

定 CsA 血药浓度较 FPIA 平均低 $20.6 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。由于 EMIT 是利用抗原抗体相互识别并结合来产生检测信号,因而那些化学结构相近于母体的代谢产物以及样本中的内源性物质有可能产生交叉反应,使得测定结果偏高,如 MTX 的次要代谢物 4-氨基-4-脱氧-N10-甲基喋酸与 EMIT 检测 MTX 存在显著的交叉反应,这也可能是 EMIT 测定 MTX 的结果高于 FPIA 的原因之一^[7]。有文献报道,EMIT 测定血浆中 CsA 浓度,其测定结果低于 FPIA,对于同一血样,EMIT 的测定值大约为 FPIA 测定值的 70%^[8],本研究同样显示,EMIT 测定 CsA 血药浓度较 FPIA 平均低 $20.6 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,表明对于 CsA 血药浓度检测,EMIT 比 FPIA 有更高的特异性。

虽然 EMIT 在测定 VPA、MTX、CsA 血药浓度时与 FPIA 结果存在较明显差异,但是把 2 种方法测定的结果进行回归分析,可获得每种药物血药浓度两组测定值间的换算公式: $Y_{\text{VPA}} = -1.8941 + 1.1903X$, $r = 0.983$; $Y_{\text{MTX}} = 0.09924 + 1.136X$, $r = 0.992$; $Y_{\text{CsA}} = -1.1465 + 0.8461X$, $r = 0.971$,具有较好的相关性。此换算公式有助于临床上判断 EMIT 与 FPIA 测定结果间的关系,并结合相关参考值进行临床评价。本研究还对 EMIT 测定 VPA、MTX、CsA 血药浓度进行方法学验证,结果 EMIT 精密度、准确度良好,质控结果良好,符合测定要求。

总之,本研究及时对 EMIT 与 FPIA 监测 VPA、MTX、CsA 血药浓度进行了对比研究,并将结果

反馈给相关科室,从而为医护人员合理调整用药剂量提供可靠的依据。

REFERENCES

- [1] MEI Y, WANG Y, SONG X W, et al. An retrospectively analysis on results of serum sodium valproate concentration monitoring on children with epilepsy [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2011, 28(2): 174-177.
- [2] LI J H. Methods and application of therapeutic drug monitoring(临床治疗药物监测的方法和应用) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2003: 9.
- [3] ZOU D Q, WEI X H, ZHEN X L, et al. Analysis of CsA whole blood concentration determined by FPIA method [J]. Exp Lab Med(实验与检验医学), 2010, 28(3): 290, 312.
- [4] CHEN L, HE Q, RUAN J. Cyclosporine absorption profiling and therapeutic drug monitoring in stable renal allograft recipients [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2010, 27(5): 466-468.
- [5] MOES D J, PRESS R R, DE FIJTER J W, et al. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry outperforms fluorescence polarization immunoassay in monitoring everolimus therapy in renal transplantation [J]. Ther Drug Monit, 2010, 32(4): 413-419.
- [6] CHEN H. Application of the bland-altman plot for evaluation of consistency of different assessment methods [J]. Chin J Health Statistics(中国卫生统计), 2007, 24(3): 308-315.
- [7] SLØRDAL L, PRYTZ P S, PETERSEN I, et al. Methotrexate measurements in plasma: comparison of enzyme multiplied immunoassay technique, TDx fluorescence polarization immunoassay, and high pressure liquid chromatography [J]. Ther Drug Monit, 1986, 8(3): 368-372.
- [8] WITZKE O, HEEMANN U, THESING A, et al. A comparison of EMIT and FPIA methods for the detection of cyclosporin A blood levels: does impaired liver function make a difference? [J]. Eur J Clin Pharmacol, 1997, 52(5): 413-416.

收稿日期: 2012-01-05

HPLC 测定不同产地蔓性千斤拔中染料木苷和染料木素的含量

杨启明, 张春风, 杨中林* (天然药物活性物质与功能国家重点实验室, 南京 210009)

摘要: 目的 建立 HPLC 同时测定蔓性千斤拔中染料木苷和染料木素含量的方法, 并比较不同产地蔓性千斤拔药材中 2 种成分的含量。方法 SinoChrom ODS-BP 色谱柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-0.2%甲酸水溶液, 梯度洗脱, 流速 $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 柱温 30°C , 检测波长 261 nm。结果 染料木苷在 $4.8\sim 28.8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好($r = 0.9998$), 平均加样回收率($n = 6$)为 99.9%, RSD 为 1.78%, 染料木素在 $1.6\sim 9.6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好($r = 0.9998$), 平均加样回收率($n = 6$)为 98.0%, RSD 为 1.17%; 8 个不同产地蔓性千斤拔中染料木苷和染料木素的含量分别为 $0.321\sim 0.574 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 $0.179\sim 0.263 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。结论 本方法测定蔓性千斤拔中染料木苷和染料木素的含量, 快捷简便, 精密可靠, 重现性、稳定性良好; 8 个不同产地药材中以产自广西阳朔的蔓性千斤拔药材中 2 种成分含量总和最高。

作者简介: 杨启明, 男, 硕士生 Tel: (025)83271425 E-mail: westcityphantom@163.com
Tel: (025)83271425 E-mail: yzl1950@yahoo.com.cn

*通信作者: 杨中林, 女, 硕士, 教授, 博导

关键词: 蔓性千斤拔; 染料木苷; 染料木素; 高效液相色谱法

中图分类号: R917.101

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2012)08-0744-05

Simultaneous Determination of Genistin and Genistein in *Moghania Philippinens* (Merr. et Rolfe) Li. from Different Places by HPLC

YANG Qiming, ZHANG Chunfeng, YANG Zhonglin* (State Key Laboratory of Natural Products and Functions, Nanjing 210009, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for the simultaneous determination of genistin and genistein in *Moghania philippinens* (Merr. et Rolfe) Li, and compare the contents of the two components in *Moghania philippinensis* (Merr. et Rolfe) Li from different places. **METHODS** SinoChrom ODS-BP column (4.6 mm×250 mm, 5 μm) was used with acetonitrile-water solution containing 0.2% formic acid as the mobile phase in gradient elution at the flow rate of 1 mL·min⁻¹. The temperature of column was 30 °C, and the wavelength was 261 nm. **RESULTS** A good linearity was obtained over the range of 4.8-28.8 μg·mL⁻¹ for genistin($r=0.999\ 8$), and the average recovery($n=6$) was 99.9%(RSD=1.78%), a good linearity was obtained over the range of 1.6-9.6 μg·mL⁻¹ for genistein($r=0.999\ 8$), and the average recovery($n=6$) was 98.0%(RSD=1.17%). The contents of genistin and genistein in *Moghania philippinens* (Merr. et Rolfe) Li. from different places were 0.321-0.574 mg·g⁻¹ and 0.179-0.263 mg·g⁻¹, respectively. **CONCLUSION** The method used for the determination of genistin and genistein in *Moghania philippinens* (Merr. et Rolfe) Li. is convenient and accurate. Repeatability and stability is satisfactory. Among *Moghania philippinens* (Merr. et Rolfe) Li. from different places, the total contents of genistin and genistein from Yangshuo, Guangxi is the highest.

KEY WORDS: *Moghania philippinens*; Genistin; Genistein; RP-HPLC

千斤拔又名千斤吊、老鼠尾、一条根、钻地风等。2010年版中国药典一部附录Ⅲ中收载千斤拔为豆科植物蔓性千斤拔 *Moghania philippinensis* (Merr. et Rolfe) Li.、大叶千斤拔 *Moghania macrophylla* (Willd.) O. Kuntze 或绣毛千斤拔 *Moghania ferruginea* (Wall. ex Benth.) Li.的干燥根^[1]。地方用药中还会使用球穗千斤拔 *M. strobilifera* (Linn.) Ait.、宽叶千斤拔 *M. latifolia* Benth.等同属植物^[2-3]。

中医认为千斤拔主要具有强筋壮骨、祛风除湿、舒筋活络、消炎止痛等功效。其被广泛用于治疗妇科疾病、风湿痹痛等病症的中成药中,是妇科千金片、金鸡胶囊、金鸡冲剂、壮腰健肾丸等中成药的主要原料药^[4]。现代药理学动物实验表明,千斤拔提取物具有抗炎镇痛、抑制血栓、神经保护、脑组织保护、内分泌调节等药理作用^[5-9]。

诸种千斤拔中的主要化学成分均为黄酮类化合物^[10],其中染料木苷与染料木素2种大豆异黄酮类成分是其中含量较高的主要成分,该2种成分具有雌激素样作用、改善胰岛素抵抗等多种药理学活性^[11-12]。本实验选用市场上最常见的千斤拔品种蔓性千斤拔 *Moghania philippinens* (Merr. Et Rolfe) Li.作为研究对象,建立了其中染料木苷与

染料木素2种成分的含量测定方法,并测定了不同产地药材的含量,为千斤拔药材的质量控制提供了依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

LC-20AT 高效液相色谱仪及 SPD-20A 紫外检测器(日本岛津公司); TB-25 电子分析天平(丹佛仪器有限公司); KQ-250E 型超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司); HH-4 数显恒温水浴锅(国华电器有限公司)。

1.2 试剂

色谱纯甲醇(江苏汉邦科技有限公司,批号:112026); 色谱纯乙腈(美国天地试剂公司,批号:1103531); 市售纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司,批号:311934); 分析纯甲酸(南京化学试剂有限公司,批号:10120111319)。

1.3 试药

染料木苷对照品(批号:111709-200501,纯度≥98%),染料木素对照品(批号:111704-200501,纯度≥98%)均来源于中国药品生物制品检定所;蔓性千斤拔药材(购自各地药材公司,经中国药科大学杨中林教授鉴定为豆科植物蔓性千斤拔 *Moghania philippinens* (Merr. et Rolfe) Li.的干燥根)。

2 方法与结果

2.1 检测波长的确定

对染料木苷对照品溶液与染料木素对照品溶液分别进行 190~500 nm 紫外全波长扫描, 结果染料木苷与染料木素在 261 nm 处有共同最大吸收, 故确定紫外检测波长为 261 nm。

2.2 色谱条件

色谱柱: 依利特 SinoChrom ODS-BP(4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相: 0~14 min, 乙腈:0.2%甲酸水=22:78, 15~30 min, 乙腈:0.2%甲酸水=38:62; 检测波长: 261 nm; 柱温: 30 ℃; 流速: 1 mL·min⁻¹; 进样量: 20 μL。

在该色谱条件下, 样品中染料木苷与染料木素色谱峰与相邻峰分离度达到 1.5 以上, 理论板数不<5 000。混合对照品溶液与样品溶液 HPLC 色谱图见图 1。

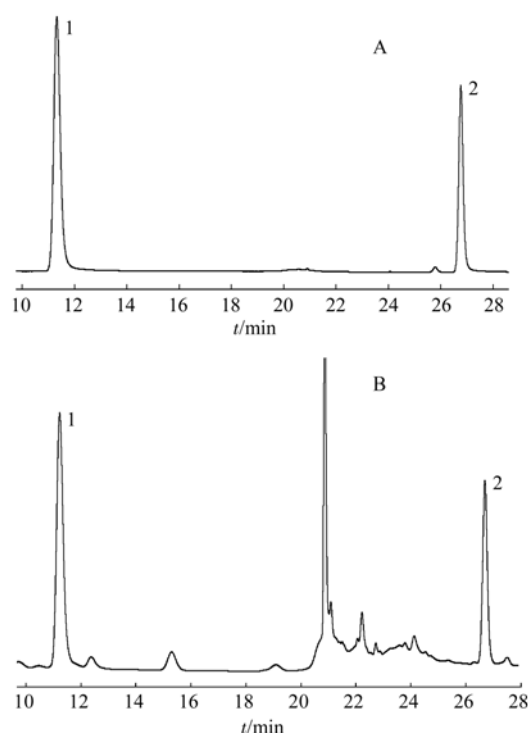


图 1 对照品溶液和样品溶液 HPLC 图

A—对照品溶液; B—样品溶液; 1—染料木苷; 2—染料木素

Fig 1 HPLC chromatograms of reference solution and sample solution

A—reference solution; B—sample solution; 1—genistin; 2—genistein

2.3 样品最佳提取条件的考察

2.3.1 提取溶剂的选择 精密称取蔓性千斤拔药材干燥粗粉 1 g, 8 份, 分别以 50 mL 30%甲醇、50%甲醇、70%甲醇、100%甲醇、30%乙醇、50%

乙醇、70%乙醇、90%乙醇溶液超声提取 60 min, 按“2.2”项下色谱条件测定, 比较染料木苷与染料木素峰面积大小, 结果见图 2, 得到最佳提取溶剂为 70%乙醇。

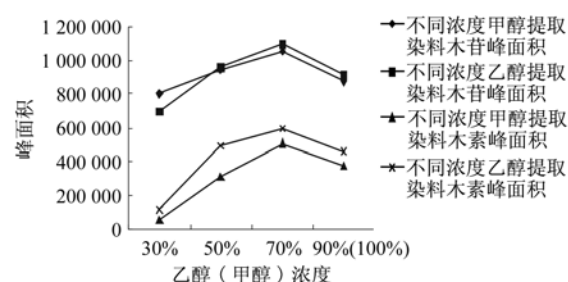


图 2 不同提取溶剂对染料木苷和染料木素峰面积的影响

Fig 2 Peak area of Genistin and Genistein with different extraction solvent

2.3.2 提取方法的选择 精密称取蔓性千斤拔药材干燥粗粉 1 g, 2 份, 加入 50 mL 70%乙醇, 分别进行超声提取、回流提取 60 min, 按“2.2”项下色谱条件测定, 比较染料木苷与染料木素峰面积大小, 结果见图 3, 得到最佳提取方法为超声提取。

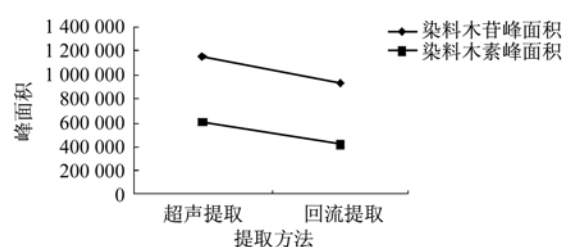


图 3 不同提取方法对染料木苷和染料木素峰面积的影响

Fig 3 Peak area of Genistin and Genistein with different extraction method

2.3.3 提取时间的选择 精密称取蔓性千斤拔药材干燥粗粉 1 g, 4 份, 加入 50 mL 70%乙醇, 分别超声提取 30, 60, 90, 120 min, 按“2.2”项下色谱条件测定, 比较染料木苷与染料木素峰面积大小, 结果见图 4, 得到最佳提取时间为 60 min。

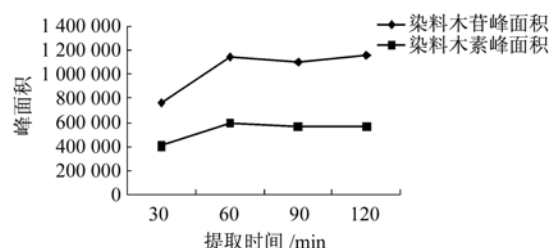


图 4 不同提取时间对染料木苷和染料木素峰面积的影响

Fig 4 Peak area of Genistin and Genistein with different extraction time

2.3.4 料液比的选择 精密称取蔓性千斤拔药材干燥粗粉 1 g, 4 份, 分别加入 25, 50, 75, 100 mL 70%乙醇, 超声提取 60 min, 按“2.2”项下色谱条件测定, 比较染料木苷与染料木素峰面积大小, 结果见图 5, 得到最佳料液比为 1:50。

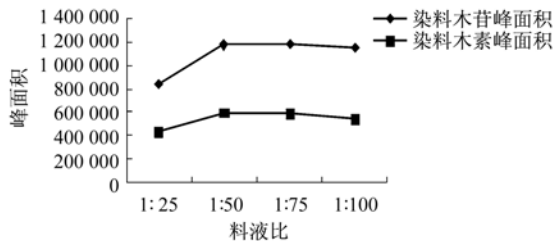


图 5 不同料液比对染料木苷和染料木素峰面积的影响
Fig 5 Peak area of Genistin and Genistein with different solid-liquid ratio

2.4 供试品溶液的制备

由“2.3”项下得到的最佳提取条件制备供试品溶液。精密称取蔓性千斤拔药材干燥粗粉 1 g, 置于锥形瓶中, 加入 50 mL 70%乙醇, 浸泡 60 min, 超声提取 60 min, 溶剂补足失重, 过滤, 得提取液, 过 0.45 μm 微孔滤膜即得。

2.5 对照品溶液的制备

精密称取染料木苷对照品 2 mg、染料木素对照品 2 mg, 分别置于 25 mL 量瓶中, 以甲醇溶解并定容至刻度, 精密吸取 15 mL 染料木苷对照品溶液、5 mL 染料木素对照品溶液至 25 mL 量瓶中, 加入甲醇定容至刻度, 混合均匀, 即得含有 48 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 染料木苷、16 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 染料木素的混合对照品溶液。

2.6 线性范围考察

精密吸取 1, 2, 3, 3.5, 4, 5, 6 mL 混合对照品溶液至 10 mL 量瓶中, 甲醇定容至刻度, 按“2.2”项下色谱条件测定, 以浓度(C)为横坐标, 峰面积(A)为纵坐标绘制标准曲线, 并计算线性相关系数(r)。得到染料木苷标准曲线回归方程为 $A=106\,975C-405.19$, $r=0.999\,8$, 线性范围为 4.8~28.8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; 染料木素标准曲线回归方程为 $A=160\,620C-2\,005.1$, $r=0.999\,8$, 线性范围为 1.6~9.6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

2.7 方法学考察

2.7.1 仪器适应性试验 精密吸取染料木苷浓度为 12.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、染料木素浓度为 4.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混

合对照品溶液, 按“2.2”项下色谱条件平行测定 6 次, 计算染料木苷与染料木素峰面积的 RSD 值分别为 0.84%与 0.85%, 证明仪器精密度良好。

2.7.2 重复性试验 按“2.4”项下方法平行制备 6 份供试品溶液, 按“2.2”项下色谱条件测定, 计算染料木苷与染料木素峰面积的 RSD 值分别为 1.0%与 1.4%, 证明该方法重复性良好。

2.7.3 稳定性试验 将供试品溶液放置 0, 2, 4, 8, 12, 16 h, 按“2.2”项下色谱条件测定, 计算染料木苷与染料木素峰面积的 RSD 值分别为 1.4%与 1.5%, 证明供试品溶液在 16 h 内稳定。

2.7.4 加样回收试验 精密称取染料木苷含量为 0.574 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 、染料木素含量为 0.188 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 的蔓性千斤拔药材干燥粗粉 6 份, 每份 1 g。配制染料木苷含量为 1.148 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、染料木素含量为 0.376 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液, 精密吸取 0.5 mL, 加入每份样品中。按“2.4”项下方法制备供试品溶液按“2.2”项下色谱条件测定, 计算染料木苷与染料木素平均回收率分别为 99.9%与 98.0%及 RSD 值分别为 1.78%与 1.17%, 表明方法回收率良好, 结果见表 1。

表 1 加样回收试验

成分	称样量/ g	样品含 量/mg	加入量/ mg	测得量/ mg	回收率/ %	平均回 收率/%	RSD/ %
染料木苷	1.000 0	0.574	0.574	1.146	99.52	99.9	1.78
	0.999 9	0.574	0.574	1.142	98.91		
	0.999 7	0.574	0.574	1.158	101.73		
	1.000 1	0.575	0.574	1.162	102.39		
	0.999 9	0.574	0.574	1.140	98.44		
	1.000 2	0.575	0.574	1.138	98.19		
染料木素	1.000 0	0.188	0.188	0.371	97.36	98.0	1.17
	0.999 9	0.188	0.188	0.373	98.67		
	0.999 7	0.188	0.188	0.370	96.81		
	1.000 1	0.188	0.188	0.373	98.45		
	0.999 9	0.188	0.188	0.375	99.76		
	1.000 2	0.188	0.188	0.370	97.01		

2.8 样品含量测定

取 8 个不同产地的蔓性千斤拔药材, 按“2.4”项下方法制备供试品溶液, 供试品溶液与染料木

苷、染料木素浓度分别为 12.0, 4.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的混合对照品溶液分别进样测定, 以外标一点法计算蔓性千斤拔药材中染料木苷与染料木素的含量。8 个不同产地蔓性千斤拔药材中染料木苷与染料木素含量见表 2。

表 2 不同产地蔓性千斤拔中染料木苷与染料木素的含量 ($n=3$)

Tab 2 Content of genistin and genistein in *Moghania philippinensis* (Merr. et Rolfe) Li. from different places($n=3$)

产地	染料木苷含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$	染料木素含量/ $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$
广西阳朔	0.574	0.188
广西钟山	0.425	0.231
广西平乐	0.505	0.235
云南富宁	0.381	0.233
福建柘荣	0.321	0.183
广东普宁	0.438	0.179
云南景洪	0.320	0.194
广西富州	0.424	0.263

3 讨论

分别选用依利特 SinoChrom ODS-BP(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm)、Phenomenex Gemini 5u C₁₈ 110A(250 mm $\times$ 4.60 mm, 5 μm)、汉邦 Hadera ODS-2(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μm)3 种不同品牌色谱柱对样品进行含量测定, 染料木苷与染料木素含量 RSD 值分别为 1.81%与 1.53%; 选取不同柱温 25, 30, 35 $^{\circ}\text{C}$ 对样品进行含量测定, 染料木苷与染料木素含量 RSD 值分别为 1.11%与 1.37%; 选取不同流速 0.8, 1.0, 1.2 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ 对样品进行含量测定, 染料木苷与染料木素含量 RSD 值分别为 1.42%与 1.36%, 本实验耐用性良好。

由测定结果可见, 来自不同产地的蔓性千斤拔药材中染料木苷与染料木素含量相差不大。其中染料木苷含量最高的是产自广西阳朔的药材, 含量达到 0.574 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 含量最低的是产自云南景洪的药材, 含量为 0.320 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$; 染料木素含量最高的是产自广西富州的药材, 含量达到 0.263 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 含量最低的是产自广东普宁的药材, 含量

为 0.179 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$; 2 种成分含量总和最高的是产自广西阳朔的药材, 含量总和达到 0.762 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 含量总和最低的是产自福建柘荣的药材, 含量总和为 0.504 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。

REFERENCES

- [1] Ch.P(2010)Vol I (中国药典 2010 年版. 一部) [S]. 2010: Appendix 22.
- [2] RAO W W, HUANG J K, WEN Z F, et al. A survey on the varieties of *Flemingia* (*Flemingia*) and comparison of their respective quality [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 1999, 30(3): 219-222.
- [3] LI H M, YANG S D, YANG Z Y, et al. Pharmacognostical study of *Flemingia latifolia* [J]. *J Yunnan Univ Tradit Chin Med*(云南中医学院学报), 2009, 32(5): 12-16.
- [4] ZHANG L X, PENG J M, MA J. Research Progress of *Flemingia* [J]. *J Chin Med Mater*(中药材), 2007, 30(7): 887-890.
- [5] CHEN Y, LI K S, HUANG F J. Effects of *moghania philippinensis* on analgesia and anti-inflammation [J]. *Guangxi Med J*(广西医学), 1993, 15(2): 77-79.
- [6] ZHANG M Q, GUAN M, NIAN X L, et al. Study on mechanism of inhibiting thrombosis by flavonoids from *Flemingia* [J]. *Chin J Gerontology*(中国老年学杂志), 2009, 29(16): 2704-2706.
- [7] WANG J F, XU Y J, YAN H, et al. Effect of Qianjinba on content of substance P after sciatic nerve crushed injury in rats [J]. *Chin J Coal Ind Med*(中国煤炭工业医学杂志), 2007, 10(5): 590-592.
- [8] ZHAO J X, YIN C J, LIN S H, et al. Effect of *flemingia* on protecting brain tissue and blood-brain barrier after subarachnoid hemorrhage in rabbits [J]. *J Norman Bethune Univ Med Sci*(白求恩医科大学学报), 1997, 23(5): 489-491.
- [9] WEI L J, CHEN H M, WANG J H. Effects research of *Flemingia* decoction on immuno-endocrine of ovariectomized rat [J]. *Guangxi J Tradit Chin Med*(广西中医药), 2009, 32(6): 46-49.
- [10] LI L, QIN M J, ZHANG L X, et al. Research progress on chemical constituents and biological activities of *Flemingia* [J]. *Mod Pharm Clin*(现代药物与临床), 2009, 24(4): 203-211.
- [11] LEI H W, LU F E, DONG H, et al. Effect of genistin on improving free fatty acid-induced insulin resistance in HepG2 hepatocytes [J]. *Res Int Tradit Chin West Med*(中西医结合研究), 2010, 2(4): 178-181.
- [12] YU L H, LIU K, LIU B L. Studies on pharmacological effect of genistein [J]. *Pharm Clin Res*(药学与临床研究), 2010, 18(3): 299-302.
- [13] WEI Y Z. The classification and distribution of the genus *Flemingia* Roxb. ex Ait. in China [J]. *Guihaia*(广西植物), 1991, 11(3): 198-204.

收稿日期: 2011-10-11