

量变化规律,发现以坐果 50d 作为转折点,鲜果中的甙 V 含量急剧上升,而总黄酮的含量下降。在生产实践中也发现,果龄少于 50d 的罗汉果,均以苦味为主,随着罗汉果生长期的增加,罗汉果的味道逐渐由苦变甜。

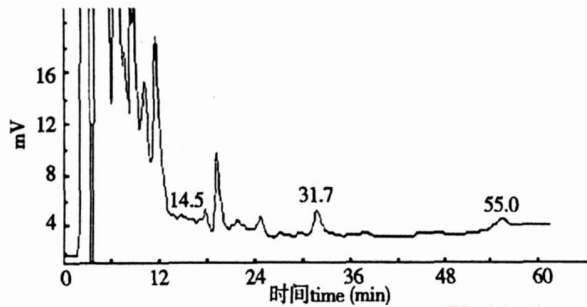


图3 50d 罗汉果皂甙色谱图

Fig.3 50d Chromatogram of mogrol glycosides

Mogrol glycosides :14.5;Mogrol glycosides :31.7;Mogrol glycosides :55.0.

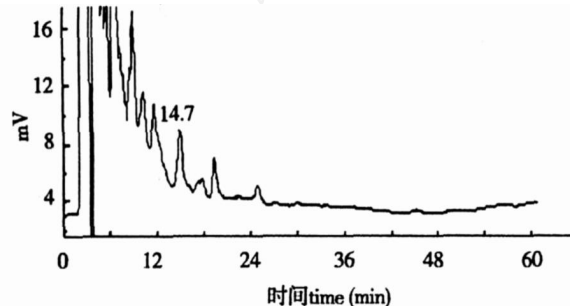


图4 70d 罗汉果皂甙色谱图

Fig.4 70d Chromatogram of mogrol glycosides

Mogrol glycosides :14.7.

为进一步研究罗汉果皂甙的代谢转化规律,本研究拟采集不同生长期罗汉果鲜果,并对二糖甙(甙)、三糖甙(甙)和五糖甙(甙V)进行分析。结果表明,罗汉果在授粉 10d 后,已有罗汉果甙和甙次生代谢物产生,随着果龄增加,甙逐渐减少,甙逐渐增加。果龄 50d 的罗汉果中,能检测出低含量的甜甙 V。果龄 70d 时,罗汉果皂甙成分主要是甙 V,甙与甙检测不到。这种现象提示,罗汉果五糖甙(甙 V)可能是以幼果中低糖甙(苦甙)作为前体,经历生物代谢转化途径形成的,这条代谢转化途径可能与葡萄糖基转移酶(Glucosyltransferase)有关。葡萄糖基转移酶在许多活性植物次生代谢物

合成中起重要作用,史玲玲等^[8]报道,葡萄糖基转移酶在红景天甙生物合成中起重要作用,葡萄糖基转移酶催化葡萄糖和酪醇合成红景天甙。因此,可以推测葡萄糖基转移酶参与了罗汉果皂甙的代谢转化,在糖基转移酶作用下,葡萄糖残基逐步转移至罗汉果甙元或低糖甙,逐步糖基化,最后形成呈强甜味的四糖甙、五糖甙。根据现有研究资料,目前尚不清楚有几种葡萄糖基转移酶参与了罗汉果甜甙的生物合成以及具体的合成过程。因此,探索罗汉果甜甙的生物合成与糖基转移酶之间的关系,分离、克隆罗汉果糖基转移酶基因,并研究其功能将是下一阶段的主要工作。

表1 不同果龄罗汉果皂甙成分分析(n=3)

Table 1 Analysis of mogrol glycosides at different growing period(Content: $\mu\text{g}/100\text{mg}$ extract)

果龄 (d)	甙 ($\mu\text{g}/100\text{mg}$)	甙 ($\mu\text{g}/100\text{mg}$)	甙 ($\mu\text{g}/100\text{mg}$)
10	0.0	48.4	3 666.4
20	0.0	40.8	3 195.9
30	0.0	476.0	2 329.8
40	0.0	530.5	1 284.9
50	95.1	1 213.8	828.9
60	549.3	41.6	0.0
70	1 331.4	0.0	0.0

参考文献:

- [1]广西壮族自治区卫生厅. 广西中药志第二辑[M]. 南宁:广西壮族自治区人民出版社,1983:195.
- [2]李坚,李沛波,袁干军. 罗汉果水提取物的止咳作用研究[J]. 海南医学院学报,2008,14(1):16-18.
- [3]赵燕,刘国艳,史贤明,等. 罗汉果浓缩汁及罗汉果甜甙对小鼠血脂代谢的影响[J]. 中国食品学报,2008,8(1):9-12.
- [4]张俐勤,戚向阳,陈维军,等. 罗汉果皂甙提取物对糖尿病小鼠血糖、血脂及抗氧化作用的影响[J]. 中国药理学通报,2006,22(2):237-240.
- [5]Takasaki M, Konoshima T, Murata Y, et al. Anticarcinogenic activity of natural sweeteners, cucurbitane glycosides, from *Momordica grosvenori* [J]. *Cancer Lett*, 2003,198(1):37-42.
- [6]李典鹏,陈月圆,潘争红,等. 不同生长日龄罗汉果皂甙类成分变化研究[J]. 广西植物,2004,24(6):546-549.
- [7]陈全斌,义祥辉,余丽娟,等. 不同生长周期的罗汉果鲜果中甜甙 V 和总黄酮含量变化规律研究[J]. 广西植物,2005,25(3):274-277.
- [8]史玲玲,王莉,张艳霞,等. 红景天甙的生物合成及其关键代谢酶研究[J]. 生命科学,2008,20(2):287-290.

高效液相色谱法测定大鼠血清染料木素浓度

任国峰¹,汤凌¹,谭鸿毅²,杨爱青¹,阳国平²,黄忆明¹

(1. 中南大学公共卫生学院,湖南长沙 410078;2. 中南大学湘雅三医院,湖南长沙 410013)

摘要:目的:建立大鼠血清中染料木素浓度的 HPLC 测定方法。方法:大鼠血清以叔丁基甲醚萃取,萃取物用氮气吹干后,用甲醇溶解用于色谱分析。色谱条件:采用 Thermo C18 柱(250mm \times 4.6mm, $5\mu\text{m}$);以乙腈 - 0.02mol/L 磷酸二氢钾(35:65, pH=4.3)为流动相;流速为 1.0mL/min;检测波长为 260nm;柱温为 40 $^{\circ}\text{C}$;进样量为 10 μL 。结果:染料木素最低检测浓度为 0.01mg/L;标准曲线线性范围为 0.01~10.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ($r=0.9998$);相对回收率为(101.31 \pm 3.47)%;日内 RSD 与日间 RSD 均小于 10.00%。结论:该方法简便、快速、灵敏度高,重现性及稳定性较好,适用于大鼠血清染料木素浓度测定和药代动力学的研究。

关键词:高效液相色谱法;染料木素;大鼠;血清浓度

中图分类号:R927.2 文献标识码:A 文章编号:1004-311X(2009)04-0051-03

Determination of Genistein in Rat Serum by HPLC

REN Guo-feng¹, TANG Ling¹, TAN Hong-yi², YANG Ai-qing¹, YANG Guo-ping², HUANG Yi-ming¹

(1. School of Public Health, Central South University, Changsha 410078; 2. Xiangya 3rd Hospital, Central South University, Changsha 410013, China)

Abstract: Objective: An assay method for genistein in rat serum by high performance liquid chromatography was established. **Method:** Serum sample was extracted with tert-butyl methyl ether (TBME) for HPLC analysis. The HPLC assay was conducted using Thermo C18 column (4.6mm \times 250mm, $5\mu\text{m}$) with acetonitrile - 0.02mol/L potassium dihydrogen phosphate (35:65) as mobile phase at a flow rate of 1.0 mL \cdot min⁻¹. 10 μL of sample solution were injected into the C18 column where the temperature was 40 $^{\circ}\text{C}$. The detection wave length was 260nm. **Result:** The limit of detection for genistein was 0.01mg \cdot L⁻¹ in serum sample. The linearity range for genistein was obtained from 0.01mg \cdot L⁻¹ to 10.00mg \cdot L⁻¹, $r=0.9998$. The recoveries of genistein were 100.1% \pm 1.8%. The relative standard deviations of the intra-day and inter-day

were less than 10%. **Conclusion:** The method is simple, rapid, sensitive, and accurate, and has a good reproducibility and stability, which may be used for serum concentration monitoring and pharmacokinetics study for genistein.

Key words: HPLC; genistein; rat; serum concentration

染料木素(genistein)属于异黄酮类化合物,其化学名为4,5,7-三羟基异黄酮,是一种典型的植物雌激素^[1]。近年来其对中老年慢性疾病的防治作用越来越受到重视,动物实验、临床研究以及流行病学调查表明染料木素能降低乳腺癌、前列腺癌等疾病的发病率,缓解更年期综合征和骨质疏松症,调节血脂、预防心血管疾病^[2,3]。目前生物样本及食品中染料木素的测定方法包括高效液相色谱法(HPLC)^[4]、紫外可见分光光度法(UV)^[4]、毛细管电泳法(CE)^[5]、薄层扫描法^[6]、液质联用法(LC-MS)^[7]、时间分辨荧光免疫分析法(TR-FIA)^[8]等,一般多以高效液相色谱法为主,但多使用二极管阵列检测器^[9]。本研究用紫外检测器对其进行检测,建立大鼠血清染料木素浓度的检测方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料:SPF级健康成年SD雄性大鼠80只(体重180~200g),由中国科学院上海实验动物中心提供,实验动物许可证:SCXK(沪)2007-0005。实验期间大鼠喂食无大豆饲料,饲料组成:小麦粉20%,玉米粉32%,麸皮25%,鱼粉(进口)15%,酵母1%,骨粉1.7%,食盐1%,鱼肝油1%,奶粉2%,矿物质添加剂0.3%,维生素添加剂1%。饲养条件:中南大学湘雅实验动物学部屏障环境动物实验室,实验动物使用许可证号:SYXK(湘)2005-0005。

1.1.2 试剂:染料木素(含量99.3%,批号:06070617,上海同田生化);泮托拉唑钠(含量95.1%,批号:100575-200301,中国药品生物制品检定所);乙腈、甲醇、叔丁基甲醚、二甲基亚砜(进口色谱纯,美国TEDIA公司);磷酸为国产分析纯;水为重蒸馏水。大豆异黄酮,由山东三维长润生物有限公司提供,规格40%,其主要成分的含量分别为:染料木苷32.0%、染料木素0.6%、大豆苷6.2%、大豆黄素0.2%、黄豆苷0.3%、黄豆素苷元0.2%,批号:Y07-0707。丙酸睾酮注射液,上海通用药业股份有限公司。

1.1.3 仪器:高效液相色谱系统(岛津LC-20A液相色谱仪,CBM-20Alite系统控制器,LC-20AT输液泵,CTO-20A柱温箱,SL-20A自动进样器,SPD检测器,LC solution工作站;日本岛津公司)。Sartorius电子天平(北京赛多利斯仪器系统有限公司),Centrifuge 5415R冷冻变速离心机,LDZ522低速自动平衡离心机(北京医用离心机厂),XW280A涡旋混合器(上海医科大学仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 色谱条件:色谱柱:岛津VP-ODS C18柱(250mm×4.6mm,5μm,Thermo);流动相:乙腈-0.02mol/L磷酸二氢钾(35:65,磷酸调pH4.3);流速:1.0mL/min;检测波长:260nm;柱温:40;进样量:10μL;灵敏度:0.01AUFS。

1.2.2 标准液的配制:Z精密称取干燥过的染料木素标准品4.3mg置于25mL容量瓶中,用甲醇溶解并定容稀释至刻度,混匀,即得0.172mg/mL标准储备液,放置冰箱中保存。

1.2.3 内标液的配制:精密称取干燥至恒重的泮托拉唑钠5mg置于25mL容量瓶中,用二甲基亚砜溶液溶解并定容,得

0.2mg/mL的内标溶液,4℃保存。

1.2.4 血样处理与测定方法:取100μL大鼠血清样品,加入10μL内标(0.2mg/mL的泮托拉唑钠),混匀,加入1.5mL叔丁基甲醚,在涡旋振荡器上混匀萃取3min,离心(3000r/min,5min)。取出上层萃取液置另一试管中,50℃水浴,N₂吹干,残渣用100μL甲醇溶液混匀至充分溶解,取20μL进样分析,记录色谱图。以样品峰面积A_s与内标峰面积A_i之比Y代入标准曲线计算血清浓度,色谱结果见图1。

1.3 统计分析:实验结果采用SPSS16.0统计软件包建立数据库,进行描述性统计分析和绘制统计图。

2 结果与分析

2.1 方法特异性考察

分别取空白血清、空白血清加染料木素和内标及大鼠血清样品加入内标的样品。从标准及样品色谱图上可知,染料木素和内标色谱峰分离良好,无杂质峰干扰,保留时间分别为7.9min和9.0min。色谱结果见图1。

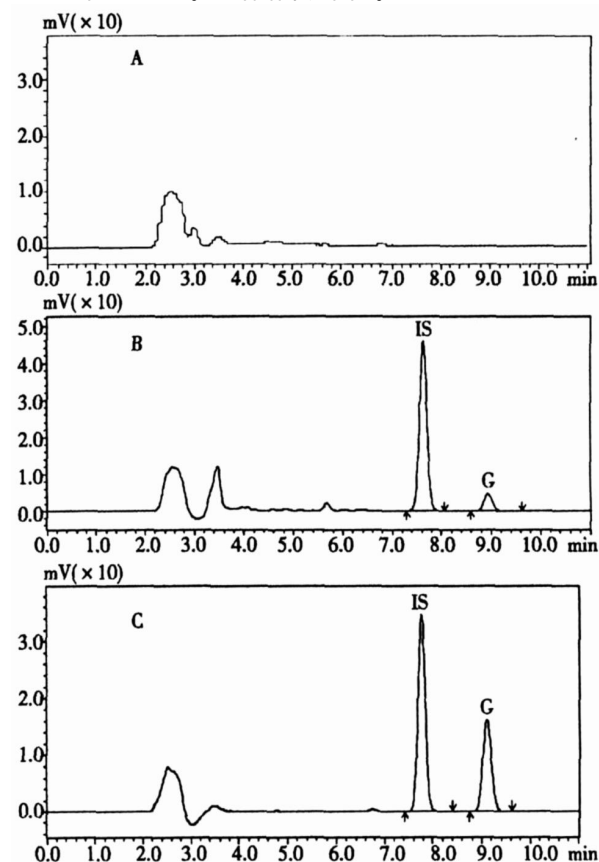


图1 染料木素的HPLC色谱图

A. 空白血清; B. 空白血清+内标(IS)+染料木素(G); C. 大鼠血清样品色谱图。

Fig. 1 HPLC chromatogram of genistein

A. blank rat serum; B. blank rat serum + internal standard + genistein; C. rat serum sample (G- genistein, IS - internal standard).

2.2 标准曲线的绘制

取100μL空白大鼠血清置于10mL的具塞玻璃试管中,分别加入不同浓度的染料木素标准储备液10μL,混匀,使其浓度分别为0.0098、0.0195、0.0781、0.3125、1.25、5、10μg/mL。按血样处理与测定方法操作,以不同浓度染料木素系列溶液的峰面积(A_s)和内标峰面积(A_i)来计算Y(Y=A_s/A_i),以Y为纵坐标,染料木素的浓度X为横坐标进行线性回归。得回归曲线

收稿日期:2008-10-26;修回日期:2009-04-21

基金项目:国家自然科学基金面上项目(“大豆异黄酮抗良性前列腺癌的实验研究”,30500407)资助

作者简介:任国峰(1973-),男,山西忻州人,硕士,副教授,硕士,研究方向:植物化学物与中老年慢性疾病,主持国家省级项目2项,承担7项,发表论文近10篇。黄忆明(1942-),女,湖南长沙人,学士,教授,博导,研究方向:老年营养。

为: $Y=0.4396X-0.0022$, $r=0.9998$ ($n=7$)。结果表明染料木素在 $0.01 \sim 10.00 \mu\text{g/mL}$ 范围内呈良好的线性关系。见图 2。

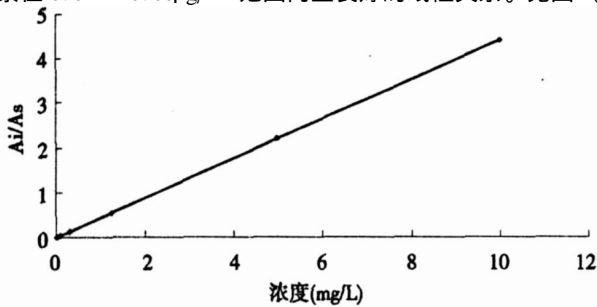


图2 标准曲线

Fig.2 Standard curve

2.3 检测限的测定

取标准储备液适量,各加血清 0.1mL ,制成含染料木素为 0 和 $0.01 \mu\text{g/mL}$ 的样品,按血样处理与测定方法操作,取 $20 \mu\text{L}$ 进样,用信噪比法,得染料木素的最低检测浓度为 $0.01 \mu\text{g/mL}$ 。

2.4 相对回收率试验

分别于 0.2mL 空白大鼠血清中加入低、中、高三种浓度的染料木素标准液 $20 \mu\text{L}$,混匀,使其浓度分别为 0.0195 、 0.3125 、 $5.0 \mu\text{g/mL}$,按血样处理与测定方法操作,以标准曲线计算出染料木素血清浓度,以测得值与加入值之比计算回收率,每种浓度样品重复测定 5 次。结果见表 1。

表1 大鼠血清中染料木素的相对回收率 ($n=5$)

Tab.1 Relative recovery of genistein in rats serum ($n=5$)

加入量 (mg/L)	测得量 (mg/L)	相对回收率 (%)	平均回收率 (%)
0.0195	0.0190	97.59	
0.3125	0.3183	101.87	101.31 \pm 3.47
5.0000	5.2234	104.47	

2.5 精密度测定

取 0.0195 、 0.3125 、 $5.0 \mu\text{g/mL}$ 的低、中、高三种浓度,按血样处理与测定方法操作,以 1d 内每种浓度每个样品重复 5 次测得的染料木素浓度计算日内精密度,分别为 1.37% 、 1.08% 、 0.89% ;以 1w 内连续 3d 测得的染料木素浓度计算日间精密度,分别为 2.53% 、 1.98% 、 2.28% 。

2.6 染料木素的室温稳定性

用空白血清配制 0.0195 、 0.3125 、 5.0mg/L 的低、中、高三不同浓度的样品,于室温分别放置 2h 、 4h 、 8h 、 12h ,进行稳定性考察。测定结果显示,血清中染料木素在室温下放置 12h 具有良好的稳定性,三个浓度的 RSD 值分别为 2.16% 、 2.18% 、 2.52% 。

2.7 样品测定

80 只大鼠按体重随机分为 5 组:A 组为正常对照组,B 组为模型组,C、D、E 分别为低、中、高剂量组。除正常对照组外,其余 4 组大鼠腹部皮下注射丙酸睾酮 $3\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$,正常对照组注射麻油。连续注射 1w 后,低、中、高剂量组分别按大豆异黄酮 $60\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 、 $120\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 、 $240\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 灌胃,正常对照组和模型组灌胃 0.5% CMC - Na,连续 28d 。第 28d 开始灌胃后 2h 尾静脉取血,离心分离血清。取 0.2mL 血样按血样处理与测定方法操作,以标准曲线计算出染料木素血清浓度,结果见表 2。血清染料木素浓度 E 组 $>$ D 组 $>$ C 组。

3 讨论

大鼠血清中染料木素浓度低,干扰物质较多,给直接测定带来很大的不便,一般多采用有机溶剂萃取后进行测定。本实验中选择叔丁基甲醚不仅可以有效地提取样本中的染料木素,而且其干扰峰很少。在测定染料木素的 HPLC 方法中使用

的流动相往往都含有大量的水及一定的酸,易造成染料木素水解,因此选择岛津 VP - ODS C18 色谱柱作为检测柱,在长期的检测过程中体现了良好的重现性及稳定性。传统方法中流动相为甲醇 - 醋酸铵体系或甲醇 - 水体系,前者易造成仪器内部堵塞、损伤色谱柱,后者则易出现色谱峰出峰过快或峰形不好,经过试验摸索,本方法选择采用乙腈 - 0.02mol/L 磷酸二氢钾缓冲液 ($35 \sim 65$, $\text{pH} 4.3$) 作为流动相,可避免前述方法的诸多缺点,节省试剂及试验时间,延长色谱柱的使用寿命。

为研究不同剂量大豆异黄酮对良性前列腺增生雄性大鼠的影响,根据文献^[10]报道 SD 大鼠摄入染料木素 2h 后血清水平达到峰值,对这一时段大鼠血清染料木素测定的结果显示,本实验方法简便、快速、灵敏,重现性及稳定性较好,无需使用较为昂贵的质谱仪,广泛适用于大鼠血清染料木素浓度测定和药代动力学的研究^[11,12]。

表2 大鼠血清中染料木素浓度

Tab.2 Concentration of genistein in rat serum

组别	n	血清染料木素 (mg/L)
A	16	ND
B	16	ND
C	16	1.49 ± 0.12^a
D	16	2.67 ± 0.22^b
E	16	3.57 ± 0.29^c

注:ND,未检测出。表中数字表中同列数字右上角字母不同者,表示各组间差异有显著性 ($P < 0.05$);反之,表示差异无显著性 ($P > 0.05$)。

参考文献:

- [1] Van Meeuwen JA, Van den Berg M, Sanderson JT, et al. Estrogenic effects of mixtures of phyto- and synthetic chemicals on uterine growth of prepubertal rats[J]. *Toxicol Lett*, 2007, 170(2):165 - 176.
- [2] Peraboi FG, Von Low EC, Ellinger J, et al. Soy isoflavone genistein in prevention and treatment of prostate cancer[J]. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*, 2008, 11(1):6 - 12.
- [3] Rios DR, Rodrigues ET, Cardoso AP, et al. Effects of isoflavones on the coagulation and fibrinolytic system of postmenopausal women[J]. *Nutrition*, 2008, 24(2):120 - 126.
- [4] Klejduš B, Mikelova R, Petrlva J, et al. Determination of isoflavones in soy bits by fast column high - performance liquid chromatography coupled with UV - visible diode - array detection[J]. *J Chromatography A*, 2005, 1084(1 - 2):71 - 79.
- [5] Peng YY, Ye JN. Determination of isoflavones in red clover by capillary electrophoresis with electrochemical detection[J]. *Fitoterapia*, 2006, 77(3):171 - 178.
- [6] 潘妮婕,张尊听,郑俊丽.薄层扫描法测定槐角丸中的染料木苷和总染料木素[J]. *分析实验室*, 2004, 23(12):25 - 27.
- [7] Grace PB, Mistry NS, Carter MH, et al. High through put quantification of phytoestrogens in human urine and serum using LC - MS/MS[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2007, 853(1 - 2):138 - 146.
- [8] Talbot DC, Osborne RM, Dadd T, et al. Monoclonal antibody - based time - resolved fluorescence immunoassays for daidzein, genistein, and equol in blood and urine: application to the Isoheart intervention study[J]. *Clin Chem*, 2007, 53(4):748 - 756.
- [9] 保健食品检验与评价技术规范(2003年版)[S]. 中华人民共和国卫生部, 2003:294 - 296.
- [10] Chang HC, Churchwell MI, Delclos KB, et al. Mass spectrometric determination of genistein tissue distribution in diet - exposed Sprague - Dawley rats[J]. *J Nutr*, 2000, 130(8):1963 - 1970.
- [11] Gol Khoo S, Ahmadi AR, Hanachi P, et al. Determination of daidzein and genistein in soy milk in Iran by using HPLC analysis method[J]. *Pak J Biol Sci*, 2008, 11(18):2254 - 2258.
- [12] Cao Y, Calafat AM, Doerge DR, et al. Isoflavones in urine, saliva, and blood of infants: data from a pilot study on the estrogenic activity of soy formula[J]. *J Expo Sci Environ Epidemiol*, 2009, 19(2):223 - 234.