

HPLC法测定白花前胡甲素在大鼠肝微粒体中的含量*

邹军¹, 胡新颖², 朱铨^{1**}, 普布赤列³, 高学敏¹

(1. 厦门大学医学院, 厦门 361005; 2. 延边大学药学院, 延吉 133000; 3. 西藏自治区林芝食品药品监督管理局, 林芝 860000)

摘要 目的:建立一种快速准确检测大鼠肝微粒体中白花前胡甲素(Pd - Ia)含量的方法。**方法:**以华蟾毒精为内标物, 采用Hypersil - C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以甲醇 - 水 (75 : 25) 为流动相, 流速 1 mL · min⁻¹, 检测波长 321 nm, 柱温 25 ℃, 进样量 20 μL。**结果:** Pd - Ia 浓度在 1 ~ 100 μg · mL⁻¹ 范围内与峰面积呈现良好的线性关系 ($r = 0.9989$); 日内精密密度 RSD 2.9%; 日间精密密度 RSD 8.5%; 平均加样回收率 ($n = 9$) 为 98.4%。**结论:** 本文建立的方法操作简单, 可用于 Pd - Ia 含量的测定。

关键词: 高效液相色谱法; 白花前胡甲素 (Pd - Ia); 华蟾毒精; 大鼠; 肝微粒体

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254 - 1793 (2009) 06 - 0923 - 03

HPLC determination of praeruptum A (Pd - Ia) in rat hepatic microsomal fraction*

ZOU Jun¹, HU Xin - ying², ZHU Xuan^{1**}, Phurbutinley³, GAO Xue - min¹

(1. Medical College of Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. Pharmacy College of Yanbian University, Yanji 133000, China;

3. Linzhi Food and Drug Administration Bureau, Linzhi 860000, China)

Abstract Objective: To establish a method of determination of praeruptum A (Pd - Ia) in rat hepatic microsomes fraction by HPLC. **Method:** Hypersil - C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column was adopted at a temperature of 25 ℃. An HPLC method was established using cinobufagin as internal standard. The mobile phase consisted of methanol - water (75 : 25) at a flow rate of 1.0 mL · min⁻¹. The UV detection wavelength was set at 321 nm, the injection volume was 20 μL. **Results:** The calibration curve was shown to be a linear over the range of 1 - 100 μg · mL⁻¹ ($r = 0.9989$). The mean recovery ($n = 9$) was 98.4%, The RSDs of intra - day and inter - day were less than 2.9% and 8.5%, respectively. **Conclusion:** The method is specific, simple and has been successfully applied to the determination of Pd - Ia.

Key words: HPLC; praeruptum A (Pd - Ia); cinobufagin; rats; hepatic microsomes

白花前胡 *Peucedanum praeruptum* Dunn 为伞形科前胡属植物, 药用其根, 性味苦、辛, 微寒, 归肺经, 具有疏散风热、降气化痰的作用, 临床上用于风热咳嗽痰多、痰热喘满、咯痰黄稠等症, 是中国药典收载的常用药材之一^[1], 主要有效成分为香豆素类化合物。其中白花前胡甲素 (praeruptum A, Pd - Ia) 是前胡中的有效成分, 具有明显的钙离子拮抗活性, 能显著增加冠状动脉血流量^[2]。体外活性试验也表明 Pd - Ia 具有显著逆转肿瘤细胞多药耐药的活性, 并能提高肿瘤多药耐药细胞对抗癌药物的敏感性^[3], 在临床应用上有很广阔的发展前景。白花前

胡中 Pd - Ia 和 白花前胡乙素 (praeruptin B, Pd -) 含量的 GC 和 HPLC 测定方法已有报道^[4-6], 由于 Pd - Ia 的最大紫外吸收在 321 nm, 内标物的寻找有一定的难度, 故现有的检测方法不加内标, 由于肝微粒体蛋白峰的干扰难以克服, 降低了检测的准确度。本文旨在建立以华蟾毒精为内标物, 应用反相 HPLC 法测定大鼠肝微粒体中 Pd - Ia 的浓度, 为研究白花前胡甲素的药物代谢动力学特征及其制剂的开发应用提供依据。

1 仪器与试剂

实验动物 Wistar 大鼠, 雄性, 体重 (280 ± 25)

* 福建省自然科学基金 (2008J0015); 福建省新世纪优秀人才支持计划项目

** 通讯作者 Tel: (0592) 8258825; E - mail: zhuxuan@xmu.edu.cn

g,由中科院上海实验动物中心提供,清洁级,生产许可证:SCXK(沪)2004-0001,使用许可证:SYXK(闽)2004-0001,实验前禁食24 h。

LC-20AD 高效液相色谱仪,LC Solution 色谱工作站(日本岛津公司);AL104型电子分析天平(METTLER TOLEDO公司);KQ-100B型超声波清洗器(昆山市超声仪器公司);1-15K型离心机(Sigma公司);G560型涡旋仪(美国 Scientific Industries公司);2HWY-211B型恒温培育箱(上海智城分析仪器制造有限公司);10 μL , 100 μL , 1000 μL 微量移液器(Eppendorf)。

Pd-Ia(99.4%,日本明治药科大学赠送);华蟾毒精(沈阳药科大学赠送);甲醇为色谱纯,水为双蒸水;三甲基氨基甲烷(Tris)为 Sigma 公司产品,分析纯;氯化钾为分析纯。

2 溶液配制

2.1 对照品溶液 精密称定 Pd-Ia 5 mg,置 10 mL 量瓶中,用甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀即得对照品溶液(0.5 mg \cdot mL⁻¹),并以此溶液为母液,取适量,稀释成 0.1 mg \cdot mL⁻¹ 的溶液,以此方法依次稀释得 0.05, 0.01 mg \cdot mL⁻¹ 的溶液,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内保存备用。

2.2 内标物溶液 称取华蟾毒精 5 mg,置 100 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,再稀释成浓度为 0.8 $\mu\text{g} \cdot$ mL⁻¹ 的溶液,作为内标液,于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内保存备用。

2.3 Tris-HCl 缓冲盐^[7] Tris-HCl 缓冲溶液含 EDTA(稳定剂) 1 mmol \cdot L⁻¹、KCl 154 mmol \cdot L⁻¹ 和 Tris 50 mmol \cdot L⁻¹,并用 60% 盐酸调节 pH 至 7.4。

3 色谱条件^[6,8]

采用 Hypersil-C₁₈ (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱;以甲醇-水(75:25)为流动相,流速 1 mL \cdot min⁻¹,检测波长 321 nm,柱温 25 $^{\circ}\text{C}$,进样量 20 μL 。

4 样品制备与处理

4.1 肝微粒体液制备^[9,10] 大鼠拉颈椎处死,开腹取肝脏,用滤纸吸干水分,称重。立即放入冰冷的 1.15% KCl 溶液中清洗,用剪刀剪成碎块,反复清洗至无血色。加 4 倍肝质量的 1.15% KCl 的磷酸缓冲溶液(0.01 mol \cdot L⁻¹, pH 7.4),在冰浴中用组织匀浆机制成匀浆,再超声(500 W, 40 kHz)分散 30 s,4 $^{\circ}\text{C}$ 下 10000 $\times g$ 离心 20 min。上清液用 4 层纱布过滤除漂浮脂类物,滤液在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 70000 $\times g$ 离心 60 min,取上清液,在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 100000 $\times g$ 离心 60 min,沉淀即为肝微粒体。用 Tris-HCl 缓冲液悬浮

均匀,体积为原上清液的 1/4 即可,分装于塑料管中,于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存,采用 Lowry^[11] 法测定肝微粒体蛋白浓度。

4.2 样品处理 取以上肝微粒体液 55 μL ,加入内标物溶液 55 μL ,涡旋 45 s 混匀,离心(4 $^{\circ}\text{C}$, 10000 $\times g$) 10 min,取上清液 20 μL 进样。

5 HPLC 方法学考察

5.1 线性关系考察 分别取对照品溶液适量,置 37 $^{\circ}\text{C}$ 肝微粒体液中,涡旋 45 s 混匀,制成相当于 Pd-Ia 浓度为 1, 5, 10, 50, 100 $\mu\text{g} \cdot$ mL⁻¹ 的对照品肝微粒体液,按照“4 项下的方法操作,进样 20 μL ,每个溶液连续进样 3 次,记录色谱图;以 Pd-Ia 浓度 C ($\mu\text{g} \cdot$ mL⁻¹) 为横坐标, Pd-Ia 与内标物的峰面积比值 Y 为纵坐标,用加权最小二乘法进行回归运算,求得的直线回归方程即为标准曲线。方程为:

$$Y = 0.0317X + 0.0098 \quad r = 0.9989 \quad (n = 5)$$

5.2 专属性试验 在上述的实验条件下, Pd-Ia 和内标物色谱峰保留时间分别在 5.5 min 和 7.5 min, Pd-Ia 峰形良好,无杂峰干扰,结果见图 1。

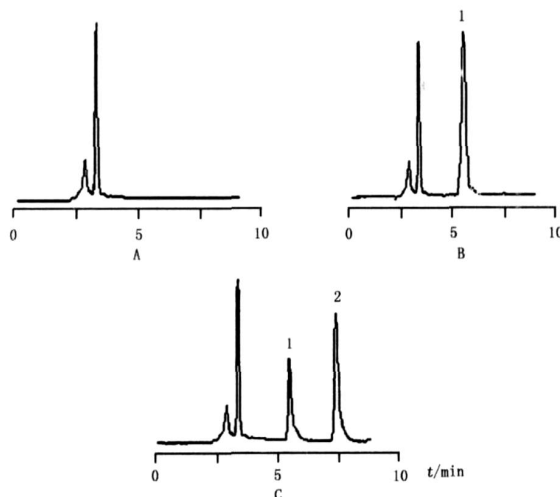


图 1 高效液相色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

A. 空白肝微粒体 (blank hepatic microsomal fraction) B. 内标 + 空白肝微粒体 (0.8 $\mu\text{g} \cdot$ mL⁻¹ internal standard and blank hepatic microsomal fraction) C. 空白肝微粒体加内标和对照品 (blank hepatic microsomal fraction spiked with 1 $\mu\text{g} \cdot$ mL⁻¹ Pd-Ia and internal standard)

1. 华蟾毒精 (cinobufagin) 2. 白花前胡甲素 (Praeruptum A)

5.3 回收率试验 取空白肝微粒体,按“5.1 项下的方法配制低、中、高 3 个浓度(1, 10, 100 $\mu\text{g} \cdot$ mL⁻¹)的对照品肝微粒体液(各配制 3 份),按照“4 项下的方法处理,进样 20 μL ,记录色谱图。将 Pd-Ia 峰面积与内标峰面积比值带入标准曲线方程,计算 Pd-Ia 测定浓度,并与加入浓度比较,计算

平均回收率 ($n = 3$) 分别为 98.0%, 95.1%, 102.0%; RSD 分别为 3.0%, 2.6%, 3.2%。

5.4 精密度与稳定性试验 取空白肝微粒体, 按“5.1 项下的方法配制低、中、高 3 个浓度 (1, 10, 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的对照品肝微粒体液, 按照“4 项下的方法操作, 进样 20 μL , 记录色谱图, 1 d 内连续测定 3 次, 以 Pd - Ia 测得值与加入值的比值求算本法的日内精密度; 将以上 3 个浓度 (1, 10, 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的对照品肝微粒体液, 在室温条件下, 连续测定 3 d (每天 1 次), 将测得结果进行方差分析计算本法的日间精密度, 结果见表 1。

表 1 Pd - Ia 精密度 ($n = 3$)

Tab 1 Precision of Pd - Ia

浓度 (concentration) / $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$	RSD / %	
	日内 (intra - day)	日间 (inter - day)
1	2.4	8.5
10	2.9	5.0
100	1.5	5.8

考察以上 3 个浓度 (1, 10, 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的对照品肝微粒体液在室温下放置 12 h 及 24 h 稳定性, 含药肝微粒体液在 -20 反复冻融 3 次 (3 d) 条件下的稳定性, 3 种浓度测定值的 RSD 均小于 15%, 表明在上述条件下 Pd - Ia 稳定性良好。

6 讨论

6.1 肝微粒体的蛋白沉淀方法是检测肝微粒体药物浓度的一个关键步骤, 决定了肝微粒体杂峰的大小以及出现的位置, 本试验采取的甲醇沉淀蛋白, 4

离心, 与常温离心相比效果更佳。本试验建立了 HPLC 测定大鼠肝微粒体中 Pd - Ia 含量的方法, 以华蟾毒精为内标进行 Pd - Ia 检测, 大大提高了液相色谱检测方法的准确性和可信度。

6.2 肝药物代谢酶类富集于肝细胞的内质网微粒体上, 即肝组织匀浆后, 经分步高速离心后所获的内质网碎片^[10]。为保证测量准确性, 肝脏取出后的所有操作均应在低温下进行。制备肝匀浆时, 应选用松紧合适的匀浆管; 匀浆时先慢后快, 使匀浆管顺着固定杆上下移动 6~8 次。

6.3 本法测定 Pd - Ia, 高、中、低 3 个浓度下测得的回收率均大于 95%。日间和日内精密度好, 且 Pd - Ia 在大鼠肝微粒体中稳定性良好。

参考文献

- 1 ChP (中国药典). 2005. Vol 1 (一部): 187
- 2 JIANG Ming - yan (姜明燕), CHANG Tian - hui (常天辉), XU Ya - jie (徐亚杰). The protective effect of *Peucedanum praenuptum* on acute myocardial infarction in anesthetized cats (中药白花前胡对麻醉猫急性心肌梗死的保护作用). *J Chin Med Univ* (中国医科大学学报), 2004, 1 (33): 22
- 3 XU Qin (徐勤), DENG Li - dong (邓立东), LIU Bu - ming (刘布鸣). Determination of Pd - Ia and Pd - Ia in *Peucedanum praenuptum* by RP - HPLC (RP - HPLC 测定白花前胡中 Pd - Ia 和 Pd - Ia 含量). *West China J Pharm Sci* (华西药科学杂志), 2001, 16 (3): 215
- 4 XU Qin (徐勤), LIU Bu - ming (刘布鸣), ZHANG Zheng - xing (张正行), et al GC determination of Pd - Ia and Pd - Ia in *Peucedanum praenuptum* Dunn (GC 测定白花前胡中白花前胡丙素和白花前胡素的含量). *Chin Pharm J* (中国药科学杂志), 2001, 36 (2): 122
- 5 YE Wen - peng (叶文鹏), LIU Jun - ting (刘俊亭), LI Yan - bing (李延兵), et al RP - HPLC determination of compositions of Pd - Ia in root of *Peucedanum praenuptum* Dunn (反相 HPLC 法测定白花前胡根中有效成分 Pd - Ia 的含量). *Phys Test Chem Anal Part B: Chan Anal* (理化检验 - 化学分册), 2002, 38 (6): 299
- 6 ZHANG Cun (张村). Study of component and quality standard of *Peucedanum praenuptum* Dunn (白花前胡化学成份及质量标准研究): [Paper of Doctor Degree (博士学位论文)]. Beijing (北京): China Academy of Chinese Medical Sciences (中国中医科学院), 2005
- 7 Zhu X, Lee DY, Shin WG Gender differences in the pharmacokinetics interaction between oral warfarin and oxolamine in rats inhibition of CYP2B1 by oxolamine in male rats *Biopharm Drug Dispos*, 2007, 28: 125
- 8 CHEN Yi - kun (陈义坤), LU Jin - qing (卢金清), HONG Bing (红兵), et al HPLC determination of Pd - Ia, quercetin and cabbage element in special cigarette and its smoke (HPLC 法测定特制卷烟及烟气中的 Pd - Ia, 槲皮素和白菜素). *Tobacco Sci Technol* (烟草科技), 2007, 1: 38
- 9 CUI Sheng - miao (崔升淼), ZHAO Chun - shun (赵春顺), GAO Kun (高坤), et al Determination of puerarin in rat liver microsomes by LC - MS and its pharmacokinetics (大鼠肝微粒体中葛根素的液相色谱质谱测定法及药物代谢动力学). *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2007, 24 (1): 32
- 10 XU Shu - yun (徐淑云), BAN Ru - lian (卞如廉), CHEN Xiu (陈修). Experiment Technique of Pharmacology (药理实验方法学). Beijing (北京): People's Medical Publishing House (人民卫生出版社), 2003. 712
- 11 Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al Protein measurement with the Folin phenol reagent *J Biol Chem*, 1951, 193: 265

(本文于 2008 年 7 月 31 日收到)