

学校代码: 10610
学 号: S063552

四川 大 学

硕 士 学 位 论 文

2008 RS-111-114

题目 羟基喜树碱磷脂复合物脂质纳米粒冻干针剂的研制

作 者 卫 薇

专 业 药 剂 学

指导教师姓名 张 志 荣 教授

二 00 八 年 四 月 三 十 日

目 录

中文摘要.....	1
英文摘要.....	3
第一章 前言.....	5
1 羟基喜树碱的治疗特点及研究概况.....	5
2 羟基喜树碱的剂型研究现状.....	7
3 选题思想.....	8
4 羟基喜树碱理化性质的试验资料及文献资料.....	10
第二章 羟基喜树碱磷脂复合物的制备及理化性质研究.....	11
1 仪器与试药.....	11
1.1 仪器.....	11
1.2 试药.....	11
2 实验内容与结果.....	12
2.1 HCPT 含量测定方法的建立.....	12
2.2 复合物的制备.....	15
2.3 复合物中羟基喜树碱在水中溶解度的测定.....	16
2.4 羟基喜树碱磷脂复合物水中分散性的研究.....	16
2.5 X 射线衍射.....	16
2.6 差示扫描量热分析(DSC).....	19
3 讨论.....	21
4 小结.....	21
第三章 羟基喜树碱磷脂复合物脂质纳米粒冻干针剂的研制.....	22
1 仪器与试药.....	22
1.1 仪器.....	22
1.2 试药.....	22
2 实验内容与结果.....	22
2.1 HCPT-PC-LN 冻干针剂制备工艺研究.....	22
2.2 HCPT-PC-LN 灭菌方法的研究.....	30

2.3 HCPT-PC-LN 冻干针剂质量评价.....	31
3 讨论.....	33
4 小结.....	34
第四章 羟基喜树碱磷脂复合物脂质纳米粒冻干针剂体外释药性质研究.....	35
1 仪器与试药.....	35
1.1 仪器.....	35
1.2 试药.....	35
2 实验内容与结果.....	35
2.1 HCPT 含量测定方法的建立.....	35
2.2 体外释药及含量测定方法.....	37
2.3 体外释药结果.....	37
3 讨论.....	39
4 小结.....	40
第五章 羟基喜树碱磷脂复合物脂质纳米粒冻干针剂小鼠体内分布的研究...41	
1 仪器与试药.....	41
1.1 仪器.....	41
1.2 试药.....	41
2 实验内容与结果.....	41
2.1 小鼠组织中 HCPT 的测定方法.....	41
2.2 HCPT-PC-LN 冻干针剂小鼠体内分布试验设计.....	42
2.3 体内分布样品中 HCPT 的 HPLC 测定方法认证结果.....	42
2.4 HCPT-PC-LN 冻干针剂小鼠体内分布试验结果.....	47
3 小结.....	52
全文小结.....	53
参考文献.....	54
综述.....	55
致谢.....	68
声明.....	69

羟基喜树碱磷脂复合物脂质纳米粒冻干针剂 给药系统的研究

首先制备了羟基喜树碱磷脂复合物并对其理化性质进行了考察。与羟基喜树碱及相应的混合物相比,复合物中羟基喜树碱在水中的溶解度显著增大,水中很容易分散形成纳米粒。差示扫描量热分析(DSC)图谱表明复合物是不同于羟基喜树碱、磷脂以及二者物理混合物的新物相。X-射线衍射分析(XRD)表明在复合物中羟基喜树碱由于与磷脂作用以无定形形态存在。羟基喜树碱磷脂复合物为羟基喜树碱新型给药系统的研究开发打下了基础。

比较了薄膜-超声分散法、高速搅拌-超声法、高压乳匀法三种纳米粒制备方法,以制得的 HCPT-PC-LN 的粒径、PDI 值和稳定性为指标,初步确定采用高压乳匀法制备 HCPT-PC-LN。通过单因素试验对高压乳匀法进行了进一步考察,包括反应溶剂;药脂比例;反应时间;药物、大豆油比例;乳化条件等因素对 HCPT-PC-LN 性质的影响,筛选出了制备工艺。该优选的制备工艺简单,重复性佳,能够制得包封率高、稳定性好的纳米粒。

以 HCPT-PC-LN 冻干针剂的外观、再分散性、粒径等为指标,筛选了乳糖、甘露醇、山梨醇、葡萄糖、蔗糖、麦芽糖等多种冻干保护剂的用量和比例。冻干过程不影响 HCPT-PC-LN 的稳定性,HCPT-PC-LN 的粒径及分布、包封率等其它相关质量指标均未明显改变。

采用荧光分光光度法考察了 HCPT-PC-LN 冻干针剂的体外释药性质,其 48 小时的累积释药不足 40%,可见 HCPT 从脂质材料中溶出的速度非常缓慢,可以想到该制剂在体内将会有一定的缓释作用。将 HCPT-PC-LN 冻干针剂的体外释放结果用 Ritger-Peppas 方程进行拟合,得出药物以零级动力学释放,机制属于浓度扩散和骨架溶蚀。

选用小鼠为动物模型,以 HCPT 溶液剂为对照,研究了 HCPT-PC-LN 冻干针剂体内分布过程,探索了 HCPT-PC-LN 冻干针剂体内分布和代谢特征。研究结果表明,HCPT-PC-LN 冻干针剂与 HCPT 溶液剂在小鼠体内的分布行为有显著性差异。HCPT-PC-LN 冻干针剂在体内的消除减慢,有很好的缓释作用。HCPT-PC-LN 冻干针剂主要经过肝脏代谢,有一定的肝靶向性,而 HCPT 水针

剂主要由肝、肾代谢。

关键词：羟喜树碱；磷脂复合物；脂质纳米粒；组织分布；肝靶向性

Study on HCPT-PC-LN freeze drying ampule

Firstly, we prepared hydroxycamptothecin-phospholipid complex, and studied on its physico-chemical properties. Compared with hydroxycamptothecin and physical mixture, the solubility of hydroxycamptothecin from complex significantly increased in water. The complex was easy to form nanoparticles in aqueous phase. The peak position and peak shape was changed in the DSC spectra of hydroxycamptothecin -phospholipid complex. X-ray powder diffraction analysis showed that hydroxycamptothecin was dispersed in an amorphous form due to the effect of phospholipid. Hydroxycamptothecin-phospholipid complex laid the foundation for the study and exploitation of hydroxycamptothecin's neotype administration system.

In order to screen the most optimal preparing technology, several preparing method of nanoparticles have been tested including thin film- hypersound dispersion method, high speed stirring- hypersound method and high pressure emulsification method. The high pressure emulsification method is employed. The size, PDI and the stability are taken as criterion to evaluate the effects of five factors, such as different reaction solvents, the ratio of HCPT and PC, the ratio of HCPT and Soybean oil etc. on the properties of HCPT-PC-LN. Then optimal formulation and process is determined and repeated. The optimal formulation was simple, so it could improve the stability of HCPT-PC-LN, the entrapment ratio was high enough which implied HCPT-PC-LN could be in full use in this formulation.

HCPT-PC-LN freeze drying ampule's appearance, redispersibility, size etc. were used as criterion to screen the dosage and ratio of several freeze drying protective additives, such as lactose, manicol, glucose etc. The stability of HCPT-PC-LN was not affected by the formulation of HCPT-PC-LN freeze drying ampule with nearly unchanged particle size, entrapment ratio etc.

Fluorospectrophotometry was used to consideration the release of HCPT-PC-LN freeze drying ampule in vitro. And after 48 hours, the accumulate

release of HCPT was no more than 40%, we could conclude that the release rate was very slow in vitro. The results showed that the drug release curve was accord with Ritger-Peppas equation. The release process was zero-order kinetics and the mechanism was density diffusion and bulk erosion.

The tissue distribution of HCPT-PC-LN freeze drying ampule is studied in comparison with HCPT injection. The HCPT-PC-LN freeze drying ampule showed statistics differences with HCPT injection in tissue distribution. The eliminate rate of HCPT-PC-LN freeze drying ampule in vivo was step down , and it was mainly metabolized by liver. Whereas HCPT injection was mainly metabolized by liver and kidney.

Key words: HCPT; phospholipids complex; lipid nanoparticles;
tissue distribution; liver targeting

第一章 前言

1 羟基喜树碱的治疗特点及研究概况

羟基喜树碱 (10-Hydroxycamptothecin, HCPT) 是中国特有珙桐科旱莲属落叶植物喜树(*Camptotheca acuminata*) 中含有的一种生物碱。上世纪六十年代, Will ME 等首先从喜树(*Camptotheca accminata*)中分离出具有抗肿瘤活性的喜树碱 (*Camptothecin*, CPT)和 HCPT。70 年代初, CPT 作为抗癌药物以水溶性钠盐的形式进入临床研究, 因其严重的副作用 (消化道反应, 白细胞及血小板减少, 血尿) 而无法继续应用于临床。1980 年, Wall 在“喜树碱的结构和活性的关系”中, 肯定了 HCPT 是所有各种天然存在或合成的 CPT 类似物中活性最高的, 而毒性比 CPT 低。在我国, 20 世纪 70 年代, HCPT 由中国科学院药物所研制成功并投入临床应用。随后由于产量纯化工艺等因素, 曾一度中断使用, 20 世纪 80 年代湖北黄石飞云制药有限公司与中国科学院上海药物所共同协作, 通过改造工艺, 重新生产出供临床使用的 HCPT, 并于 1986 年获得了新的批准文号。临床上, 一般用量为每次 4~8mg, 用氯化钠注射液 20ml 溶解后静脉注射 qd 或 qod。1 个疗程的总剂量 60~120mg。对原发性肝癌、胃癌、头颈部腺源性上皮癌、慢性粒细胞白血病、直肠癌、膀胱癌等恶性肿瘤均有疗效。

羟基喜树碱类药物为细胞周期特异性药物, 主要作用于 DNA 合成期, 对 S 期的作用较 G₁, G₂ 期明显, 对 G₀ 期细胞无作用。在较高浓度时对核分裂有抑制作用, 阻止细胞进入分裂期。在影响疗效的浓度与时间因素中, 时间为主要因素, 属于时间依赖性药物。但 HCPT 在体内代谢很快, 半衰期 5~35min。喜树碱类药物的抗肿瘤活性是通过作用于拓扑异构酶 I (TOPO I), 抑制 DNA 的复制和转录而产生的。TOPO I 在 DNA 的复制、转录和重组中均起着重要作用, TOPO I 参与调节 DNA 的拓扑构象, 涉及 DNA 复制, DNA 修复以及 RNA 转录等机制。TOPO I 使超螺旋双链 DNA 解旋时分为两步, 一是先切开双链 DNA 中的一条, 使链的末端沿螺旋轴按拧松超螺旋的方向转动; 二是将切开的 DNA 单链再连接。喜树碱类 TOPO I 抑制剂主要影响再连接反应, 即抑制剂与 TOPO I 和切口的 DNA 结合, 形成药物-TOPO I-DNA 三元复合物, 使断裂的 DNA 堆积, 导致 DNA 磷酸二酯键断裂, 进而出现程序性细胞凋亡和死亡。由于癌细胞

中 TOPO I 含量比正常细胞高得多, 所以更易遭受 TOPO I 的抑制作用, 达到杀死癌细胞的目的。

HCPT 的抗肿瘤活性与其分子结构密切相关, HCPT 是为五环结构, 含有一个吡咯嗉啉环, 一个共轭吡啶环和一个六元 α -羟基内酯环(环 E), CPT 基本环 A 环中 10 位的 H 由 OH 取代即为 HCPT。结构式见图 1-1。

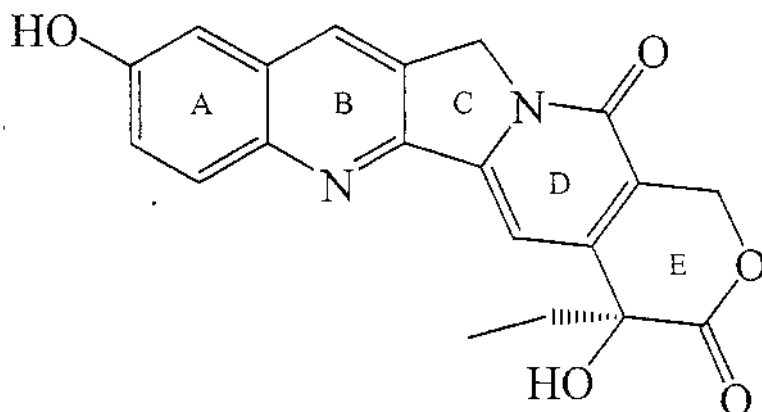


Figure1-1 The structure of HCPT

其结构中存在一个手性碳原子, 只有 20(S)构型有药理活性, 而 20(R)或 20(R,S)构型均无药理活性。闭合六元 α -羟基内酯环(环 E)是发挥抗癌活性的必须形式, 在与 TOPO I 作用的过程中, HCPT 内酯环打开, 酰基与 TOPO I 的亲核部分相互作用, 并进一步形成 HCPT-TOPO I-DNA 三元复合物。故 α -羟基内酯环的完整性是保证喜树碱类药物为拓扑异构酶 I 抑制剂的必须结构, 内酯环打开则活性大大降低或无活性。研究表明, 喜树碱类药物的存在形式依赖于体系的酸碱性, pH < 5.0 时, 喜树碱类药物几乎全部以内酯形式存在; pH > 7.5 时, 以开环羧酸盐形式存在为主。在生理条件下(pH7 或以上), 内酯环迅速水解成开环的羧基形式, 平衡后 80%以上的药物以羧基的形式存在。在 pH7.4 的人血浆中, 内酯环迅速打开成非活性的羧基形式, 半衰期仅 11 min, 平衡时内酯仅占 0.2%。人血浆白蛋白(HAS)倾向于结合开环 HCPT, HAS 同开环喜树碱的结合力是其内酯形式的 150 倍。因此, 保持 HCPT 的内酯环结构, 延长体内半衰期, 有利于增加抗肿瘤活性。

羟基喜树碱存在很多不良及应, 如: (1)胃肠道反应: 主要表现在恶心、呕吐、食欲减退等反应, 但不严重, 一般都能坚持治疗, 停药后上述症状很快减

轻并消失。(2)对造血系统的影响:骨髓抑制轻,白细胞有部分下降,但能维持在 $1 \times 10^9 L^{-1}$ 以上;对红细胞、血小板未发现明显抑制作用。(3)对泌尿系统的影响:较喜树碱少见,有少数病例出现尿急、尿痛及血尿,停药1周后逐渐消失。(4)其它反应:有少数病例出现脱发,停药后可自行恢复生长。偶尔引起心电图轻微改变。毒副作用与药物剂量、疗程、年龄、给药方式有关,剂量大,疗程长,年龄越小,副作用越大。缓慢滴注有利于降低副反应的发生。提示将 HCPT 以内酯形式制成脂质体、乳剂、固体脂质纳米粒等缓释微粒体系,有利于降低副反应。

2 羟基喜树碱的剂型研究现状

羟基喜树碱不溶于水,临床上通过碱化开环制成钠盐水针剂,虽增加了水溶性,但是丧失了六元 α -羟基内酯环(环 E)的完整性,成为非生理活性的羧基形式。开环喜树碱不能被癌细胞吸收,不是细胞内作用靶 TOPO I 的抑制剂,其在体内的抗肿瘤活性是通过在血浆中转化成闭环喜树碱达到的。也有观点认为,HCPT 的内酯形式与羧基形式在体外对同一种肿瘤细胞显示出类似的细胞毒性,而体内闭环 HCPT 的抑瘤率明显高于(约两倍)开环 HCPT,是因为闭环 HCPT 的亲脂性较强,容易进入细胞内,而开环 HCPT 极性大,水溶性大,在体内被快速代谢和清除。

目前,HCPT 的制剂主要是钠盐注射液,除了前面提出的丧失了六元 α -羟基内酯环(环 E)的完整性,由于其分子结构中具有酚羟基,HCPT 露置于空气中或遇光、热不稳定,易氧化和水解,含量下降。钠盐粉针解决了钠盐注射液的贮存稳定性,但仍存在内酯开环疗效降低且半衰期短的问题;胶囊剂口服给药,适合于治疗胃肠道肿瘤,不过加大了给药剂量,增加了毒副作用。为解决喜树碱类药物不溶于水的难题,药学研究者尝试了如下方法:(1)结构修饰,引入一些碱性基团合成一些水溶性喜树碱。在美国,两种 HCPT 衍生物已被批准用于实体瘤治疗:伊洛替康 (irinotecan, CPT-11),水溶性前体药物,起作用的主要是体内代谢物 7-乙基-10-羟基喜树碱(SN-38),用于其他抗癌药物无效的转移的结肠、直肠癌;拓扑特肯 ((S)-9-二甲胺甲撑基-10-羟基喜树碱盐酸盐, topotecan, TPT),半合成水溶性喜树碱衍生物,用于小细胞肺癌、紫杉醇无效的卵巢癌、

消化道肿瘤等。9-氨基喜树碱(9-animocamptothecin, 9-AC)、9-硝基喜树碱(9-nitrocamptothecin, 9-NC, 在体内转化成 9-AC)为水不溶性衍生物, 抗癌活性比母体化合物高, 目前处于 III 期临床阶段。另外处于早期临床阶段的 HCPT 衍生物还有 GI147211(一种水溶性的全合成喜树碱衍生物)和 DX-8951f(一种非前药的喜树碱衍生物)。(2)改进剂型, 已有 HCPT 微球制剂、固体脂质纳米粒、脂质体和纳米乳剂等的报道。

随着新的药物传递系统的不断发展, 通过一些特殊的传递方法与策略, 可以部分解决药物存在的一些问题, 诸如溶解度差, 稳定性不好, 毒性和不良反应大等。载体输送系统亚微粒(如微乳、微球、脂质体)的研究已成为药物新剂型研究中非常活跃的领域。脂质体、微乳、亚微乳, 聚合物纳米粒等一系列药物载体被发展起来, 并在选择性吸收和靶向给药等方面取得了显著的成就。以上几种给药系统已经应用于喜树碱类药物, 然而, 都存在一些不足之处, 由于 10-羟基喜树碱的脂溶性也很差, 一般的脂质体对其载药量很低; 含药微乳, 亚微乳则由于其物理稳定性, 油相对药物的溶解度等问题限制了其进一步发展, 如 10-羟基喜树碱脂肪乳剂的处方(中国新药杂志 2005, 14(6): 720—723): 8mg HCPT, 12g 注射级大豆油, Pluronic F68 5g, 甘油 2.5g 及卵磷脂 4.5g, 大量的辅料造成制备成本的上升, 还可能带来一些副作用; 聚合物纳米粒在制备过程中可能带来有潜在毒性的物质, 如有机溶剂、残留单体、聚合反应引发剂等, 所用的生物降解性高分子材料在细胞吞噬降解后也常产生细胞毒性。

综上所述, 可以看出目前还没有可用于临床的, 保持喜树碱内酯环活性结构, 载药量高的药物制剂。

3 选题思想

磷脂复合物(phytosome 或 phospholipid complex)系指在非质子传递体系溶剂中, 药物与磷脂以一定配比关系结合而形成的复合物。意大利学者 Bombardelli 等首先研究发现, 某些天然活性成分与磷脂结合形成的复合物表现出与原化合物显著不同的理化性质和生物特性, 具有较强的亲脂性, 可有效地提高天然活性成分的体内吸收, 显著地改善其生物有效性。

由于羟基喜树碱水不溶、脂难溶, 将其制备成任何剂型, 都需要耗费大量

的辅料, 用去大量的溶剂, 费时费力, 而最终得到的制剂载药量也不高。本课题考虑先制备羟基喜树碱磷脂复合物, 改变羟基喜树碱的理化性质, 使其溶解度增加, 增大其在水中的再分散性; 同时磷脂与羟基喜树碱结合, 磷脂能够保护HCPT六元 α -羟基内酯环(环E)的完整性; 再者, 磷脂复合物中, 磷脂与天然活性成分的摩尔比一般为0.3:1~2:1, 也就是说, 反应所需的磷脂用量很少, 载药量大大提高。总之, 羟基喜树碱磷脂复合物的制备将为羟基喜树碱新型给药系统的研究开发打下基础。

20 世纪 80 年代, Burke 等研究发现, 磷脂能通过磷脂双分子层屏蔽喜树碱类药物不稳定的五元内酯环, 明显提高喜树碱类药物在溶液中的稳定性。此外, 磷脂与喜树碱类药物形成的复合物可直接在水中形成胶态分散体(参见中国专利 95195659.0, M.彻里安)。但是, 单纯的喜树碱衍生物磷脂复合物在水中的分散效果并不是十分理想, 需要很大比例的磷脂, 喜树碱与磷脂的重量比高达 1: 80~93。

所以本课题设计在羟基喜树碱磷脂复合物形成后, 加适量脂质材料, 使其在水中能够分散形成均匀的纳米粒。

纳米粒(Lipid nanoparticles, LN)系指粒径在 1~1000nm 的粒子, 它们具有特殊的医疗价值。当药物到达血液系统时, 经典的药物剂型(如片剂、软膏、注射剂)不能调整药物在体内的行为(分布和消除), 药物是根据其化学结构决定其物理性质和化学性质, 从而影响其生物特性(组织和血浆蛋白亲和性, 膜受体亲和力, 对酶生物转化的敏感性)。而药物与纳米粒载体结合后, 可隐藏药物的理化性质, 因此其体内过程依赖于载体的理化性质。

纳米制剂具有良好的靶向性和缓释作用, 这样可以减少给药剂量和次数, 从而解决了现有水针剂半衰期短、毒副作用大等问题。

4 羟基喜树碱理化性质的试验资料及文献资料

羟基喜树碱是喜树碱的 10-位羟基衍生物, 在理化性质方面与喜树碱基本相同。其基本物理性质见表 1-1。

Table 1-1 The physical characters of HCPT

性状	分子式	分子量	熔点	构型
黄色柱状结晶	$C_{20}H_{16}N_2O_5$	364	266~267(分解)	S

其不同于普通的生物碱，与一般生物碱试剂无反应，如常用的检测试剂：得拉盖道夫(用碘化铋钾试验生物碱形成特性及加成化合物的结晶)和苯酚(三氯化铁)试剂，呈阴性；吲哚分析，负反应；与各种酸不形成结晶盐；也不能用重氮甲烷或二甲基硫酸酯进行甲基化；其内酯环可被氢氧化钠在室温下打开生成盐，酸化后又重新生成喜树碱。

喜树碱没有明显的碱性，属于中性的生物碱，不溶于酸，与酸不易成盐，所以不能用提取生物碱常规方法分离。连续的共轭 π 键使喜树碱在紫外光下呈现强烈的蓝色荧光。喜树碱不溶于水，除氯仿、甲醇、丙酮、二甲基亚砷等少数溶剂外，不溶于一般的有机溶剂，是水不溶、脂难溶性药物。

HCPT在正辛醇/水、正辛醇/PBS (pH 5.0)中的表观分配系数见表1-2。

Tabl-2 The apparent partition coefficients of HCPT in octanol/distilled water and PBS (pH5.0)

	$C_T(\text{ug/ml})$	$C_O(\text{ug/ml})$	$C_W(\text{ug/ml})$	P	$\text{Lg}P_{\text{OCT}}$
octanol/distilled water	104.25	99.84	4.41	22.63	1.35
octanol/PBS(pH5.0)	104.25	102.38	1.87	54.75	1.74

第二章 羟基喜树碱磷脂复合物的制备及理化性质研究

药物磷脂复合物是药物通过与磷脂复合而形成的药物载体系统,理化性质和生物特性较原化合物均有不同程度的改变,表现出类似磷脂的性质。当用水处理药物磷脂复合物时,多个磷脂复合物分子有序排列,呈现胶团形状,形成类似但不同于脂质体的球状体。文献报道,磷脂复合物具有改善药物的理化性质,提高生物利用度等特点。本章制备了羟基喜树碱磷脂复合物,并较系统地研究其理化性质,为羟基喜树碱新型给药系统的研究开发打下基础。

1 仪器与试药

1.1 仪器

Waters2690-996 高效液相色谱仪(美国 Waters 公司);
NETZSCH 200PC 差示量热扫描分析仪(DSC);
X 射线衍射仪(菲利普 X'pert POR MPO);
BP 211D 电子天平(Sartorius 公司);
Zetasizer Nano ZS90 激光粒度分析仪(英国 Malvern 公司)
85-2 型恒温磁力搅拌器(巩义市英峪予华仪器厂);
JY92-II 超声波细胞粉碎机(宁波新芝科器研究所);
R-201 旋转蒸发器(上海申生科技有限公司);
QZX-C 空气浴振荡器(哈尔滨市东明医疗仪器厂);
PHS-25 型 pH 计(上海精科雷磁);
TGL-16C 台式高速离心机(湖南星科);
SK-3300H 超声波清洗器(上海科导超声仪器公司)

1.2 试药

羟基喜树碱对照品(中国药品生物制品检定所);
羟基喜树碱(四川广瀚生物技术有限公司,含量 98.29%,批号 060208);
大豆卵磷脂(上海太伟药业有限公司);
大豆油(铁岭北亚药用油有限公司)

2 实验内容与结果

2.1 HCPT 含量测定方法的建立

2.1.1 破膜溶剂的选择

羟基喜树碱磷脂复合物脂质纳米粒 (HCPT-PC-LN) 中, 药物嵌入脂质材料中, 为准确完全测定 HCPT-PC-LN 中药物的浓度, 必须选择合适的破膜溶剂破坏脂质材料, 溶解脂质中的所有药物。

实验筛选了乙醇、丙酮、甲醇、乙腈等有机溶剂, 实验结果表明每 100ul 制剂(含 HCPT 200ug)加入 3ml 甲醇超声能够得到完全澄清透明的溶液, 即以此法作为 HCPT-PC-LN 中 HCPT 测定的破膜方法。

2.1.2 色谱条件

色谱柱: Kromasil ODS-1 150×4.6mm;

流动相: 0.1M 醋酸铵 (冰醋酸调节 pH6.0) - 甲醇 (50: 50);

流速: 1.0ml·min⁻¹;

柱温: 30℃;

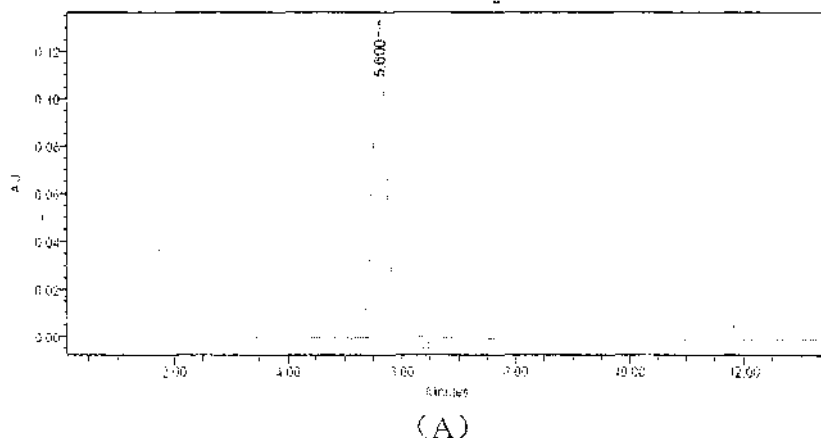
检测波长: 382nm

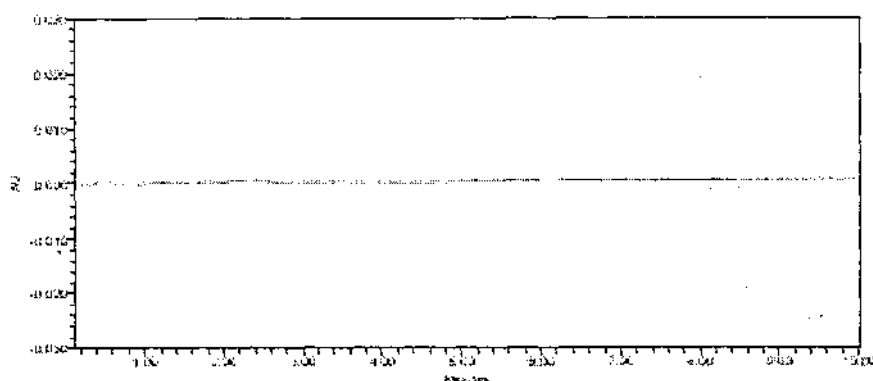
2.1.3 色谱条件专属性试验

HCPT-PC-LN 样品溶液: 取 HCPT-PC-LN 溶液 0.1ml 置 10ml 容量瓶中, 加甲醇溶解至刻度, 摇匀即得;

空白对照溶液: 取空白纳米粒溶液 0.1ml 置 10ml 容量瓶中, 加甲醇溶解至刻度, 摇匀即得;

结果: 空白辅料对 HCPT-PC-LN 中 HCPT 测定无干扰。见图 2-1。





(B)

Figure 2-1 HPLC chromatograph of HCPT-PC-LN(A) and blank adjuvant(B)

2.1.4 线性与范围

精密称取 HCPT 对照品 1.50mg 置 25ml 容量瓶中,加甲醇超声溶解,放冷,定容至刻度,作为储备液。精密吸取储备液适量以甲醇为溶剂分别稀释成浓度为 $0.1\text{ug} \cdot \text{ml}^{-1}$ 、 $0.5\text{ug} \cdot \text{ml}^{-1}$ 、 $1.0\text{ug} \cdot \text{ml}^{-1}$ 、 $2.0\text{ug} \cdot \text{ml}^{-1}$ 、 $5.0\text{ug} \cdot \text{ml}^{-1}$ 和 $9.0\text{ug} \cdot \text{ml}^{-1}$ 的浓度系列。取上述标准溶液各 20ul 注入色谱仪,在上述色谱条件下进样分析,记录 HCPT 的峰面积。结果见表 2-1。

Table 2-1 Result of determination of HCPT standard curve

$C(\text{ug} \cdot \text{ml}^{-1})$	0.1	0.5	1.0	2.0	5.0	9.0
Peak area	8923	41828	93223	180320	445178	805764

以峰面积 (A) 对浓度 (C) 进行线性回归,得标准曲线方程为:
 $A=89426C+224.42$, $R=0.9999$ 。线性范围: $0.1\text{ug} \cdot \text{ml}^{-1} \sim 9.0\text{ug} \cdot \text{ml}^{-1}$ 。

