

毛细管电泳法用于测定大鼠血浆中淫羊藿苷含量的研究

曾雪^{1,2,5}, 唐倩^{1△}, 徐颖倩¹, 刘应杰¹, 陈竹^{3,4}, 夏培元²

(1. 重庆医药高等专科学校药学院 401331; 2. 陆军军医大学西南医院药剂科 400050; 3. 重庆市食品药品检验检测研究院 401121; 4. 重庆市化学药品质量控制与评价协同评价中心 401121; 5. 重庆市药物制剂工程技术研究中心, 重庆 401331)

[摘要] **目的** 采用毛细管电泳法测定大鼠血清中淫羊藿苷的含量。**方法** 用乙酸乙酯萃取, 并采用甲醇沉淀的方法处理血浆, 以熔融石英毛细管柱(67.4 cm×75 μm, 有效长度 51 cm)为分离柱, 20 mmol/L 磷酸, 100 mmol/L SDS(20% 乙腈, 2% 2-丙醇)为缓冲溶液, pH=2.0, 检测波长 254 nm。**结果** 血清中淫羊藿苷线性范围 0.12~2.7 mg/mL, 精密度 RSD 为 1.7%, 重复性 RSD 为 3.7%, 加样回收率 RSD 为 3.29%。**结论** 毛细管电泳法方法简单, 结果准确, 重复性好, 可用于检测血清中淫羊藿苷的含量。

[关键词] 毛细管电泳; 淫羊藿苷; 含量测定

[中图分类号] R446.1

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2018)22-2948-03

Study on content determination of icariin in rat plasma by capillary electrophoresis

ZENG Xue^{1,2,5}, TANG Qian^{1△}, XU Yingqian¹, LIU Yingjie¹, CHEN Zhu^{3,4}, XIA Peiyuan²

(1. Chongqing medical and pharmaceutical college 401331; 2. Department of Pharmacy, Southwest Hospital, Army Medical University, Chongqing 400050, China; 3. Chongqing Municipal Institute for Food and Drug Control, Chongqing 401121, China; 4. Collaborative Evaluation Center for Chemical Medicine Quality Control and Evaluation, Chongqing 401121, China; 5. Chongqing Municipal Engineering Technology Research Center of Pharmaceutical Preparation, Chongqing 401331, China)

[Abstract] **Objective** To adopt the capillary electrophoresis method to determine plasma Icariin content. **Methods** The extraction used ethyl acetate and the methynol depositing was adopted to treat the plasma. The separation column was fused-silica capillary column (67.4 cm × 75 μm, effective length 51 cm). 20 mmol/L phosphoric acid and 100 mmol/L SDS (20% acetonitrile and 2% propanol ethyl carbinol served as the buffer solution, pH2.0, the detection wavelength was 254 nm. **Results** The linear range of icariin in serum was 0.12—0.27 mg/mL. RSD of precision was 1.7%. RSD of reproducibility was 3.7%. RSD of recovery rate was 3.29%. **Conclusion** The method is simple and accurate with good reproducibility, and can be used for the content determination of serum icariin.

[Key words] capillary electrophoresis; icariin; content determination

淫羊藿属于小檗科, 具有补肝肾、强筋骨、祛风湿、抗衰老、抑制肿瘤和提高免疫力等作用。目前, 国内外学者已经从淫羊藿属植物中分离鉴定出具有活性的黄酮类化合物 106 种, 主要是一类以羟基、甲氧基、羟氧基、异戊烯基等为取代基的 2-苯基色原酮衍生化合物。其中淫羊藿苷在人体内代谢成淫羊藿苷元, 对白细胞介素(IL)-8 和肿瘤坏死因子 α(TNF-α) mRNA 的产生有一定抑制作用, 并促进机体产生促成骨细胞生长的因子, 影响骨细胞的增殖, 提高碱性磷酸酶的活性, 从而达到治疗骨质疏松的目的^[1-5]。淫羊藿成分的分析多采用高效液相色谱法(HPLC), 该方法操作步骤多, 流动相处理复杂, 试剂量消耗大^[6-8]。高效毛细管电泳(HPCE)作为一种分离分析技术, 具有高灵敏度, 高分辨率, 缓冲溶液处理简单, 操作简便等优点, 有利于开展复杂生化样品的分析,

目前毛细管电泳技术配合不同的测试手段已经在天然产物化学中开展了的以黄酮化合物为主的多项研究^[9-11]。本文以 HPCE 为分析方法, 以十二烷基磺酸钠(SDS)为缓冲溶液添加剂, 建立检测血清中淫羊藿苷代谢物含量的方法^[12-15]。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SD 大鼠, 雄性, 体质量(200±20)g, 从重庆医科大学动物实验中心购买, 给药前 12 h 禁食, 自由饮水。

1.2 仪器与试剂 CL1020 高效毛细管电泳仪(紫外检测器, 中国北京彩陆科学仪器有限公司), GWA-UN1 型超纯水器(北京普析通用仪器有限公司), SK-1 涡旋混合器(常州国旺仪器制造有限公司), AUX220 电子天平(日本岛津)。CQ250 超声波清洗器(上海超声波仪器厂), TDG16 台式高速离心机

[屹谱仪器制造(上海)有限公司]。淫羊藿苷标准品(有效纯度 98.0%,批号 14110704,美仑生物科技有限公司),磷酸(分析纯,重庆精细化工工厂);2-丙醇(分析纯,重庆精细化工工厂);乙腈(优级纯,天津四友化工有限公司);十二烷基磺酸钠(SDS,相对分子量 272.38,美国);其他实验试剂均采用分析纯。

1.3 方法

1.3.1 对照品溶液制备 精密称取淫羊藿对照品 5 mg,置于 5 mL 容量瓶中,加 70%乙醇溶解并定容至刻度,摇匀。

1.3.2 动物实验 取 6 只健康雄性 SD 大鼠,取对照品溶液灌胃给药(剂量相当于对照品 0.2 mg/100 g),灌胃后分别于 0.15、0.5、1、2、3、4、5、6、8、12 h 尾静脉采血 0.2~0.4 mL,置于放有肝素的塑料离心管中,4 000 r/min 离心 10 min,取上层血浆置于 -20 °C 冰箱中保存备用。再取 3 只健康雄性 SD 大鼠,同法处理收集空白血浆备用。

1.3.3 血浆样品处理 取空白血浆 3 份约 0.5 mL 于 5 mL 塑料离心管中,直接加入对照品溶液 100 μ L,漩涡混合均匀,分别比较乙酸乙酯萃取-甲醇沉淀、甲醇和乙腈直接沉淀两种处理血浆的电泳图,最后确定使用乙酸乙酯萃取法-甲醇沉淀的方法处理血浆。

1.3.4 样品淫羊藿苷浓度测定 采用 75 μ m \times 67.4 cm 石英毛细管柱(有效长度 51 cm,河北永年瑞丰色谱配件有限公司);分离电压 20 kV;进样方式采用电动进样,进样电压 15 kV;进样时间 5 s;操作温度 25 °C;缓冲溶液 20 mmol/L 磷酸,100 mmol/L SDS (20%乙腈,2% 2-丙醇),pH2.0,检测波长 254 nm。

2 结果

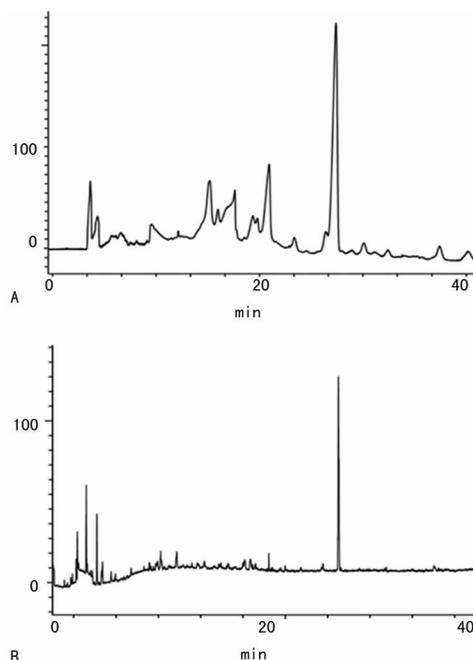
2.1 血浆样品处理方法考察 血浆处理方法有 3 种,甲醇直接沉淀法,甲醇、乙腈沉淀法,乙酸乙酯沉淀法。甲醇直接沉淀血浆,易出现乳化现象,首先排除。血浆中由于内源性干扰物较多,对比甲醇乙腈沉淀法和乙酸乙酯沉淀法,结果显示,采用乙酸乙酯萃取后,可明显减少内源性干扰物(见图 1)。故本试验先采用乙酸乙酯进行萃取,然后采用甲醇沉淀处理,具体操作:取“1.3.2”项下直接加入淫羊藿苷对照品溶液的空白血浆,加入 2.5 mL 乙酸乙酯,振荡萃取 3 min,离心(5 000 r/min,5 min),移取上清液,于 37 °C 水浴氮气吹干,残渣加入 100 μ L 甲醇漩涡振荡 1 min 溶解,高速离心(10 000 r/min,2 min),取上清液^[11-12]。

2.2 采血时间的考察 将“1.3.2”项下的大鼠灌胃给药后血样按“1.3.3”项下电泳条件进样,以成分峰响应值为指标,分析考察血药浓度达到最大的时间,作为淫羊藿苷代谢物含量测定时间(见图 2),结果显示,给药后 3 h 后,血药浓度达到峰值。

2.3 方法学考察

2.3.1 专属性试验 精密吸取实验方法“1.3.1”项下对照品溶液;实验方法“1.3.2”项下灌胃 SD 大鼠血

浆样品和“1.3.2”项下空白血浆各 0.5 mL,作为对照品溶液,供试品溶液和阴性对照溶液,按实验方法“1.3.3”项下电泳条件进行测定,记录电泳图(见图 3),结果显示阴性对照没有干扰峰,而供试品溶液的出峰时间相比对照品溶液有所后移,分析是因为淫羊藿苷在体内代谢成淫羊藿次苷 II 所致。



A: 甲醇+乙腈沉淀血浆; B: 乙酸乙酯萃取, 甲醇沉淀血浆
图 1 淫羊藿苷不同处理条件下的血浆 HPLC

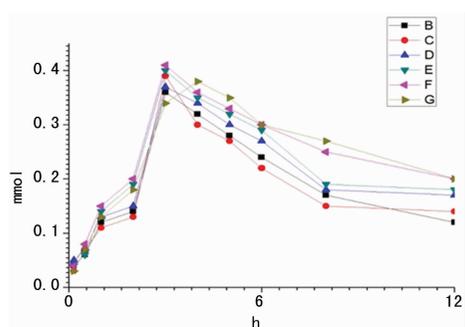
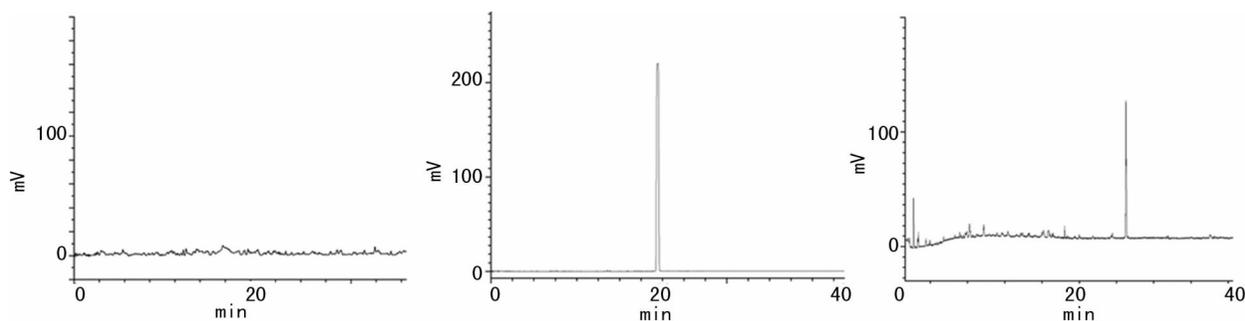


图 2 6 只 SD 大鼠体内不同时间淫羊藿苷电泳峰面积响应值

2.3.2 线性关系考察 取 5 份空白血浆样品 0.5 mL 于 10 mL 塑料离心管中,依次加入实验方法“1.3.1”项下对照品溶液 0.01、0.05、0.1、0.5、1 mL 漩涡混合均匀,先乙酸乙酯萃取,然后甲醇沉淀,取上清液,得质量浓度为 0.002、0.01、0.02、0.1、0.2 mg/mL 梯度血浆溶液,按实验方法“1.3.3”项下条件进行电泳测定,以淫羊藿苷质量浓度为横坐标(X),以电泳峰面积为纵坐标(Y)进行回归计算,得到回归方程为: $Y = 127\ 395X - 216\ 893$, $r = 0.998\ 7$ 。结果表明,淫羊藿苷在 0.12~2.7 mg/mL 范围内线性关系良好。

2.3.3 精密度试验 精密吸取实验方法“1.3.1”项下对照品溶液 0.5 mL 与实验方法“1.3.2”项下空白血浆中,按“结果 1”项下方法处理血浆,连续进样 6 次,测定电泳峰面积,计算淫羊藿苷峰面积 $RSD = 1.7\%$ 。



A: 阴性对照; B: 对照品溶液; C: 供试品溶液

图 3 专属性试验

2.3.4 重复性试验 另取 6 只健康雄性 SD 大鼠, 取实验方法“1.3.1”项下对照品溶液灌胃给药, 并于给药后 3 h 进行尾静脉采血, 按实验方法“1.3.2”项下要求进行血样处理, 按实验方法“1.3.3”项下要求进行电泳测定, 计算淫羊藿苷峰面积的 RSD 为 3.7%。

2.3.5 加样回收率试验 按实验方法“1.3.2”项下方法制备 6 份血浆样品各 0.5 mL, 按实验方法“1.3.3”项下方法进行电泳测定, 记录 6 份样品淫羊藿苷的电泳峰面积; 再依次向 6 份样品中加入等质量淫羊藿对照品 0.2 mg, 按实验方法“1.3.3”项下方法进行电泳测定, 记录 6 份样品中淫羊藿峰面积, 并计算加样回收率结果(表 1)。

表 1 回收率试验结果(n=6)

编号	加样前含量(mg)	加入量(mg)	加样后含量(mg)	加样回收率(%)	平均加样回收率(%)	RSD(%)
1	0.340 7	0.2	0.525 3	92.3	96.5	3.29
2	0.342 1	0.2	0.535 7	96.8		
3	0.305 1	0.2	0.507 6	101.3		
4	0.302 2	0.2	0.499 8	98.8		
5	0.327 9	0.2	0.517 5	94.8		
6	0.307 4	0.2	0.497 5	95.1		

2.4 含量测定 取 3 只健康雄性 SD 大鼠, 按实验方法“1.3.1”项下对照品溶液灌胃给药(剂量相当于对照品 0.2 mg/100 g), 灌胃后 3 h 采血, 并按实验方法“1.3.2”项下方法处理血浆, 按实验方法“2.3.1”电泳条件测定, 测得大鼠体内淫羊藿苷的含量(见表 2)。

表 2 大鼠体内淫羊藿苷含量

编号	大鼠体质量(g)	给药量(mg)	血药浓度(mg/mL)
1	218	0.435	0.13
2	207	0.414	0.14
3	213	0.426	0.12

3 讨 论

本研究目的是以 HPCE 为检测手段, 检测血清中淫羊藿代谢物的血药浓度, 为淫羊藿的体内药物分析提供新的方法和检测途径。

本文的检测对象是含药血液样本, 血液中内源性

干扰物多, 如果直接进行电泳分析, 会导致信噪比降低, 目标信号被噪音掩盖, 因此血液样本的前处理是关键, 前处理的目的是去除内源性物质同时不会影响目标物的检测, 本文比较了目前常用的 3 种血液处理方法, 最后采用乙酸乙酯萃取血浆, 甲醇沉淀的方法, 避免样品乳化现象的同时, 降低了内源性干扰物影响, 有效提高了信噪比。

本文对大鼠采用灌胃方式给药, 淫羊藿进入体内后受代谢过程影响, 血药浓度呈现连续变化过程, 为了准确测定淫羊藿血药浓度, 本试验连续测定了给药后 12 h 的大鼠血药浓度, 确定在灌胃给药后 3 h, 血药浓度达到峰值, 以此时间作为采样时间, 可降低检测结果的相对误差, 保证结果准确度。

淫羊藿苷给药后, 在大鼠体内是以代谢物形式存在, 分析代谢物可能是淫羊藿次苷 II, 本文并未采用淫羊藿次苷 II 为对照品, 而是采用淫羊藿苷为对照品, 比较了淫羊藿苷对照品的电泳图、空白血清电泳图和给药后血清电泳图, 证明了淫羊藿苷在体内代谢后仅仅是出峰时间出现延后, 但不妨碍定量分析。

淫羊藿苷及其代谢物分子接近电中性, 本文在缓冲溶液中加入 SDS, 调整 pH 到 2.0, 可增加待测组分带负点能力, 克服缓冲溶液电渗流, 利于电泳分离。但加样回收率试验 RSD 偏高, 分析原因可能是 SD 大鼠个体差异、给药方式等多种因素综合导致含药量差异偏大。除此之外, 进样方式存在系统误差, 进样量准确度偏低, 最终结果 RSD 偏高, 后期可通过更改进样方式解决。毛细管电泳方法简便, 试剂消耗量少, 与高效液相色谱相比, 不需要对流动相进行脱气和过滤处理, 仅采用以磷酸为主的缓冲溶液即可满足分析要求。在本文中, 淫羊藿苷在血浆中的含量随时间逐渐降低, 本文可实现 0.12 mg/mL 的定量分析, 具有较低定量限。同时相比于高效液相色谱, 不易堵塞柱子, 更适合生化样本的分析。

参考文献

- [1] 唐一甲, 杨菊云, 刘霆, 等. 肝康颗粒治疗慢性乙型肝炎的疗效观察[J]. 中国现代医学杂志, 2005, 15(20): 3193-3194, 3196.
- [2] 潘志伟, 王秋娟, 徐静, 等. 淫羊藿苷对(下转第 2955 页)

社会各方面压力的改变,这些压力是导致大学生亚健康的重要原因^[13],而高年级学生相对于低年级学生的某些压力更大,如学习压力、就业压力等,他们的亚健康程度较低年级大学生更重^[14];另外一个原因是,本研究并没有特别的要求大五六年级学生一定学习过养生康复知识,也没有排除大一年级学生里面有接触过养生知识的人群,以上因素会产生干扰和混杂。

综上所述,本研究提示中医专业知识对于改善大学生女性状况以及以女性状况为主的亚健康状态可能有一定的优势,它可能是女性状况以及以女性状况为主的亚健康状态的一个保护因素,值得将来进一步的研究加以验证。对于躯体状况、情志状况、生活状况、精力状况、禀赋状况、社会环境状况及以上表现为主的亚健康状态,尚不能得出中医专业知识的学习能有效改善上述情况的结论,需要进一步更有针对性的研究加以验证和解释。

参考文献

[1] LI G, XIE F, YAN S, et al. Subhealth: definition, criteria for diagnosis and potential prevalence in the central region of China[J]. BMC Public Health, 2013, 13: 446.

[2] CHEN J, CHENG J, LIU Y, et al. Associations between breakfast eating habits and health-promoting lifestyle, suboptimal health status in Southern China: a population based, cross sectional study[J]. J Transl Med, 2014, 12: 348.

[3] JIAN L B, HUANG Y, XIAO Y, et al. Association of lifestyle factors and suboptimal health status: a cross-sectional study of Chinese students[J]. BMJ Open, 2014, 4(6): e5156.

[4] PRICE J R, MITCHELL E, TIDY E, et al. Cognitive behaviour therapy for chronic fatigue syndrome in adults[J]. Cochrane Database Syst Rev, 2008(3): D1027.

[5] 杨菊香,涂春兰,李志峰,等. 治未病理念应用于亚健康人群体检中的健康促进效果观察[J]. 护理学报, 2014, 21(15): 61-64.

[6] 孙大中,修宗昌,胡嘉雯. 中医养生理论干预大学生亚健康状态的相关性研究[J]. 当代医学, 2015, 21(15): 163-164.

[7] 刘保延,何丽云,谢雁鸣,等. “亚健康状态调查问卷”的设计思想与内容结构[J]. 中国中医基础医学杂志, 2007, 13(05): 382-387.

[8] 姚万霞,刘键. 中医健康教育对痛经女生脉图的影响研究[J]. 辽宁中医杂志, 2008, 35(9): 1334-1335.

[9] 王博,王明闯,王忠民. 运用中医理论心理干预女大学生月经疾病[J]. 中医药临床杂志, 2015, 27(7): 907-910.

[10] 邹慧英. 健康教育用于崩漏患者的临床护理体会[J]. 中国伤残医学, 2014, 22(8): 287.

[11] 张翠英,石鹤峰,蔡永敏,等. 682 例亚健康状态与月经异常调查分析[J]. 辽宁中医杂志, 2009, 36(12): 2087-2089.

[12] 林晓生,王海燕,曾纪斌,等. 中医“治未病”综合干预对体检亚健康人群心理健康的影响[J]. 世界中西医结合杂志, 2014, 9(4): 399-401.

[13] CHEN J, XIANG H, JIANG P, et al. The role of healthy lifestyle in the implementation of regressing suboptimal health status among college students in China: A nested case-control study[J]. Int J Environ Res Public Health, 2017, 14(3): 240-258.

[14] 赵秀琴,赵连志,王晶,等. 医学生亚健康流行病学分布特征及影响因素[J]. 中国公共卫生, 2012, 28(3): 380-382.

(收稿日期:2018-02-04 修回日期:2018-05-22)

(上接第 2950 页)

大鼠离体心脏的作用及对血液流变学的影响[J]. 中国药科大学学报, 2007, 38(5): 429-432.

[3] 李翠玲,张玲,顾洪涛,等. 淫羊藿苷体内抑瘤作用及其机制[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 2007, 14(2): 137-142.

[4] 狄凯军,章静波. 国内外淫羊藿苷药理作用研究要览[J]. 自然杂志, 2003, 25(4): 191-196.

[5] 李梨. 淫羊藿苷对缺血再灌注致脑损伤保护作用的实验研究[D]. 重庆:重庆医科大学, 2005: 98-104.

[6] 沙明. 高效液相色谱法测定朝鲜淫羊藿中淫羊藿甙的含量[J]. 色谱, 1997, 15(2): 166-167.

[7] 王明权,毕志明,李萍,等. 高效液相色谱法测定淫羊藿中淫羊藿定 C 和淫羊藿苷的含量[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(11): 1025-1027.

[8] CHEN X J, GUO B L, LI S P, et al. Simultaneous determination of 15 flavonoids in Epimedium using pressurized liquid extraction and high-performance liquid chromatography[J]. J Chromatogr A, 2007, 1163(1/2): 96-104.

[9] 张静姝,余丽丽. 流动注射毛细管电泳测定益母草中 4 种

黄酮[J]. 西北大学学报(自然科学版), 2016(3): 381-384.

[10] 赵有轩,王敦青. 毛细管电泳在线富集技术在黄酮类化合物分析中的应用[J]. 化学试剂, 2016(4): 323-326.

[11] 王冠,唐苑融. 毛细管电泳安培检测在线富集分析生物胺研究[J]. 华东师范大学学报(自然科学版), 2016(1): 123-133.

[12] 丽娜,马莹慧,赵伟,等. 淫羊藿属植物中化学成分分析研究进展[J]. 中国新药杂志, 2013, 22(8): 919-922.

[13] 王雨,李亦捷. 淫羊藿苷在肿瘤细胞抑制方面的研究进展[J]. 中国中药指南, 2015(4): 50-51.

[14] LIU J, LOU Y. Determination of icariin and metabolites in rat serum by capillary zone electrophoresis: rat pharmacokinetic studies after administered of icariin[J]. J Pharm Biomed Anal, 2004, 36(2): 365-370.

[15] CHENG S F, WANG S. HPLC analysis and pharmacokinetics of icariin in rats[J]. J Sep Sci, 2007, 30(9): 1307-1312.

(收稿日期:2018-02-02 修回日期:2018-05-20)