

- glioma cell [J]. *Neurosci Bull*, 2014, 30(1): 67-73.
- [2] HARAKEH S, DIAB-ASSAF M, AZAR R, et al. Epigallocatechin-3-gallate inhibits tax-dependent activation of nuclear factor kappa B and of matrix metalloproteinase 9 in human T-cell lymphotropic virus-1 positive leukemia cells [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(3): 1219-1225.
 - [3] ORŠOLIĆ N, SIROVINA D, GAJSKI G, et al. Assessment of DNA damage and lipid peroxidation in diabetic mice: effects of propolis and epigallocatechin gallate (EGCG) [J]. *Mutat Res*, 2013, 757(1): 36-44.
 - [4] KHALATBARY A R. Natural polyphenols and spinal cord injury [J]. *Iran Biomed J*, 2014, 18(3): 120-129.
 - [5] KHAN N, KHYMENETS O, URPI-SARDÀ M, et al. Cocoa polyphenols and inflammatory markers of cardiovascular disease [J]. *Nutrients*, 2014, 6(2): 844-880.
 - [6] KAUL D, SHUKLA A R, SIKAND K, et al. Effect of herbal polyphenols on atherogenic transcriptome [J]. *Mol Cell Biochem*, 2005, 278(1/2): 177-184.
 - [7] VASENWALA S M, SETH R, HAIDER N, et al. A study on antioxidant and apoptotic effect of *Azadirachta indica*(neem) in cases of cervical cancer [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2012, 286(5): 1255-1259.
 - [8] PANGJIT K, TANTIPHAIPUNWONG P, SAJJAPONG W, et al. Iron-chelating, free radical scavenging and anti-proliferative activities of *Azadirachta indica* [J]. *J Med Assoc Thai*, 2014, 97(S4): 36-43.
 - [9] SINGH U P, MAURYA S, SINGH D P. Phenolic acids in neem (*Azadirachta indica*): a major pre-existing secondary metabolites [J]. *J Herb Pharmacother*, 2005, 5(1): 35-43.
 - [10] SITHISARN P, SUPABPHOL R, GRITSANAPAN W. Comparison of free radical scavenging activity of Siamese neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss var. *siamensis* Valetton) leaf extracts prepared by different methods of extraction [J]. *Med Princ Pract*, 2006, 15(3): 219-222.
 - [11] MANIKANDAN P, ANANDAN R, NAGINI S. Evaluation of *Azadirachta indica* leaf fractions for *in vitro* antioxidant potential and protective effects against H₂O₂-induced oxidative damage to pBR322 DNA and red blood cells [J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57(15): 6990-6996.
 - [12] LI C Y, FENG J. Antioxidant activity of polyphenolics extracted from the leaves and pomace of *Rabbiteye blueberry* (*Vaccinium ashei* reade) [J]. *Sci Technol Food Indust(食品工业科技)*, 2013, 34(7): 56-60.
 - [13] RIETHMULLER E, TÓTH G, ALBERTI A, et al. Antioxidant activity and phenolic composition of *Corylus colurna* [J]. *Nat Prod Commun*, 2014, 9(5): 679-682.
 - [14] PACIFICO S, GALLICCHIO M, LORENZ P, et al. Neuroprotective potential of *Laurus nobilis* antioxidant polyphenol-enriched leaf extracts [J]. *Chem Res Toxicol*, 2014, 27(4): 611-626.
 - [15] WANG Y Q, MA L Y, ZHANG Z Q. Antioxidant capacity and extraction technique of polyphenol from the leaf of *Azadirachta indica* [J]. *Fine Chem(精细化工)*, 2015, 32(1): 64-68.
 - [16] NIU P F, QIU N X, DU Y. Separation of polyphenols from apple pomace based on different polarities and their antioxidative activities *in vitro* [J]. *Tran Chin Soc Agr Eng(农业工程学报)*, 2008, 24(3): 238-242.
 - [17] BENZIE I F F, STRAIN J J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay [J]. *Anal Biochem*, 1996(239): 70-76.

收稿日期: 2015-04-21

蟾酥缓释微丸的质量标准

李雅雅, 刘伯宇, 黄绳武* (浙江中医药大学药学院, 杭州 310053)

摘要: 目的 研究并制定蟾酥缓释微丸的质量标准。方法 采用 TLC 鉴别制剂中各成分; 采用 HPLC 分别测定华蟾酥毒基及酯蟾毒配基的含量; 采用紫外分光光度计测定制剂中吲哚生物碱类成分。结果 3 批制剂均出现与对照品相对应的斑点, 阴性制剂无干扰; 华蟾酥毒基在 0.018 4~0.570 4 μg 内呈良好线性关系($r=0.999\ 8$, $n=6$), 平均加样回收率为 100.46%, RSD 为 3.08%($n=9$); 酯蟾毒配基在 0.007 8~0.241 8 μg 内呈良好线性关系($r=0.999\ 8$, $n=6$), 平均加样回收率为 98.28%, RSD 为 2.22%($n=9$)。初步确定 3 批样品中华蟾素毒基与酯蟾毒配基的总量不得 $<0.006\ g\cdot g^{-1}$, 吲哚生物碱类含量不得 $<0.007\ g\cdot g^{-1}$ 。结论 本法专属性强、简便可行, 可作为蟾酥缓释微丸的质量标准。

关键词: 蟾酥缓释微丸; 薄层色谱法; 高效液相色谱法; 紫外分光光度计; 质量标准

中图分类号: R917

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2015)11-1324-06

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.11.010

Quality Standard of Venenum Bufonis Sustained-release Pellets

LI Yaya, LIU Boyu, HUANG Shengwu* (*Pharmaceutical College, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China*)

作者简介: 李雅雅, 女, 硕士生 Tel: 15869134120 E-mail: liyaya133@163.com
E-mail: hsw55@163.com

***通信作者:** 黄绳武, 男, 教授 Tel: 18606505050

ABSTRACT: OBJECTIVE To study and develop the quality standards of Venenum Bufonis sustained-release pellets. **METHODS** TLC method was used to identify agents in various medicinal materials. The content of cinobufagin and resibufogenin were determined by HPLC. The ultraviolet spectrophotometer was used to determine indole alkaloids. **RESULTS** Corresponding spots were observed in 3 batches of samples by comparing with the reference substance. Negative preparations had no interference. The linear range of cinobufagin was 0.018 4–0.570 4 μg ($r=0.999\ 8$, $n=6$), and the average recovery rate was 100.46%, RSD=3.08% ($n=9$). The linear range of resibufogenin was 0.007 8–0.241 8 μg ($r=0.999\ 8$, $n=6$), and the average recovery rate was 98.28%, RSD=2.22% ($n=9$). It was preliminarily determined that the total content of cinobufagin and resibufogenin of 3 batches of samples was not $<0.006\ \text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, and the content of indole alkaloids contents was not $<0.00\ 7\ \text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. **CONCLUSION** This method is specific, simple and feasible to be the quality standard of Venenum Bufonis sustained-release pellets.

KEY WORDS: Venenum Bufonis sustained-release pellets; TLC; HPLC; ultraviolet spectrophotometer; quality standard

蟾酥为蟾蜍科动物中华大蟾酥 *Bufo bufo gargarizans* Cantor 或黑眶蟾蜍 *Bufo melanostictus* Schneider 的干燥分泌物, 药用历史悠久, 性味甘辛、温, 有毒, 具有抗肿瘤、消肿、醒神、开窍、强心和止痛等作用^[1]。蟾毒内酯类是蟾酥中的脂溶性成分, 也是蟾酥中的主要化学物质, 包括华蟾酥毒基、酯蟾毒配基等。吲哚生物碱类是蟾酥中的水溶性成分, 包括蟾蜍色胺及 5-羟色胺 (5-hydroxytryptamine, 5-HT) 等^[2-4]。中国药典 2010 年版收载的蟾酥薄层鉴别和含量测定主要针对华蟾素毒基和酯蟾毒配基^[5], 而对于水溶性成分吲哚生物碱类的测定未有记载。已有文献报道, 在标准的基础上增加吲哚生物碱的薄层鉴别、含量测定指标 5-HT^[6-7]、华蟾酥毒基与酯蟾毒配基^[8]。本课题组前期已制备蟾酥缓释微丸, 并对其形态及体外释放机制进行了初步研究^[9], 为了能更有效地控制该制剂的质量, 本实验建立了全面的蟾酥缓释微丸薄层鉴别方法, 并采用 HPLC 测定该缓释微丸中华蟾酥毒基、酯蟾毒配基含量, 采用紫外分光光度法测定该制剂中吲哚生物碱类含量。结果表明薄层鉴别方法简便、全面、专属性强, 含量测定方法快捷、准确、可控性好, 为蟾酥缓释微丸质量标准的建立提供参考依据。

1 材料

LC-20A 高效液相色谱仪(检测器 SPD-20A, 日本岛津); 紫外分光光度计 UV759S(上海精密科学仪器有限公司); 溶出度测试仪 RC-80D 型(天津市国铭医药有限公司); FA2004 电子天平(常州市幸运电子设备有限公司); KQ5200DE 数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); HH-4 数显恒温水浴锅(常州澳华仪器有限公司)。

蟾酥(浙江百草中药饮片公司, 批号: 20120521, 产地: 江苏)经浙江中医药大学中药资

源与鉴定教研室陈锡林教授鉴定为蟾蜍科动物中华大蟾酥 *Bufo bufo gargarizans* Cantor 或黑框蟾蜍 *Bufo melanostictus* Schneider; 华蟾酥毒基对照品(中国食品药品检定研究院, 批号: 110803-200605, 纯度 $\geq 99.6\%$); 酯蟾毒配基对照品(宝鸡市辰光生物科技有限公司, 批号: 20120825, 纯度 $\geq 98\%$); 5-HT 对照品(南昌贝塔生物科技有限公司, 批号: 10015-201206, 纯度 $\geq 98\%$); 正丁醇(江苏强盛功能化学股份有限公司); 醋酸(上海凌峰化学试剂有限公司); 环己烷(上海强顺化学试剂有限公司); 三氯甲烷(衢州巨化试剂有限公司); 硫酸(浙江中皇化工试剂有限公司); EudragitRS 30D(Evonik Rohm GmbH, 批号: G120518503); EudragitRL 30D(Evonik Rohm GmbH, 批号: G120816521); 滑石粉(批号: G1331032)、柠檬酸三乙酯 TEC(批号: 110067)、微晶纤维素(MCC, 批号: 36136)、乳糖(批号: 0806222)、羟丙基甲基纤维素(HPMC, 批号: K1215033)均购自阿拉丁试剂有限公司; 水为高纯水; 甲醇、乙腈均为色谱纯; 其他试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 理化性质考察

2.1.1 性状 本品为硬胶囊, 内容物为棕褐色的微丸, 气味略腥。

2.1.2 鉴别

2.1.2.1 蟾毒内酯类成分 取相当于蟾酥 0.1 g 的蟾酥缓释微丸, 研磨成细粉, 加乙醇 10 mL, 加热回流 30 min, 过滤, 滤液置 10 mL 量瓶中, 加乙醇至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。取酯蟾毒配基对照品、华蟾酥毒基对照品, 加乙醇分别制成 $1\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液, 作为对照品溶液。吸取上述 4 种溶液各 10 μL , 分别点于同一硅胶 G 薄层板上, 以环己烷-三氯甲烷-丙酮(4:3:3)展开剂, 展开,

取出, 晾干, 置紫外光灯(365 nm)下检视。结果供试品色谱中, 与对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的斑点, 阴性无干扰。结果见图 1。

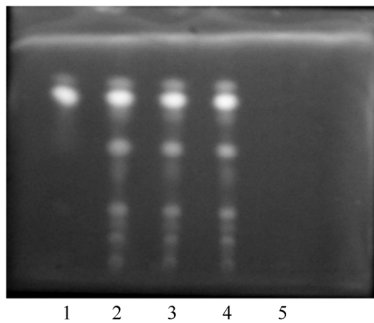


图 1 蟾酥缓释微丸 TLC 鉴别

1-混合对照品; 2、3、4-3 批蟾酥缓释微丸; 5-空白微丸。

Fig. 1 TLC identification of Venenum Bufonis sustained-release pellets

1-mixed reference substances; 2, 3, 4-3 batches of Venenum Bufonis sustained-release pellets; 5-blank sustained-release pellets.

2.1.2.2 蟾毒色胺类成分 取蟾酥缓释微丸 0.5 g, 研磨成细粉, 加水 30 mL, 煎煮 3 次, 每次 60 min, 过滤, 滤液置至 100 mL 量瓶中, 加水至刻度, 摇匀, 作为供试品溶液。吸取上述溶液分别点于同一硅胶 G 高效薄层板上, 以正丁醇-醋酸-水(4:1:5)的上层液为展开剂, 展开, 取出, 晾干, 喷 20% 对二甲氨基苯甲醛盐酸(2:3)溶液, 105 °C 加热至斑点显色清晰。结果供试品色谱中, 在与对照药材、5-HT 色谱相应的位置上, 显相同蓝紫色斑点, 阴性无干扰。结果见图 2。

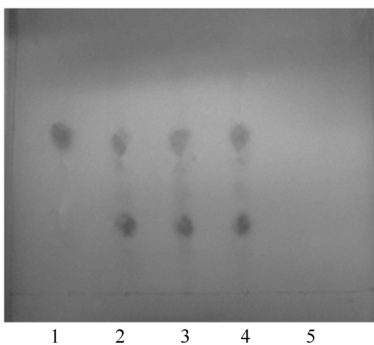


图 2 蟾酥缓释微丸 TLC 鉴别

1-5-HT 对照品; 2、3、4-3 批样品; 5-空白微丸

Fig. 2 TLC identification of Venenum Bufonis sustained-release pellets

1-5-HT reference substance; 2, 3, 4-3 batches of samples; 5-blank sustained-release pellets.

2.1.3 检查 应符合中国药典 2010 年版一部附录 IL 胶囊剂各项下的检查规定及微生物限度检查规定。

2.1.3.1 水分检查 参照中国药典 2010 年版一部(附录 IXH)水分测定项下第 1 法(烘干法)进行测定^[5], 除另有规定外, 不得>9.0%。取蟾酥缓释微丸 5 g, 平铺于干燥至恒重的扁形称量瓶中, 打开瓶盖在 105 °C 干燥 5 h, 将瓶盖盖好, 移置干燥器中, 冷却 30 min, 精密称定, 再在 105 °C 干燥 1 h, 冷却, 称重, 至连续 2 次称重的差异不>5 mg 为止。根据减失的重量, 计算供试品中含水量(%). 结果 3 批样品含水量均<9.0%, 符合规定, 平均含水量为 4.02%, 见表 1。

表 1 3 批样品水分测定结果

Tab. 1 Results of moisture determination of 3 batches of samples

批号	重量/g	恒重后重量/g	测定结果/%
20131216	4.890	4.706	3.76
20131217	4.920	4.715	4.17
20131218	4.779	4.581	4.14

2.1.3.2 微生物限度检查 按中国药典 2010 年版一部附录 XII C 微生物限度检查法检测。结果显示 3 批样品均符合药品卫生标准每克细菌不得>1 000 个, 霉菌不得>100 个, 不得检出致病菌和活螨的要求。结果见表 2。

表 2 3 批样品的微生物限度检查结果

Tab. 2 Results of microbial limit inspection of 3 batches of samples

批号	细菌	霉菌	致病菌	活螨	沙门氏菌
20131216	<200	<20	未检出	未检出	未检出
20131217	<200	<20	未检出	未检出	未检出
20131218	<200	<20	未检出	未检出	未检出

2.1.4 装量差异 根据中国药典 2010 年版一部附录 IL 胶囊剂装量差异检查法进行试验, 结果显示 3 批样品装量差异最大值分别为 1.65%, 3.71%, 3.27%, 最小值分别为-2.32%, -3.16%, -3.71%, 均在±10%以内, 符合规定。结果见表 3。

2.2 含量测定

2.2.1 色谱条件与系统适用性试验 以十八烷基硅烷键合硅胶为填充剂, 以乙腈-水(50:50)为流动相, 检测波长为 296 nm; 柱温 40 °C, 理论板数按华蟾酥毒基峰、酯蟾毒配基峰计算应分别不<4 000。

2.2.2 对照品溶液的制备 精密称取华蟾酥毒基对照品 1.84 mg、酯蟾毒配基对照品 0.78 mg, 置于 10 mL 量瓶, 加甲醇至刻度, 即得。

表 3 3 批样品装量差异

Tab. 3 Quantity difference of 3 batches of samples

序号	重量/g		
	131217	131218	131216
1	0.100	0.103	0.100
2	0.101	0.105	0.101
3	0.099	0.104	0.103
4	0.102	0.098	0.102
5	0.103	0.100	0.100
6	0.099	0.101	0.100
7	0.104	0.100	0.097
8	0.100	0.099	0.099
9	0.102	0.100	0.100
10	0.103	0.101	0.104

2.2.3 供试品溶液的制备 取蟾酥细粉约 0.2 g, 精密测定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 20 mL,

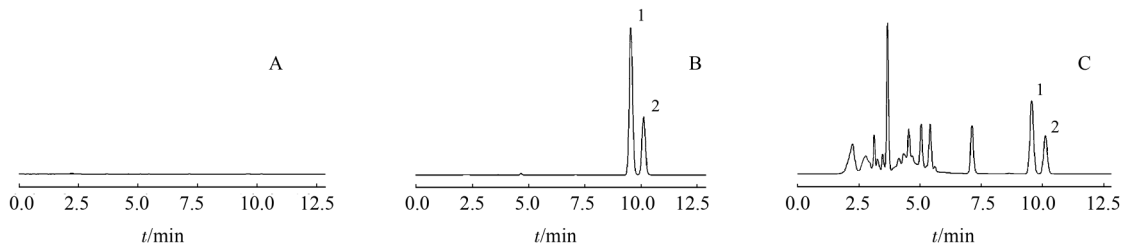


图 3 高效液相色谱图

A-空白溶液; B-对照品溶液; C-供试品溶液; 1-华蟾酥毒基; 2-脂蟾毒配基。

Fig. 3 HPLC chromatograms

A-blank solution; B-reference substance solution; C-sample solution; 1-cinobufagin; 2-resibufogenin.

2.2.5.2 华蟾酥毒基标准曲线绘制 分别精密量取“2.2.2”项下混合对照品溶液 0.05, 0.35, 0.65, 0.95, 1.25, 1.55 mL, 置 5 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀。精密吸取各浓度的对照品溶液 10 μ L 注入高效液相色谱仪, 测定峰面积, 以华蟾酥毒基对照品溶液浓度($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程 $y = 8597567.2878x + 1515.1190$ ($r = 0.9998$), 表明华蟾酥毒基在 0.0184~0.5704 μg 内呈良好线性关系。

2.2.5.3 脂蟾毒配基标准曲线绘制 分别精密量取“2.2.2”项下对照品溶液 0.05, 0.35, 0.65, 0.95, 1.25, 1.55 mL, 置 5 mL 量瓶, 甲醇稀释至刻度, 摇匀。精密吸取各浓度对照品溶液 10 μ L 注入高效液相色谱仪, 测定峰面积, 以脂蟾毒配基对照品溶液浓度($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)为横坐标, 峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线, 得回归方程 $y = 11072854.0904x + 557.0310$ ($r = 0.9998$), 表明脂蟾毒配基在 0.0078~0.2418 μg 内呈良好线性关系。

2.2.5.4 仪器精密度试验 分别精密吸取低、中、

称定重量, 加热回流 1 h, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 过滤, 取续滤液, 即得。

2.2.4 最大波长的选择 取上述对照品溶液适量, 置 10 mL 量瓶, 加甲醇定容至 10 mL。以甲醇为空白, 在 200~400 nm 内扫描, 结果对照品溶液在 296 nm 附近有最大吸收, 故选择 296 nm 为测定波长。

2.2.5 方法学考察

2.2.5.1 专属性考察 取华蟾酥毒基、脂蟾毒配基混合对照品溶液、供试品溶液和溶剂甲醇, 过膜 (0.45 μm), 按“2.2.1”项下色谱条件测定, 结果显示, 在此色谱条件下, 溶剂不干扰药物的测定。色谱图见图 3。

高混合对照品溶液, 重复操作 6 次, 按“2.2.1”项下方法测定峰面积, 求得相对标准偏差 RSD。华蟾酥毒基 RSD 分别为 0.67%, 0.28%, 0.32%, 脂蟾毒配基 RSD 分别为 0.64%, 0.23%, 0.36%, 表明该仪器精密度良好。

2.2.5.5 稳定性试验 精密吸取同一供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12 h, 按“2.2.1”项下方法测定, 记录色谱图, 计算 RSD。华蟾酥毒基及脂蟾毒配基 RSD 分别为 0.07%, 0.09%, 表明二者在 12 h 内稳定。

2.2.5.6 重复性试验 分别精密吸取 6 份同一批供试品溶液, 按“2.2.1”项下方法测定, 记录色谱图, 求相对标准偏差 RSD。华蟾酥毒基及脂蟾毒配基的 RSD 分别为 2.64%, 2.51%, 表明方法重复性良好。

2.2.5.7 加样回收率试验 精密移取已知含量的供试品溶液 0.5 mL, 平行移取 9 份, 置 10 mL 量瓶中; 另分别加入相当于供试品含量 80%, 100%, 120% 的对照品溶液, 加甲醇定容至刻度, 摇匀,

过 0.45 μm 微孔滤膜, 取续滤液, 按“2.2.1”项下方法测定, 记录色谱图峰面积, 平行测定。测得华蟾酥毒基平均回收率为 100.46%, 脂蟾毒配基平均加样回收率为 98.28%。该方法回收率高, 可用于蟾酥含量测定。

2.2.6 蟾毒内酯类成分含量测定 取 3 批蟾酥缓释微丸各 0.2 g, 研磨成粉, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 20 mL, 称定重量, 加热回流 1 h, 放冷, 再称定重量, 用甲醇补足减失的重量, 摇匀, 滤过, 取续滤液, 即得。平行制备 3 份供试品溶液, 进样, 测定峰面积, 结果见表 4。

表 4 蟾毒内酯类成分含量($n=3$)

Tab. 4 The content of toad venom lactone($n=3$)

批号	平均含量/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$		总含量/ $\text{mg}\cdot\text{mg}^{-1}$	RSD/%
	华蟾酥毒基	脂蟾毒配基		
20131216	0.004 81	0.002 88	0.007 69	0.700
20131217	0.004 99	0.002 81	0.007 80	
20131218	0.004 96	0.002 81	0.007 77	

由表 4 可见, 华蟾酥毒基与脂蟾毒配基的总量均不 $<0.6\%$, 所以初步确定 3 批样品中华蟾酥毒基与脂蟾毒配基的总量不得 $<0.006\text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

2.2.7 吲哚生物碱类含量测定 取 3 批蟾酥缓释微丸各 0.5 g, 研磨成粉, 置具塞锥形瓶中, 精密加入 60 倍量的水, 提取 3 次, 每次加热回流 1 h, 放冷, 摇匀, 过滤, 取续滤液, 定容于 100 mL 量瓶中即得。平行制备 3 份供试品溶液, 在 556 nm 处测定紫外吸收值, 结果见表 5。

表 5 吲哚生物碱类含量($n=3$)

Tab. 5 The content of indole alkaloids($n=3$)

批号	吸光度	含量/ $\text{mg}\cdot\text{mg}^{-1}$	平均含量/ $\text{mg}\cdot\text{mg}^{-1}$	RSD/%
20131216	0.281	0.007 10	0.007 22	2.82%
20131217	0.279	0.007 06		
20131218	0.296	0.007 49		

由表 5 可见, 吲哚生物碱含量均不 $<0.7\%$, 所以初步确定 3 批样品中吲哚生物碱含量不得 $<0.007\text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

2.3 体外溶出度

称取 3 批蟾酥缓释胶囊, 采用中国药典 2010 年版附录 XC 规定的溶出度测定项下第 2 法装置, 以 500 mL 0.1% 十二烷基硫酸钠($\text{pH}=7.0$)为溶出介质, 水浴温度为 $(37\pm0.5)^{\circ}\text{C}$, 转速为 $100\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 。

分别于 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 取样 5 mL, 同时补加同温度空白介质 5 mL, 用微孔滤膜过滤, 滤液作为供试品, 按照“2.2.1”项下方法测定, 计算累积释放量, 并对时间作图得溶出曲线。结果见图 4。

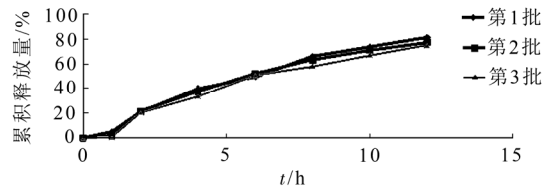


图 4 缓释微丸胶囊体外溶出曲线

Fig. 4 *In vitro* dissolution curves of sustained-release pellets capsules

3 讨论

3.1 蟾酥缓释微丸薄层鉴别

本实验参照中国药典 2010 年版收载的蟾酥的鉴别方法进行试验摸索, 将制备的供试品溶液点于硅胶 G 板上, 以环己烷-三氯甲烷-丙酮(4:3:3)为展开剂展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯(365 nm)下检测, 此方法对于蟾毒内酯类成分的分离度好。鉴于蟾毒色胺类成分的薄层鉴别, 中国药典 2010 年版未有收载, 本试验在 TLC 鉴别中分别选择了正丁醇-醋酸-水(6:1:5)、正丁醇-醋酸-水(4:1:5)、异丙醇-浓氨水-水(18:1:1)等多种溶剂系统, 比较对吲哚生物碱类成分的薄层展开效果, 确定以正丁醇-醋酸-水(4:1:5)上层液为展开剂, 结果供试品色谱在与对照品色谱相应的位置上色谱斑点显色清楚, 阴性无干扰, 所以将本法作为蟾酥缓释微丸的薄层鉴别方法符合中药鉴别的相关要求。

3.2 蟾酥缓释微丸含量测定

蟾酥具有一定的抗肿瘤作用, 其成分为脂溶性成分和水溶性成分, 主要有效脂溶性成分为华蟾酥毒基和脂蟾毒配基, 主要有效水溶性成分为吲哚生物碱。目前对蟾毒内酯类成分的研究较多, 但对蟾毒色胺类成分研究的报道较少。本实验对华蟾酥毒基、脂蟾毒配基及吲哚生物碱进行含量测定, 通过色谱条件选择和方法学考察, 建立了同时测定制剂中华蟾酥毒基和脂蟾毒配基的方法, 该法简单、可行; 同时建立了测定制剂中吲哚生物碱的方法, 该方法简单、稳定、可行。根据指标性成分定量研究结果, 暂定指标性成分含量限度: 制剂(微丸)每克含华蟾酥毒基及脂蟾毒配

基总量不得 $<0.006\text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ ，含吡啶生物碱类成分含量不得 $<0.007\text{ g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

3.3 体外溶出度

为了提高患者的顺应性，本实验将蟾酥缓释微丸装入胶囊，并对缓释微丸胶囊进行溶出试验。3批蟾酥缓释微丸在0.1%十二烷基硫酸钠(pH=7.0)的溶出介质中，溶出曲线基本一致。从溶出曲线看，蟾酥缓释微丸2 h累积释放量为20%~30%，未表现出突释，6 h时累积释放量达50%，12 h累积释放量 $>80\%$ ，表明该蟾酥缓释微丸在12 h内已基本释放完全。蟾酥缓释微丸可减少血药浓度的波动，避免不良反应，减少给药次数。

REFERENCES

- [1] YANG S, MA X B, ZHANG B. Optimized compatibility of anticancer monomers from *Venenum Bufonis* by uniform design [J]. *Chin New Drugs J*(中国新药杂志), 2014, 23(17): 2077-2080.
- [2] GAO H, ZEHL M, LEITNER A, et al. Comparison of toad venoms from different *Bufo* species by HPLC and LC-DAD-MS/MS [J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 131(2): 368-376.
- [3] QU T, GAO H M, CHEN L M, et al. Content of indole alkaloids and bufadienolides contained in toad medicines [J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2012, 37(20): 3086-3091.
- [4] XIA X, JIN H, YAN S, et al. Analysis of the bioactive constituents of Chansu in rat plasma by high performance liquid chromatography with mass spectrometric detection [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 53(3): 646-654.
- [5] 中国药典. 一部[S]. 2010: 附录 47.
- [6] HU X Y, LI Y R, YUAN J, et al. Optimization of alcohol precipitation process of cinobufacini extract by multi-index comprehensive evaluation method [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2012, 23(4): 1016-1019.
- [7] 霍雨佳, 孙萍, 李慧. 正交试验法优选蟾皮中吡啶类生物碱的提取工艺[J]. *山东中医药大学学报*, 2012, 36(6): 536-538.
- [8] 黎美芬, 梁记芯, 陈增山. 高效液相色谱法测定小儿奇应丸中华蟾酥毒基和脂蟾毒配基的含量[J]. *中国现代药物应用*, 2014, 8(5): 245-247.
- [9] JIANG S S, LI Y S, TU Y Q, et al. Preparation of *Venenum Bufonis* sustained-release pellets and its release mechanism *in vitro* [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*(中国现代应用药学), 2015, 32(9): 1103-1106.

收稿日期: 2015-06-17

新型 β -肽环氧酮类蛋白酶体抑制剂的合成与活性评价

张建康¹, 庄让笑¹, 胡永洲² (1.杭州市西溪医院, 杭州 310023; 2.浙江大学药学院, 杭州 310012)

摘要: 目的 设计合成新型的 β -肽类蛋白酶体抑制剂, 并对其活性进行评价。方法 根据先导化合物 Carfilzomib 与蛋白酶体的作用方式, 保留其与蛋白酶体结合的关键环氧酮片段, 并结合 β -氨基酸的特点, 采用氨基酸替换、生物电子等排等药物设计的方法, 设计一类结构新颖的蛋白酶体抑制剂; 采用缩合、氧化、还原等反应, 合成系列目标化合物; 通过体外酶抑制活性实验检验化合物活性。结果 合成了8个结构新颖的 β -肽环氧酮类衍生物, 化合物结构经¹H-NMR、ESI-MS确证, 部分化合物体现了一定的蛋白酶体抑制活性。结论 β -氨基酸作为一种重要的 α -氨基酸替换结构, 有望能够丰富短肽类蛋白酶体抑制剂的结构类型。

关键词: 蛋白酶体抑制剂; β -肽环氧酮; 合成; 活性评价

中图分类号: R914.5

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2015)11-1329-08

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2015.11.011

Synthesis, Biological Evaluation of Novel β -Peptidyl Epoxyketone Proteasome Inhibitors

ZHANG Jiankang¹, ZHUANG Rangxiao¹, HU Yongzhou² (1. *Xixi Hospital of Hangzhou, Hangzhou 310023, China*; 2. *College of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310012, China*)

ABSTRACT: OBJECTIVE To discover novel β -peptidyl epoxyketone proteasome inhibitors, evaluate their enzymatic activities. **METHODS** According to the binding interactions of lead compound Carfilzomib with proteasome, the epoxyketone group of Carfilzomib was retained in the drug design. A series of novel proteasome inhibitors were designed by combining the retained epoxyketone group, β -amino acid using rational drug design strategies such as amino acid, bioisostere replacement.

作者简介: 张建康, 男, 博士 Tel: (0571)85463955 E-mail: zjk0125@yeah.net