

文章编号: 1006-2858(2010)10-0821-04

HPLC法测定人参皂苷 Re 蛋清蛋白 纳米混悬剂中的药物含量

张雅昕, 王 龙, 刘克非, 王 范, 徐 晖, 邓意辉
(沈阳药科大学 药学院, 辽宁 沈阳 110016)

摘要: 目的 建立人参皂苷 Re 蛋清蛋白纳米混悬剂中药物含量的测定方法。方法 采用 Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-体积分数为 0.05% 磷酸水溶液 (体积比 25:75), 流速 1.0 mL·min⁻¹, 紫外检测波长 203 nm, 柱温 25 ℃。结果 在本实验条件下, 制剂中辅料对药物含量的测定无干扰, 人参皂苷 Re 质量浓度在 44.40~177.6 mg·L⁻¹ 内线性关系良好 ($r = 0.9999$, $n = 5$), 药物平均加样回收率为 100.1%, RSD 为 0.84% ($n = 9$)。结论 此方法准确可靠、简便易行、重现性好, 可用于人参皂苷 Re 蛋清蛋白纳米混悬剂中药物含量的测定。
关键词: 人参皂苷 Re 蛋清蛋白纳米混悬剂; 高效液相色谱法; 含量测定
中图分类号: R 917; R 927.2 **文献标志码:** A

人参皂苷 Re (ginsenoside Re, 化学结构式见图 1) 属人参皂苷三醇型 (B 型), 外观为无色针状结晶, 显酸性, 难溶于水, 易溶于甲醇、乙醇、丙二醇。文献报道, 人参皂苷 Re 可明显降低肿瘤细胞膜流动性, 有一定抗肿瘤作用; 可抑制细胞膜上不饱和脂肪酸的过氧化反应, 有显著的抗衰老功能^[1]。另外, 人参皂苷 Re 可通过调节中枢胆碱能系统及改善异常血液流变状态, 对化学药物导致的记忆损伤具有很好的修复作用^[2]; 并且能够改善休克的血流动力学障碍和微循环障碍, 维持内环境的稳定和组织的正常状态及功能^[3]。

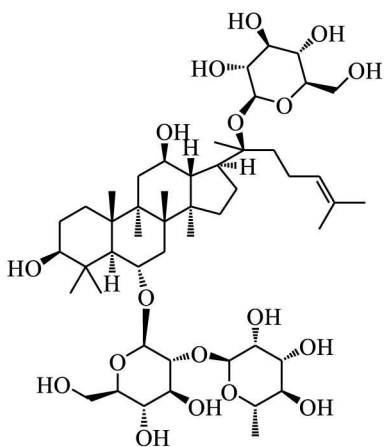


Fig 1 Structure of ginsenoside Re

一般而言, 难溶性药物受体内溶出速度的影响, 经口给药吸收较差, 生物利用度低, 个体差异大, 将其制成纳米混悬剂, 可以增加药物粒子的表面积, 并能减小扩散层的厚度^[4], 使药物溶出速度增加, 从而提高经口给药的生物利用度。在纳米混悬剂中, 常采用加入表面活性剂或高分子聚合物作为稳定剂来抑制药物粒子间的聚集沉积^[5-6]。作者根据人参皂苷 Re 的特性, 成功地用探头超声法制备了人参皂苷 Re 蛋清蛋白纳米混悬剂^[7-8]。蛋清蛋白不仅方便易得、成本低, 而且蛋清本身是一种天然的营养物质、无毒, 并且对于大多数人群而言, 蛋清不存在免疫原性, 是一理想的药物传递系统载体。目前尚未见关于用蛋清蛋白作为稳定剂的报道。为了对制剂进行有效的质量控制, 作者建立了 HPLC 法测定制剂中人参皂苷 Re 的含量。

1 仪器与材料

高效液相色谱仪: P230 高压恒流泵、DAD230 二极管阵列检测器、DAD2000 色谱数据处理工作站 (大连依利特科学仪器有限公司), Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm, 美国迪马公司), KQ5200B 超声波清洗器 (江苏昆山超声仪器有限公司)。

收稿日期: 2010-01-14
基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 资助项目 (2009CB930300)
作者简介: 张雅昕 (1986-), 女 (汉族), 辽宁葫芦岛人, 硕士研究生, E-mail: luckyxixi@163.com; 邓意辉 (1964-), 男 (汉族), 湖南花垣人, 教授, 博士, 主要从事药物靶向新剂型的研究, Tel: 024-23986316, E-mail: dds66@163.com。

人参皂苷 Re 对照品 (中国药品生物制品检定所, 批号 110754-200822), 人参皂苷 Re 原料药 (大连医海生物科技有限公司), 乙醇、甲醇、乙腈 (色谱纯, 江苏汉邦科技公司), 无水乙醇 (药用级, 安徽安特生物化学有限公司), 水 (重蒸水, 自制), 人参皂苷 Re 蛋清蛋白纳米混悬剂 (规格为 $2.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 批号 20091117、20091124、20091202 自制)。

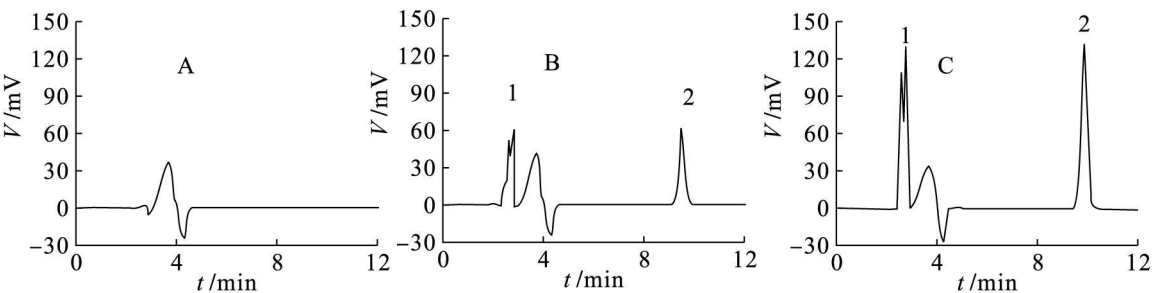
2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱: Diamonsil C₁₈ 色谱柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-体积分数为 0.05% 磷酸水溶液 (体积比 25: 75); 柱温: 25 ℃; 流速: $1.0\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$; 紫外检测波长: 203 nm; 进样量: 20 μL。

2.2 溶液的制备

取人参皂苷 Re 对照品 5.0 mg 精密称定。



A—Ethanol; B— $355.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ginsenoside Re; C— $888.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ginsenoside Re; 1—Unknown; 2—Ginsenoside Re

Fig 2 HPLC chromatograms of ethanol and ginsenoside Re in 99.7% ethanol

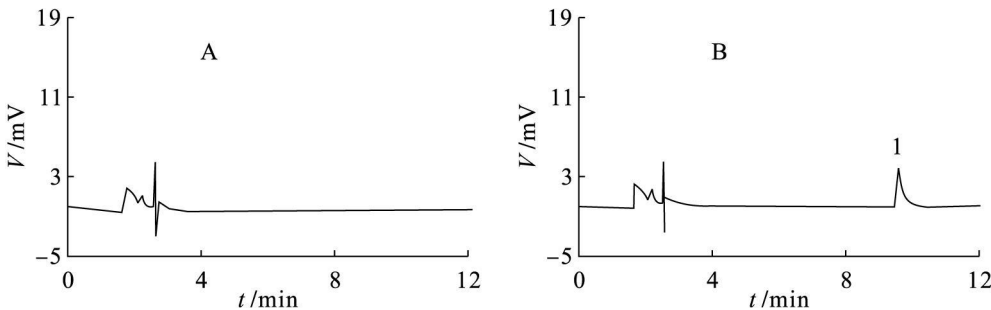
收集峰 1 的流出液进行 HPLC 分析, 发现流出液主峰的保留时间 (图 3 中峰 1) 和人参皂苷 Re 的保留时间相同 (图 2 中峰 2), 且在峰 1 的位置没有其他峰出现。由紫外光谱图 (图 4) 可见, 图 2 中峰 1 和峰 2 的紫外吸收特征一致, 证明溶剂峰前端的物质即为人参皂苷 Re。作者采用体

积分数为 20% 的乙醇溶液溶解药物, 并用流动相稀释进行 HPLC 分析, 经过验证, 体积分数为 20% 的乙醇溶液对药物出峰情况没有影响, 并且能够保证药物完全溶解。目前作者尚未见关于该现象的报道, 具体机理有待进一步论证。

精密量取人参皂苷 Re 蛋清蛋白纳米混悬剂 1.0 mL, 置 10 mL 量瓶中, 加入乙醇-乙腈 (体积比 2: 1) 6.0 mL 沉淀蛋白。于 200 W、40 kHz 下超声提取 5 min, 用乙醇-乙腈 (体积比 2: 1) 稀释至刻度, 混匀后将内容物全部转移至离心管中, $10\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 10 min, 通过 0.22 μm 微孔滤膜除去蛋白沉淀。精密移取续滤液 4.0 mL, 置 10 mL 量瓶中, 流动相稀释至刻度, 混匀, 得供试溶液。

实验中作者发现, 若采用无水乙醇配制药液进行 HPLC 分析, 在溶剂峰前端会出现一个峰 (图 2 中峰 1), 并且峰面积随药物质量浓度的增加而增大。

积分数为 20% 的乙醇溶液溶解药物, 并用流动相稀释进行 HPLC 分析, 经过验证, 体积分数为 20% 的乙醇溶液对药物出峰情况没有影响, 并且能够保证药物完全溶解。目前作者尚未见关于该现象的报道, 具体机理有待进一步论证。



A—Ethanol; B—Peak 1 in Fig 2; 1—Ginsenoside Re

Fig 3 HPLC chromatograms of effluent

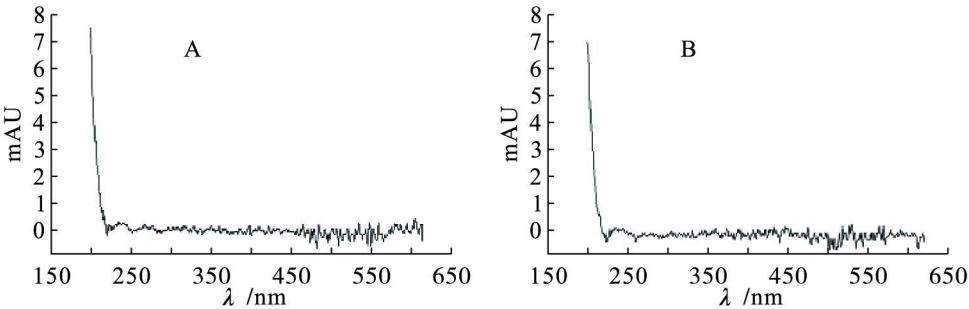


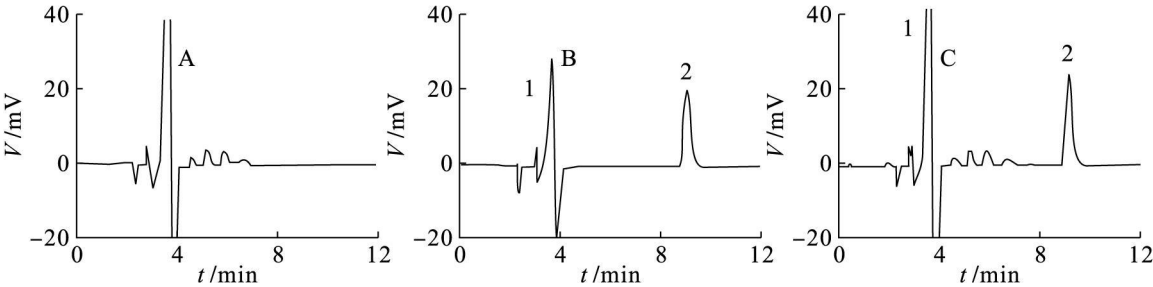
Fig 4 UV absorption spectrum s of peak 2(A) and peak 1(B)

2. 3 色谱系统适用性及专属性试验

在“2. 1”条色谱条件下, 理论塔板数按人参皂苷 Re 计不低于 5 000 人参皂苷 Re 色谱峰与相邻色谱峰分离度大于 1. 5 拖尾因子 0. 95 ~ 1. 05

取自制的空白纳米混悬剂 (除不加入主药

外, 制备工艺与供试品相同) 和人参皂苷 Re 纳米混悬剂, 按“2. 2”条方法处理样品, 分别进样 20 μL。另配制 Re 对照溶液, 流动相稀释, 进样 20 μL, 色谱图见图 5。空白辅料对主药的含量测定无干扰。



A— Blank nanosuspension B— Standard C— Sample 2—G insenoside Re

Fig 5 HPLC chromatograms of nanosuspension and ginsenoside Re standard

2. 4 线性关系考察

分别精密量取对照储备液 1. 0 1. 6 2. 0 3. 0 4. 0 mL, 置 10 mL 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 混匀, 制得质量浓度分别为 44. 40 71. 00 88. 80 133. 2 177. 6 mg L⁻¹ 的对照溶液。分别进样 20 μL, 记录峰面积。以峰面积 (A) 对质量浓度 (ρ, mg L⁻¹) 绘制标准曲线, 计算线性方程为 A = 4. 267 ρ - 1. 970, r = 0. 999 9。结果表明人参皂苷 Re 质量浓度在 44. 40 ~ 177. 6 mg L⁻¹ 内与峰面积呈良好的线性关系。

2. 5 稳定性试验

取“2. 4”条中质量浓度为 88. 80 mg L⁻¹ 的人参皂苷 Re 溶液, 于 4℃ 冰箱放置, 并在 0 2 4 8 12 24 h 分别取样 20 μL 经 HPLC 分析, 计算得各时间点峰面积 (A) 的平均值为 0 h 时测定值的 100. 1%、100. 3%、99. 9%、100. 2%、100. 2%。表明该溶液在 4℃ 下 24 h 内稳定。

2. 6 精密度试验

精密量取人参皂苷 Re 蛋清蛋白纳米混悬剂 (批号 20091117) 供试品 5 份, 按“2. 2”条方法制

成供试溶液。分别取样 20 μL 进行 HPLC 分析, 记录峰面积, 计算得人参皂苷 Re 含量的 RSD 值为 1. 2%。表明仪器的精密度良好。

2. 7 重复性试验

取“2. 4”条中质量浓度为 44. 40 88. 80 177. 6 mg L⁻¹ (低、中、高) 的人参皂苷 Re 对照溶液, 连续进样 6 次, 记录峰面积, 计算得 RSD 分别为 0. 5%、0. 6%、0. 6%。表明方法的重复性良好。

2. 8 定量限的确定

将人参皂苷 Re 对照溶液稀释不同的倍数, 进行 HPLC 分析, 测得定量限 (S/N = 10) 为 200 ng

2. 9 回收率试验

精密量取 1. 0 mL 的空白纳米混悬剂 9 份, 分别置于 10 mL 量瓶中, 精密加入质量浓度为 2. 5 g · L⁻¹ 对照溶液 0. 8 1. 0 1. 2 mL 各 3 份, 充分混匀, 按“2. 2”条方法除去蛋白。分别精密量取续滤液 4. 0 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 用流动相稀释至刻度, 混匀。分别进样 20 μL, 记录峰面积, 计

算回收率, 结果见表 1。表明该方法的回收率符合要求。

Table 1 The results of recoveries of ginsenoside Re (n = 9)

<i>m</i> _{added} /mg	<i>m</i> _{found} /mg	Recovery /%	Average recovery /%	RSD /%
2.0	2.024	101.2	100.1	0.8
2.0	1.994	99.7		
2.0	2.012	100.6		
2.5	2.508	100.3		
2.5	2.485	99.4		
2.5	2.493	99.7		
3.0	2.997	99.9		
3.0	3.021	100.7		
3.0	2.988	99.6		

2.10 供试品含量测定

取 3 批自制的人参皂苷 Re 蛋清蛋白纳米混悬剂, 按“2.2”条方法制备供试溶液, 分别进样 20 μL。另取质量浓度为 0.1 g L⁻¹ 的对照溶液, 同法测定。用峰面积按外标法计算含量, 测得 3 批供试品的标示质量分数含量分别为: 99.8% (批号 20091117)、99.4% (批号 20091124)、100.9% (批号 20091202), RSD 值为 1.1%。

3 讨论与结论

a. 蛋白沉淀剂的选择: 文献通常采用乙腈沉淀蛋白, 产生的沉淀疏松且容易过滤除去^[9-10]。但作者发现人参皂苷 Re 在乙腈中几乎不溶, 如果以乙腈作为蛋白沉淀剂, 则不能充分提取药物。实验中发现, 在用对药物具有良好溶解性的甲醇或乙醇沉淀蛋白时, 这 2 种溶剂虽然能将药物充分提取, 但所得的沉淀较少且悬浮于溶剂中, 不易除去。故作者考察了不同比例的甲醇-乙腈、乙醇-乙腈作为蛋白沉淀剂的情况, 发现当采用乙醇-乙腈体积比 2:1 为混合溶媒时, 产生的沉淀疏松、易除去, 可将药物充分提取, 而且操作方便, 重现性好, 故最终选择乙醇-乙腈 (体积比 2:1) 沉淀蛋白。采用混合溶媒作为蛋白沉淀剂, 一方面, 使制剂中的蛋白被沉淀分离, 容易除去; 另一方面, 保证药物溶解于有机溶剂中, 可将其充分提取。

b. 作者所建立的蛋清蛋白纳米混悬剂中人参皂苷 Re 的含量测定方法, 重现性好, 精密度高, 测定结果准确可靠, 可作为该制剂的质量控制方法。

参考文献:

[1] 彭纓. 人参皂苷 Re 及其固体分散物药物动力学研

究[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2001: 5-7.

[2] 姜红柳, 杨振, 孟勤, 等. 人参皂苷 Re 对小鼠学习记忆障碍的作用[J]. 中国药理学通报, 2008, 24(10): 1399-1400.

[3] 吕爽. 人参皂苷 Re 的抗休克作用[D]. 沈阳: 沈阳药科大学, 2006: 44-50.

[4] KATTEBONAA S, CHANDRASEKHAR V S R, BALAJI S D. Drug nanocrystals: a novel formulation approach for poorly soluble drugs[J]. International Journal of Pharm Tech Research, 2009, 1(3): 682-694.

[5] EERDENBRUGH B V, MOOTER G V, AUGUSTIJNS P. Top-down production of drug nanocrystals: Nanosuspension stabilization, miniaturization and transformation into solid products[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2008, 364: 64-75.

[6] LEE J, CHO I J Y, PARK C H. Characteristics of polymers enabling nanocomminution of water-insoluble drugs[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2008, 355: 328-336.

[7] 张辉, 霍美容, 周建平. 伊曲康唑白蛋白纳米混悬剂的制备和表征[J]. 中国药科大学学报, 2008, 39(6): 510-514.

[8] JUNGHANN S J U A H, MÜLLER R H. Nanocrystal technology: drug delivery and clinical applications[J]. International Journal of Nanomedicine, 2008, 3(3): 295-309.

[9] 王宁, 邓意辉, 王绍宁, 等. 高效液相色谱法测定葫芦素 B 人血清白蛋白纳米粒中药物含量[J]. 中国新药杂志, 2007, 16(23): 1968-1970.

[10] 刘欣荣, 王龙, 卢懿, 等. HPLC 法测定羟基喜树碱人血清白蛋白纳米粒中的药物含量[J]. 沈阳药科大学学报, 2009, 26(1): 48-51.

(下转至第 839 页)

tiline and bismuth respectively in plasma, and study the pharmacokinetics and relative bioequivalence following oral administration of compound ranitidine tablets and compound ranitidine capsules in healthy volunteers. **Methods** Twenty healthy volunteers took compound ranitidine tablets and compound ranitidine capsules respectively. The concentration of ranitidine in plasma was determined by HPLC, and the concentration of bismuth in plasma was determined by ICP-MS, then the concentration-time curves were plotted and the main pharmacokinetic parameters were calculated respectively. **Results** The main pharmacokinetic parameters of test and reference preparation respectively in plasma were ranitidine $t_{max} = (1.9 \pm 0.5)$ and (2.1 ± 0.6) h, $C_{max} = (492.8 \pm 276.7)$ and $(466.5 \pm 224.4) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $t_{1/2} = (2.9 \pm 1.6)$ and (2.8 ± 1.0) h, $AUC_{0-t} = (2548.3 \pm 895.6)$ and $(2377.5 \pm 887.0) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$, $AUC_{0-\infty} = (2562.9 \pm 912.8)$ and $(2377.5 \pm 887.0) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$. The relative bioavailability of tropisetron for test drug was $(111.6 \pm 35.4)\%$ of ranitidine, bismuth $t_{max} = (0.4 \pm 0.2)$ and (0.3 ± 0.1) h, $C_{max} = (56.0 \pm 40.2)$ and $(53.3 \pm 37.9) \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $t_{1/2} = (6.9 \pm 2.6)$ and (7.2 ± 2.3) h, $AUC_{0-t} = (151.8 \pm 118.9)$ and $(156.3 \pm 117.9) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$, $AUC_{0-\infty} = (153.1 \pm 120.2)$ and $(157.7 \pm 119.3) \mu\text{g} \cdot \text{h} \cdot \text{L}^{-1}$. The relative bioavailability of bismuth was $(95.3 \pm 16.2)\%$. **Conclusions** The two kinds of compound ranitidine formulations are bioequivalent in healthy volunteers.

Key words ranitidine bismuth pharmacokinetics bioequivalence

(上接第 824页)

Determination of the content of ginsenoside Re in egg albumen nanosuspensions by HPLC

ZHANG Yaxin, WANG Long, LIU Ke-fei, WANG Fan, XU Hui, DENG Yihui
(School of Pharmacy, Shenyang Pharmaceutical University, Shenyang 110016 China)

Abstract Objective To establish an HPLC method for the content determination of ginsenoside Re in egg albumen nanosuspensions. **Methods** The separation was performed with a Diamonsil C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) at 25 °C, and the mobile phase was acetonitrile-0.05% phosphoric acid (V:V = 25:75), the flow rate was 1.0 mL · min⁻¹ and detection wavelength was set at 203 nm. **Results** The linear range of ginsenoside Re was 44.40-177.6 mg · L⁻¹ (r = 0.999 9, n = 5). The average recovery of ginsenoside Re was 100.1%, and RSD was 0.84% (n = 9). **Conclusions** The method is simple, accurate and reproducible, and it can be used for determination of ginsenoside Re in egg albumen nanosuspensions.

Key words ginsenoside Re egg albumen nanosuspension HPLC content determination