技术与方法 文章编号:0253-3626(2010)07-1037-03

固相萃取 RP-HPLC 测定小鼠肝脏组织中的德氮吡格

刘 嫱,陈志琼,靳红卫,李 伟,夏 铸,程训官,张昕宇,郑小红,余 瑜
(重庆医科大学药学院药物化学教研室 重庆市生物化学与分子药理学重点实验室 重庆市药物工程研究中心,重庆 400016)

【摘 要】目的:建立小鼠肝脏组织中德氮吡格(Tetrazanbigen)的反相高效液相色谱(RP-HPLC)测定方法。方法:精密称取小鼠肝脏组织,匀浆后固相萃取(Solid phase extraction,SPE)。液相色谱采用 Lichrospher C18 色谱柱(4.6 mm × 250 mm,5 μm),以甲醇-0.1%三乙胺水溶液(pH 6.5)(体积比 90:10)为流动相,流速 1.0 ml/min,检测波长 260 nm,进样量 20 μl。结果:实验表明,肝脏组织匀浆液中德氮吡格在 2 ~ 20 μg/ml 范围内与峰面积呈良好的线性关系(r=0.999 3),平均回收率为 106.47%。最低定量限为 1.0 μg/ml。结论:本文建立的固相萃取 RP-HPLC 方法简便、准确、选择性和重现性好,适合于德氮吡格的肝脏组织浓度检测。

【关键词】德氮吡格;固相萃取;反相高效液相色谱法;肝脏
【中国图书分类法分类号】R917 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-01-05

Determination of tetrazanbigen in liver by reversed-phase high performance liquid chromatography

LIU Qiang, et al
(*Department of Pharmacochemistry, College of Pharmacy, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To establish a solid phase extraction (SPE) and reversed-phase high-performance liquid chromatographic (RP-HPLC) method for the determination of tetrazanbigen in liver. *Methods*: Tetrazanbigen in liver samples was determined after a C18 solid phase extraction on a Lichrospher C18 column at 260 nm with an isocratic mobile phase of 90% methanol in 100 ml methanol-deionized water (pH 6.5), containing 0.1% triethyl amine. The flow rate was set at 1.0 ml/min. *Results*: The linearity was good over the concentration range of 2 ~ 20 μg/ml (r=0.9 993). The average recovery and RSD were 106.47% and 3.0% respectively. The lower limit of quantification was 1.0 μg/ml. *Conclusion*: The method is simple, accurate and can be used to determine the TNBG concentration in liver and study its metabolism.

【Key words】Tetrazanbigen; Solid phase extraction; RP-HPLC; Liver

作者简介:刘 嫱(1978-),女,讲师,博士,研究方向:药代动力学。现在海南医学院药学系药理教研室。
通讯作者:余 瑜,男,教授,E-mail:yuyu3519@163.com。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30772595、30371632、30171070)。

参 考 文 献

[1] 罗 聪,安 洪,蒋电明,等.振荡磁场下超顺磁性链霉素 PELA 微球体外药物释放特征探索[J].中国抗生素杂志,2008,33(2):101-105.
[2] 竺心影,王敏伟,刘国卿,等.药理学[M].北京:人民卫生出版社,1995.352-353.
[3] Denkbas E B, Kilicay E, Birlikseven C, et al. Magnetic chitosan microspheres: preparation and Characterization[J]. Reactive & Functional Polymers, 2002, 50(3): 225-232.
[4] Liu Y, Deng X M. Influences of preparation conditions on particle size and DNA loading efficiency for poly(DL-lactic acid-polyethylene glycol) microspheres entrapping free DNA[J]. Journal of Controlled Release, 2002, 83: 147-155.
[5] Deng X M, Zhou S B, Li X H, et al. In vitro Degradation and release profile for poly-dl-lactide-poly (ethylene glycol) microspheres containing human serum albumin[J]. controlled Release, 2001, 71 (2): 165-173.

(责任编辑:冉明会)

德氮吡格（Tetrazanbigen，TNBG）是本课题组研制的自主创新设计合成的含 2- 苯基萘三环共平面的氮杂甾烷类化合物[1]。经体内、外实验证明，德氮吡格具有良好的抗肿瘤作用，其作用机制主要是通过干扰肿瘤细胞的脂代谢过程，导致肿瘤细胞死亡，这一全新的抗肿瘤作用机制与目前广泛应用的细胞毒类抗肿瘤药物截然不同[2]。鉴于此，建立药物在肝脏组中的含量测定方法，测定肝脏组织中的药物浓度有利于了解药物的分布和代谢状况，显得尤为重要。本文采用固相萃取（Solid phase extraction，SPE）技术富集净化肝脏组织样品，通过反相高效液相色谱（RP-HPLC）紫外检测法测定了肝脏组织中的德氮吡格含量。该方法操作简便，稳定性好，重现性高，为下一步研究德氮吡格在小鼠体内的组织分布奠定了基础。

1 实验部分

1.1 药品与试剂

德氮吡格（TNBG）由本课题组自制，纯度 >99.5%，批号：20030201。甲醇（色谱纯，上海吴泾化工有限公司），其他试剂为国产分析纯。

1.2 仪器与色谱条件

Agilent 1100 series 高效液相色谱仪，色谱柱为 ODS 色谱柱（Lichrospher C18：4.6 mm × 250 mm，5 μm）；流动相为甲醇-0.1%三乙胺水溶液（pH 6.5 ）（体积比 90:10）；流速为 1.0 ml/min，柱温为 30℃；检测波长为 260 nm，进样量 20 μl。

固相萃取仪及萃取小柱 AccuBond Ⅱ ODS C18（安捷伦科技公司）；玻璃匀浆器（江苏海门市麒麟医用仪器厂）；GL-88B 旋涡混匀器（江苏海门市麒麟医用仪器厂）；Anke TGL-16G 台式高速离心机（上海安亭科学仪器厂）；HS-1200D 型超声波清洗机（上海新芝生物技术研究所）；Elgastat UHO 超纯水器（英国 Elga 公司）；Model SA7 20 pH 计（美国 Orion 公司）。

1.3 实验动物

一级昆明种小鼠由重庆医科大学实验动物中心提供，不限雌雄，体重（25 ± 3）g。

1.4 实验方法

1.4.1 德氮吡格标准溶液的配制 精密称取德氮吡格 10.0 mg，用适量甲醇溶解后，稀释定容到 50 ml 的容量瓶中，得到 200 μg/ml 的德氮吡格标准溶液备用。

1.4.2 肝组织样品的处理方法 依次用甲醇，三蒸水各 3 ml 取对固相萃取仪上的 C18 萃取小柱进行活化后，再用碳酸钠溶液（0.1 mol/L）3 ml 平衡小柱（备用）。

精密称取小鼠的肝组织样品 0.4 g，加入 0.6 ml 生理盐水，用玻璃匀浆器制成匀浆。将 0.5 ml 匀浆液置离心管中，加入碳酸钠溶液（0.1 mol/L，0.15 ml）和 0.8 ml 甲醇，涡旋 1 min，于 12 000 r/min 离心 20 min，取上清液 0.5 ml，加入碳酸钠溶液（0.1 mol/L）3 ml，混匀后，上柱，用三蒸水 15 ml 冲洗，再用甲醇 0.5 ml 洗脱，定量收集，取 20 μl 进样，记录色谱图，读取峰面积。

1.4.3 HPLC 方法 测定德氮吡格的色谱条件为：流动相：甲醇：0.1%三乙胺水溶液 =90:10（v/v，pH 6.5），流速：1.0 ml/min，柱温：30℃，测定波长：260 nm，取 20 μl 处理后的样品洗脱液注入高效液相色谱仪，记录色谱图，以峰面积外标法定量。

1.4.4 标准曲线的制备 取 1.5 ml 具塞 EP 离心管 6 支，加入 0.5 ml 小鼠肝组织匀浆，再分别加入德氮吡格的标准溶液，使肝组织匀浆中德氮吡格的最终质量浓度分别为 2、4、6、8、10、20 μg/ml。混匀后按 1.4.2 处理肝组织样品，取 20 μl 进样，记录色谱图，读取峰面积。

2 结果和讨论

2.1 肝组织样品处理方法

本试验是在已建立的测定德氮吡格血浆样品方法的基础上进行研究[3]，比较试验得知，采用 SPE 对肝脏样品进行预处理，不仅一次可处理多个样品，并且小柱可重复再生活化使用，还能保证较高的萃取回收率。同时，样品经过 C18 固相萃取小柱净化，还能保护 HPLC 柱。另外，由于德氮吡格呈现弱碱性，实验中曾用浓硫酸调节生物样品混合液为酸性，试图使被测定德氮吡格成为盐直接进入上清液，然后将上清液直接进样，结果表明采用该方法的德氮吡格回收率极低（15%），即使将上清液再通过 SPE 处理德氮吡格回收率也不高。后来将混合液用 0.1 mol /L 的碳酸钠溶液调节为碱性（pH=8）使德氮吡格游离而被甲醇提取出来，回收率显著增高（90%）。因为德氮吡格为弱碱性物质，如果用 NaOH 来调节样品溶液 pH，固然能提高德氮吡格的提取率，但同时也将血清中强碱性物质提取出来，导致干扰物质增多，影响后续分析，所以选择了碳酸钠溶液调节 pH[4]。

2.2 标准品德氮吡格的 HPLC 色谱图

测定德氮吡格的色谱条件为：流动相：甲醇：0.1%三乙胺水溶液 =90:10（v/v，pH 6.5），流速：1.0 ml/min，柱温：30℃，测定波长：260 nm。在上述色谱测定条件下德氮吡格的保留时间约为（5.7 ± 0.2）min（图 1）。

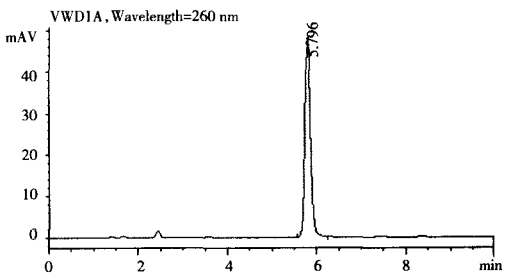


图 1 标准品德氮吡格的 HPLC 色谱图

2.3 肝脏组织中德氮吡格的 HPLC 色谱图

采用 1.4.2 方法处理小鼠空白肝脏组织（a）、小鼠空白肝脏组织加德氮吡格标准溶液的混合物（b）、静脉注射德氮吡

格后提取的小鼠肝脏组织（c）（所用德氮吡格标准溶液浓度为 10 μg/ml），然后按 1.2 的色谱条件进行分析，结果如图 2 所示，肝组织样品经过 SPE 处理后，德氮吡格与所有内源性物质之间可以达到良好分离，德氮吡格的保留时间约为 5.7 min。该方法专属性强，符合含量测试要求。

2.4 肝脏中德氮吡格的标准曲线

以色谱峰面积（A）对德氮吡格浓度（c，μg/ml）进行线性回归，得到线性回归方程为：A=8.708C+0.275，r=0.999 3（n=6），由此表明德氮吡格在 2～20 μg/ml 范围内，浓度与峰面积有良好的线性关系。将 2 μg/ml 标准溶液进行稀释，当信噪比为 3 时，德氮吡格的最低检测限为 1.0 μg/ml。

2.5 测定方法的准确度与精密度

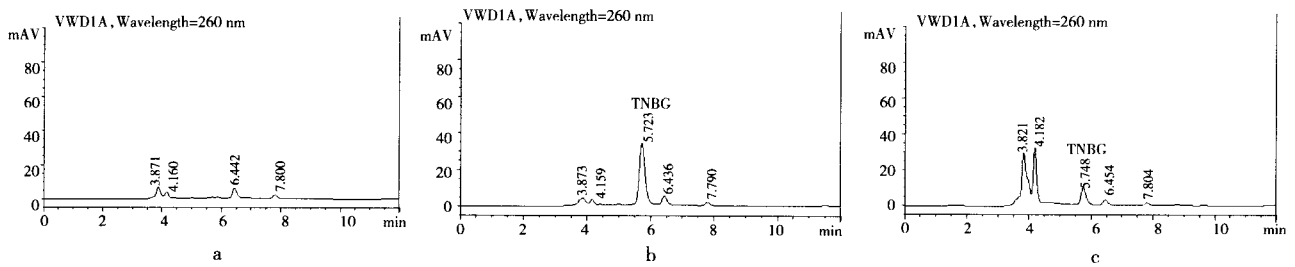
取 0.5 ml 小鼠空白肝组织匀浆置于 1.5 ml 具塞离心管中，分别加入德氮吡格的标准溶液，使匀浆中德氮吡格的最终浓度分别为 2、10、20 μg/ml。按 1.3.3 处理肝组织样品，取 20 μl 进样，记录色谱图，读取峰面积，计算回收率。每个浓度样品于一日内不同时间进样 5 次进行测定，计算日内精密度，在 1 周内不同的 3 d 分别进样 5 次，计算日间精密度，其结果见表 1。

由表 1 可见，德氮吡格在肝脏组织中的回收率都大于 90%，相对标准偏差小于 6%，表明该分析方法准确度高、精密度高、重现性好，适用于肝脏组织中德氮吡格含量的测定。

2.6 肝脏组织中德氮吡格的含量

取小鼠 8 只，分 2 组，按德氮吡格 10 mg/kg 的剂量，尾静脉注射，于 2 h 和 4 h 后，分别处死小鼠，取肝脏，照 1.4.2 方法处理、测定并计算，肝脏组织中德氮吡格的含量（n=4，$\bar{x} \pm s$）分别为：（3.319 ± 1.553）μg/g 和（2.540 ± 0.514）μg/g。

综上所述，本文建立的固相萃取 RP-HPLC 方法简便、准确、选择性和重现性好，适合于德氮吡格的肝脏组织含量检测及药动学研究。



a.空白小鼠肝脏；b.空白小鼠肝脏加标准品德氮吡格；c.小鼠肝脏中的德氮吡格

图 2 小鼠肝脏中德氮吡格的测定色谱图

表 1 小鼠肝脏中德氮吡格 HPLC 法的回收率和精密度（n=5）

样品浓度（μg/ml）	回收率（%）	平均回收率（%）	精密度（%）	
			日内	日间
2.0	115.9		4.97	4.30
10.0	113.5	106.47	5.07	5.47
20.0	90.0		1.62	1.96

参 考 文 献

[1] 余 瑜.一种氮杂甾体化合物的制备及其用途[P].中国发明专利 951114506.

[2] 李龙江，杨晓兰，袁拥华，等. 德氮吡格对人肝癌细胞株 QGY-7701 基因表达的影响[J].第三军医大学学报，2006，28（2）：151-153.

[3] 刘 嫱，陈志琼，杨 菲，等. 反相高效液相色谱法测定小鼠血浆中德氮吡格[J].西南大学学报（自然科学版），2008，30（7）：117-120.

[4] 陈志琼，张 斌，刘 嫱，等. 固相萃取 RP-HPLC 测定小鼠肝脏组织中的多沙唑嗪[J]. 分析试验室，2007，26（8）：18-20.

（责任编辑：关蕴良）