

# 微乳液相色谱法同时测定大鼠灌服大花罗布麻叶提取物后血浆中4种黄酮类成分的含量<sup>Δ</sup>

庄鲁江<sup>1\*</sup>, 刘金岩<sup>1</sup>, 李欢欢<sup>2,3</sup>, 周 军<sup>4#</sup>(1.新疆维吾尔自治区人民医院药学部, 乌鲁木齐 830001; 2.新疆医科大学基础部药理教研室, 乌鲁木齐 830011; 3.新疆农业大学医院药房, 乌鲁木齐 830052; 4.新疆军区乌鲁木齐总医院药剂科, 乌鲁木齐 830002)

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2017)01-0039-04  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2017.01.10

**摘要** 目的:建立同时测定大鼠血浆中槲皮素-3-*O*-槐糖苷、罗布麻甲素、金丝桃苷、芸香苷4种黄酮类成分含量的方法。方法:取8只SD大鼠,ig大花罗布麻叶提取物混悬液,0.1 g/kg(以提取物计)。给药后1 h于眼眶采血1 mL,离心后采用微乳液相色谱法(MELC)测定4种黄酮类成分含量。色谱柱为Zorbax SB-C<sub>18</sub>,流动相为微乳体系[月桂醇聚氧乙烯醚-正丁醇-乙酸乙酯-三乙胺-水(体积比为2.5:3.0:1.7:0.3:92.5, pH=5.0)],流速为0.8 mL/min,柱温为30 ℃,检测波长为360 nm,进样量为10 μL,内标为岩白菜素。同时与使用常规有机溶剂为流动相的高效液相色谱法(HPLC,流动相为0.2%磷酸水溶液-乙腈,梯度洗脱,其余条件同MELC法)进行相关比较。结果:大鼠血浆中槲皮素-3-*O*-槐糖苷、罗布麻甲素、金丝桃苷、芸香苷检测质量浓度线性范围为10~1 000 ng/mL( $r \geq 0.998 0$ ),定量下限(信噪比为10)均为10 ng/mL,精密度、稳定性、重复性试验的RSD均不超过7.5%( $n=5$ ),平均加样回收率在97.4%~98.5%之间(RSD均不大于5.3%, $n=5$ ),提取回收率均在88.7%~100.3%之间(RSD均不大于6.14%, $n=5$ )。MELC与HPLC的方法学考察结果均符合药典规定,血药浓度测定结果相近,但与HPLC法比较,MELC法可缩短检测时间(10 min vs. 40 min),减少有机溶剂使用量(0.38 mL vs. 28 mL)。结论:本研究建立的MELC法快速简便、绿色环保,可用于大鼠血浆中大花罗布麻叶4种黄酮类成分的同时测定。

**关键词** 微乳液相色谱法;大鼠;血浆;大花罗布麻叶;黄酮类成分;含量测定

## Simultaneous Determination of 4 Flavonoids from *Poacynum hendersonii* Leaf Extract in Rat Plasma Sample with Intra-gastric Administration by Microemulsion Liquid Chromatography

ZHUANG Lujiang<sup>1</sup>, LIU Jinyan<sup>1</sup>, LI Huanhuan<sup>2,3</sup>, ZHOU Jun<sup>4</sup>(1.Dept. of Pharmacy, Xinjiang Uygur Autonomous Region People's Hospital, Urumqi 830001, China; 2.Pharmacology Teaching and Research Section, Basic Medical College, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China; 3.Dept. of Pharmacy, Xinjiang Agricultural University Hospital, Urumqi 830052, China; 4.Dept. of Pharmacy, Urumqi General Hospital of Xinjiang Military Command, Urumqi 830002, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish the method for the simultaneous determination of 4 flavonoids in rat plasma sample, such as quercetin-3-*O*-sophoroside, isoquercitrin, hyperin, rutin. METHODS: 8 SD rats were selected and given *Poacynum hendersonii* leaf extract suspension intra-gastrically 0.1 g/kg (calculated by extract). The blood sample 1 mL was collected from orbit 1 h after medication. The contents of 4 flavonoids were determined by microemulsion liquid chromatography (MELC) after centrifugation. The separation was performed on Zorbax SB-C<sub>18</sub> column with mobile phase consisted of microemulsion [polyoxyethylene lauryl ether-*n*-butanol-ethyl acetate-triethylamine-water (volume ratio was 2.5:3.0:1.7:0.3:92.5, pH=5.0)] at the flow rate of 0.8 mL/min. The column temperature was set at 30 ℃, and detection wavelength was 360 nm. Sample size was 10 μL, and internal standard was bergenin. It was compared with HPLC method using organic solvent as mobile phase (mobile phase consisted of 0.2% phosphoric acid solution-acetonitrile, gradient elution, other condition same as MELC method). RESULTS: In rats plasma, the linear range of quercetin-3-*O*-sophoroside, isoquercitrin, hyperin, rutin were 10-1 000 ng/mL ( $r \geq 0.998 0$ ). The limits of quantitation was 10 ng/mL ( $S/N=10$ ). RSDs of precision, stability and reproducibility tests were all below 7.5% ( $n=5$ ). Average sample recoveries were between 97.4%-98.5% and RSDs were less than 5.3% ( $n=5$ ). Extraction recoveries were between 88.7%-100.3% ( $RSD \leq 6.14\%$ ,  $n=5$ ). The methodological evaluation results of MELC and HPLC method were all in line with the regulations of

<sup>Δ</sup> 基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(No.2015211C246)

\* 副主任药师。研究方向:中药药理学。电话:0991-8564433。E-mail:732407306@qq.com

# 通信作者:副主任药师,博士。研究方向:中药药理学。电话:0991-4992865。E-mail:sjbzj415@126.com

pharmacopeia, and the results of blood concentration between them were similar. Compared with HPLC method, MELC method could shorten detection time (10 min vs. 40 min) and reduce the amount of organic solvent (0.38 mL vs. 28 mL). CONCLUSIONS: Established MELC method is rapid, simple and green, and can be used for 4 flavonoids from *P. hendersonii*

大花罗布麻 *Poacynum hendersonii* (Hook. F.) Woodson 是夹竹桃科白麻属植物,其药用部位是叶<sup>[1]</sup>。研究表明大花罗布麻叶具有降血压、降血脂、强心、抗血栓、抗氧化和脑保护等作用<sup>[2-3]</sup>。现代药理学研究证明,槲皮素-3-*O*-槐糖苷、罗布麻甲素、金丝桃苷和芸香苷等4种黄酮类成分为大花罗布麻叶的主要有效成分<sup>[4]</sup>。随着大花罗布麻叶在临床应用上的深入<sup>[5]</sup>,有必要建立一种简单有效的方法以测定生物样品中4种黄酮成分含量。

微乳液相色谱法(Microemulsion liquid chromatography, MELC)是以微乳为流动相的高效液相色谱法(HPLC)<sup>[6]</sup>,具有绿色环保、分离效率高、速度快、复杂样品无需预处理等优势<sup>[7-8]</sup>。在本研究中,笔者采用MELC法对大鼠灌服大花罗布麻叶提取物后血浆中4种黄酮类成分进行测定,为大花罗布麻叶的进一步研究提供理论基础。

## 1 材料

### 1.1 仪器

1100 HPLC 仪,包括 G1354A 四元梯度泵、G1315A 二极管阵列紫外检测器(DAD)、G1313A 自动进样器、G1316A 可调柱温恒温箱和 Agilent 色谱工作站(美国 Agilent 公司);BP211D 电子天平(德国 Sartorius 公司)。

### 1.2 药材、药品与试剂

大花罗布麻叶(新疆本草堂中药饮片有限公司,批号:201500606),经新疆中药民族药研究所刘发主任药师鉴定为真品;槲皮素-3-*O*-槐糖苷对照品(批号:18609-17-1)、罗布麻甲素对照品(批号:21637-25-2)、金丝桃苷对照品(批号:482-36-0)、芸香苷对照品(批号:153-18-4)均购自美国 Sigma-Aldrich 公司,纯度均不低于95%;岩白菜素对照品(中国食品药品检定研究院,批号:111532-201402,纯度:98%);十二烷基硫酸钠、月桂醇聚氧乙烯醚、十二烷基聚乙二醇醚、聚氧乙烯单叔辛基苯基醚、正辛烷、正己烷、环己烷、乙酸乙酯、三乙胺、磷酸等均为分析纯,乙腈为色谱纯,水为超纯水。

### 1.3 动物

健康SD大鼠8只,♂,体质量(220±20)g,兰州军区乌鲁木齐总医院实验动物中心[动物合格证号:SYXK(军)2007-023]。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液的制备

2.1.1 对照品溶液的制备 精密称取槲皮素-3-*O*-槐糖苷、罗布麻甲素、金丝桃苷和芸香苷对照品各5mg,置于25mL量瓶中,甲醇溶解,定容,即得质量浓度均为200μg/mL的对照品溶液。

2.1.2 内标溶液的制备 精密称取岩白菜素对照品5mg,置于25mL量瓶中,甲醇溶解,定容,即得质量浓度

为200μg/mL的内标贮备液。使用时,稀释成质量浓度为50ng/mL的内标溶液。

### 2.2 微乳流动相的制备

将2.5%(体积分数,下同)月桂醇聚氧乙烯醚(表面活性剂)、3.0%正丁醇(助表面活性剂)、1.7%乙酸乙酯(油相)、0.3%三乙胺(添加剂)、92.5%水溶液混合,磷酸(H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)调节pH至5.0,超声(功率:200W,下同)20min,经0.45μm滤膜过滤后,超声20min,即得透明稳定的微乳流动相溶液,静置过夜,备用。

### 2.3 大花罗布麻叶提取物的制备

精密称取大花罗布麻叶药材100g,用75%乙醇加热回流提取2次,每次1.5h,合并滤过液,经减压蒸馏和冻干后,共获得9.03g固体提取物。精密称取固体提取物适量,用微乳流动相稀释至质量浓度为250ng/mL,经0.45μm滤膜过滤后,按“2.6.1”项下色谱条件进样测定。结果,大花罗布麻叶固体提取物中含槲皮素-3-*O*-槐糖苷、罗布麻甲素、金丝桃苷、芸香苷分别为12.64、9.39、4.23、6.65μg/g。

### 2.4 给药与取血

取SD大鼠8只,禁食不禁水12h后,取“2.3”项下大花罗布麻叶提取物,加入0.5%羧甲基纤维素钠水溶液制成混悬液后ig给药,0.1g/kg(以提取物计,给药剂量依据前期药动学及安全性考察结果确定)。给药1h后从大鼠眼球取血1mL,置于经肝素抗凝的EP管中,以离心半径为11cm、4000r/min离心5min,分离血浆,于-20℃冰箱冷冻保存,备用。

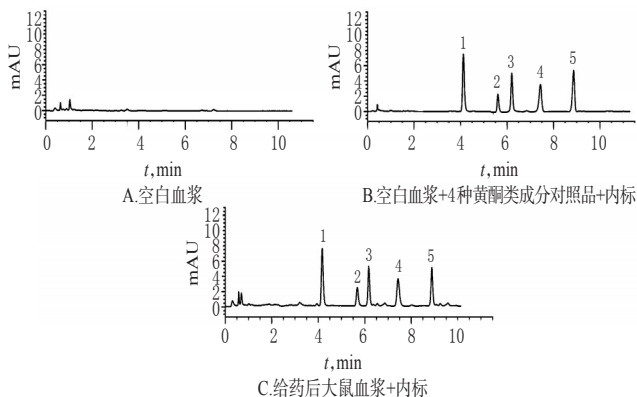
### 2.5 血浆样品的处理

取空白血浆、“2.4”项下冻存血浆(置于37℃水浴中融化),各吸取200μL置于2.0mL EP管内,加内标溶液40μL、微乳流动相1.0mL,于旋涡混合器混匀5min后,以离心半径为9cm、13000r/min离心5min,取上清液进样测定。

### 2.6 色谱条件与方法学考察

2.6.1 色谱条件 色谱柱:Zorbax SB-C<sub>18</sub>(150mm×4.6mm,5μm);流动相:月桂醇聚氧乙烯醚-正丁醇-乙酸乙酯-三乙胺-水(体积比为2.5:3.0:1.7:0.3:92.5,pH=5.0);流速:0.8mL/min;检测波长:360nm;柱温:30℃;进样量:10μL;内标:岩白菜素。

2.6.2 专属性 取大鼠空白血浆、空白血浆+对照品溶液+内标溶液、给药后大鼠血浆+内标溶液各200μL,按“2.5”项下方法处理后,再按“2.6.1”项下色谱条件进样测定。结果显示,在该色谱条件下,理论板数以4种黄酮类成分计均不低于8000,分离度均大于1.5,血浆中的内源性物质不干扰黄酮类成分与内标物的测定。色谱图见图1。



1. 槲皮素-3-*O*-槐糖苷; 2. 金丝桃苷; 3. 罗布麻甲素; 4. 芸香苷; 5. 内标(岩白菜素)

1. quercetin-3-*O*-sophoroside; 2. hyperin; 3. isoquercitrin; 4. rutin; 5. IS (bergenin)

图1 微乳液相相色谱图

Fig 1 MELC chromatograms

2.6.3 线性关系与定量下限 取“2.1.1”项下对照品溶液适量,依次加入200  $\mu$ L空白血浆,制成质量浓度为10、50、100、500、1 000 ng/mL的系列血浆溶液,按“2.5”项下方法处理。精密吸取上述系列对照品血浆溶液各10  $\mu$ L,按“2.6.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。以槲皮素-3-*O*-槐糖苷、罗布麻甲素、金丝桃苷、芸香苷的质量浓度( $x$ , ng/mL)为横坐标,以色谱峰面积比( $y$ )为纵坐标进行线性回归。结果,4种黄酮类化合物的线性方程依次为 $y=0.0541x+0.0227$  ( $r=0.9988$ )、 $y=0.0475x+0.0201$  ( $r=0.9985$ )、 $y=0.0193x+0.0224$  ( $r=0.9985$ )、 $y=0.0285x+0.0235$  ( $r=0.9980$ ),线性范围均为10~1 000 ng/mL;定量下限(信噪比为10)均为10 ng/mL,检测限(信噪比为3)依次为2.9、3.1、3.3、3.2 ng/mL。

2.6.4 精密度 精密吸取“2.6.3”项下低、中、高(10、100、1 000 ng/mL)3种质量浓度的血浆溶液各200  $\mu$ L,共5份,按“2.5”项下方法处理后,再按“2.6.1”项下色谱条件进样测定。分别于当日和连续5 d内进样测定,记录峰面积。结果,4种黄酮类成分日内、日间精密度RSD均小于7.5% ( $n=5$ ),表明本方法精密度良好。

2.6.5 稳定性 取“2.6.4”项下的3种质量浓度血浆溶液各5份,分别于放置0、2、5、10、15 d时,按“2.5”项下方法处理,再按“2.6.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,4种黄酮类成分峰面积的RSD均小于7.2% ( $n=5$ ),表明4种黄酮类成分在15 d内稳定性良好。

2.6.6 重复性 取“2.6.4”项下3种质量浓度血浆溶液各5份,按“2.5”项下方法处理后,按“2.6.1”项下色谱条件进样测定,记录峰面积。结果,4种黄酮类成分的RSD均小于4.5% ( $n=5$ ),表明本方法重复性较好。

2.6.7 加样回收率 取“2.6.4”项下3种质量浓度血浆溶液各200  $\mu$ L,精密加入已知质量浓度(200 ng/mL)的血浆样品溶液100  $\mu$ L,按“2.5”项下方法处理后,再按

“2.6.1”项下色谱条件连续测定5次。结果,4种黄酮类成分的平均加样回收率在97.4%~98.5%之间( $RSD \leq 5.3\%$ ,  $n=5$ )。

2.6.8 提取回收率 取“2.6.4”项下3种质量浓度血浆溶液适量,各5份,按“2.5”项下方法处理后,再按“2.6.1”项下色谱条件进样测定。结果,4种黄酮类成分的提取回收率分别为(94.5  $\pm$  5.8)%、(95.5  $\pm$  4.7)%、(94.9  $\pm$  5.2)%、(96.1  $\pm$  3.8)%,RSD分别为6.14%、4.92%、5.48%、3.95% ( $n=5$ )。提取回收率在88.7%~100.3%之间(RSD均不大于6.14%),表明样品提取回收率稳定,符合生物样品分析要求。

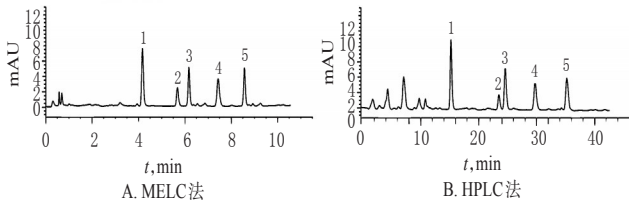
## 2.7 样品测定

取“2.4”项下大鼠血浆,按“2.5”项下方法处理后,再按“2.6.1”项下色谱条件进样测定。结果,大鼠血浆中槲皮素-3-*O*-槐糖苷、金丝桃苷、罗布麻甲素和芸香苷的血药浓度分别为657.25、512.56、153.32、329.67 ng/mL,RSD分别为3.74%、3.87%、4.02%、4.08% ( $n=8$ )。

## 2.8 MELC法与使用常规有机溶剂为流动相的HPLC法比较

通过参考文献[9],进行预实验建立了使用常规有机溶剂为流动相的HPLC法(简称HPLC法),测定了大鼠血浆中4种黄酮类成分的含量。血浆处理过程如下:取血浆200  $\mu$ L于离心管内,加“2.1.2”项下内标溶液(50 ng/mL)40  $\mu$ L,混匀后加入乙腈1 mL,振荡3 min,以离心半径为9 cm、13 000 r/min离心3 min,取上清液0.8 mL,在45  $^{\circ}$ C水浴中用氮气吹干,加入200  $\mu$ L甲醇溶解残渣,作为血浆样品溶液。色谱条件将流动相改为0.2%磷酸水溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0~5 min,30% B;5~15 min,30% B $\rightarrow$ 40% B;15~30 min,40% B $\rightarrow$ 60% B;30~40 min,60% B $\rightarrow$ 70% B),其余条件同“2.6.1”项下。按照药典规定对HPLC法的方法学进行考察,结果大鼠血浆中槲皮素-3-*O*-槐糖苷、罗布麻甲素、金丝桃苷、芸香苷在质量浓度为10~1 000 ng/mL内线性关系良好( $r \geq 0.9982$ ),定量下限(信噪比为10)均为10 ng/mL,精密度、稳定性、重复性试验的RSD均不超过6.9% ( $n=5$ ),平均加样回收率在96.7%~97.9%之间(RSD均不大于6.1%,  $n=5$ ),提取回收率在95.2%~97.1%之间(RSD均不大于6.55,  $n=5$ )。4类成分的血药浓度分别为632.47、486.18、129.97、301.21 mg/mL,RSD分别为4.54%、4.71%、5.18%、5.42% ( $n=8$ )。这表明两种方法的方法学考察结果均符合药典规定,但采用HPLC法分析,完成一次样品分析的时间为40 min,乙腈的消耗量约28 mL。而本研究建立的MELC法在10 min内即可完成样品分析,分离效率高(完全分离),且不消耗乙腈,乙酸乙酯用量约为0.14 mL,正丁醇约为0.24 mL。两种液相色谱法图见图2(大鼠血浆+样品+内标)。由此可见,采用

MELC方法可大幅缩短检测时间,大量减少有机溶剂的消耗,降低成本,绿色环保。



1. 槲皮素-3-O-槐糖苷; 2. 金丝桃苷; 3. 罗布麻甲素; 4. 芸香苷; 5. 内标(岩白菜素)

1. quercetin-3-O-sophoroside; 2. hyperin; 3. isoquercitrin; 4. rutin; 5. IS (bergenin)

图2 微乳液相色谱图和高效液相色谱图  
Fig 2 MELC and HPLC chromatograms

### 3 讨论

#### 3.1 微乳流动相的确定

3.1.1 表面活性剂的考察 笔者考察了十二烷基硫酸钠、十二烷基聚乙二醇醚、月桂醇聚氧乙烯醚、聚氧乙稀单叔辛基苯基醚等表面活性剂对4种黄酮类成分的分选效果。结果,非离子型表面活性剂月桂醇聚氧乙烯醚在210 nm波长处无吸收、色谱基线稳定,故选择月桂醇聚氧乙烯醚作为最佳表面活性剂。同时,考察月桂醇聚氧乙烯醚的体积分数对4种黄酮类成分的分选选择性的影响。结果显示,月桂醇聚氧乙烯醚体积分数为2.5%时,4种黄酮类成分的分选效果最好。

3.1.2 助表面活性剂的考察 分别选择正丁醇、正戊醇、正丙醇、异丙醇为助表面活性剂,考察其对4种黄酮类成分分选行为的影响。结果显示,3.0%正丁醇对4种黄酮类成分的分选保留时间最适合,分选效果最优。

3.1.3 油相的考察 笔者考察了正辛烷、正己烷、环己烷、正庚烷、甲苯、乙酸乙酯作为油相对分选效果的影响。结果表明,1.7%乙酸乙酯对4种黄酮类成分的分选能力最强、分选效果最理想。

3.1.4 添加剂和pH值的考察 因为黄酮类成分多带有羟基,因此三乙胺浓度和pH值对黄酮类成分的分选保留时间有较大影响。当三乙胺浓度为0.3%时,4种黄酮类成分的分选保留时间均缩短;当pH=5.0(用适量H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>调节)时,4种黄酮类成分分选度最好。

3.1.5 温度的考察 柱温对微乳液相色谱的分选也有一定影响。本研究表明,当柱温≥30℃时,4种黄酮类成分的峰形较好,柱效明显提高。考虑到样品和色谱柱对温度的耐受性,最终选择柱温为30℃。

#### 3.2 MELC法的优点

生物样品多需经过预处理才能进行仪器分析。主要的样品预处理方法有液-液萃取法<sup>[10]</sup>、固相萃取法<sup>[11]</sup>等,但这些方法存在分选步骤多、有效成分易损失、有机溶剂使用量大、分选结果精密度和准确度不理想等不

足<sup>[12]</sup>。本试验采用MELC法同时测定大鼠血浆中4种黄酮类成分的含量,血浆样品可以经稀释后直接进样,明显减少了操作步骤,缩短了分析时间,降低了分析物的损失,减少了有机溶剂用量,且方法学考察结果显示该方法具有准确、稳定、重复性好、灵敏度高等特点。

综上所述,本文建立的MELC法可以满足大鼠灌服大花罗布麻叶提取物后血浆中4种黄酮类成分定量测定的要求,对研究该药物的体内过程和临床日常监测具有参考意义。

### 参考文献

- [1] 曾斌芳,田莉,燕雪花.新疆罗布麻的药理作用和现代应用研究进展[J].中国民族民间医药,2009,18(2):11-13.
- [2] 朱玉龙,张建,唐晓丽.中药罗布麻治疗作用研究进展[J].中国保健营养,2013,7(7):138-139.
- [3] 庄鲁江,孙江兵,周军.大花罗布麻叶总黄酮对脑缺血保护作用的研究[J].中华神经外科疾病研究杂志,2013,12(4):360-361.
- [4] 强静,李奇,刘训红,等.大花罗布麻叶黄酮类成分的分析[J].新疆中医药,2009,27(5):31-34.
- [5] 马成.大花罗布麻叶对多巴胺能神经的保护作用研究[D].乌鲁木齐:新疆医科大学,2010.
- [6] 何素珍.微乳液相色谱法在中药成分分析中的应用[D].广州:南方医科大学,2012.
- [7] Zhou J, Zhang Q, Sun JB, et al. Simultaneous separation and determination of four phenylethanoid glycosides in plasma sample after oral administration of Cistanche salsa extract by microemulsion liquid chromatography[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2014(951/952):24-31.
- [8] 薛晖,王新,葛新.微乳液相色谱法测定南、北五味子中5种木脂素类成分[J].中国中医药信息杂志,2015,22(5):94-98.
- [9] 彭兆亮,李洁,樊玲,等. HPLC测定大鼠血浆中1,8-二川芎嗪基大黄酮及其药理学研究[J].中国药理学通报,2016,32(1):109-113.
- [10] 陈春枚,赖剑锋,陈志强. HPLC法测定人血清中拉莫三嗪浓度的方法研究[J].中国药房,2015,26(32):4504-4505.
- [11] 郭均平,张金安,胡敏芳.固相萃取结合高效液相色谱法测定人血浆中酒石酸唑吡坦的浓度[J].中国药师,2015,19(4):788-790.
- [12] Zhou J, Sun XL, Wang SW. Micelle-mediated extraction and cloud-point preconcentration of osthole and imperatorin from *Cnidium monnieri* with analysis by high performance liquid chromatography[J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1200(2):93-99.

(收稿日期:2016-06-01 修回日期:2016-11-11)

(编辑:刘明伟)