

## 淫羊藿苷及其代谢产物在骨质疏松 模型大鼠肾脏组织中的分布

刘晓阳, 訾慧\*, 郑洪新, 张振秋\*, 李可强  
(辽宁中医药大学, 沈阳 110032)

**[摘要]** **目的:**探索骨质疏松模型大鼠灌胃给予淫羊藿苷后淫羊藿苷及其代谢产物在肾脏中分布情况。**方法:**按  $118 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  灌胃给予骨质疏松模型大鼠淫羊藿苷单体, 分别于 40 min, 1.5, 2.5, 4, 12, 24 h 取出肾脏组织, 经生物样品预处理后, 采用 HPLC 测定肾脏中淫羊藿苷及其代谢产物(淫羊藿次苷 I、淫羊藿次苷 II、淫羊藿素)的质量浓度, 流动相 0.4% 乙酸水溶液(A)-甲醇(B)梯度洗脱(0~11 min, 43% A; 12~30 min, 37% A; 31~46 min, 43% A), 检测波长 270 nm。**结果:**给药 40 min 后, 在肾脏组织中检测到淫羊藿苷( $0.0175 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )淫羊藿次苷 I( $0.0142 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )及淫羊藿次苷 II( $0.0127 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ); 给药 2.5 h 后, 淫羊藿苷( $0.1343 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )、淫羊藿次苷 I( $0.0804 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )及淫羊藿次苷 II( $0.1024 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )质量浓度均较高, 24 h 后基本消除; 2.5 h 检测到淫羊藿素( $0.0272 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 4 h 质量浓度较高( $0.0822 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 24 h 时仍存在( $0.0259 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )。**结论:**淫羊藿苷在大鼠肾脏中分布较快, 与其代谢产物共存于肾脏组织中, 具有较高的质量浓度并能维持一定时间, 提示其作用靶点可能为肾脏, 与中医学理论认为淫羊藿归肝、肾经相符合。建立的 HPLC 简便、快速, 为淫羊藿苷的体内研究提供参考。

**[关键词]** 淫羊藿苷; 淫羊藿次苷 I; 淫羊藿次苷 II; 淫羊藿素; 骨质疏松模型大鼠

**[中图分类号]** R282.4; R283.6; R945 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2014)17-0125-04

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfx.2014170125

**[网络出版地址]** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20140715.1342.016.html>

**[网络出版时间]** 2014-07-15 13:42

## Tissues Distribution of Icariin and Its Metabolites in Kidney of Osteoporosis Model Rats

LIU Xiao-yang, ZI Hui\*, ZHENG Hong-xin, ZHANG Zhen-qiu\*, LI Ke-qiang  
(Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore tissues distribution characteristics of icariin and its metabolites including icarisid I, icarisid II and icaritin in the kidney of osteoporosis model rats after intragastric administration of icariin. **Method:** Kidney tissues were gotten from rats in 40 min, 1.5, 2.5, 4, 12, 24 h after intragastric administration of icariin with dosage of  $118 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ . After pretreated biological samples, HPLC was employed to determine contents of icariin and its metabolites with mobile phase of 0.4% aqueous acetic acid (A)-methanol (B) for gradient elution (0-11 min, 43% A; 12-30 min, 37% A; 31-46 min, 43% A) and detection wavelength at 270 nm. **Result:** At 40 min after intragastric administration, icariin ( $0.0175 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ), icarisid I ( $0.0142 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) and icarisid II ( $0.0127 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) could be checked out; these ingredients reached high concentrations at 2.5 h and eliminated basically after 24 h. Icaritin was checked out at 2.5 h and arrived the high concentration at 4 h, but it still existed at 24 h. **Conclusion:** Icariin distributed fast and coexisted

**[收稿日期]** 20131224(012)

**[基金项目]** 中国博士后科学基金项目(20110491541)

**[第一作者]** 刘晓阳, 硕士, 从事中药分析研究, Tel: 15840302159, E-mail: 1046030713@qq.com

**[通讯作者]** \* 张振秋, 教授, 博士生导师, 从事中药质量标准研究, Tel: 0411-85896199, E-mail: zhangzhenqiu@sina.com;

\* 訾慧, 博士后, 从事中药小复方物质基础研究, Tel: 13940431196, E-mail: cihui@126.com

with its metabolites in the kidney of rats, these ingredients had higher concentrations and maintained a certain period of time in the kidney, which pointed their target may be the kidney, it matched the Chinese medicine theory that Epimedii Folium went through the liver and kidney. This established method was accurate and fast, which could provide a reference for *in vivo* pharmacokinetic research of icariin.

[Key words] icariin; icarisid I; icarisid II; icaritin; osteoporosis model rats

淫羊藿又名仙灵脾,具有补肾阳、强筋骨、祛风湿等功效<sup>[1]</sup>。淫羊藿苷作为其药效活性成分,具有抗肿瘤<sup>[2]</sup>、延缓衰老、抗痴呆<sup>[3]</sup>、改善心血管系统<sup>[4]</sup>、抗骨质疏松<sup>[5]</sup>等作用。淫羊藿苷在大鼠体内会代谢为淫羊藿次苷 I、淫羊藿次苷 II 及淫羊藿素等<sup>[6]</sup>,这些代谢产物亦具有一定药理活性。近年关于淫羊藿苷及其代谢产物的药代动力学研究逐渐增多<sup>[7-10]</sup>,但尚无关于生物体内淫羊藿苷及其代谢产物共 4 种物质同时测定的报道。本实验利用 HPLC 同时测定大鼠体内淫羊藿苷及其代谢产物的含量,并对这 4 种物质在大鼠肾脏中分布情况进行考察,为淫羊藿苷制剂的开发提供参考。

## 1 材料

LC-20AT 型高效液相色谱仪 (SPD-20A 型紫外检测器,日本岛津),TD-25 型电子分析天平(美国丹佛仪器北京有限公司),TGL-16C 型高速离心机(上海安亭科学仪器厂),WX-80A 微型涡旋混合仪(上海沪西分析仪器厂),FJ-200 型高速分散均质机(上海标本模型厂)。

淫羊藿苷、大黄素对照品(中国食品药品检定研究院,纯度均 >98%,批号分别为 110737-200415,110756-200110),淫羊藿次苷 I、淫羊藿次苷 II、淫羊藿素对照品(上海融禾医药科技有限公司,纯度均 >98%,批号分别为 121020,121117,121102),甲醇、乙腈均为色谱纯,水为超纯水,其他试剂均为分析纯。

SPF 级雌性大鼠 48 只,体重(200.0 ± 10.0)g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号 1100170659。试验前 1 周放入实验室饲料,实验室温度(20 ± 2)℃,相对湿度(60 ± 5)%,给予标准实验室,自由饮水,试验前禁食过夜。

## 2 方法与结果

**2.1 造模** 取 SPF 级雌性大鼠,采用卵巢摘除术将双侧卵巢完全摘除,3 个月后,大鼠因雌激素缺乏而导致骨质疏松,说明造模基本成立。

**2.2 给药及组织样品采集方案** 取骨质疏松模型大鼠 42 只,随机等分为 6 个试验组及空白对照组。

给药前禁食 12 h,空白对照组给予生理盐水,给药组按剂量 118 mg·kg<sup>-1</sup> 对大鼠灌胃给予淫羊藿苷,分别在给药前和给药后 40 min,1.5,2.5,4,12,24 h 眼眶静脉取血后处死(血液待用),解剖采集各组织器官,用生理盐水冲净残留血液及内容物后,用滤纸吸干水分,称重,用剪刀将其剪成小块并搅拌均匀,加入 0.5 g·mL<sup>-1</sup> 生理盐水溶液制备匀浆,组织匀浆样品于 -20℃ 保存待测。

**2.3 组织样品的预处理** 样品解冻,取匀浆液 200 μL,加入 0.1 mol·L<sup>-1</sup> 盐酸、甲醇、乙腈及 0.040 2 g·L<sup>-1</sup> 大黄素 100,200,200,100 μL,涡旋震荡 5 min,离心(1 万 r·min<sup>-1</sup>,10 min,下同),经 0.22 μm 微孔滤膜滤过,吸取续滤液进样。

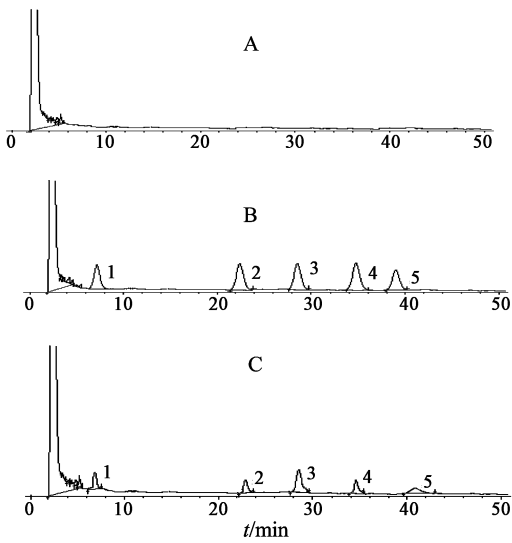
**2.4 色谱条件** Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),柱温 40℃,流动相 0.4% 乙酸水溶液(A)-甲醇(B)梯度洗脱(0~11 min,43% A;12~30 min,37% A;31~46 min,43% A),流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,检测波长 270 nm,定量环进样 20 μL。

**2.5 溶液的配制** 精密称取淫羊藿苷,淫羊藿次苷 I,淫羊藿次苷 II,淫羊藿素对照品适量,分别置于不同 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并定容,依次得 0.262,0.267,0.235,0.261 g·L<sup>-1</sup> 对照品溶液。精密称取大黄素对照品适量,加甲醇溶解并定容,摇匀,得 0.040 2 g·L<sup>-1</sup> 的内标溶液。所有溶液于 4℃ 密避保存,备用。

## 2.6 分析方法的建立与验证

**2.6.1 专属性试验** 取大鼠空白组织(肾脏)样品、空白肾脏加对照品溶液及内标溶液、灌胃后肾脏组织样品加内标溶液,按 2.4 项下色谱条件测定,见图 1。结果表明在大鼠肾脏组织中对照品与内标色谱峰分离良好,不受内源性物质干扰。

**2.6.2 标准曲线的制备** 取大鼠空白组织匀浆上清液 9 份,每份 200 μL,加入各对照品溶液和内标溶液 100 μL,按 2.3 项下方法处理,按 2.4 项下色谱条件测定,以质量浓度为横坐标,指标成分与内标的峰面积比为纵坐标,采用加权最小二乘法进行回归计算<sup>[11]</sup>,结果见表 1。



A. 空白组织; B. 空白组织 + 对照品 + 内标;  
C. 组织样品 + 内标; 1. 淫羊藿苷; 2. 淫羊藿次苷 I;  
3. 淫羊藿次苷 II; 4. 淫羊藿素; 5. 大黄素(内标)

图 1 大鼠灌胃给予淫羊藿苷后肾脏匀浆液 HPLC

表 1 淫羊藿苷及其代谢产物的回归方程、相关系数和线性范围

成分	回归方程	r	线性范围/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
淫羊藿苷	$Y = 0.4848X + 0.0287$	0.9942	0.012793 ~ 3.750
淫羊藿次苷 I	$Y = 0.4868X + 0.0143$	0.9974	0.013037 ~ 3.375
淫羊藿次苷 II	$Y = 0.7718X + 0.0078$	0.9983	0.011475 ~ 2.375
淫羊藿素	$Y = 0.3539X + 0.0186$	0.9974	0.025488 ~ 3.625

**2.6.3 提取回收率** 取大鼠空白组织匀浆上清液 200  $\mu\text{L}$ , 按 2.6.2 项下操作制备淫羊藿苷、淫羊藿次苷 I、淫羊藿次苷 II、淫羊藿素的低、中、高质量浓度的模拟生物样品 ( $n = 3$ ), 按 2.4 项下色谱条件测定, 记录峰面积 ( $A_i$ ); 另取空白组织匀浆上清液 200  $\mu\text{L}$ , 按 2.3 项下方法操作, 取上清液, 分别加入淫羊藿苷, 淫羊藿次苷 I, 淫羊藿次苷 II, 淫羊藿素低、中、高质量浓度的对照品溶液 100  $\mu\text{L}$  ( $n = 3$ ), 涡旋震荡 5 min, 离心后进样分析, 记录峰面积 ( $A_r$ ), 按  $A_i/A_r$  计算平均提取回收率分别为 86.2%, 89.6%, 83.9%, 84.0%, RSD 依次为 4.5%, 3.0%, 4.5%, 3.5%, 均符合定量要求。同法考察内标的提取回收率 88.7%, RSD 3.2%。

**2.6.4 精密度与准确度** 取大鼠空白组织匀浆液 200  $\mu\text{L}$ , 按 2.6.2 项下方法制备低、中、高质量浓度的模拟生物样品, 同日内按 2.4 项下色谱条件测定, 记录峰面积比值, 每个质量浓度进行六样本分析, 测定日内精密度, 重复操作, 连续进样 3 d。结果淫羊藿苷, 淫羊藿次苷 I, 淫羊藿次苷 II, 淫羊藿素的日

内精密度 RSD 依次为 3.2%, 3.1%, 3.3%, 3.9%, 准确度 RSD 依次为 3.3%, 3.0%, 3.3%, 3.9%; 日间精密度和准确度 RSD 均依次为 4.4%, 3.4%, 3.9%, 4.4%, 符合生物样品分析要求。

**2.6.5 稳定性试验** 将高、中、低 3 个质量浓度的模拟生物样品于常温下保存 12 h, 将模拟生物样品置于  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  环境中, 取出后于室温下自然融解, 再置于  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  环境中, 经过 3 个冻融-冷冻循环后每个质量浓度取 3 个样本进行测定; 将模拟生物样品于  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  保存 30 d 后进行 3 个冻融-冷冻循环, 每个质量浓度取 3 个样本进行测定。结果淫羊藿苷, 淫羊藿次苷 I, 淫羊藿次苷 II, 淫羊藿素短期稳定性 RSD 依次为 4.1%, 3.8%, 4.0%, 4.5%, 长期稳定性 RSD 依次为 3.8%, 4.4%, 4.4%, 4.0%, 表明处理好的组织样品在 2 个时间段内均可保持稳定, 未发生明显的降解反应。

**2.7 样品测定** 大鼠按剂量  $118\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  灌胃给予淫羊藿苷后, 取不同时间点 (40 min, 1.5, 2.5, 4, 12, 24 h) 的组织匀浆样品, 按 2.3 项下方法处理, 按 2.4 项下方法测定淫羊藿苷及其代谢产物在大鼠肾脏中质量浓度, 结果见图 2。

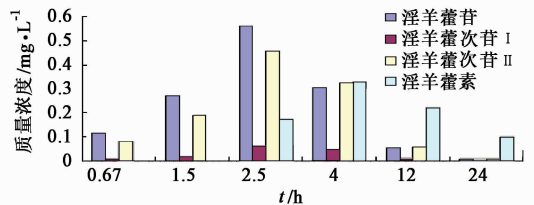


图 2 大鼠灌胃给予淫羊藿苷后肾脏中淫羊藿苷及其代谢产物的药-时关系 ( $n = 6$ )

### 3 讨论

由图 2 可知, 淫羊藿苷及代谢产物在肾脏中有较高的富集。给药后药物迅速分布至大鼠肾脏中, 给药 40 min 后, 淫羊藿苷及淫羊藿次苷 I、淫羊藿次苷 II 已被检测, 2.5 h 后这 3 种成分质量浓度较高, 4 h 后质量浓度均显著下降, 给药后 12 h 各成分质量浓度较先前大幅下降, 24 h 后药物基本消除。给药 2.5 h 后检测到淫羊藿素, 4 h 后质量浓度较高, 之后逐渐降低, 24 h 时仍存在。前期研究对淫羊藿苷血药浓度随时间的变化趋势进行考察, 发现其体内分布情况呈二室开放模型, 与在肾脏组织中代谢趋势基本相同。淫羊藿苷及其代谢产物在肾脏组织中质量浓度较高并能维持一定时间, 提示其作用靶点可能是肾脏, 这与中医学传统理论认为淫羊

藿归肝、肾经,具有补肾阳、强筋骨的作用相符合,可为淫羊藿的药效学研究提供参考。

本实验建立了 HPLC 同时测定大鼠肾脏中淫羊藿苷及其代谢产物含量的方法,各指标成分与肾脏中其他成分完全分离,方法简单,精密度好,灵敏度高,不受杂质峰影响,测定结果不易被干扰。预试验对内标物进行了考察,包括汉黄芩苷、野黄芩苷、补骨脂素、欧前槲素、木犀草素、苯甲酸等,结果只有大黄素保留时间适宜,出峰位置无干扰,在 270 nm 处具有较高的吸收度,符合内标物选择原则。

预试验对乙酸乙酯、甲醇、乙腈等除蛋白效果进行考察,结果显示甲醇和乙腈的混合溶剂效果较好,提取回收率优于乙酸乙酯,故选甲醇和乙腈作为提取溶剂。在选择流动相时,曾对甲醇-水和乙腈-水 2 个系统进行考察,结果发现甲醇-水梯度洗脱对淫羊藿苷及其代谢产物的分离效果较好,保留时间适宜。检测波长分别考察了 245, 270, 350 nm,结果显示在 270 nm 处内标物、淫羊藿苷及其代谢产物均具有较高的响应值,测量结果较好。

#### [参考文献]

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典. 一部[S]. 北京:中国医药科技出版社,2010:306.
- [2] 杜道兵,卢万根,曹丛仁,等. 淫羊藿苷促进宫颈癌

- TC-1 细胞凋亡作用的研究[J]. 现代生物医学进展, 2011,11(4):646.
- [3] 龚其海,杨丹莉,石京山,等. 淫羊藿苷的神经药理作用及分子机制研究进展[J]. 中国新药与临床杂志, 2011,30(7):481.
- [4] 夏国莲,黄兆铨. 淫羊藿对心血管系统药理作用的研究新进展[J]. 中华中医药学刊,2010,28(8):1676.
- [5] 刘波,张睿,徐彭,等. 淫羊藿对去卵巢大鼠骨质疏松的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2013,19(7):178.
- [6] 贾晓斌,钱浅,孙娥,等. 淫羊藿黄酮药代动力学研究进展[J]. 中成药,2012,34(11):2193.
- [7] 刘海培,孟繁华,郭继芬,等. 高效液相色谱-串联质谱法测定大鼠血浆中淫羊藿素[J]. 药化学报,2009,44(10):1140.
- [8] 叶丽卡,陈济民,刘四海,等. 淫羊藿苷在大鼠体内的药代动力学[J]. 临床药学,1999,34(1):33.
- [9] 刘子琛,徐英,陈世忠. 淫羊藿次苷 I 在大鼠体内的药动学和组织分布研究[J]. 中国药学杂志,2008,43(11):848.
- [10] 张依,姚志红,秦子飞,等. LC-MS/MS 测定家兔胆汁中淫羊藿次苷 II[J]. 暨南大学学报:自然科学版, 2012,33(3):305.
- [11] 钟大放. 以加权最小二乘法建立生物分析标准曲线的若干问题[J]. 药物分析杂志,1996,16(5):343.

[责任编辑 刘德文]