

# 高效液相色谱法确定兔人参药物血清制作中的灌药周期研究

郭晨旭, 钱 军, 李 靖, 金 鑫, 喻大军

**[摘要]** **目的:** 采用高效液相色谱分析法测定不同灌药周期兔药物血清中人参的有效成分人参皂苷 Rg1 血药浓度, 确立中药药物血清制作中的灌药周期。 **方法:** 色谱柱为 Cosmosil C18 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 人参皂苷 Rg1 流动相为甲醇:0.1% 磷酸(60:40), 检测波长 203 nm。 **结果:** 随着灌药时间的延长, 血清中的人参皂苷 Rg1 的血药浓度逐渐增加, 在灌胃 3 d 血药浓度最低, 灌胃 7 d、14 d、21 d 血药浓度均明显高于 3 d ( $P < 0.01$ ), 21 d 与 14 d 相比差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。 **结论:** 高效液相色谱法简便、准确, 重复性好, 为中药药物血清实验中实验动物的灌药周期提供实验依据, 并能够有效控制四君子汤拆方人参的质量。

**[关键词]** 药物/分析; 人参皂苷 Rg1; 高效液相色谱法

**[中图分类号]** R 927.2

**[文献标志码]** A

**DOI:** 10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2015.06.001

## The determination of feeding cycle in the production of rabbit ginseng serum by HPLC

GUO Chen-xu, QIAN Jun, LI Jing, JIN Xin, YU Da-jun

(Department of Surgical Oncology, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To detect the blood drug concentration of ginsenosides Rg1 in different feeding cycles by high performance liquid chromatography (HPLC) for determining the feeding cycle in the production of rabbit ginseng serum. **Methods:** The C18 column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) was used, the Methanol-0.1% phosphate (60:40) was the mobile phase of ginsenosides Rg1, and the detection wave-length was 203 nm. **Results:** With the prolonging of feeding cycle, the blood drug concentration of ginsenosides Rg1 increased proportionally, the concentrations of 7 days, 14 days and 21 days were significantly higher than the concentrations of 3 days ( $P < 0.01$ ), the difference between 21 days and 14 days was not statistically significant ( $P > 0.05$ ). **Conclusions:** The HPLC is simple, accurate and reproducible, which can provide the experimental evidence in determining the feeding cycle of serum test, and effectively control the quality of ginseng.

**[Key words]** drug/analysis; ginsenosides Rg1; high performance liquid chromatography

随着中医药治疗恶性肿瘤越来越受到人们的关注, 更多研究<sup>[1-2]</sup>通过实验来对中药的有效成分进行鉴定和分析。中药的动物血清制作现阶段已成为各类细胞干预实验中常被采用的关键步骤之一, 而对于实验动物的灌药周期并无权威且有实际理论基础的文献报道<sup>[3]</sup>。本实验在中药干预细胞体外培养实验中, 制作动物的含中药血清, 提取不同灌药周期的动物药物血清, 利用高效液相色谱分析法 (HPLC) 快速、准确、稳定、高效的特点, 以已知四君子汤的拆方之一人参的有效成份人参皂苷 Rg1 为对照, 通过对不同灌药周期的药物血清有效成份的血药浓度进行检测、对比, 从而确定出实验过程中对动物灌药的最佳周期, 现作报道。

**[收稿日期]** 2014-04-21

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目 (8117386); 蚌埠医学院研究生科研创新计划项目 (Byycxz1314)

**[作者单位]** 蚌埠医学院第一附属医院 肿瘤外科, 安徽 蚌埠 233004

**[作者简介]** 郭晨旭 (1987-), 男, 硕士, 住院医师。

**[通信作者]** 钱 军, 硕士研究生导师, 主任医师, 教授。E-mail: qianjun215036@sina.com

## 1 材料与方 法

1.1 仪器 LC-15C 型高效液相色谱仪 (日本岛津); SPD 型紫外检测器 (日本岛津); 岛津 LC-solution15C 型色谱工作站; AB135-S 型十万分之一电子天平 (德国梅特勒); KQ-300B 型超声波清洗器 (江苏昆山超声仪器厂)。

1.2 药品及耗材 人参皂苷 Rg1 标准品 YY90237-20 mg (上海源叶生物科技有限公司, 批号 20121206); 中药材人参 (蚌埠医学院第一附属医院中药房提供), 乙腈为色谱纯 (德国默克公司, 批号 100030), 甲醇为色谱纯 (德国默克公司, 批号 106007), 磷酸为分析纯 (天津西尔斯化工有限公司, 批号 13-015-08209), 水为去离子水。

1.3 实验动物 纯种新西兰大白兔 10 只, 雌性, 体质量约 2 kg, 蚌埠医学院动物实验中心提供。随机分为空白对照组和人参实验组各 5 只。

1.4 药物血清的制备 药物每日剂量为人参 15 g, 熬制汤剂后控制生药浓度约为 0.2 g/ml, 4 °C 冰箱

保存备用。根据“人和动物体表面积折算的等效剂量比率表”<sup>[4]</sup>,人参实验组动物按等体积以人参汤剂灌胃,每次灌胃前禁食,但自由饮水 12 h,连续灌胃 21 d,每天 2 次,分别于 3、7、14、21 d 末次灌胃后 1 h,耳正中动脉采血。空白对照组采取 0.9% 氯化钠注射液灌胃,于 21 d 后采血。将离心管室温下倾斜放置 3~4 h,待血液凝固后放入 4℃ 冰箱中过夜。次日吸出上层血清,4 000 r/min 离心 10 min,收集血清,1.5 ml EP 管分装。-20℃ 保存备用。

1.5 色谱条件 色谱柱:Cosmosil C18 柱(4.6 mm × 250 mm, 5 μm);人参皂苷 Rg1 流动相:甲醇:0.1% 磷酸(60:40);检测波长 203 nm,流速 1.00 ml/min,柱温 30℃。

1.6 线性关系考察 精密称取干燥后并且恒质量的人参皂苷 Rg1 标准对照品适量,依次制成 30、150、300、600、1 500、3 000 μg/ml 的对照品溶液。定量为 20 μl 进样,得出对照品的回归方程: $Y = 7\,346X + 4\,078, R^2 = 0.999$ 。并且得出人参皂苷 Rg1 具备良好线性的范围为 30~3 000 μg/ml。

### 1.7 方法学考察

1.7.1 仪器精密度考察 根据标准曲线的线性范围,分别选取低(50 μg/ml)、中(1 000 μg/ml)、高(2 500 μg/ml)3 个浓度平行配制 6 份,按血清处理方法处理,依次进样测定。记录药物的峰面积,计算人参皂苷 Rg1 测定方法的精密度。

1.7.2 稳定性考察 取同一批号人参皂苷 Rg1 标准品,根据标准曲线选取低(50 μg/ml)、中(1 000 μg/ml)、高(2 500 μg/ml)浓度室温下分别在 0、2、4、6、8、10、12 h 进样,测得人参皂苷 Rg1 标准品低中高浓度峰面积值的 RSD 分别为 0.68%、1.02%、0.83%。结果表明,人参皂苷 Rg1 标准品溶液在 12 h 内是基本稳定的。

1.7.3 样品分析方法 取不同灌药周期的人参药物血清以及空白对照组血清各 1 ml,分别加 2 ml 甲醇振荡 3 min,4℃ 冷藏 1 h 后离心(3 000 r/min),将上清液蒸干,分别加甲醇溶解至 1 ml,20 μl 自动进样,观察各高效液相色谱图的峰值。

1.7.4 提取回收率试验 由标准曲线选取在低(50 μg/ml)、中(1 000 μg/ml)、高(2 500 μg/ml)3 种血清样品,按 1.7.3 方法进行样品分析,另选取以甲醇制成相应浓度的人参皂苷 Rg1 标准品溶液,不经处理直接进样,2 组峰面积进行比较,得出人参皂苷 Rg1 提取回收率。

1.7.5 血清样品检测结果 依照上述条件,分别对

标准品人参皂苷 Rg1、不同灌药周期的人参实验组药物血清及空白对照组血清样本进行 HPLC 法检测。记录 HPLC 色谱图中药物峰的保留时间、峰面积,并将峰面积代入标准曲线换算出血药浓度后进行比较。

1.8 统计学方法 采用方差分析和 *q* 检验。

## 2 结果

2.1 人参皂苷 Rg1 测定方法的精密度 结果表明,低中高浓度的 RSD 分别为 1.21%、1.43%、1.67%。

2.2 人参皂苷 Rg1 的提取回收率 人参皂苷 Rg1 提取回收率在加样 1 000 μg/ml 时达最高(见表 1)。

表 1 人参皂苷 Rg1 的提取回收率结果( $n=6; \bar{x} \pm s$ )

加入量/(μg/ml)	提取回收率/%	CV/%
50	97.00 ± 1.28	1.32
1 000	102.42 ± 1.59	1.56
2 500	98.37 ± 0.95	0.97

2.3 血清样品检测结果 药物血清色谱图主要的对照区域由各实验组空白血清、对照组相对无杂峰干扰区域决定。人参组血清空白对照组的 HPLC 色谱图在 RT 3.50~9.50 min 间无明显杂峰干扰,可作为该实验组的主要比较区域(见图 1)。

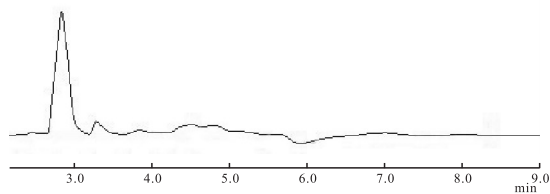


图 1 人参血清空白对照组的比较区域

在 21 d 内,随着灌药天数的增加,各组人参皂苷 Rg1 特征峰的保留时间和持续时间均无明显改变(见表 2),但相应的血药浓度却逐渐增加(见图 2)。在灌胃 3 d 血药浓度最低,灌胃 7 d、14 d 和 21 d 血药浓度均明显高于较 3 d( $P < 0.01$ ),而 21 d 与 14 d 相比差异无统计学意义( $P > 0.05$ )(见表 3)。

表 2 人参药物血清标准品相应峰的位置及持续时间

灌药时间/d	保留时间/min	持续时间/min
3	7.02	1.47
7	7.02	1.47
14	7.02	1.47
21	7.02	1.47

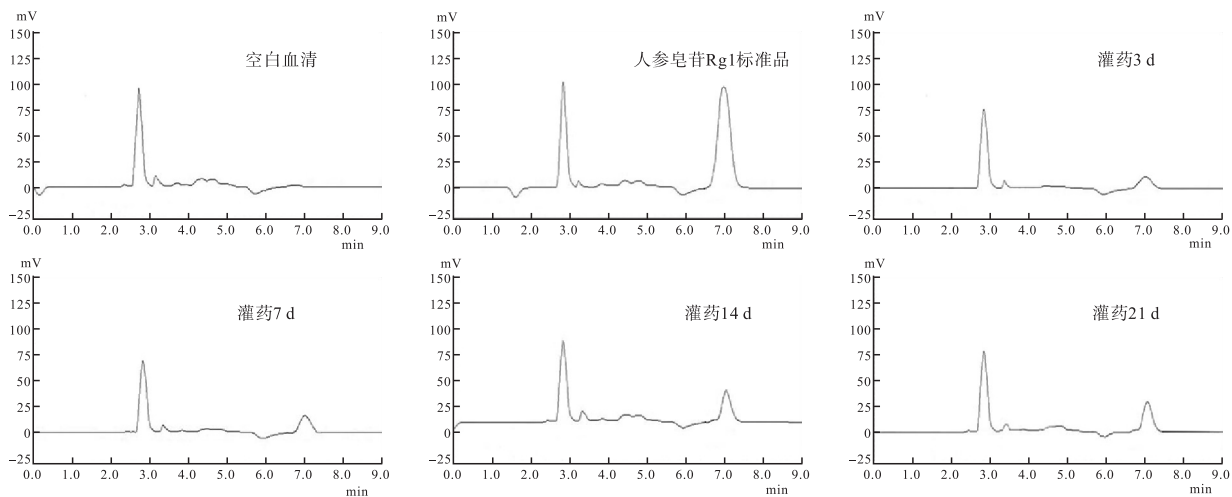


图2 不同灌药周期的人参皂苷Rg1特征峰

表3 人参药物血清相应峰的血药浓度 (n=5;  $\bar{x} \pm s$ )

灌药时间/d	血药浓度/( $\mu\text{g/ml}$ )	F	P	MS <sub>组内</sub>
3	100.62 $\pm$ 2.14	828.03	<0.01	18.571
7	130.28 $\pm$ 5.73 **			
14	211.88 $\pm$ 3.82 ** $\Delta\Delta$			
21	206.37 $\pm$ 4.72 ** $\Delta\Delta$			

q 检验;与灌药 3 d 比较 \* \* P<0.01;与灌药 7 d 比较  $\Delta\Delta$  P<0.01

### 3 讨论

本实验利用 HPLC 特异性强、准确快速并可定性半定量的特点,采用 HPLC 法,以四君子汤拆方人参为媒介,选择并参照人参皂苷 Rg1 标准品,比较不同灌药周期的动物血清中的血药浓度,从而为相关实验确立有效可行的灌药方案。

人参皂苷 Rg1<sup>[5]</sup>、白术内酯 I<sup>[6]</sup>、茯苓酸<sup>[7]</sup>、甘草酸<sup>[8]</sup> 分别为四君子汤中 4 个拆方的主要有效成分,也通常被用为相关实验中确定有效成分的标准品,这些标准品的含量测定可以综合评价各拆方药物的质量<sup>[9]</sup>。但是对于在制作药物血清时的灌药时间,相关研究<sup>[10-11]</sup> 并没有统一的标准,只是在一些中药药物血清实验中将 3 d 作为灌药时间的标准<sup>[12]</sup>。故为了节约实验资源,建立相关实验中的灌药标准,通过实验来敲定中药药物血清制作时的灌药时间显得尤为重要。

本研究选取人参为研究对象,通过 HPLC 法检测不同灌药周期药物血清的供试液,首先检测灌药 3 d 的药物血清中的血药浓度,再在此基础上延长灌药时间,继续选取 7、14 d 2 个时间点,结果显示 3 个时间点的供试血清在设定的 HPLC 条件下人参皂苷 Rg1 均得到了满意分离,并与标准品的 HPLC 色

谱图比较、鉴别,显示人参皂苷 Rg1 标准品的特征峰在药物血清的 HPLC 色谱图中存在相应的表达,表明经常规中药灌胃的兔药物血清中确存在人参皂苷 Rg1。同时我们对不同灌药周期的药物血清样品进行观察、对比,发现在 14 d 内随着灌药周期的延长,药物血清中相应的标准品的特征峰面积呈增长趋势。而在 14 d 后,继续在灌药 21 d 时利用 HPLC 法检测血药浓度,发现人参药物血清的标准品特征峰面积不再有明显的变化,药物浓度折线图也呈现明显的平台期,这可能和中药在实验动物体内的吸收后的药物有效成分的半衰期有关,即存在所谓的饱和度。

目前,在中医药相关基础实验,尤其是在对细胞进行药物血清干预的细胞学实验中,动物药物血清的制作尤为关键<sup>[13-14]</sup>。而中药灌胃为所有实验开展的基石,定性且定量地监测药物血清中所含实验需验证的有效成份<sup>[15-16]</sup>,能使得实验结果更加具有准确性与说服力。本实验结果显示,随着灌胃时间的延长,药物血清中的血药浓度将增加,于 14 d 达到最高,之后即进入平台期,从而初步确立了中药药物血清制作中的灌药周期,即 14 d 可作为实验动物的最佳灌药时间,并能够实现研究中实验组的同步性。同时也证实了本实验中使用的的人参皂苷 Rg1 标准品可作为四君子汤的拆方之一人参的质控指标,进一步为四君子汤余三方的血药浓度的测定以及随后更多的中药实验奠定理论基础。

#### [ 参 考 文 献 ]

[1] 王惠成,张邦升,沈英,等.高效液相色谱法测定脑脉泰胶囊中人参皂苷 Rg1 的含量[J].中国医院药学杂志,2010,30(3): 263-264.

研究<sup>[13]</sup>认为,PTEN 通过抑制 PI3KPAKT 途径从而抑制 VEGF 的表达。李敬东等<sup>[14]</sup>发现,牙龈癌组织中 PTEN 与 VEGF 的表达存在相关性。本文研究结果显示,乳腺癌组织中 PTEN 与 VEGF-D 的表达呈显著负相关关系与张莉萍等<sup>[11]</sup>报道一致。PTEN 与 VEGF-D 间的关系尚存在不同观点,还需大量实验研究。

综上所述,PTEN 与 VEGF-D 表达与乳腺癌浸润、转移和预后密切相关,临床联合检测 PTEN 和 VEGF-D 对预测乳腺癌生物学行为及预后有一定意义。抗淋巴管生成治疗将是肿瘤治疗的新方向,VEGF-D 的研究可能为乳腺癌抗淋巴管生成治疗提供新的参考方向。

#### [ 参 考 文 献 ]

- [1] Bilynskyj BT. The breast cancer treatment as a marker of progress in oncology[J]. *Exp Oncol*,2010,32(3):190-194.
  - [2] Tavassoli FA,Devilee P. Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs[M]. Lyon:IARC Press,2003:10-80.
  - [3] Xiong Y,Cao LP,Rao HL,et al. Clinical significance of peritumor lymphatic vessel density and lymphatic vessel invasion detected by D2-40 immunostaining in FIGO Ib1-II a squamous cell cervical cancer[J]. *Cell Tissue Res*,2012,348(3):515-522.
  - [4] Achen MG,Jeltsch M,Kukk E. et al. Vascular endothelial growth factor(VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2(Flk1) and VEGF receptor 39(Flt4)[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,1998,95(2):548-553.
  - [5] 邓恋. 淋巴管新生与肿瘤转移的研究进展[J]. *实用癌症杂志*,2013,28(1):95-97.
  - [6] 施华球,鄢俊,王祥财. VEGF-D 与其受体在结直肠癌中的表达及与淋巴管生成的关系[J]. *山东医药*,2010,50(1):38-39.
  - [7] 杨泽妹,徐海霞. 血管内皮生长因子及其受体在子宫内膜癌中的表达及对淋巴管生成的作用[J]. *中国老年学杂志*,2010,30(15):2117-2118.
  - [8] Schimanski C,Schlaegel F,Jordan M. VEGF-D correlates with metastatic disease in gastric cancer patients undergoing surgery[J]. *World J Surg*,2011,35(5):1010-1016.
  - [9] 朱勇杰,师晓莉,沈妮娜,等. 血管内皮生长因子 VEGF-C 和 VEGF-D 在卵巢上皮癌的表达及其预后研究[J]. *新疆医科大学学报*,2014,27(12):1591-1594.
  - [10] Nakamura Y,Yasuoka H,TsuJimoto M, et al. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor D in breast carcinoma with long-term follow-up[J]. *Clin Cancer Res*,2003,9(2):716-721.
  - [11] 张莉萍,王一,黄国平,等. 乳腺癌中 PTEN 蛋白表达及其与 VEGF、MMP-9 表达的相关性研究[J]. *Diag Pathol*,2008,15(5):382-385.
  - [12] Sotiropoulou N,Bravou V,Kounelis S, et al. Tumor expression of lymphangiogenic growth factors but not lymphatic vessel density is implicated in human cervical cancer progression[J]. *Pathology*,2010,42(7):629-636.
  - [13] Price TJ,Hardingham JE, Lee CK, et al. Prognostic impact and the relevance of PTEN copy number alterations in patients with advanced colorectal cancer(CRC) receiving bevacizumab[J]. *Cancer Med*,2013,2(3):177-285.
  - [14] 李敬东,梁锐英,赵艳萍,等. 牙龈癌中 VEGF 及 PTEN 的表达及其相关性分析[J]. *上海口腔医学*,2014,23(5):619-623.
- ( 本文编辑 章新生 )
- 
- (上接第 703 页)
- [2] 谭晓梅,傅钧庭,罗佳波,等. 高效液相色谱串联质谱法测定中药注射剂对 P815 细胞脱颗粒后上清液中组胺含量[J]. *分析测试学报*,2013,32(4):483-487.
  - [3] 俞发荣,谢明仁,张琛,等. 苍耳子药物血清对 H4 细胞毒性作用的实验研究[J]. *中国临床研究*,2013,26(3):209-210.
  - [4] 陈奇. 中药药理研究方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,1993:33-34.
  - [5] 马静,李学林,唐进法,等. HPLC 测定不同厂家参麦注射液中人参皂苷 Rg1 和 Re 的含量[J]. *中国实验方剂学杂志*,2013,19(11):79-81.
  - [6] 刘玉强,才谦. 50 批不同来源白术药材及饮片中白术内酯 I 和白术内酯 III 含量的 HPLC 法测定[J]. *药物分析杂志*,2012,32(7):1249-1252.
  - [7] 王光忠,邵贝贝,邓媛媛,等. RP-HPLC 测定茯苓乙醇提取物中茯苓酸的含量[J]. *中国现代中药*,2012,14(1):41-42.
  - [8] 王晓莉,巩丽丽,容蓉,等. 3 种方法制备的四逆汤中甘草苷、甘草酸含量测定[J]. *中国实验方剂学杂志*,2012,18(6):71-71.
  - [9] 徐秋香,郁红礼,吴皓,等. HPLC 同时测定四君子汤中 4 种指标性成分的含量[J]. *中国实验方剂学杂志*,2013,19(3):62-65.
  - [10] 吕涛,姚希贤,孙泽明. 药物血清内黄芪甲苷含量测定及其抑制 HSCs 活化增殖的实验研究[J]. *中华中医药学刊*,2012,29(12):2770-2773.
  - [11] 陈萌,娄利霞,吴爱明,等. 活血益气方及其拆方药物血清对 VEGF<sub>165</sub> 转染脐静脉内皮细胞分泌 MMP-9、MMP-2 的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*,2012,18(2):156-160.
  - [12] 倪彩霞,曾南,汤奇,等. 芳香开窍药对正常小鼠脑屏障通透性的影响[J]. *江苏中医药*,2011,43(2):88-89.
  - [13] 金泉克,肖海娟,孙珏,等. 中药复方肠胃清含药血清对胃癌 SGC7901 细胞凋亡的影响[J]. *中国中医药信息杂志*,2012,19(5):32-35.
  - [14] 王熙月,韩凤娟,汤欣,等. 中药复方药物血清对 CDKN2A 和 RPS3a 基因在人卵巢癌细胞株 SKOV3 中表达的影响[J]. *世界中西医结合杂志*,2011,6(9):747-750.
  - [15] 张颖,林力,刘光宇,等. 塞络通灌胃后人参皂苷在大鼠体内的药代动力学及脑分布研究[J]. *中国中药杂志*,2014,39(2):316.
  - [16] 邱楠楠,刘金平,卢丹,等. 紫红参提取物灌胃给予大鼠后入血成分研究[J]. *医药导报*,2014,33(1):16-19.
- ( 本文编辑 姚仁斌 )