

· 药物代谢 ·

## UPLC 测定肝微粒体中柚皮苷和柚皮素含量

林靖然, 邓少东, 肖凤霞\*, 林励, 邓韬, 张旭倩

(广州中医药大学中药学院, 广州 510006)

**[摘要]** **目的:**建立 UPLC 测定大鼠肝微粒体中柚皮苷和柚皮素含量的方法,并初步考察二者于不同时间点的代谢情况。**方法:**采用 UPLC 色谱系统, ACQUITY BEH C<sub>18</sub> 色谱柱(3.0 mm × 100 mm, 1.7 μm), 流动相甲醇-0.1% 乙酸水溶液梯度洗脱, 流速 0.5 mL·min<sup>-1</sup>, 柱温 30 °C, 检测波长 283, 289 nm, 内标为槲皮素, 进样量 3 μL。**结果:**柚皮苷及柚皮素均与槲皮素分离良好且无内源性干扰。生物样品中柚皮苷和柚皮素的线性范围分别为 3.814 ~ 38.143 ( $r=0.999\ 2$ ), 3.586 ~ 35.857 mg·L<sup>-1</sup> ( $r=0.999\ 6$ ); 柚皮苷的方法回收率 95.43% ~ 97.95%, 绝对回收率 97.33% ~ 98.18%; 柚皮素的方法回收率 95.27% ~ 99.31%, 绝对回收率 97.71% ~ 99.73%; 柚皮素在体外肝微粒体中的 I 相代谢较柚皮苷显著。**结论:**该方法快速、灵敏、准确, 可用于大鼠肝微粒体中柚皮苷和柚皮素的含量测定。

**[关键词]** 柚皮苷; 柚皮素; 大鼠; 肝微粒体; 超高效液相色谱法

**[中图分类号]** R945 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)16-0175-04

**[doi]** 10.11653/syfy2013160175

## Determination of Naringin and Naringenin in Rat Liver Microsomes by UPLC

LIN Jing-ran, DENG Shao-dong, XIAO Feng-xia\*, LIN Li, DENG Tao, ZHANG Xu-qian

(School of Chinese Materia Medica, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

**[Abstract]** **Objective:** To establish a method for determining the content of naringin and naringenin in rat liver microsomes by UPLC, and preliminary investigation *in vitro* metabolism of two ingredients at different times points. **Method:** Determination was performed on UPLC chromatographic system, ACQUITY BEH C<sub>18</sub> column (3.0 mm × 100 mm, 1.7 μm) with a mobile phase of methanol-0.1% acetic acid and gradient elution at a flow rate of 0.5 mL·min<sup>-1</sup>, detection wavelength was 283, 289 nm, column temperature was 30 °C, with quercetin as an internal standard, injection volume was 3 μm. **Result:** Naringin, naringenin and internal standard quercetin had good separation degree and no endogenous interference. The linear range of naringin and naringenin were 3.814-38.143 ( $r=0.999\ 2$ ), 3.586-35.857 mg·L<sup>-1</sup> ( $r=0.999\ 6$ ), respectively. Method recoveries of naringin ranged from 95.43% to 97.95% and absolute recoveries ranged from 97.33% to 98.18%. Method recoveries of naringenin ranged from 95.27% to 99.31% and absolute recoveries ranged from 97.71% to 99.73%. I phase metabolism of naringenin in *in vitro* liver microsomes was more significant than naringin. **Conclusion:** This method was rapid, sensitive and accurate, it could be used for determination of naringin and naringenin in rat liver microsomes.

**[Key words]** naringin; naringenin; rat; liver microsomes; UPLC

**[收稿日期]** 20130226(006)

**[基金项目]** 国家科技部“十二五”科技支撑计划项目(2011BAI01B02); 广东省科技计划项目(2012A030100005); 茂名市科技重大专项项目(2012A01002)

**[第一作者]** 林靖然, 硕士, 从事中药资源开发利用与新药研究, Tel:020-39358250, E-mail: jatonlin@163.com

**[通讯作者]** \* 肖凤霞, 教授, 从事中药资源开发利用与中药新药研究, Tel:020-39358250, E-mail: 596898148@qq.com

柚皮苷与柚皮素为化橘红中黄酮类活性成分<sup>[1-3]</sup>,具有显著的抗炎<sup>[4]</sup>、抗肿瘤<sup>[5-6]</sup>、抗氧化<sup>[7-8]</sup>、降血脂<sup>[9]</sup>等生物活性。肝脏是药物代谢的主要场所,其富含的细胞色素 P-450(CYP 450)参与众多药物的氧化反应<sup>[10]</sup>,据报道柚皮苷及柚皮素可诱导或抑制多种 CYP 450 酶的活性,肝脏酶系统是药物 I 相反应和 II 相反应所必须的,在以肝脏为基础的体外代谢中应用十分广泛。目前对柚皮苷和柚皮素的研究主要集中于生理活性方面,对二者在离体肝微粒体中代谢情况鲜有报道。本实验拟建立大鼠离体肝微粒体中柚皮苷及柚皮素的含量测定方法,并考察二者在不同时间点的代谢情况,为柚皮苷和柚皮素的药物代谢动力学特征研究及新药开发应用提供依据。

### 1 材料

ACQUITY UPLC 系统(美国 Waters 公司),佳美 SK-1 型快速混匀器(江苏金坛市佳美仪器厂),TGL-16B 型台式离心机(上海安亭科学仪器厂),BP211D 型 1/10 万电子分析天平(德国 Sartorius 公司),Genpure 超纯水系统(德国 TKA 公司)。

柚皮苷对照品(中国食品药品检定研究院,纯度 99%,批号 110722-201009),柚皮素对照品(自制,纯度 98.68%),槲皮素对照品(成都曼思特生物科技有限公司,纯度 98.13%,批号 MUST-12020101),三羟甲基氨基甲烷盐酸盐(Tris-HCl)缓冲液(pH 7.4,上海螺旋生物科技有限公司),还原型辅酶 II 四钠盐( $\beta$ -NADPH,批号 WH201109,  $C_{21}H_{26}N_7Na_4O_{17}P_3$ ,纯度 98%),聚山梨酯 80(天津百世化工有限公司),乙腈、甲醇为色谱纯,水为超纯水,其余试剂均为分析纯。

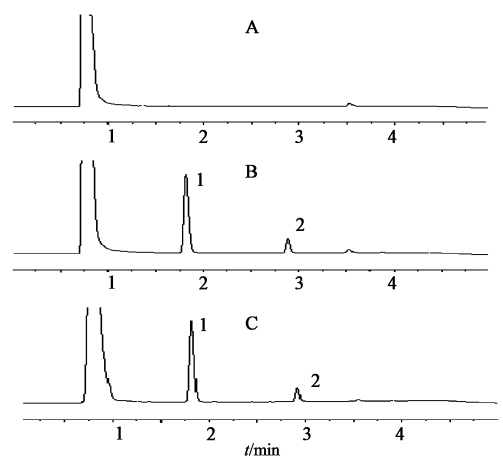
Sprague-Dawley (SD) 大鼠,雌雄各半,体重(180 ± 20) g,由广州中医药大学实验动物中心提供,合格证号 SCXK(粤)2008-0020,实验前动物禁食 12 h,自由饮水。

### 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** Waters ACQUITY UPLC@ BEH  $C_{18}$  色谱柱(3.0 mm × 100 mm, 1.7  $\mu$ m),流动相甲醇(A)-0.1% 乙酸水溶液(B)梯度洗脱(0 ~ 3 min, 40% ~ 70% A),检测波长 283, 289 nm,流速 0.5 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 30 °C,进样量 3  $\mu$ L,见图 1,2。

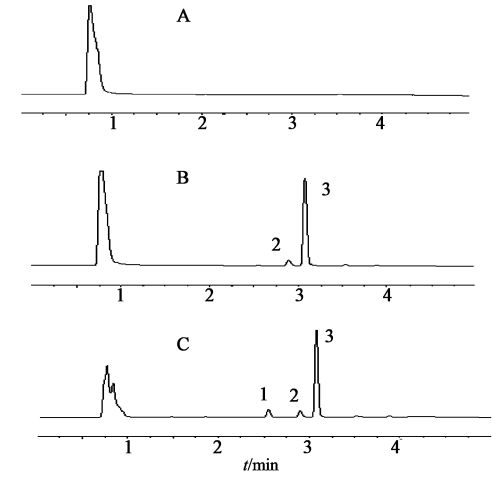
#### 2.2 溶液配制

**2.2.1 对照品贮备液** 精密称取柚皮苷、柚皮素 5.34, 5.02 mg,分别置于 10 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。



A. 空白微粒体; B. 空白微粒体 + 内标 + 柚皮苷;  
C. 样品溶液; 1. 柚皮苷; 2. 槲皮素

图 1 肝微粒体中柚皮苷 HPLC



A. 空白微粒体; B. 空白微粒体 + 内标 + 柚皮素;  
C. 样品溶液; 1. 代谢产物; 2. 槲皮素; 3. 柚皮素

图 2 肝微粒体中柚皮素 HPLC

**2.2.2 内标溶液** 精密称定槲皮素 1.50 mg 置于 50 mL 量瓶中,加乙腈溶解并稀释至刻度,混匀,待用。

**2.2.3 Tris-HCl 缓冲液** 精密移取 Tris-HCl 缓冲液适量,置 100 mL 量瓶中,加入 1 g 吐温-80,用生理盐水稀释至刻度,调 pH 7.4,即得 0.1 mol·L<sup>-1</sup>的缓冲盐溶液。

**2.2.4 再生系统溶液** 精密称取 NADPH 0.025 g,用 Tris-HCl 缓冲液 7.5 mL 溶解完全,即得 4.0 mmol·L<sup>-1</sup>的 NADPH 再生系统溶液,采取临用新鲜配制方式。

**2.3 生物样品处理** 采用钙离子沉淀蛋白法制备肝微粒体,BCA 法测定微粒体中蛋白质量浓度<sup>[11]</sup>。取大鼠肝微粒体悬液适量,用 Tris-HCl 缓冲液稀释,加入对照品贮备液、NADPH 溶液,使形成 0.7 mL 的

温孵体系(蛋白质浓度  $1.146 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ , NADPH 摩尔浓度  $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ),置  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  振荡温孵,孵育一段时间后,加入  $0.7 \text{ mL}$  含有内标的乙腈终止反应。取上述液体涡旋  $1 \text{ min}$ ,于  $1 \text{ 万 r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心  $10 \text{ min}$ ,取上清液  $3 \text{ }\mu\text{L}$  进样测定。

**2.4 标准曲线的制备** 取肝微粒体悬液 6 份,分别加入  $10, 20, 40, 60, 80, 100 \text{ }\mu\text{L}$  对照品贮备液,按 2.3 项下方法处理,进样,以样品质量浓度为横坐标,峰面积与内标峰面积比值为纵坐标,得回归方程  $Y_{\text{柚皮苷}} = 0.4147X + 0.7719 (r = 0.9992)$ ,  $Y_{\text{柚皮素}} = 0.9246X - 0.0214 (r = 0.9996)$ ,线性范围依次为  $3.814 \sim 38.143, 3.586 \sim 35.857 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

**2.5 精密度试验** 取肝微粒体悬液,配制低、中、高

3 个质量浓度的对照品溶液,按 2.3 项下方法处理后进样。同日内重复测定 5 次,连续测定 5 d,结果柚皮苷日间及日内精密度的 RSD 均  $< 3.91\%$ ,柚皮素则均  $< 3.79\%$ ,表明仪器精密度良好。

**2.6 稳定性试验** 量取低、中、高 3 个质量浓度的对照品溶液,按 2.3 项下方法处理,于室温条件下,分别在  $0, 2, 4, 6, 8, 12 \text{ h}$  进样分析,结果柚皮苷含量的 RSD 均  $< 3.91\%$ ,柚皮素均  $< 3.33\%$ ,表明样品溶液在室温下放置  $12 \text{ h}$  稳定性良好。

**2.7 回收率试验** 取肝微粒体悬液,配制低、中、高 3 个质量浓度的样品液,分别加入  $10, 60, 100 \text{ }\mu\text{L}$  对照品贮备液,计算方法回收率和绝对回收率,结果见表 1。

表 1 肝微粒体中柚皮苷和柚皮素回收率试验 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

成分	质量浓度 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	实测值 / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	方法回收率 / $\%$	RSD / $\%$	绝对回收率 / $\%$	RSD / $\%$
柚皮苷	3.81	$3.736 \pm 0.13$	$97.95 \pm 3.52$	3.59	$98.18 \pm 1.48$	1.51
	22.89	$21.84 \pm 0.26$	$95.43 \pm 1.14$	1.19	$97.33 \pm 0.69$	0.71
	38.14	$36.90 \pm 1.48$	$96.75 \pm 3.87$	4.00	$97.36 \pm 1.04$	1.07
柚皮素	3.59	$3.79 \pm 0.04$	$99.31 \pm 0.99$	1.00	$97.71 \pm 1.23$	1.26
	21.51	$22.17 \pm 0.26$	$96.86 \pm 1.14$	1.18	$99.48 \pm 0.96$	0.97
	35.85	$36.34 \pm 1.01$	$95.27 \pm 2.66$	2.79	$99.73 \pm 0.77$	0.77

**2.8 孵育时间对柚皮苷和柚皮素体外代谢的影响**

配制质量浓度约  $0.025 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  的总黄酮溶液,于  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  振荡温孵,在不同时间点取样(柚皮苷溶液温孵  $0, 20, 40, 60, 80 \text{ min}$ ;柚皮素溶液温孵  $0, 20, 40, 60, 80, 100, 120 \text{ min}$ ),加入  $0.7 \text{ mL}$  含有内标的乙腈终止反应。取上述液体涡旋  $1 \text{ min}$ ,于  $10000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心  $10 \text{ min}$ ,取上清液  $3 \text{ }\mu\text{L}$  进样测定,结果见表 2。发现在  $0 \sim 80 \text{ min}$ ,柚皮苷的酶促反应曲线趋于平缓,表明柚皮苷在离体肝微粒体中代谢速率缓慢;在  $0 \sim 120 \text{ min}$ ,柚皮素酶促反应成线性关系,表明柚皮素在肝微粒体中呈线性消除。

表 2 不同孵育时间点柚皮苷和柚皮素含量测定 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

$t/\text{min}$	柚皮苷		柚皮素	
	$\bar{x} \pm s/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	RSD/ $\%$	$\bar{x} \pm s/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	RSD/ $\%$
0	$20.41 \pm 0.569$	2.79	$19.05 \pm 0.037$	0.19
20	$20.37 \pm 0.898$	4.41	$17.92 \pm 0.677$	3.78
40	$20.13 \pm 0.683$	3.39	$17.84 \pm 0.024$	0.13
60	$19.55 \pm 0.334$	1.71	$17.51 \pm 0.449$	2.56
80	$19.33 \pm 0.532$	2.75	$16.90 \pm 0.214$	1.27
100	-	-	$15.93 \pm 0.778$	4.88
120	-	-	$14.98 \pm 0.216$	1.44

**3 讨论**

曾选择以甲醇-水或乙腈-水为流动相,发现峰形不对称,峰较宽,故考虑加入酸液。当选择  $0.1\%$  乙酸时,发现峰形良好,达到了测定要求。在筛选内标物时,考察了橙皮苷、芦丁、槲皮素、山奈酚 4 种黄酮类物质,结果芦丁和橙皮苷保留时间与柚皮苷保留时间相近,基线不能分离,色谱峰分离度差,达不到测定要求;山奈酚色谱峰和柚皮苷、柚皮素色谱峰能完全分离,但与槲皮素色谱峰相比,保留时间较长;槲皮素出峰时间、峰形及分离度均比较合适,因此,选定以槲皮素为内标。

肝微粒体体外温孵法是研究药物体外肝代谢的一种常用方法,具有制备方便、重复性好、孵育条件易优化等特点<sup>[12]</sup>。肝微粒体样品蛋白沉淀方式是其重要一环,决定了杂峰的多少及对目标峰的干扰程度。尝试用甲醇沉淀蛋白,结果杂峰较多,分离效果不佳。改用乙腈直接沉淀蛋白,离心后进样,杂峰较少,对目标峰无干扰。

通过建立柚皮苷与柚皮素的肝微粒体中含量的测定方法及二者的体外代谢研究,发现柚皮素在体外肝微粒体中被迅速代谢成 1 个代谢产物,且 I 相

# 尼莫地平纳米结构脂质载体的制备及大鼠体内药动学

王宏媛<sup>1</sup>, 刘强<sup>2</sup>, 张云杰<sup>1</sup>, 王莹<sup>1</sup>, 周泯江<sup>1</sup>, 杨春荣<sup>1\*</sup>

(1. 黑龙江省生物药制剂重点实验室, 佳木斯大学药学院, 黑龙江 佳木斯 154007;  
2. 力品药业有限公司, 福建 厦门 361000)

**[摘要]** 目的: 制备尼莫地平纳米结构脂质载体, 考察其性质及大鼠体内药代动力学。方法: 采用熔融-超声法制备经甲氧基聚乙二醇磷脂酰乙醇胺修饰的尼莫地平纳米结构脂质载体 (mPEG2000-DSPE-NMD-NLC), 通过透射电镜观察形态, 测定粒径、包封率、载药量和 Zeta 电位, 考察体外释药特性。采用 HPLC 测定不同时间点大鼠血浆中尼莫地平质量浓度, 以尼莫地平注射液为对照, 计算 mPEG2000-DSPE-NMD-NLC 在大鼠体内的药代动力学参数。结果: 制备的 mPEG<sub>2000</sub>-DSPE-NMD-NLC 形态呈类球形, 大小均匀, 表面圆整; 粒径约 85 nm, Zeta 电位 ( $-12.77 \pm 0.15$ ) mV, 包封率和载药量分别为 ( $97.66 \pm 0.45$ )%, ( $1.46 \pm 0.05$ )%; 在 0~6 h 累计释放率 20.03%, 24 h 则为 43.06%; 药代动力学参数为  $t_{1/2} = 21.65$  h, MRT = 21.09 h, CL = 557.30 mL·h<sup>-1</sup>·kg<sup>-1</sup>, AUC<sub>(0-t)</sub> = 6 411.96 μg·h<sup>2</sup>·L<sup>-1</sup>。结论: mPEG<sub>2000</sub>-DSPE-NMD-NLC 的粒径分布均匀, 体内外缓释效果明显, 体内循环时间明显延长, 为改善尼莫地平的临床疗效提供参考。

**[关键词]** 尼莫地平; 纳米结构脂质载体; 熔融-超声法; 体外释放; 药代动力学

**[中图分类号]** R945 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)16-0178-05

**[doi]** 10.11653/syjf2013160178

**[收稿日期]** 20130522(008)

**[基金项目]** 黑龙江省研究生创新科研项目 (YJSCX2012-363HLJ); 黑龙江省自然科学基金项目 (D201158); 黑龙江省卫生厅项目 (2011-451); 黑龙江省中医管理局项目 (ZHY12-Z197)

**[第一作者]** 王宏媛, 在读硕士, 从事药剂学研究, Tel: 18714543711, E-mail: wanghongyuanka@sina.com

**[通讯作者]** \* 杨春荣, 博士, 副教授, 从事脑靶向给药系统研究, Tel: 0454-8610920, E-mail: yangchunrong98@yahoo.com.cn

代谢较柚皮苷显著, 可为柚皮苷和柚皮素的药物代谢动力学特征研究及新药开发应用提供参考。

## [参考文献]

[1] 袁旭江, 林励, 陈志霞. 化橘红中酚性成分的研究[J]. 中草药, 2004, 35(5): 499.  
[2] 杜勇, 李琰, 张小茜. 蜜橘橘红痰咳胶囊质量标准的研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2006, 12(10): 14.  
[3] 汪兰芳, 方优妮, 韩建伟, 等. 正交试验优选橘红贴膏的乙醇渗漉提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(6): 38.  
[4] 杨娟, 周向东. 柚皮素对炎症性气道黏液高分泌的作用[J]. 中国现代医学杂志, 2010, 20(5): 726.  
[5] 李秀娟, 周志钦. 柑桔柚皮苷抗癌活性研究进展[J]. 中国果业信息, 2011, 28(1): 28.  
[6] 韩小芬. 柚皮素抗纤维化、抗肿瘤作用的研究[D]. 郑

州: 河南大学, 2008.

[7] 冯颖倩, 左学兰, 李瑞芳, 等. 柚皮素对阿霉素损伤的正常血细胞的保护作用[J]. 中国实验血液学杂志, 2008, 16(4): 790.  
[8] 周燕文, 时雪峰. 柚皮苷对四氧嘧啶致糖尿病小鼠的降糖与抗氧化作用[J]. 中国药师, 2012, 15(3): 293.  
[9] 张甘良, 汪钊, 朱国孟. 柑桔生物类黄酮柚皮苷生物活性的研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2005, 17(B06): 117.  
[10] 曾苏. 药物代谢学[M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2004: 2.  
[11] 夏宗玲, 陈荣, 邹素兰, 等. HPLC 法测定大鼠肝微粒体中鞣酐的含量[J]. 中国药房, 2010, 21(37): 3483.  
[12] 杨本坤, 王素军, 莫李立, 等. 药物代谢体外模型的研究进展[J]. 广东药学院学报, 2011, 27(6): 649.

[责任编辑 全燕]