动相系统中, 乙腈-水为最佳分离系统。本文对 Shim-pack CLC ODS (150 × 4.6 mm, 5 μm) 柱和 ZORBAX ODS (250 × 4.6 mm, 5 μm) 柱进行比较, 前者使两成分接近基线分离, 后者则使两成分达完全基线分离。

2.4 甲醇使蟾酥脂质体溶解至澄清, 可能是甲醇破坏了脂质体双分子层, 使药物释放而利于测定。

2.5 当用色谱纯乙腈做流动相, 样品用流动相溶解时, 标准品色谱图基本无杂峰。因色谱

纯乙腈较贵,我们改用分析纯乙腈做流动相;又因样品需要甲醇溶解,使色谱图中杂峰较多,但未影响待测组分的测定。

参考文献

1 南京药学院药剂学教研组编著. 药剂学. 1984;1000

- 2 茅勤,翁帼英,黄祥贤. 蟾酥脂质体的正交函数分光度法测定. 中草药,1989;20(3):12
- 3 聂荣海,张清敏,钱进. 蟾酥中蟾毒内酯化合物的分离和含量测定. 中成药研究,1980;(5):41
- 4 Verpoorte R, Phan-quô - Kinh, Baerheim Svendsen A. Chemical constituents of vietnamese toad venom, collected from bufo melanostictus schneider. part I . the bufadienolides. J of Natural Products,1980;43(3):347

Determination of Three Bufadienolides in the Liposome-Ch'an Su by RP-HPLC

Zhou Xuemin, Chen Peiyuan, Xu Meijuan, Weng Guoying, Wan Lingling
Nanjing Institute of Materia Medica, 210009

A RP-HPLC method was developed to separate and determine resibufogenin, cinobufagin and bufalin in the liposome-Ch'an su. A ZORBAX ODS column (250×4.6 mm, $5 \mu\text{m}$) at the room temperature and a mobile phase of acetonitrile-water (53 : 47) was used. Flow rate was 1 ml/min, and UV wavelength was 295 nm. The recovery of bufadienolide was 98.4~100.6%, $CV < 2.58\%$. The method is simple and rapid.

Key words RP-HPLC; Bufadienolide; Liposome

中国药科大学 1993 学年全日制本专科招生情况通报

为适应社会主义市场经济和医药事业发展的需要,经国家教委和国家医药管理局批准,本校 1993 学年招生人数将明显增加,并且恢复了专科层次的招生。根据国家指令性招生计划,我校将继续在全国除西藏、台湾以外的 29 个省、直辖市、自治区招生;此外还将招收委托代培生和自费生。目前已与河南、山东、江苏、浙江、广东、广西等省区签订了百余人的委托代培合同,自费生拟在江苏省招收。

本校 1993 年招生专业计有 13 个,其中:

本科:药物制剂、药物分析、药理学、化学制药、生物制药(微生物制药方向)、生物制药、英语药学、中药制药、中药鉴定和医药企业管理(国际医药贸易方向)等 10 个专业。除药理学专业为五年制外,其余专业均为四年制。

专科:药物制药工艺、化学制药工艺和医药企业管理(医药营销方向)等 3 个专业,学制均为三年。

我校 1993 年度招生数量虽有较大增加,但还远不能满足医药事业发展的需求,很多医药企事业单位未能在我校落实委培生计划,我校将本着着眼未来、长期合作、分期分批解决的精神,逐步满足各有关单位的要求。需要药学人才的单位可在每年 9 至 11 月份与本校招生办公室联系委托代培事宜,争取尽早安排。

(招生办公室 郭耀宗)