

2 讨论

紫杉醇是从短叶紫杉树皮中分离的天然产物,主要用于治疗卵巢癌和乳腺癌,对肺癌、大肠癌、淋巴瘤等也有一定疗效。多西他赛是从浆果紫杉针叶中提取的前体物再经半合成的产物,在北美和欧盟的医院中被用作治疗晚期乳癌和小细胞肺癌的一线药物。两药虽然结构相近,但多西他赛在 C_{10} 和 C_{13} 上酯侧链的特性和构型,使其对微管结合部位的亲和力较紫杉醇好,药理活性比紫杉醇强;在细胞内,多西他赛的浓度比紫杉醇高 3 倍,而且滞留的时间长;在相等毒性剂量下对某些肿瘤的杀伤作用比紫杉醇大 2 倍^[5]。经紫外扫描,多西他赛在 227 nm 处有最大吸收峰,在 203 nm 处有较强的末端吸收,吸收强度约为 233 nm 处的 2 倍,为提高体内分析的灵敏度,选择 203 nm 为血药浓度的测定波长。

紫杉醇和多西他赛在大鼠体内的处置均符合二室模型,即均符合双指数线性动力学模型。两药的 α 、 $t_{1/2,\alpha}$ 、 V_c 不存在统计学差异 ($P > 0.05$),而 β 、 $t_{1/2,\beta}$ 、 $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ 、 $AUC_{0 \rightarrow \tau}$ 、 Cl 均存在统计学差异。紫杉醇和多西他赛的分布半衰期分别为 0.18 ± 0.21 、 0.07 ± 0.02 h,均较短,血药浓度迅速下降,说明两者能迅速分布到各组织受体中;两药的中心室分布容积 V_1 分别为 0.26 ± 0.09 、 0.59 ± 0.59 L·kg⁻¹,较大,具有广泛的血管外分布特性以及结合于血浆和

组织蛋白的效应,而两者又是通过与微管蛋白结合发生作用的,所以更有利于药效的发挥。多西他赛的消除半衰期 ($t_{1/2\beta} = 3.18 \pm 0.80$ h) 约为紫杉醇 ($t_{1/2\beta} = 1.08 \pm 0.33$ h) 的 3 倍,可能是多西他赛在 C_{10} 和 C_{13} 上的酯侧链构型,使其与血浆蛋白的结合力强于紫杉醇,从而在血浆中的消除速率比紫杉醇慢,发挥药效的时间更持久。

多西他赛为紫杉醇的结构改造药物,两药均为抗癌药物,对两药进行药动学研究并比较其在体内的药动学差异,可为分析比较两药构效关系及临床应用提供参考。

参考文献:

- [1] Zhang QY, Cong YZ. A new kind of antitumor drugs - Taxol and Taxotere [J]. Chin Tradit Herb Drugs, 1995, 26: 657 - 659.
- [2] Ge ZH, Li H, Wang N, et al. Pharmacokinetics of taxol in dogs [J]. Chin Pharm Sin, 1997, 32: 603 - 605.
- [3] Zhang XN, Tnag LH, Yan XY, et al. Pharmacokinetics of Paclitaxel Lyophilized injection in rat [J]. Chin Tradit Patent Medic, 2005, 27: 556 - 558.
- [4] Madhu BG, Stephen PA. Simple and sensitive high - performance liquid chromatography method for the determination of docetaxel in human plasma or urine [J]. J Chromatogr B, 2000, 748: 383 - 388.
- [5] Yuan YJ. New antitumor drugs - taxol and taxotere [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2002: 1.

收稿日期: 2009 - 12 - 20

HPLC 测定大鼠血浆中的三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_{g_1} 、 R_{b_1}

赖玲¹, 刘华钢^{1*}, 文丽², 秦艳娥¹, 陆仕华¹, 陈明³, 刘冠萍³

(1. 广西医科大学药学院, 广西南宁 530021; 2. 广西中医学院, 广西南宁 530001; 3. 广西梧州制药股份有限公司, 广西梧州 543000)

摘要: 目的 采用 HPLC 测定大鼠血浆中三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_{g_1} 、 R_{b_1} 的含量。方法 以淫羊藿为内标, 采用 C_{18} 色谱柱, 乙腈 - 水线性梯度洗脱, 流速 1.0 mL·min⁻¹, 柱温 30 °C, 检测波长 203 nm。结果 样品中的 3 种皂苷成分分离良好, 且线性关系良好; R_1 、 R_{g_1} 和 R_{b_1} 的线性范围分别为 $2 \sim 200$ 、 $5.5 \sim 550$ 、 $10.5 \sim 1050$ $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 检测限分别为 0.6 、 0.55 、 0.79 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。结论 所建方法操作简单、结果准确可靠, 可用于测定大鼠体内三七皂苷 R_1 和人参皂苷 R_{g_1} 、 R_{b_1} 的含量。

关键词: 高效液相色谱法; 三七皂苷 R_1 ; 人参皂苷 R_{g_1} ; 人参皂苷 R_{b_1} ; 大鼠血浆; 含量测定

中图分类号: R917

文献标志码: A

文章编号: 1006 - 0103(2011)01 - 0054 - 03

Determination of notoginsenoside R_1 and ginsenoside R_{g_1} , R_{b_1} in rat plasma by HPLC

LAI Ling¹, LIU Hua - gang^{1*}, WEN Li², QIN Yan - e¹, LU Shi - hua¹, CHEN Ming³, LIU Guan - ping³

(1. Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi, 530021 P. R. China; 2. Guangxi Traditional Chinese Medical University, Nanning, Guangxi, 530001 P. R. China; 3. Guangxi Wuzhou Pharmaceutical Group Co., Ltd., Wuzhou, Guangxi, 543000 P. R. China)

基金项目: 广西企业科技特派员专项(桂科攻 09321049); 广西自然科学基金(青年基金项目 2010GXNSFB013068)

作者简介: 赖玲, 女, 广西桂林, 讲师, 正攻读药理学专业的博士学位。Email: victroy0773@yahoo.com.cn

* 通信作者(Correspondent author), Email: hgliu@263.net

Abstract: OBJECTIVE To establish an assay method for the determination of notoginsenoside R₁ and ginsenoside R_{g₁}、R_{b₁} in rat plasma. **METHODS** Icariin was used as the internal standard. C₁₈ column was used. The mobile phase was acetonitrile - water gradient elution, flow rate was 1.0 mL·min⁻¹, the column temperature was 30 °C and the detected wavelength was at 203 nm. **RESULTS** Three saponins were separated well. A good linear relationship was obtained with the range of 2 - 200 μg·mL⁻¹ for notoginsenoside R₁, 5.5 - 550 μg·mL⁻¹ for ginsenoside R_{g₁} and 10.5 - 1050 μg·mL⁻¹ for ginsenoside R_{b₁}. The limit detection was 0.6, 0.55, 0.79 μg·mL⁻¹, respectively. **CONCLUSION** The method is simple and accurate for analysis of notoginsenoside R₁ and ginsenoside R_{g₁}、R_{b₁} in rat plasma.

Key words: HPLC; Notoginsenoside R₁; Ginsenoside R_{g₁}; Ginsenoside R_{b₁}; Rat plasma; Content determination

CLC number: R917

Document code: A

Article ID: 1006 - 0103(2011) 01 - 0054 - 03

三七的主要成分三七总皂苷(PNS)在血液系统、心血管系统以及抗炎、抗衰老等方面具有特殊药理活性^[1]。PNS中三七皂苷R₁(R₁)、人参皂苷R_{g₁}(R_{g₁})和人参皂苷R_{b₁}(R_{b₁})的含量较高。现选取R₁、R_{g₁}、R_{b₁}为考察指标,以淫羊藿为内标,采用HPLC法同时测定其在血液中的浓度,旨在为PNS的药物动力学和组织分布研究提供方法。

1 实验部分

1.1 仪器、试药与动物

高效液相色谱仪(日本岛津)。三七皂苷R₁(批号:110745-200415)、人参皂苷R_{g₁}(批号:110704-200318)、人参皂苷R_{b₁}(批号:110703-200424)对照品、淫羊藿内标(批号:110737-200413)(中国药品生物制品检定所);甲醇、乙腈为色谱纯;水为三蒸水(自制)。♂SD大鼠(广西医科大学实验动物中心),体重250±20 g。

1.2 方法与结果

1.2.1 色谱条件 色谱柱为Welchrom-C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈-水,线性梯度洗脱:0 min(21:79)~15 min(40:60)~18 min(45:55)~20 min(21:79)~25 min(21:79);流速1.0 mL·min⁻¹;进样量20 μL;检测波长203 nm;柱温30 °C^[2-4]。

1.2.2 溶液的配制 分别精密称取2.0 mg R₁、5.5 mg R_{g₁}、10.5 mg R_{b₁},加甲醇溶解,定容至10 mL,浓度分别为200、550、1.05×10³ μg·mL⁻¹,作为三七总皂苷(PNS)对照品贮备液。精密称取0.25 g PNS,置10 mL量瓶中,加入蒸馏水溶解定容,即得供试液。精密称取6.5 mg淫羊藿内标,加甲醇溶解定容至100 mL,作为内标溶液。

1.2.3 样品的预处理 取0.15 mL大鼠样品血浆,加15 μL内标溶液和甲醇-乙腈(1:1)的混合液0.45 mL,漩涡混合2 min,于1×10⁴ r·min⁻¹离心10 min,吸取上层混合液于Ep管中,于50 °C水浴中吹干混合液后,加入甲醇0.1 mL,漩涡混合,于1×10⁴

r·min⁻¹离心10 min,取20 μL进样。在“1.2.1”项色谱条件下,R₁、R_{g₁}、R_{b₁}、内标与生物样品中的杂质分离较好,与相邻峰的分度均大于1.5, t_R分别为14~15 min(内标)、9~10 min(R₁)、10~11 min(R_{g₁})、17~18 min(R_{b₁}),血浆中的杂质对药物及内标均无干扰,色谱峰分离较好。空白血浆、含药血浆和静脉给药大鼠血浆样品的色谱图见图1。

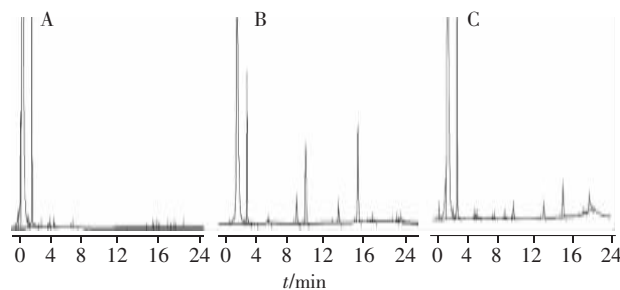


图1 空白血浆(A)、含药血浆(B)和静脉给药大鼠血浆(C)的HPLC图

Fig 1 HPLC chromatograms of blank plasma (A), PNS plasma (B) and PNS plasma after intravenous administration to rats (C)

1.2.4 标准曲线的制备 在EP管中分别加入不同体积的PNS对照品溶液,50 °C水浴吹干甲醇后,分别加入0.15 mL空白血浆,配成含不同浓度PNS的生物样品,按“1.2.3”“1.2.1”项测定PNS中R₁、R_{g₁}、R_{b₁}与内标的峰面积A_s与A_i,分别以三者的A_s/A_i为纵坐标、浓度为横坐标,进行线性回归,回归方程为:Y_{R₁}=0.007X+0.027(r=0.9948);Y_{R_{g₁}}=0.008X+0.151(r=0.9930);Y_{R_{b₁}}=0.006X+0.216(r=0.9917),线性范围分别为2~200、5.5~550、10.5~1050 μg·mL⁻¹。

1.2.5 精密度试验 取空白血浆,加入适量的PNS对照品溶液和内标溶液,按“1.2.3”项方法操作,制备低、中、高浓度的样品溶液,在一日内按重复测定5次,求得日内RSD。将上述3个浓度的样品在5 d内陆续各重复测定5次,计算每天的平均值,以5 d的平均值求得日间RSD(表1)。

1.2.6 稳定性试验 将低、中、高浓度的 PNS 血浆样品分别在常温和 4 °C 下放置 2、4、6、8、10、12、24 h。按“1.2.3”项方法操作,在“1.2.1”项条件下测定 R_1 、 R_{g1} 、 R_{b1} 的含量变化,考察温度对样品稳定性的影响。在 24 h 内,常温下, R_1 、 R_{g1} 、 R_{b1} 的 RSD 分别为 6.31%、3.08%、3.73%,4 °C 下则分别为 9.46%、2.04%、3.73%。血浆样品在 24 h 内常温和 4 °C 储存,均符合稳定性要求。

表 1 精密度试验 ($n=5$)

Table 1 Precision test ($n=5$)

Components	$C/\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Interday RSD/%	Intraday RSD/%
R_1	4	4.87	7.24
	20	6.31	3.49
	100	3.98	2.31
R_{g1}	11	5.66	6.02
	55	8.53	2.48
	275	7.72	4.69
R_{b1}	21	3.47	2.94
	105	8.13	6.67
	525	4.06	5.43

1.2.7 检测限和定量限的测定 取适量 PNS 对照品溶液稀释后,加入空白血浆中,经“1.2.3”项方法处理测定,测得血浆中 R_1 、 R_{g1} 和 R_{b1} 的检测限分别为 0.6、0.55、0.79 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($S/N=3$); 定量限分别为 2.00、1.83、2.63 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($S/N=10$)。

1.2.8 回收率试验 取空白血浆,加入适量的 PNS 对照品溶液和内标溶液,制成低、中、高浓度的样品溶液,每个浓度各 5 份,按“1.2.3”项下方法测定,计算对照品峰面积和内标峰面积比值 A_s/A_i ,标准曲线法计算浓度,所得浓度与实际浓度比值即为方法回收率,测得各对照品峰面积与相应浓度对照品(未加空白血浆处理)峰面积的比值,即为提取回收率(表 2)。在试验浓度范围内, R_1 、 R_{g1} 、 R_{b1} 在血浆中的提取回收率均大于 50%,完全符合生物样品的分析要求。

表 2 回收率实验结果 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 2 Results of recovery test ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Components	Added/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Recovery of method		Recovery of extraction	
		\bar{X}	RSD/%	\bar{X}	RSD/%
R_1	4	95.73	4.02	54.54	7.55
	20	101.44	6.96	70.29	4.27
	100	98.76	5.17	82.13	3.75
R_{g1}	11	104.34	2.66	75.23	7.05
	55	103.61	4.60	68.82	1.44
	275	99.05	5.34	74.43	1.93
R_{b1}	21	105.27	5.92	75.03	8.17
	105	96.74	4.27	87.18	3.05
	525	97.63	2.13	61.99	6.23

1.2.9 样品的测定 取健康 SD 大鼠 5 只,实验前禁食 12 h(自由饮水),分别尾静脉注射供试液 0.5

mL(按 50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的剂量)。给药后于 0.1、0.25、0.5、0.75、1、1.5、2、4、8、12、24 h 时尾静脉取血约 0.3 mL,按“1.2.3”项下方法操作。吸取 20 μL 进样,以随行的标准曲线计算血药浓度,药-时曲线见图 2。

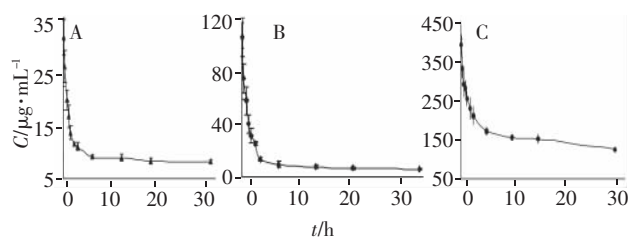


图 2 大鼠血浆中 R_1 (A)、 R_{g1} (B) 和 R_{b1} (C) 的药-时曲线

Fig 2 Concentration - time curves of R_1 (A), R_{g1} (B) and R_{b1} (C) in rats plasma

2 讨论

为了同时测定 PNS 中的 R_1 、 R_{g1} 、 R_{b1} 成分,选用了线性梯度洗脱的方法。最大吸收波长在 203 nm,若采用甲醇为流动相则基线波动较大,且甲醇存在末端吸收,会影响 PNS 测定结果,最终确定了文中的流动相。在此条件下,基线平稳,各主要测定峰能达到良好分离。参照文献^[2-6],曾考察了龙胆苦苷、茶碱、咖啡因等为内标物时的测定结果均不能同时满足 3 种成分的测定。最终确定淫羊藿为内标,出峰时间适中(14~15 min),与 3 种成分能很好地分离,未见文献报道。

实验以 PNS 中含量较大的组分 R_1 、 R_{g1} 、 R_{b1} 为指标,淫羊藿为内标,采用 RP-HPLC 同时测定其血药浓度,生物介质不影响样品的测量,样品和内标完全分离,提取回收率、方法回收率、精密度等都符合生物样品的分析要求。

参考文献:

- [1] 何晶. 三七的药理作用及研究进展 [J]. 天津药学, 2004, 16 (5): 58-60.
- [2] 孙丽, 邓远辉. 液相色谱-质谱联用测定人尿中人参皂苷-Rd 的浓度 [J]. 中药新药与临床药理, 2007, 18 (6): 471-474.
- [3] 梁宁, 赵怀清, 周迎春, 等. HPLC 法同时测定三七总皂苷中人参皂苷 R_{g1} 与 R_{b1} 的含量 [J]. 中草药, 2002, 33 (8): 704-705.
- [4] 詹雁, 阮佳, 谭镭, 等. RP-HPLC 同时测定复方制剂中的人参皂苷 R_{g1} 、 R_{b1} [J]. 华西药学期刊, 2007, 22 (6): 703-705.
- [5] 王雁, 毕开顺. 三七 HPLC 指纹图谱的建立 [J]. 中国中药杂志, 2003, 28 (4): 316-320.
- [6] 周绚, 傅超美, 易秋艳, 等. 三七药材三七总皂苷及三七缓释片的指纹图谱 [J]. 华西药学期刊, 2009, 24 (1): 74-77.

收稿日期: 2010-03-10