

淫羊藿苷在不同条件下的降解动力学行为

陶俊烨¹， 丁选胜^{1*}， 吴正红^{2*}， 丁雨寅¹， 宋征宇¹， 王勤¹

(1. 中国药科大学基础医学与临床药学院, 江苏南京 211100; 2. 中国药科大学药学院, 江苏南京 211100)

摘要: 目的 考察淫羊藿苷在不同条件 (pH、温度、缓冲液) 下的降解动力学行为。方法 HPLC 法测定淫羊藿苷含有量后, 计算其在不同 pH (1.0、3.0、4.5、6.0、6.8、8.0)、温度 (4、25、37、60 °C)、缓冲液 (0.1、0.3、0.5 mol/L 磷酸盐、柠檬酸盐、醋酸盐) 下的降解动力学参数。结果 淫羊藿苷降解符合一级动力学方程, 在 pH 6.8 时降解速率最小, 稳定性最强。其降解速率随着温度、磷酸盐浓度升高而增加, 随着醋酸盐浓度升高而降低, 在不同浓度柠檬酸盐缓冲液中无明显变化。结论 淫羊藿苷降解与 pH、温度、缓冲液有一定关系。

关键词: 淫羊藿苷; 降解动力学行为; pH; 温度; 缓冲液; HPLC

中图分类号: R94

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2019)08-1763-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2019.08.002

Degradation kinetic behaviors of icariin under different conditions

TAO Jun-ye¹， DING Xuan-sheng^{1*}， WU Zheng-hong^{2*}， DING Yu-yin¹， SONG Zheng-yu¹，
WANG Qin¹

(1. School of Basic Medicine and Clinical Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211100, China; 2. School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211100, China)

ABSTRACT: AIM To investigate the degradation kinetic behaviors of icariin under different conditions (pH, temperature, buffer). **METHODS** HPLC was adopted in the content determination of icariin, after which the degradation kinetic parameters under different pH values (1.0, 3.0, 4.5, 6.0, 6.8, 8.0), temperatures (4, 25, 37, 60 °C) and buffers (0.1、0.3、0.5 mol/L phosphates, citrates, acetates) were calculated. **RESULTS** The degradation of icariin accorded with first-order kinetic equation, whose minimum degradation rate and strongest stability were observable at the pH value of 6.8. The degradation rate was elevated with the increase of temperature and phosphate concentration, and reduced with the increase of acetate concentration, which demonstrated no obvious changes in different concentrations of citrate buffers. **CONCLUSION** The degradation of icariin has certain relationships with pH, temperature and buffer.

KEY WORDS: icariin; degradation kinetic behaviors; pH; temperature; buffer; HPLC

淫羊藿苷是从淫羊藿干燥叶中提取出的有效成分之一, 具有促进骨代谢^[1]、增强生殖功能^[2-3]等多种药理作用, 近年来该成分对心血管疾病的改善作用逐渐被人们所重视^[4], 同时它对糖尿病及其并发症也有一定疗效^[5]。但淫羊藿苷在水中的溶解性较低^[6], 故在一定程度上限制了相关新药的

开发。

目前, 已有关于淫羊藿苷稳定性和溶解度的报道^[6-7], 但对其降解动力学的研究还比较少。由于人体胃肠道中具有不同的 pH 和化学环境^[8], 本实验将探究淫羊藿苷在不同 pH 缓冲液中的稳定性, 以及在不同 pH、温度、缓冲液中的降解动

收稿日期: 2018-11-01

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目 (2017ZX09301004)

作者简介: 陶俊烨 (1995—), 男, 硕士生, 从事糖尿病肾病研究。Tel: 15189807579, E-mail: 1205567483@qq.com

* 通信作者: 丁选胜 (1962—), 男, 教授, 博士生导师, 从事药理学和新药研究。Tel: 13357823738, E-mail: dxs0162@sina.com

吴正红 (1966—), 男, 教授, 博士生导师, 从事缓控制剂与微粒载药系统研究。E-mail: zhenghongwu66@126.com

力学行为, 以期为该成分进一步开发应用提供参考。

1 材料

SPD20-A 高效液相色谱仪(配置 LC-20AT 溶剂输送泵、UV-VIS 检测器、Rheodyne 7725i 手动进样阀、LC Solution 工作站, 日本岛津公司); RPL-D2000 柱温箱(大连日普利科技仪器有限公司); PHS-3C 雷磁 PH 计(上海仪电科学仪器股份有限公司); CPA225D 电子天平[赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]; ZYC-200B 恒温摇床(上海溪乾仪器设备有限公司); 80-2 电动离心机(常州国宇仪器制造有限公司); DF-101SA-H 集热式恒温加热磁力搅拌器(南京科尔仪器设备有限公司); 超声波清洗机(上海比朗仪器制造有限公司)。

淫羊藿苷原料药(陕西锦泰生物工程有限公司, 批号 JT171010, 含有量>98%); 淫羊藿苷对照品(中国食品药品检定研究院, 批号 110737-201516, 含有量 94.2%)。盐酸(南京化学试剂股份有限公司, 批号 170320098H, 含有量 36%~38%); 氢氧化钠(西陇化工股份有限公司, 批号 1112021); 十二水合磷酸氢二钠(西陇科学股份有限公司, 批号 171221); 磷酸二氢钠(批号 030210109)、一水合枸橼酸(批号 150505182K)、三水合枸橼酸三钠(批号 160306063U)、乙酸(批号 171012355F)(南京化工试剂股份有限公司); 无水乙酸钠(国药集团化学试剂有限公司, 批号 20170301); 甲醇(批号 21171001)、乙腈(批号 011370501)为色谱纯(上海星可高纯溶剂有限公司)。

2 方法与结果

2.1 淫羊藿苷含有量测定

2.1.1 色谱条件 Hedera ODS-2 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相乙腈-水(3.4:6.6); 检测波长 270 nm; 体积流量 1.0 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$; 进样量 20 μL 。

2.1.2 溶液制备 精密称取淫羊藿苷对照品 20 mg 于小烧杯中, 少量甲醇溶解后移入 100 mL 量瓶中, 甲醇定容至 0.2 mg/mL, 即得对照品溶液。精密称取淫羊藿苷原料药 20 mg, 甲醇制成每 1 mL 含 0.4 mg 该成分的溶液, 即得供试品溶液。

2.1.3 线性关系考察 按照 2015 年版《中国药典》^[9]方法, 精密量取对照品贮备液 2.5、5.0、10.0、20.0 mL, 置于 50 mL 量瓶中, 流动相稀释

并定容, 摆匀, 得 10、20、40、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 对照品溶液, 将 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶液分别稀释 2、4 倍, 得到 2.5、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 0.45 μm 有机系滤头过滤, 取中间段续滤液, 在“2.1.1”项色谱条件下进样 20 μL 测定, 每个质量浓度进行 3 次。以溶液质量浓度为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(Y)进行回归, 得方程为 $Y=51\ 919X+49\ 687$ ($r=0.999\ 8$), 在 2.5~80 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内线性关系良好。

2.1.4 专属性考察 取流动相、供试品溶液、对照品溶液, 在“2.1.1”项色谱条件下进样 20 μL 测定, 再取配制好的 400 μL 母液, 稀释 1 倍后加入人工肠液和大鼠回肠液以加速其降解, 在选定时间取 20 μL , 在“2.1.1”项色谱条件下进样测定, 结果见图 1。由图可知, 淫羊藿苷峰型良好, 溶剂峰不产生干扰, 降解产物无干扰^[10]。

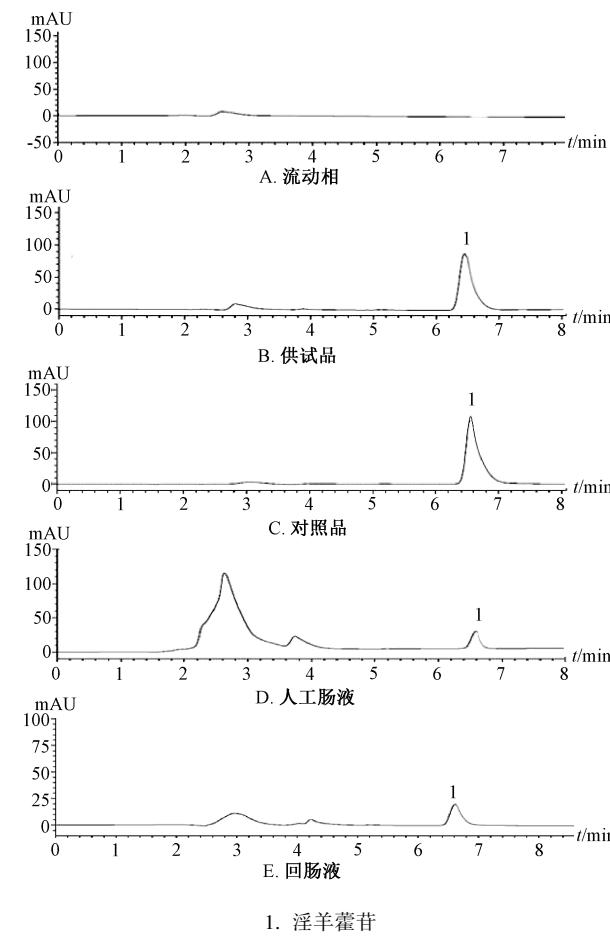


图 1 淫羊藿苷 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of icariin

2.1.5 精密度试验 取对照品溶液, 在“2.1.1”项色谱条件下进样测定 6 次, 测得淫羊藿苷峰面积 RSD 为 0.6%, 表明仪器精密度良好。

2.1.6 加样回收率试验 精密称取对照品 1.6、2.0、2.4 mg, 置于 10 mL 量瓶中, 甲醇溶解并稀释至刻度, 量取 5 mL 至 50 mL 量瓶中, 流动相稀释至 20、40、80 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 在“2.1.1”项色谱条件下进样测定 3 次, 测得淫羊藿苷平均加样回收率为 99.86%, RSD 为 1.59%。

2.1.7 检测限考察 对照品溶液用流动相逐步稀释, 在“2.1.1”项色谱条件下进样测定, 以峰高接近基线噪音 3 倍时的质量浓度为检测限, 测得其为 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

2.1.8 缓冲液配制^[10-12]

2.1.8.1 磷酸盐缓冲液(调节 pH 用) 磷酸二氢钠溶液: 精密称取磷酸二氢钠 24.00 g, 加水溶解后置于 1 000 mL 量瓶中, 定容至刻度, 即得 (0.2 mol/L)。

磷酸氢二钠溶液, 精密称取十二水合磷酸氢二钠 71.63 g, 加水溶解后置于 1 000 mL 量瓶中, 定容至刻度, 即得 (0.2 mol/L)。

然后, 将 2 种溶液按照一定比例混合, 再用盐酸和氢氧化钠溶液调节 pH (微量, 几乎不影响体积), 即得 (0.2 mol/L)。

2.1.8.2 磷酸盐缓冲液(测定动力学参数用)

磷酸二氢钠溶液, 精密称取磷酸二氢钠 1.2、3.6、6.0 g, 加水溶解后置于 100 mL 量瓶中, 定容至刻度, 即得 (0.1、0.3、0.5 mol/L)。

磷酸氢二钠溶液, 精密称取十二水合磷酸氢二钠 3.58、10.74、17.91 g, 加水溶解后置于 100 mL 量瓶中, 定容至刻度, 即得 (0.1、0.3、0.5 mol/L)。

然后, 将 2 种溶液按照一定比例混合, 氢氧化钠或盐酸调 pH, 即得 (0.1、0.3、0.5 mol/L)。

2.1.8.3 醋酸盐缓冲液 醋酸钠溶液, 精密称取醋酸钠 0.82、2.46、4.10 g, 加水溶解后置于 100 mL 量瓶中, 定容至刻度, 即得 (0.1、0.3、0.5 mol/L)。

醋酸溶液, 精密量取冰醋酸 0.57、1.7、2.85 mL, 加水溶解后置于 100 mL 量瓶中, 定容至刻度, 即得 (0.1、0.3、0.5 mol/L)。

然后, 将 2 种溶液按照一定比例混合, 氢氧化钠溶液调 pH, 即得 (0.1、0.3、0.5 mol/L)。

2.1.8.4 柚橼酸盐缓冲液 柚橼酸溶液, 精密称取一水合枸橼酸 2.10、6.30、10.5 g, 加水溶解后置于 100 mL 量瓶中, 定容至刻度, 即得 (0.1、0.3、0.5 mol/L)。

枸橼酸钠溶液, 精密称取三水合枸橼酸钠 3.12、9.36、15.6 g, 加水溶解后置于 100 mL 量瓶中, 定容至刻度, 即得 (0.1、0.3、0.5 mol/L)。

然后, 将 2 种溶液按照一定比例混合, 氢氧化钠或盐酸调 pH, 即得 (0.1、0.3、0.5 mol/L)。

2.2 淫羊藿苷稳定性研究 取淫羊藿苷适量, 甲醇溶解并定容至刻度, 制成每 1 mL 含 400 μg 该成分的溶液, 精密量取 8 份, 每份 1 mL, 置于 10 mL 量瓶中, 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液稀释至刻度, 调 pH 为 1、2、3、4、5、6、7、8, 摆匀, 避光, 在 25 ℃ 下放置。然后, 于第 0、2、4、6、8、12、24 h 取样, 在“2.1.1”项色谱条件下进样测定, 计算保留率, 公式为保留率 = $C_t/C_0 \times 100\%$, 其中 C_t 为淫羊藿苷处理后质量浓度, C_0 为淫羊藿苷初始质量浓度。结果见图 2。

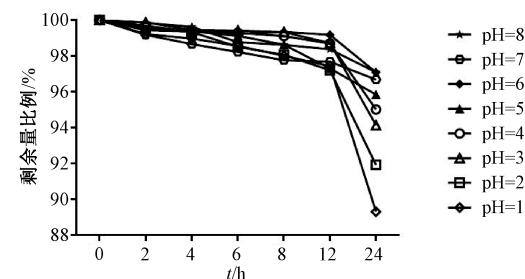


图 2 淫羊藿苷保留率
Fig. 2 Retention rates of icariin

由图可知, 12 h 内淫羊藿苷在 pH 1~8 磷酸盐缓冲液中的稳定性相对良好, 保留率都在 97% 以上, 并随着 pH 增大呈逐渐上升的趋势; 24 h 后, 淫羊藿苷保留率均有所下降, 在酸性条件下更明显。

2.3 淫羊藿苷降解动力学研究

2.3.1 pH 值 取淫羊藿苷适量, 甲醇溶解并定容至刻度, 制成每 1 mL 含 400 μg 该成分的溶液, 精密量取 1 mL 至 10 mL 量瓶中, 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液稀释至刻度, 调 pH 为 1、3、4.5、6、6.8、7、8 (由于胃肠道中 pH 不同, 故选取几个与人体胃肠道中不同部位 pH 相似的点), 摆匀, 分装于 6 mL 西林瓶中, 密封, 于 0、6、12、36、60、72 h 取样。然后, 以降解一定时间后淫羊藿苷剩余浓度对数 ($\ln C$) 对时间 (t) 作图, 再按反应动力学方法计算反应级数及表观降解速率常数 (K), 结果见图 3、表 1。

由图 3 可知, 降解曲线具有线性, 基本符合一级动力学降解过程 ($R^2 > 0.8600$); 由图 3、表 1

可知, 淫羊藿昔在 pH 6.8 时降解速率最小, 稳定性最强。

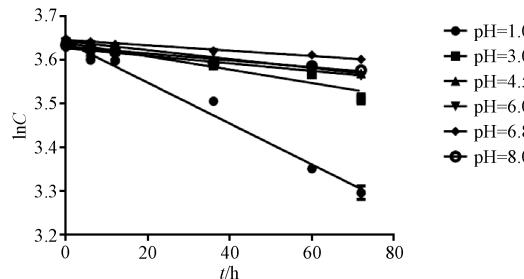


图 3 淫羊藿昔在不同 pH 下的降解曲线

Fig. 3 Degradation curves for icariin under different pH values

表 1 淫羊藿昔在不同 pH 下的动力学参数

Tab. 1 Kinetic parameters for icariin under different pH values

pH	动力学方程	K	R^2
1.0	$\ln C = -0.004676t + 3.641$	0.004676	0.9814
3.0	$\ln C = -0.001531t + 3.639$	0.001531	0.9176
4.5	$\ln C = -0.000869t + 3.627$	0.000869	0.8679
6.0	$\ln C = -0.001021t + 3.643$	0.001021	0.9594
6.8	$\ln C = -0.000611t + 3.646$	0.000611	0.9619
8.0	$\ln C = -0.000789t + 3.631$	0.000789	0.9373

2.3.2 温度 取淫羊藿昔适量, 甲醇溶解并定容至刻度, 制成每 1 mL 含 400 μg 该成分的溶液, 精密量取 1 mL 至 10 mL 量瓶中, 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液定容至刻度, 调节 pH 为 6.8, 密封, 在 4、25、37、60 $^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴中加热, 于 0、12、24、36、48、60 h 取样。然后, 将峰面积代入标准曲线计算质量浓度, 以某温度降解一定时间后淫羊藿昔剩余浓度对数 ($\ln C$) 对时间 (t) 作图, 结果见图 4、表 2。

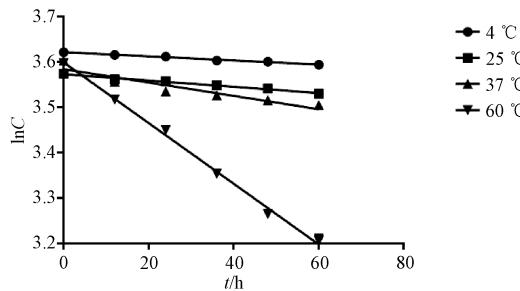


图 4 淫羊藿昔在不同温度下的降解曲线

Fig. 4 Degradation curves for icariin under different temperatures

由此可知, pH 为 6.8 时, 淫羊藿昔在不同温度下的降解均为一级反应, 而且温度越高, 降解速率越快。

表 2 淫羊藿昔在不同温度下的动力学参数

Tab. 2 Kinetic parameters for icariin under different temperatures

温度/°C	动力学方程	K	R^2
4	$\ln C = -0.000456t + 3.622$	0.000456	0.9562
25	$\ln C = -0.000687t + 3.573$	0.000687	0.9329
37	$\ln C = -0.001471t + 3.584$	0.000869	0.8661
60	$\ln C = -0.006687t + 3.599$	0.006687	0.9954

2.3.3 缓冲液 精密称取淫羊藿昔适量, 甲醇溶解并定容至刻度, 制成每 1 mL 含 400 μg 该成分的溶液, 精密量取 1 mL 至 10 mL 量瓶中, 0.1、0.3、0.5 mol/L 磷酸盐、柠檬酸盐、醋酸盐缓冲液定容至刻度, 调 pH 为 6.8, 摆匀, 分装入 6 mL 西林瓶中, 密封。然后, 将峰面积代入标准曲线计算质量浓度, 以降解一定时间后淫羊藿昔的剩余浓度对数 ($\ln C$) 对时间 (t) 作图, 再将缓冲降解所对应的 K 值绘图, 结果见图 5~6、表 3。

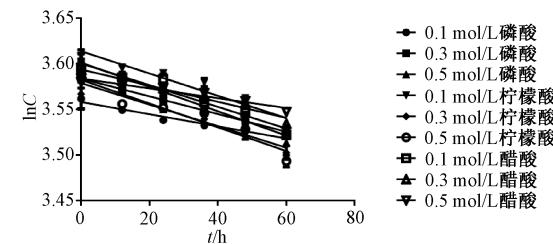


图 5 淫羊藿昔在不同缓冲液中的降解曲线

Fig. 5 Degradation curves for icariin in different buffers

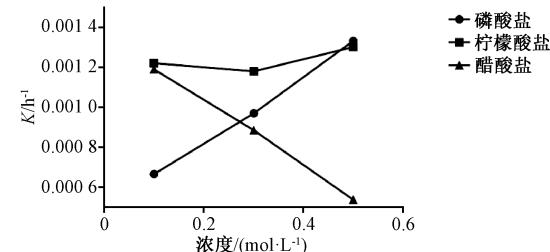


图 6 不同缓冲液对淫羊藿昔降解速率的影响

Fig. 6 Effects of different buffers on the degradation rate of icariin

表 3 淫羊藿昔在不同缓冲液中的动力学参数

Tab. 3 Kinetic parameters for icariin in different buffers

缓冲液	动力学方程	K	R^2
0.1 mol/L 磷酸盐	$\ln C = -0.000666t + 3.558$	0.000666	0.9023
0.3 mol/L 磷酸盐	$\ln C = -0.000970t + 3.584$	0.000970	0.9664
0.5 mol/L 磷酸盐	$\ln C = -0.001333t + 3.601$	0.001333	0.9504
0.1 mol/L 柠檬酸盐	$\ln C = -0.001221t + 3.614$	0.001221	0.9045
0.3 mol/L 柠檬酸盐	$\ln C = -0.001180t + 3.579$	0.001180	0.8784
0.5 mol/L 柠檬酸盐	$\ln C = -0.001302t + 3.583$	0.001302	0.8875
0.1 mol/L 醋酸盐	$\ln C = -0.001190t + 3.600$	0.001190	0.9104
0.3 mol/L 醋酸盐	$\ln C = -0.000885t + 3.594$	0.000885	0.9260
0.5 mol/L 醋酸盐	$\ln C = -0.000538t + 3.584$	0.000538	0.9050

由图5、表3可知,淫羊藿苷在不同缓冲液中的降解行为均为一级动力学,而且速率不同;由图6可知,淫羊藿苷的降解速率在磷酸盐缓冲液中随着盐浓度升高而升高,在柠檬酸盐缓冲液中无明显变化,在醋酸盐缓冲液中随着盐浓度升高而下降。

3 讨论

大多数单体成分在贮存过程中可能会受到环境因素的影响而发生降解,其动力学行为基本符合零级或一级模型^[13]。淫羊藿苷属于中药单体成分,其降解动力学研究结果表明,它在不同pH下的降解曲线呈线性, R 在 0.9 以上^[14-15] (≥ 0.81), 即符合一级动力学特征;在酸性环境下,该成分降解速率大于弱酸性、中性条件下,在 pH 6.8 时最小,即此时稳定性最强;随着温度上升,该成分降解速率增大,在人体体温 (37 °C) 下其降解速率 K 值是室温下的 2 倍。本实验选用了 3 种常见缓冲液,每种 3 个浓度,发现在 25 °C、pH 6.8 时,磷酸盐缓冲液中淫羊藿苷降解速率与盐浓度呈正比,柠檬酸盐缓冲液中无明显变化,醋酸盐缓冲液中与盐浓度呈反比。

另外,本实验虽然模拟了人体胃肠道的 pH,但并无酶参与,与内环境有一定差异,这也是今后需要进一步研究的方向。

参考文献:

- [1] Qian W, Su Y, Zhang Y, et al. Secretome analysis of rat osteoblasts during icariin treatment induced osteogenesis [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(5): 6515-6525.

- [2] Chen M X, Hao J, Yang Q Z, et al. Effects of icariin on reproductive functions in male rats [J]. *Molecules*, 2014, 19(7): 9502-9514.
- [3] Meng X, Pei H, Lan C. Icariin exerts protective effect against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2015, 73(1): 229-235.
- [4] 李 媚, 王学美. 淫羊藿苷药理作用研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2008, 33(23): 2727-2732.
- [5] 陈 凯. 淫羊藿苷对糖尿病大鼠肾脏的保护作用及其机制研究 [D]. 杭州: 浙江工业大学, 2012.
- [6] 王亚乐, 贾晓斌, 陈 彦, 等. 淫羊藿苷平衡溶解度和表观油水分配系数的测定 [J]. 中华中医药杂志, 2008, 23(9): 777-779.
- [7] 陈毅平, 陈双英, 陈文财, 等. 淫羊藿苷的稳定性及其影响因素 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(5): 78-81.
- [8] 贾亮亮, 袁 丁, 王洪武, 等. 淫羊藿苷药理作用的研究进展 [J]. 现代生物医学进展, 2010, 10(20): 3976-3979.
- [9] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2015 年版一部 [S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015.
- [10] 郑福东, 衣守志, 孙姝娟. 盐酸盐缓冲液在环保型除锈剂中的应用 [J]. 电镀与环保, 2018, 38(3): 41-43.
- [11] 王瑞斌. 复相磷酸钙在醋酸盐缓冲溶液中溶解行为研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2005.
- [12] 李英敏, 傅中斐, 尤红煜. 柚橼酸盐缓冲溶液在乳腺癌石蜡切片 ER、PR、PCNA 检测中的应用 [J]. 河北医科大学学报, 1998, 19(5): 307-308.
- [13] 张继远, 刘晓谦, 杨立新, 等. 常山碱稳定性及其降解动力学研究 [J]. 中国中药杂志, 2017, 42(16): 3178-3184.
- [14] 何晨阳, 王忠博, 范春雪, 等. 紫甘蓝花色苷的热降解动力学研究 [J]. 食品工业科技, 2018, 39(4): 33-37, 43.
- [15] 祁少芳, 高丽琼, 舒文娟, 等. 盐酸阿莫罗芬在水溶液中的降解动力学研究 [J]. 药学进展, 2010, 34(11): 518-522.