

反相高效液相色谱法测定鼠肝微粒体中依普黄酮及其在代谢研究中的应用

余露山, 胡晓渝, 姚彤炜(浙江大学药学院药物分析研究室, 浙江 杭州 310031)

摘要:目的 建立鼠肝微粒体中依普黄酮的反相高效液相色谱测定法, 以研究依普黄酮的体外代谢。方法 本法中依普黄酮与鼠肝微粒体共孵育之后用氯仿提取, 采用地非三唑为内标, 以 Nova-park C_{18} 柱为分析柱, 乙腈-0.1% 醋酸溶液 (60:40) 为流动相, 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 紫外检测波长为 250 nm。结果 依普黄酮在 $1 \sim 100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内线性关系良好 ($r = 0.9998$)。检测限为 $0.02 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($S/N \geq 3$), 定量限为 $0.1 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($RSD < 5.0\%$, $S/N = 8$, $n = 3$)。方法回收率达 $96.90\% \sim 112.8\%$, 日内, 日间 RSD 分别 $< 8.0\%$ 和 $< 10\%$ ($n = 5$)。结论 此法简便, 准确, 可用于依普黄酮的体外代谢研究。

关键词: 依普黄酮; 反相高效液相色谱; 药物代谢; 微粒体

中图分类号: R977; R917.794

文献标识码: A

文章编号: 1007-7693(2003)06-0447-03

Determination of ipriflavone metabolism in rat hepatic microsomes by RP-HPLC

YU Lu-shan, HU Xiao-yu, YAO Tong-wei (College of Pharmaceutical Sciences Zhejiang University, Hangzhou, 310031)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish a RP-HPLC method to determine ipriflavone in rat hepatic microsomes. **METHOD** Ipriflavone

作者简介: 余露山, 男, 25岁, 药物分析学博士。E-mail: LSYU@eyou.com

flavone in rat hepatic microsomal incubation media was extracted by chloroform and diphenyltriazol was used as internal standard . The determination was performed in a Nova park C₁₈ column with a mobile phase of acetonitril-0.1 % acetic acid(60: 40 ,v/v) at a flow-rate of 1.0 mL·min⁻¹. A UV-VIS detector was operated at 250nm. **RESULTS** The assay was linear over the range of 1-100 μg·mL⁻¹ for ipriflavone (*r*=0.9998) . The limit of detection was 0.02μg·mL⁻¹(*S/N* ≥3) and the limit of quantification was 0.1 μg·mL⁻¹(*RSD* < 5.0 % , *S/N* = 8 , *n* = 3) . The method afforded recoveries of 96.9 % ~ 112.8 % (*n* = 5) , and inter day and intra-day relative standard deviation were 2.95 % ~ 7.63 % and 4.38 % ~ 9.80 % (*n* = 5) , respectively . **CONCLUSION** The method is simple , accurate , which can be used to study the metabolism of ipriflavone in rat hepatic microsomes .

KEY WORDS: ipriflavone ; RP-HPLC ; metabolism ; microsomes

依普黄酮(ipriflavone, IP)为植物雌激素异黄酮衍生物,具有雌激素拮抗特性,通过抑制骨吸收和促进骨形成过程,维持代谢的动态平衡,可有效地预防骨质疏松症^[1]。在日本、意大利等国家依普黄酮早已作为一个抗骨质疏松症药物上市。由于骨质疏松症常见于老年人,而老年人又常并发一些老年性疾病,如心血管疾病、肾病、糖尿病、老年性痴呆等。临床给药过程中就不可避免的与其他药物合用。目前临床报道最多的是依普黄酮在治疗妇女绝经期骨质疏松时常与少量雌激素合用^[2]。许多研究资料表明,一些药物既是酶的底物又是酶的诱导剂或抑制剂,联合用药过程中,这些药物可能因药酶的诱导或抑制作用发生药物相互作用,结果导致药物失活或产生不良反应^[3-5]。有文献报道^[6],依普黄酮是CYP1A2和CYP2C9两种药酶的强烈抑制剂,其能导致茶碱的血药浓度显著升高。为了解依普黄酮与其他药物的可能相互作用,为临床安全合理用药提供依据,本实验建立了鼠肝微粒体中依普黄酮 RP-HPLC测定法,并对依普黄酮在体外的代谢进行了初步研究。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

Agilent 高效液相色谱仪(安捷伦科技有限公司),包括 G1310A 泵, G1314A 可见-紫外检测器, 7725 型手动进样阀, 20μL 定量管。依普黄酮(浙江大学药学院药化教研室),地非三唑(DL111-IT,浙江仙居制药厂),枸橼酸,枸橼酸脱氢酶,氧化还原型辅酶 II(NADP/NADPH, Sigma 公司),其它试剂均为国产分析纯或生化试剂。

NADPH 再生系统的配制:枸橼酸 28.5 mg,枸橼酸脱氢酶 5.5 mg, 0.5 mol·L⁻¹ 烟酰胺 1.0 mL, 0.15 mol·L⁻¹ MgCl₂ 1.

0 mL,加 0.1 mol·L⁻¹ pH 7.4 Tris-HCl 缓冲液到 10.0 mL(临用新配)。

1.2 色谱条件

色谱柱: Nova park C₁₈(20cm × 4.6 mm, 4μm); 流动相: 乙腈-0.1%醋酸溶液(60:40); 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长: 250nm; 内标: DL111-IT; 进样量: 20μL。

1.3 测定方法

取鼠肝微粒体 100μL,加入新鲜配制并预先通氧气 1 min 的 NADPH 再生系统,稀释至蛋白质浓度约为 0.6 mg·mL⁻¹ 的混悬液,再加入 2 mg·mL⁻¹ 的依普黄酮甲醇溶液 10μL(终浓度为 20μg·mL⁻¹),混匀,37℃ 预孵育 5 min,加入新鲜配制的 NADP/NADPH 的 1% NaHCO₃ 溶液 10μL(终浓度 NADP 为 130μg·mL⁻¹, NADPH 为 40μg·mL⁻¹) 启动反应。于 37℃ 孵育一定时间,在 3, 10, 20 min 取反应液各 1.0 mL,分别加入 1.0 mL 氯仿终止反应,并沉淀蛋白质,加入 50μL 内标溶液(0.5 mg·mL⁻¹ 的 DL111-IT 甲醇溶液),旋涡提取 1 min 后,3000r·min⁻¹ 离心 20 min,取有机层 0.5 mL,于空气流下挥干氯仿,加流动相 100μL 溶解残渣,取 20μL 进样。

2 实验结果和讨论

2.1 色谱条件的选择

测定依普黄酮的流动相文献报道有甲醇-0.1%醋酸水(75:25)溶液^[7]和乙腈:0.01 mol·mL⁻¹ 醋酸钠缓冲液(pH = 5)(4:96)^[8]。综合两者,选择了数种流动相进行分析,比较各图谱所得色谱参数,综合考虑结果,选择乙腈-0.1%醋酸水溶液(60:40)为流动相,在此条件下依普黄酮与内标、代谢物都能很好分离,且保留时间适宜,空白孵育液不干扰测定,见图 1。

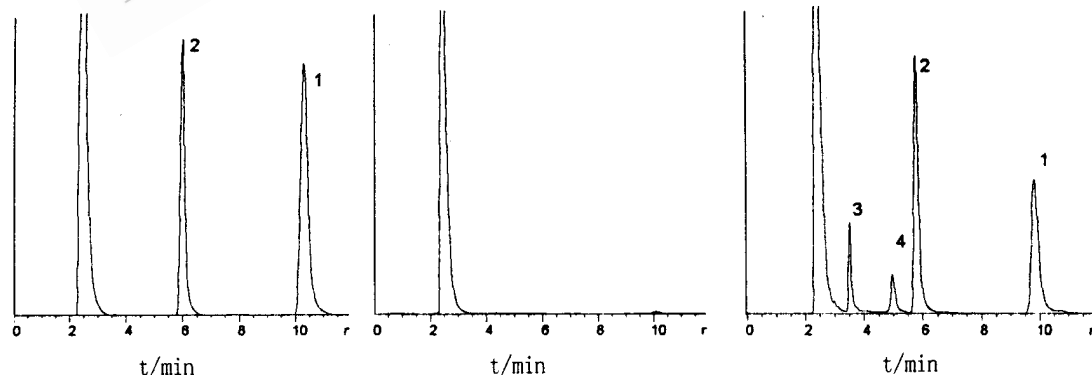


图 1 微粒体孵育液中依普黄酮的色谱图

Fig 1 Chromatograms of IP in incubation media

A. 孵育液,含 IP 和内标(未启动反应);B 空白孵育液;C 孵育液,①IP,②DL111-IT,③④代谢产物

A. blank incubation media spiked with IP($19.96\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) and internal standard (DL111-IT, $25.00\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); B. blank incubation media; C. incubation sample after incubation with CYP1A2. ①IP. ②DL111-IT. ③④metabolites

在内标的选择中,比较了非那雄胺、萘和 DL111-IT 三种物质,结果非那雄胺和依普黄酮能达到基线分离,但两者的响应值有较大差异;萘和 DL111-IT 出峰时间、分离度及响应值均较合适,但萘回收率较低,故选择 DL111-IT 为内标。

依普黄酮最大吸收波长为 254nm,DL111-IT 为 249nm。考虑到代谢产物吸收度可能有所不同,故比较了 225、250 和 275nm 三种波长。发现代谢产物在 250nm 处有最大吸收,所以选择 250nm 作为紫外检测波长。

在上述选定的色谱条件下测得样品和内标物的色谱参数,见表 1。

表 1 依普黄酮和 DL111-IT 的 HPLC 参数

Tab 1 The HPLC parameters of IP and DL111-IT

药物	保留时间 (min)	理论塔板数	分离度	容量因子	分布系数
DL111-IT	6.00	7322	-	2.70	-
IP	10.34	7476	11.43	5.37	2.0

2.2 提取溶剂的选择

对乙醚、醋酸乙酯、氯仿三种溶剂进行提取率比较。发现乙醚提取回收率较低,且易挥发,不易定量;用醋酸乙酯提取时,提取物中杂质较多。而氯仿提取率较高又具有沉淀蛋白的作用,且提取物也较干净,因此选择氯仿作为提取溶剂。

2.3 标准曲线的制备

取不同浓度依普黄酮甲醇溶液,加到失活的鼠肝微粒体孵育液中,使孵育液中依普黄酮的终浓度分别为 0.996, 2.490, 4.980, 9.960, 24.900, 49.800, 99.960 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,按“测定方法”项下方法操作。测定依普黄酮峰面积和 DL111-IT 峰面积之比(A),对依普黄酮在孵育液中浓度(C)进行线性回归,得标准曲线 $A = 0.06263 C - 4.822 \times 10^{-3}$, $r = 0.9998$ 。结果表明,依普黄酮在 1~100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 内呈良好的线性关系。

采用逐步稀释法测得依普黄酮最低检测限为 0.02 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,定量限为 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ($RSD < 5\%$, $S/N = 8$, $n = 3$)。

2.4 方法的专属性

比较空白孵育液、加有依普黄酮的空白孵育液和孵育 20 min 后的孵育液的色谱图,在依普黄酮和 DL111-IT 及代谢产物色谱峰处,内源性杂质和提取试剂均不干扰测定,因此本法可专属地用于微粒体中依普黄酮的定量测定。

2.5 方法回收率

于失活的孵育液中,精密加入高、中、低不同浓度的依普黄酮,使孵育液中终浓度分别为 0.996, 24.900, 99.600 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,按“标准曲线项下”方法进行处理,计算方法回收率和萃取回收率,结果见表 2。

2.6 方法的精密度

选取低、中、高三种浓度,按“标准曲线的制备”处理,在

1 d 内分别测定 5 份样品,计算日内精密度;每天各测定一份样品,连测 5 d,计算日间精密度。结果见表 2。

表 2 依普黄酮测定的回收率和精密度

Tab 2 Accuracy and precision for the determination of IP ($n = 5$)

加入量 ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	测得量 ($\bar{x} \pm s$)	方法回收率 (%)	绝对回收率 (%)	日内精密度 RSD (%)	日间精密度 RSD (%)
0.996	1.114 \pm 0.085	112.8	85.3	7.63	9.80
24.90	25.91 \pm 0.915	104.1	83.2	3.53	4.98
99.60	96.53 \pm 2.852	96.9	80.4	2.95	4.38

2.7 依普黄酮在鼠肝微粒体中的代谢反应

文献公认 β -萘黄酮(β -NF)主要诱导鼠肝微粒体细胞 P4501A2。依普黄酮在 β -萘黄酮诱导的鼠肝微粒体中经 20 min 孵育后,由最初的 19.32 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 下降到 10.35 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,代谢率为 46.2%;而在空白对照组(未经诱导的正常鼠肝微粒体)中依普黄酮的浓度由最初的 20.12 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 下降到 17.77 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$,代谢率仅为 11.6%。结果显示经 20 min 代谢后,依普黄酮在两种微粒体中的代谢率呈明显差异,表明 CYP1A2 在依普黄酮代谢中起主导作用,这与文献报道一致^[6]。

本实验建立的方法,可准确、方便地用于老年常用药物与依普黄酮联合给药时可能产生的药物诱导或抑制作用的研究。

参考文献

- [1] 陈慧. 骨质疏松症治疗药依普黄酮[J]. 国外医药·合成药, 生化药, 制剂分册, 2000, 21(4): 218.
- [2] 何鹏, 金一, 马林, 等. 治疗骨质疏松新药——依普黄酮[J]. 中国新药杂志, 1999, 8(10): 670.
- [3] Kim R B, Wandel C, Leake B, et al. Interrelationship between substrates and inhibitors of human CYP3A and P-Glycoprotein [J]. *Pharmaceutical*, 1999, 16(3): 408.
- [4] Ethummel K, Wilkinson GR. *In vitro* and *in vivo* drug interactions involving human CYP3A [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1998, 38: 389.
- [5] 周权, 姚彤炜, 曾苏. 中国临床药理学杂志, 2001, 17(4): 313
- [6] Monostory K, Vereczkey L, Levai F, et al. Ipriflavone as an inhibitor of human cytochrome P450 enzymes [J]. *B J Pharmacol*, 1998, 123: 605.
- [7] 姚彤炜, 舒位秋. 依普黄酮的 HPLC 测定 [J]. 中国医药工业杂志, 1996, 27(8): 357.
- [8] Monostory K and Vereczkey L. The effect of ipriflavone and its main metabolites on theophylline biotransformation [J]. *E J Drug Metab Pharmacokinet*, 1996, 21(1): 61.

收稿日期: 2002-12-15