

# SPE-HPLC法测定兔血浆中三七皂苷 R<sub>1</sub> 和人参皂苷 R<sub>g</sub>、R<sub>e</sub>的含量

杨建婷<sup>1,2</sup>, 李 霞<sup>3</sup>, 臧伟进<sup>1\*</sup>, 于晓江<sup>1</sup>

(1 西安交通大学, 陕西 西安 710061; 2 兵器工业 521医院, 陕西 西安 710065; 3 陕西省食品药品检验所, 陕西 西安 710061)

关键词: 三七; 固相萃取; 高效液相色谱

摘要: 目的: 建立三七皂苷 R<sub>1</sub>、人参皂苷 R<sub>g</sub>、R<sub>e</sub>在兔含药血浆中的固相萃取-高效液相色谱 (SPE-HPLC) 分析方法, 测定兔灌服三七提取液后, 含药血浆中 R<sub>1</sub>、R<sub>g</sub> 和 R<sub>e</sub> 的含量。方法: 固相萃取技术萃取血浆样品, 2.0 mL 70% 甲醇水进行洗脱, 高效液相色谱-二极管阵列检测法测定含药血浆中的 R<sub>1</sub>、R<sub>g</sub> 和 R<sub>e</sub>。结果: R<sub>1</sub>、R<sub>g</sub> 和 R<sub>e</sub> 的检测限分别 2.8、1.5 和 3.6 ng/mL, 线性范围分别为 0.028~2.8 μg、0.03~3.0 μg 和 0.036~3.6 μg。结论: 该方法可用于兔体内 R<sub>1</sub>、R<sub>g</sub> 和 R<sub>e</sub> 的药代动力学和组织分布研究。

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-1528(2008)11-1665-02

三七为五加科人参属植物 *Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen 的干燥根, 是中医临床常用的中药之一, 三七皂苷 R<sub>1</sub>、人参皂苷 R<sub>g</sub> 和 R<sub>e</sub> 为其主要药效成分, 临床主要用于治疗吐血、咳血、衄血、尿血、便血、崩漏等各种血症<sup>[1]</sup>。已有文献<sup>[2-4]</sup>报道三七药材及其复方制剂中三七皂苷 R<sub>1</sub>、人参皂苷 R<sub>g</sub> 和 R<sub>e</sub> 的含量测定方法。本试验建立兔灌服三七提取液后, 含药血浆中三七皂苷 R<sub>1</sub>、人参皂苷 R<sub>g</sub> 和 R<sub>e</sub> 的固相萃取-高效液相色谱分析方法, 旨在为三七的药代动力学和组织分布研究提供方法。

## 1 仪器及材料

Agilent 1100系列高效液相色谱仪 (包括二元梯度泵, 7725i 手动进样器, DAD 二极管阵列检测器, Agilent 4.02 工作站); Agilent 固相萃取仪, 固相萃取小柱 Agilent C<sub>18</sub> (6.0 mL), Sartorius BP221s 型电子天平 (万分之一, 美国 Sartorius 公司)。

人参皂苷 R<sub>g</sub> (批号: 110703-200322)、R<sub>e</sub> (批号: 110745-200414) 和三七皂苷 R<sub>1</sub> (批号: 110754-200322) 对照品 (中国药品生物制品检定所); 三七药材 (购自陕西省药材公司, 由西安市药检所进行鉴定); 色谱纯乙腈 (美国 Fisher 公司); 色谱纯甲醇 (美国 Fisher 公司); 去离子水 (自制); 其它试剂均为分析纯。

新西兰大白兔, ♀ ♂ 兼用, 体重 1.8~2.2 kg, 由西安交通大学医学院实验动物中心提供, 动物合格证号: 医动字第 08-018 号。

## 2 方法和结果

2.1 色谱条件 色谱柱 Agilent TC-C<sub>18</sub> (150 mm × 4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.1% 磷酸水溶液 (pH 2.2): 甲醇 = 80:20; 柱温: 25°C; 流速: 0.8 mL/min; 进样量: 50.0 μL。此条件下, 空白血浆及空白血浆加药供试品溶液的色谱图见图 1, 图中峰 1、2 和 3 间的分离度分别为 4.3 和 1.6。

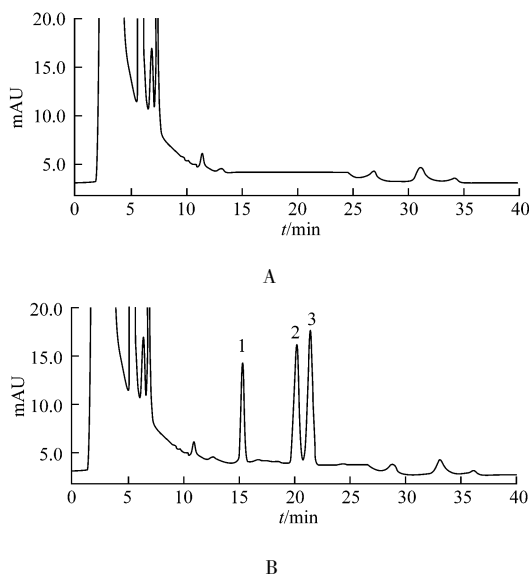


图 1 空白血浆及空白血浆加标供试品溶液色谱图  
A 空白血浆 B. 空白血浆加标 1 R<sub>1</sub> 2 R<sub>e</sub> 3 R<sub>g</sub>

2.2 对照品溶液的制备 分别精密称定三七皂苷 R<sub>1</sub> 对照品、人参皂苷 R<sub>g</sub> 和 R<sub>e</sub> 对照品 1.4、1.5、3.6 mg 用甲醇溶解至 5.0 mL 棕色量瓶中, 加甲醇至刻

收稿日期: 2007-11-13

作者简介: 杨建婷 (1975-), 女, 主管药师, 研究方向: 心血管药理学, 电话: 029-88273419 E-mail: jtytem@163.com

\* 通讯作者: 臧伟进 (1958-), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向: 心血管药理。电话 029-82655150

度,制备成 0.28、0.30、0.72 mg/mL 的对照品溶液, 4℃贮藏备用。

2.3 药材供试品溶液的制备 取三七药材,干燥至恒重,粉碎,过 50 目筛。准确称取三七粉 150.0 g 以 8 倍量 70% 的乙醇水浸泡 30 min,加热回流提取 2 次,每次 1.5 h,合并 2 次提取液,抽滤,滤液旋转蒸发浓缩至三七生药量为 2.0 g/mL, 4℃冷藏备用。

2.4 空白血浆样品供试品溶液的制备 取健康兔空白血浆 1.0 mL,肝素钠抗凝, 8 000 r/min 离心 10 min,取上清液 0.5 mL,转入已活化好的固相萃取柱,收集 70% 甲醇洗脱液 2.0 mL, 25℃氮气吹干,残渣用流动相溶解, 0.45 μm 微孔有机系滤膜滤过, 4℃冷藏备用。

2.5 空白血浆加药供试品溶液的制备 取空白血浆 0.5 mL,加入 0.5 mL 10<sup>-2</sup> 倍的 2.3 项下的药材供试品溶液,按 2.4 项下样品的制备方法制备供试品溶液。

2.6 含药血浆供试品溶液的制备 健康新西兰大白兔 12 只,平均分为血样对照组、血样实验组, 12 h 内禁食不禁水,以三七提取液灌胃。灌胃后 30.0、60.0 和 90.0 min 于耳静脉取血 1.0 mL,肝素抗凝,在 3 000 r/min 下离心 15 min,获得血浆,按 2.4 项下方法制备含药血浆。

2.7 检测限 取混合空白血浆样品溶液,加入适量对照品溶液,稀释后进样分析,测得 R<sub>1</sub>、R<sub>g</sub> 和 R<sub>e</sub> 的检测限分别为: 2.8、1.5 和 3.6 ng/mL。

2.8 线性范围 取空白混合血浆样品溶液 1.0 mL (各 7 份),分别置于 10.0 mL 试管中,分别精密吸取三七皂苷 R<sub>1</sub>、人参皂苷 R<sub>g</sub> 和人参皂苷 R<sub>e</sub> 对照品溶液适量,配成系列溶液。分别按 2.4 项下的样品制备方法制备样品,在拟定色谱条件下进样 50.0 μL,记录峰面积。以峰面积为纵坐标 (Y),以进样量为横坐标 (X, mg) 进行线性回归,得 R<sub>1</sub>、R<sub>g</sub> 和 R<sub>e</sub> 的回归方程分别为: Y = 356.948X + 1.0076 (r = 0.9995); Y = 358.992X - 3.0221 (r = 0.9994); Y = 293.769X - 1.605 (r = 0.9997), 线性范围分别为 0.028~2.8 μg、0.03~3.0 μg 和 0.036~3.6 μg (S/N = 3 计)。

2.9 方法回收率 以三七特有皂苷成分 R<sub>1</sub> 为指标测定,取空白血浆三份,加入适量的 R<sub>1</sub> 对照品溶液,分别配成低、中、高 3 个浓度的三七皂苷 R<sub>1</sub> 血浆及组织样品溶液 (2.66、5.32 和 13.30 ng/mL),在拟定分析条件下,进样 50.0 μL,计算方法三个浓度的回收率分别为 (81.0 ± 3.4)%, (95.0 ± 4.6)% 和

(103.0 ± 2.4)%, 相对标准偏差 (RSD%) 分别为 4.6、3.2 和 2.7。

2.10 方法精密度 取空白血浆样品,加入适量的 R<sub>1</sub> 对照品溶液,制备成低、中、高浓度的样品溶液,在一天内按样品测定法重复测定 6 次,求得日内相对标准偏差 (RSD%) 分别为 11.4、5.2 和 3.6。将上述 3 个浓度的样品在 6 日内陆续各重复测定 6 次,计算每天的平均值,以 6 天的平均值求得日间相对标准偏差 (RSD%) 分别为 14.2、6.3 和 4.1。

2.11 稳定性试验 冻融稳定性:将低、中、高 3 个浓度的 R<sub>1</sub> 血浆样品分别置于 -70℃ 冷冻, 24 h 后自然解冻,在拟定分析条件下,测定 R<sub>1</sub> 的浓度变化,完全解冻后将样品重新冷冻 24 h,重复 6 次,计算冻融周期对样品稳定性的影响,相对标准偏差在 3.1% ~ 10.6% 之间。

短期稳定性:将低、中、高三个浓度的 R<sub>1</sub> 血浆样品分别在室温下放置 2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、12.0、24.0 h,按空白组织样品的制备方法制备样品溶液,在拟定分析条件下,测定 R<sub>1</sub> 的浓度变化,计算温度对样品稳定性的影响,相对标准偏差在 2.5% ~ 11.6% 之间。

长期稳定性:将低、中、高 3 个浓度的 R<sub>1</sub> 血浆样品分别于贮存 1、2、4、8 周后解冻。按空白组织样品的制备方法制备样品,在拟定分析条件下,测定 R<sub>1</sub> 的浓度变化,计算贮存时间对样品稳定性的影响,相对标准偏差在 2.7% ~ 13.8% 之间。

2.12 含药血浆样品中三七皂苷 R<sub>1</sub>、人参皂苷 R<sub>g</sub> 和人参皂苷 R<sub>e</sub> 的测定 按 2.4 项下样品制备方法制备含药血浆供试品溶液,在拟定色谱条件下进样 50.0 μL,测定三种皂苷成分的含量,结果见表 1。

表 1 含药血浆样品中三七皂苷 R<sub>1</sub>、人参皂苷 R<sub>g</sub> 和 R<sub>e</sub> 的测定结果 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

名称	平均含量 / (μg/mL)		
	30.0 min	60.0 min	90.0 min
三七皂苷 R <sub>1</sub>	1.717 ± 0.132	2.492 ± 0.121	1.268 ± 0.096
人参皂苷 R <sub>g</sub>	3.430 ± 0.246	2.658 ± 0.185	1.679 ± 0.109
人参皂苷 R <sub>e</sub>	1.679 ± 0.082	2.231 ± 0.213	1.195 ± 0.114

### 3 讨论

在研究三七含药血浆样品的处理方法时,本试验对传统的液液萃取法 (LLE) 法进行了研究。结果表明:用水饱和的正丁醇萃取血浆样品,很容易出现乳化现象,虽然可以加入 NaCl 来破乳,但是样品量大时并不适合。而采用固相萃取法完全消除了乳化,同时能大大提高方法的特异性。

本研究在文献研究的基础上<sup>[2-4]</sup>,以三七的主要药效成分三七皂苷 R<sub>1</sub> 和人参皂苷 R<sub>g1</sub>、R<sub>e</sub>为指标,建立了三七体内作用过程的固相萃取-高效液相色谱研究方法。方法无干扰,特征成分三七皂苷 R<sub>1</sub> 最低检测限为 2.8 ng/mL,提取回收率和日内、日间精密密度等均符合美国 FDA 生物样品分析方法指导原则的要求,证明该方法可用于三七的药代动力学和组织分布研究。

参考文献:

[1] 中国药典 2000年版[S]. 2000: 184-184.

[2] 沈国芳, 吴永江, 程翼宇. RP-HPLC测定血栓通注射液中 4种皂苷的含量. 中国药学杂志 [J]. 2003, 38(9): 698-699

[3] Guan J, Lai C M, Li S P. A rapid method for the simultaneous determination of 11 saponins in *Panax notoginseng* using ultra performance liquid chromatography [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 44(4): 996-1000.

[4] Wan J B, Yang F Q, Li S P, et al. Chemical characteristics for different parts of *Panax notoginseng* using pressurized liquid extraction and HPLC-ELSD [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2006, 41(5): 1596-1601

## 华蟾素分散片溶出度的研究

王元清<sup>1</sup>, 严建业<sup>2</sup>, 王义强<sup>1</sup>, 喻林华<sup>1</sup>, 龙绛雪<sup>1</sup>

(1. 中南林业科技大学生命科学与技术学院, 湖南长沙 410000; 2. 湖南中医药大学药学院, 湖南长沙 410004)

关键词: 华蟾素分散片; 溶出度; 方法研究

摘要: 目的: 建立华蟾素分散片溶出度的测定方法。方法: 依据《中国药典》2005年版溶出度测定法(附录 XC 第三法), 以水为溶出介质, 转速 75 r/min, 45 min 取样后, 其溶出量不得低于标示量的 70%。结果: 华蟾素分散片溶出度测定方法在 15~150 μg 呈线性 ( $r = 0.9995$ ), 回收率 99.32%,  $RSD = 1.05%$ 。结论: 本法稳定、简便、准确。

中图分类号: R927.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-1528(2008)11-1667-03

华蟾素分散片具有解毒、消肿、止痛的功效, 是治疗中、晚期肿瘤, 慢性乙型肝炎等症具有良好疗效的中药成方制剂。溶出度是分散片质量控制的重要指标。我们以该制剂中主要成分吲哚类总生物碱为指标, 对自制的华蟾素分散片的溶出度测定方法进行考察, 以便控制质量。

### 1 仪器与试剂

1.1 仪器 UV-9200型紫外-可见光分光光度计, ZRS-8G型智能溶出试验仪, AR1140/C型电子分析天平。

1.2 试剂 华蟾素分散片(自制), 5羟色胺(批号: 1130661-31205079供含量测定用, 由 Signa 公司提供); 盐酸、无氮硫酸、对二甲氨基苯甲醛等均为分析纯, 水为纯化水。

### 2 方法与结果

2.1 溶出方法的选择 由于本品规格较小(0.3 g/片), 预实验表明主药成分含量较低, 因而在溶出度测定方法选择时, 宜选用《中国药典》2005年版二部附录 X C 收载的溶出度试验第三法为宜, 选用溶出介质质量为 100 mL。

2.2 溶出介质的选择 分别以人工胃液(0.1 mol/L 的盐酸溶液)、水以及人工肠液(pH 6.8 的磷酸盐缓冲溶液)作为溶出介质, 体积为 100 mL, 转速为 75 r/min, 取华蟾素分散片每溶出杯放 5 片, 照溶出度测定方法(中国药典 2005年版二部附录 X C), 依法操作, 45 min 时, 取样, 测定溶出百分量。其结果见表 1。

结果表明, 以水为溶出介质时, 吲哚类总生物碱 45 min 百分溶出总量基本一致, 均优于以人工胃液(0.1 mol/L 的盐酸溶液)及人工肠液(pH 6.8 的磷

收稿日期: 2007-11-15

基金项目: 中南林业科技大学 2005 年人才引进项目资助, 项目编号为 101-0645。

作者简介: 王元清(1980-), 女, 硕士, 讲师, 研究方向: 生物制药的教学与研究。电话: 0731-6545527, E-mail wangyuanqing2010@126.com