

以睾酮为探针测定大鼠 CYP3A酶活性的实验研究

黄红兵¹, 刘韬¹, 邓多², 周峰², 林子超¹, 陈倩超¹, 陈杰³, 赵立子², 毕惠嫦² (1. 华南肿瘤学国家重点实验室, 中山大学附属肿瘤医院, 广州 510060; 2. 中山大学药学院, 广州 510080; 3. 中山大学附属第一医院, 广州 510080)

摘要:目的 建立一种简便、快速、可靠的以睾酮作为探针药物, 评价大鼠 CYP3A酶活性的高效液相色谱检测方法。方法 色谱柱为 Hypersil BDS C₁₈ 柱 (4.6 mm × 150 mm, 5 μm), 柱温为 25 ℃, 检测波长为 254 nm, 内标为氢化可的松, 流动相为甲醇-10 mmol·L⁻¹ Na₂HPO₄水溶液 (pH 8.25) (55:45), 流速为 1 mL·min⁻¹。睾酮以大鼠肝微粒体温孵后, 用乙酸乙酯萃取, 离心取上清液挥干后用甲醇-水 (1:1) 复溶进样分析。结果 睾酮和氢化可的松的保留时间分别为 17.74 min 和 6.05 min; 睾酮的孵育产物 6β-羟基睾酮的保留时间为 4.72 min, 回归方程为 $Y = 0.0756X - 0.0214$ ($r = 0.9980$), 线性范围为 0.3125 ~ 20 μg·mL⁻¹, 检测限下限质量浓度为 (0.078 ± 0.016) μg·mL⁻¹ ($S/N \geq 3$), 提取回收率为 79.3% ~ 95.1%, 方法回收率为 98.0% ~ 104.0%, 低、中、高三个浓度日内、日间 RSD 均小于 10.4%; 温孵体系中其他内源性物质不干扰测定。结论 所建立的 HPLC 稳定、高效, 适合睾酮及其代谢产物 6β-羟基睾酮的测定, 可应用于药物对大鼠 CYP3A 酶活性的评价。

关键词: 睾酮; 6β-羟基睾酮; 肝微粒体; CYP3A; 高效液相色谱法

中图分类号: Q55; R917.794 文献标识码: A 文章编号: 1007-7693(2008)05-0379-04

Determination of Cytochrome P450 3A Activity in Rats with Testosterone Probe

HUANG Hong-bing¹, LIU Tao¹, DENG Duo², ZHOU Feng², LIN Zi-chao¹, CHEN QIAN-chao¹, CHEN Jie³, ZHAO Li-zi², BI HUI-chang² (1. State Key Laboratory of Oncology in South China, Tumor Hospital Affiliated to Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China; 2. School of pharmaceutical sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China; 3. The 1st Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To establish an HPLC method for evaluating CYP3A activity using testosterone *in vitro*. **METHODS** A Hypersil BDS C₁₈ column (4.6 mm × 150 mm, 5 μm) at 25 ℃ was used. The mobile phase was methanol-10 mmol·L⁻¹ Na₂HPO₄ solution (pH 8.25) (55:45) and the flow rate was 1 mL·min⁻¹. The UV wave length was set at 254 nm. The internal standard was hydrocortisone. Testosterone was incubated with rat liver microsome *in vitro*. Testosterone and its metabolism were extracted by acetic ether and dissolved by methanol-water (1:1) and further analyzed by HPLC. **RESULTS** The retention time of testosterone and hydrocortisone were 17.74 and 6.05 min. The retention time of 6β-hydroxylated testosterone was 4.72 min, and the regression equation was $Y = 0.0756X - 0.0214$ ($r = 0.9980$). The linear range was 0.3125 - 20 μg·mL⁻¹, and the minimum detectable concentration was (0.078 ± 0.016) μg·mL⁻¹ ($S/N \geq 3$). The abstraction recoveries were from 79.3% to 95.1% and the relative recoveries were from 98.0% to 104.0%. The Intra-day RSD and Inter-day RSD of low, middle and high concentrations were 3.1%, 3.6%, 1.90% and 9.8%, 10.4%, 1.60%, respectively. Others endogenous metabolins didn't interfere the detection of 6β-hydroxylated testosterone. **CONCLUSION** The method is stable, accurate and suitable for the determination of 6β-hydroxylated testosterone and evaluation of CYP3A activity.

KEY WORDS: testosterone; 6β-hydroxylated testosterone; liver microsome; CYP3A; HPLC

药物代谢的主要场所是肝脏, 肝脏进行生物转化则依赖于微粒体中的多种酶系, 其中细胞色素 P450 混和功能氧化酶系统 (CYP450) 是最大的药物代谢酶蛋白超家族, 它的 CYP3A 亚族是成人肝微粒体中最重要的成分。目前发现, CYP3A 亚族参与红霉素、尼莫地平、利多卡因、环孢霉素、奥美拉唑等大约 38 个类别共 150 多种药物的代谢, 约占临床常用药物的 50% 以上^[1]。因此, 准确地评价 CYP3A 亚族的酶活性对药物相互作用的研究具有十分重要的指导意义。

目前, 国内外已广泛认同采用液相色谱-质谱 (LC-MS) 或¹⁴C 标记的检测方法, 选用睾酮作为探针底物, 通过大鼠肝微粒体孵育后测定其代谢产物 6β-羟基睾酮的生成量, 从而对大鼠 CYP3A 酶活性进行评价^[2]。但有关文献报道的方法因睾酮在肝微粒体中的代谢产物较为复杂, 分离纯化困难, 睾酮的大多数代谢产物得不到很好的分离, 从而影响 6β-羟基睾酮的定量。本实验在借鉴前人研究的基础上, 对样品的萃取方法及 HPLC 测定条件等进行了改进, 建立了一种稳定的大

基金项目: 广东省医院药学研究基金资助项目 (编号 2008A007)

作者简介: 黄红兵, 男, 硕士, 副主任药师 Tel: (020) 87343322

E-mail: hhbsums@mail.sysu.edu.cn

鼠肝微粒体温孵体系中睾酮及其代谢产物 6 β -羟基睾酮的分离和定量分析的方法,该方法可应用于体外 CYP3A酶活性的评价,本课题已将该方法用于紫杉烷类药物对大鼠 CYP3A作用效应的系列研究。

1 实验材料

1.1 药品与试剂

睾酮 (testosterone, TS, Sigma公司, 纯度 $\geq 99\%$); 6 β -羟基睾酮 (6 β -hydroxylated testosterone, 6 β -OHT, Sigma公司, 纯度 $\geq 99\%$); 还原型辅酶 II (NADPH, AppliChem, 德国); 甲醇、乙酸乙酯 (色谱纯, Tedia); 乙二醇四乙酸 (EDTA, Roche); 焦磷酸钾、三 (羟甲基) 氨基甲烷 (Tris)、盐酸、二巯基赤藓醇、甘油、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、氯化钠、氯化钾均为国产分析纯, 水为灭菌注射用水。

1.2 仪器

Waters 高效液相系统: Waters 717 plus 自动进样器, Waters 2487 Dual λ Absorbance 检测器, Empower 色谱工作站 (Waters 公司, USA); METTLER AE-260 电子分析天平 (Delta range, Swiss); BZF-6050 真空干燥箱 (上海一恒科学仪器有限公司); 恒温水浴振荡器 (富年 SHA-e); XW-80A 旋涡混合器 (上海医科大学仪器厂); Milli Q-plus 超纯水净化系统 (Billerica, MA, USA)。

1.3 实验动物

Sprague-Dawley (SD) 大鼠, 雄性, 体重 (270 $\pm$ 20) g, 由中山大学实验动物中心提供, 实验动物质量合格证明号: 0032913。

2 实验方法

2.1 色谱条件

色谱柱: 大连依利特 Hypersil BDS C₁₈ 柱 (4.6 mm $\times$ 150 mm, 5 μ m); 柱温: 25 $^{\circ}$ C; 检测波长: 254 nm; 流动相: 甲醇-10 mmol $\cdot$ L⁻¹ Na₂HPO₄ 水溶液 (pH 8.25) (55:45); 流速: 1 mL $\cdot$ min⁻¹。

2.2 主要试剂的配制

2.2.1 睾酮 (TS) 标准储备液的配制 精密称取 0.288 0 g 睾酮至 5 mL 量瓶中, 加甲醇溶解稀释至刻度, 摇匀, 得到 200 mmol $\cdot$ L⁻¹ 的睾酮母液, 置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存, 临用前用甲醇-水 (1:1) 稀释至所需浓度。

2.2.2 6 β -羟基睾酮 (6 β -OHT) 标准储备液的配制 精密称取 6 β -羟基睾酮 0.012 5 g, 置于 5 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 旋涡混匀, 得到 0.002 5 g $\cdot$ mL⁻¹ 的 6 β -羟基睾酮的标准储备液, 置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存, 临用前用甲醇-水 (1:9) 稀释至所需浓度。

2.2.3 氢化可的松标准储备液的配制 精密称取氢化可的松 0.025 g 至 5 mL 量瓶中, 用甲醇-水 (1:1) 溶解并稀释至刻度, 摇匀, 即得到 0.005 g $\cdot$ mL⁻¹ 的储备液, 置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存, 临用前用甲醇-水 (1:9) 稀释至所需浓度。

2.2.4 磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 的配制 分别称取 0.2 g KCl, 0.2 g KH₂PO₄, 8.0 g NaCl, 1.15 g Na₂HPO₄, 用 6 mol $\cdot$ L⁻¹ 的 HCl 调 pH 至 7.4, 定容至 1 L, 置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存, 用

于肝微粒体的孵育实验。

2.2.5 焦磷酸钾溶液 (pH 7.4) 的配制 取 0.1 mol $\cdot$ L⁻¹ 的焦磷酸钾溶液和 1 mol $\cdot$ L⁻¹ 的 EDTA 溶液混匀, 用 6 mol $\cdot$ L⁻¹ 的 HCl 溶液调节 pH 至 7.4。

2.2.6 Tris-HCl (pH 7.4) 缓冲液的配制 取 0.1 mol $\cdot$ L⁻¹ 的 Tris 溶液、0.1 mmol $\cdot$ L⁻¹ 的 EDTA 溶液、0.1 mmol $\cdot$ L⁻¹ 的二巯基赤藓醇溶液、20% 甘油混匀, 用 6 mol $\cdot$ L⁻¹ 的 HCl 调节 pH 至 7.4。

2.3 SD 大鼠肝微粒体的制备

用差速离心法制备大鼠肝微粒体。将大鼠断头处死, 剖腹, 取出肝脏, 用冰冻生理盐水冲洗, 滤纸吸干, 用剪刀将肝脏剪成小块, 用冰冷的蔗糖溶液洗涤 2~3 次, 至洗出液呈无色或淡黄色。用剪刀把肝小块剪碎, 然后加约 4 倍肝重的蔗糖溶液, 在冰浴中匀浆 20 s, 重复 2 次, 匀浆液转移至离心管中, 16 000 r $\cdot$ min⁻¹ 高速离心 20 min (4 $^{\circ}$ C), 取上清液于 25 000 r $\cdot$ min⁻¹ 超速离心 60 min (4 $^{\circ}$ C), 弃上清液, 沉淀用焦磷酸钾溶液混悬均匀, 再次于 25 000 r $\cdot$ min⁻¹ 超速离心 60 min (4 $^{\circ}$ C), 弃上清液, 沉淀用 2 倍肝重的 Tris-HCl 缓冲液混悬均匀, 分装, 于 -80 $^{\circ}$ C 保存备用^[3]。

2.4 体外孵育代谢实验

精密吸取睾酮标准储备液 20 μ L, 用甲醇-水 (1:1) 180 μ L 稀释至终浓度为 20 mmol $\cdot$ L⁻¹。精密吸取 20 mmol $\cdot$ L⁻¹ 的睾酮溶液 5 μ L 于 10 mL 玻璃离心管中, 加入适量制备好的肝微粒体, 使药物反应体系中肝微粒体蛋白浓度 (用 Lowry 法测定肝微粒体蛋白浓度^[3]) 为 0.25 mg $\cdot$ mL⁻¹, 用 pH 7.4 的磷酸盐缓冲液补足体系至 500 μ L, 于 37 $^{\circ}$ C 水浴中预孵育 5 min 后, 加入 20 μ L 的 NADPH (10 mmol $\cdot$ L⁻¹) 启动反应, 37 $^{\circ}$ C 水浴 20 min 后, 加入 50 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 的内标氢化可的松 12 μ L, 再加入 3.5 mL 冰冷的乙酸乙酯终止反应。

2.5 样品处理

取终止代谢的样品, 旋涡混匀 2 min, 室温放置 10 min, 3 500 r $\cdot$ min⁻¹ 离心 10 min, 吸取上清液转移至另一离心管中, 于真空干燥箱中挥干后用甲醇-水 (1:1) 200 μ L 溶解, 旋涡混匀 2 min 后, 16 000 r $\cdot$ min⁻¹ 离心 5 min。吸取上清液 20 μ L 进样测定。

2.6 方法专属性

取灭活的大鼠肝微粒体 15 μ L 加至离心管中, 用磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 补足体系至 500 μ L, 按照“2.5”项下方法操作, 进行 HPLC 分析; 另取 3 支离心管, 各加入灭活大鼠肝微粒体 15 μ L, 再分别加入 20 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 的 6 β -羟基睾酮 50 μ L, 50 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 的内标氢化可的松 12 μ L, 20 mmol $\cdot$ L⁻¹ 的睾酮溶液 5 μ L, 按照“2.5”项下方法操作, 进行 HPLC 分析; 另将 15 μ L 灭活大鼠肝微粒体, 20 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 的 6 β -羟基睾酮 50 μ L, 50 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 的内标 12 μ L, 20 mmol $\cdot$ L⁻¹ 的睾酮溶液 5 μ L 一起加入离心管中, 用磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 补充体系至 500 μ L, 按照“2.5”项下方法操作, 进行 HPLC 分析; 另取肝微粒体和灭活肝微粒体各 15 μ L 至两支离心管中, 分别加入 20 mmol $\cdot$ L⁻¹ 的睾酮各 5 μ L, 按照“2.5”项下方法操作,

进行 HPLC 分析。

2.7 标准曲线的制备

取 10 mL 具塞离心管, 分别加入 0.3125、0.625、1.25、2.5、5、10、20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 6 β -羟基睾酮溶液 50 μL , 于各管中加入 20 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ 的睾酮溶液 5 μL , 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的内标 12 μL 以及 15 μL 灭活大鼠肝微粒体, 用磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 补足体系至 500 μL , 按照“2.5”项下方法操作, 进行 HPLC 分析。以 6 β -羟基睾酮与内标氢化可的松的峰面积比为纵坐标, 其各自对应的 6 β -羟基睾酮的浓度为横坐标进行线性回归。

2.8 回收率试验

2.8.1 方法回收率 取灭活肝微粒体 15 μL , 加入 20 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ 的睾酮溶液 5 μL , 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的内标液 12 μL , 分别加入 0.625、2.5、10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 6 β -羟基睾酮溶液 50 μL , 用磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 补充体系至 500 μL , 按照“2.5”项下方法操作, 进样测定。每个浓度平行测定 5 次, 取 6 β -羟基睾酮与内标峰面积之比的均值计算方法回收率及 RSD。

2.8.2 提取回收率 取灭活肝微粒体 15 μL , 加入 20 mmol $\cdot \text{L}^{-1}$ 的睾酮溶液 5 μL , 50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 内标 12 μL , 分别加入 0.625、2.5、10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 6 β -羟基睾酮溶液 50 μL , 用磷酸盐缓冲液 (pH 7.4) 补充体系至 500 μL , 按照“2.5”项下方法操作, 进样测定, 每个浓度平行测定 5 次, 记录 6 β -羟基睾酮与内标峰面积比值 A1; 另取上述 3 个浓度 6 β -羟基睾酮溶液各 50 μL , 加甲醇-水 (1:1) 至 200 μL , 旋涡混匀 2 min, 16 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 吸取上清液 100 μL 进样测定, 每个浓度平行测定 5 次, 记录 6 β -羟基睾酮与内标峰面积比值 A2 按照公式: $(A1/A2) \times 100\%$ 计算提取回收率及 RSD。

2.9 精密度的考察

配制 0.625、2.5、10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 低、中、高 3 种浓度 6 β -羟基睾酮的肝微粒体孵育液样品, 每一浓度按“2.4”和“2.5”方法处理后进样测定 5 次, 以 6 β -羟基睾酮与内标峰面积之比测定日内 RSD。另于不同工作日对 6 β -羟基睾酮低、中、高 3 个浓度的肝微粒体孵育体系按上述方法处理, 连续测定 3 d 得到日间 RSD。

2.10 稳定性考察

在灭活的大鼠肝微粒体孵育液中加入 0.625、2.5、10 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 低、中、高 3 种浓度的 6 β -羟基睾酮标准溶液, 室温放置, 分别于 0、4、8、12、24 h 按“2.4”和“2.5”项下方法处理、测定各浓度的 RSD 值; 同法将 3 种浓度的样品置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中储存, 分别于第 1、3、5、7 d 解冻, 按“2.4”和“2.5”项下方法处理、测定各浓度 RSD 值。

3 实验结果

3.1 方法专属性

6 β -羟基睾酮、内标氢化可的松和睾酮峰分离良好, 保留时间分别为 4.72 min、6.05 min 和 17.74 min, 三种物质与睾酮的其它代谢产物分离良好, 肝微粒体中的内源性物质不干扰测定, 见图 1。

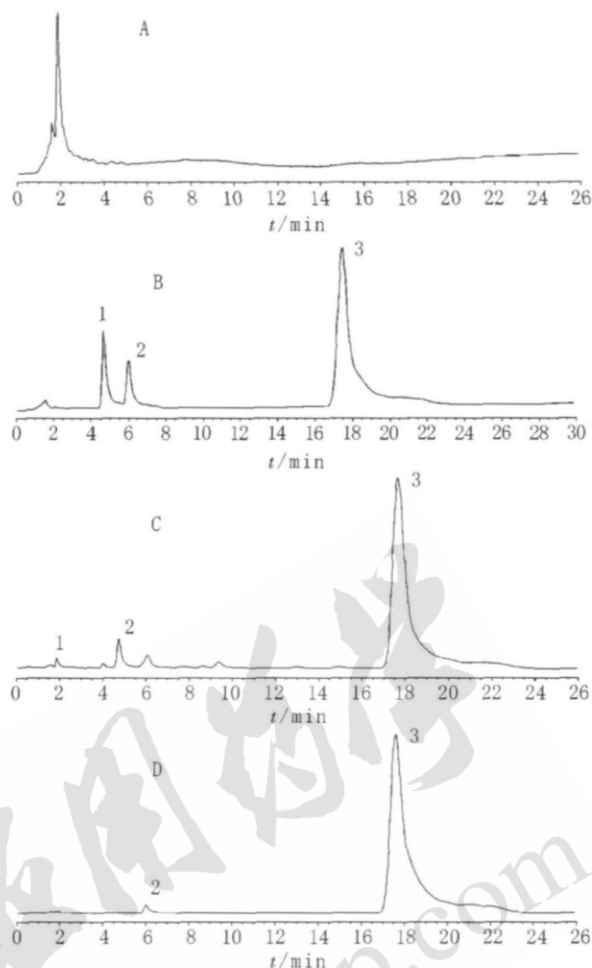


图 1 高效液相色谱图

A - 大鼠正常肝微粒体; B - 6 β -羟基睾酮、内标氢化可的松和睾酮标准混和溶液; C - 正常肝微粒体孵育睾酮; D - 灭活肝微粒体孵育睾酮; 1 - 6 β -羟基睾酮 (代谢产物, $t_R = 4.72$ min); 2 - 氢化可的松 (内标, $t_R = 6.05$ min); 3 - 睾酮 (探针药物, $t_R = 17.74$ min)

Fig 1 HPLC Chromatogram

A - blank rat liver microsome; B - 6 β -OHT, hydrocortisone and TS standards; C - TS incubated with normal rat liver microsome; D - TS incubated with inactive rat liver microsome; 1 - 6 β -hydroxylated testosterone (metabolism, $t_R = 4.72$ min); 2 - hydrocortisone (internal standard, $t_R = 6.05$ min); 3 - testosterone (probe, $t_R = 17.74$ min)

3.2 标准曲线与检测限下限

6 β -羟基睾酮的线性范围为 0.3125 ~ 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 在灭活肝微粒体中的检测限下限质量浓度为 (0.078 ± 0.016) $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($n = 5$, $S/N \geq 3$); 标准曲线方程为 $Y = 0.0756X - 0.0214$ ($r = 0.9980$)。

3.3 方法回收率和提取回收率

6 β -羟基睾酮低、中、高 3 个浓度的萃取回收率和方法回收率见表 1, RSD 均小于等于 11.0% ($n = 5$), 符合生物样本检测要求。

3.4 日内、日间精密度的

6 β -羟基睾酮低、中、高三个浓度的日内和日间精密度的见表 2, RSD 均小于等于 10.4% ($n = 5$), 符合生物样品分析要求。

表 1 大鼠肝微粒体内 6β 羟基睾酮的方法回收率与提取回收率 (n = 5)

Tab 1 Method and extraction recoveries of 6β-OHT in rat's liver microsomes(n = 5)

浓度 / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	提取回收率 /%		相对回收率 /%	
	$\bar{x}\pm s$	RSD /%	$\bar{x}\pm s$	RSD /%
0.625	86.8 ±9.51	11.00	104.0 ±2.09	3.09
2.5	95.1 ±3.35	3.52	98.0 ±8.86	3.62
10.0	79.3 ±2.83	3.57	98.8 ±1.88	1.90

表 2 6β 羟基睾酮批内与批间精密度 (n = 5)

Tab 2 Intra-day and inter-day precision data for assays of 6β-OHT(n = 5)

浓度 / $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	日内精密度		日间精密度	
	$\bar{x}\pm s$	RSD /%	$\bar{x}\pm s$	RSD /%
0.625	0.676 ±0.021	3.1	0.762 ±0.075	9.8
2.5	2.450 ±0.089	3.6	2.380 ±0.24	10.4
10.0	9.880 ±0.18	1.9	9.880 ±0.15	1.6

3.5 稳定性

室温放置条件下各浓度的 RSD 均小于 7.5% ,表明样品在 24 h 内稳定 ; - 80 ℃ 冰箱中储存各浓度的 RSD 均小于 11.2% ,表明该样品在 - 80 ℃ 条件下至少稳定 1 周。

4 讨论

目前国内外大都采用 HPLC 检测 CYP3A 酶系活性 ,以此为基础 ,本实验室所建立的以睾酮为探针底物的 HPLC ,从萃取溶剂、色谱柱规格、上样量、检测波长、保留时间、流速等方面对 HPLC 的条件进行了细致研究 ,最终确定以乙酸乙酯作为睾酮及其代谢产物的萃取溶剂 ,以磷酸氢二钠缓冲液 (pH 8.25) - 甲醇 (45 : 55) 为流动相 ,可使睾酮和 6β 羟基睾酮出峰时间提前 ,且与睾酮的多个代谢产物及内标物质氢化可的松

的色谱峰分离良好 ,满足检测需要。与文献报道^[4]的方法比较 ,本实验的样品处理过程较简便 ,消耗时间短 ,在确保稳定高效的同时简化了实验流程 ,适合体外睾酮及 6β 羟基睾酮的定量 ,为本课题进一步开展药物对 CYP3A 酶系活性及酶动力学研究提供了方法学依据。

此外 ,据文献报道和本试验考察 ,睾酮在肝微粒体中的代谢产物较为复杂 ,除在 4.72 min 左右有 6β 羟基睾酮峰外 ,在 4.0 min 和 9.4 min 左右亦有色谱峰出现 ,极可能是睾酮经由其他 CYP 酶系亚型孵育后的代谢产物。有文献报道^[4] ,睾酮的 16β-OHT 代谢物可作为 CYP2B 活性的指标 ,而 2α-OHT、16α-OHT 代谢物可作为 CYP2C 活性的指标 ,本课题将进一步对所建立的 HPLC 进行优化 ,以同时进行多个 CYP450 酶系亚型的研究。

致谢 :感谢陈杰博士对实验提供的大力帮助 !

REFERENCES

[1] MA J, QIAN B L. Research advances in human cytochrome P450s and their application in New Drug Evaluation [J]. Chin J New Drug (中国新药杂志) , 2002, 11 (1) : 36-42.

[2] JIN K T, WANG Y G, XU P, *et al.* HPLC progress determination of microsome cytochrome P450 activity of rat liver [J]. Chin J Pharm Anal (药物分析杂志) , 2006, 26 (3) : 415-419.

[3] ZENG S. Drug Metabolism (药物代谢学) [M]. Hangzhou: Zhejiang University Publishing House, 2004: 250-252.

[4] ZHANG R, LIU C H, WANG N S, *et al.* Determination of cytochrome P450 3A4 activity with testosterone probe using high performance liquid chromatography [J]. Chin J Chromatogr (色谱) , 2008, 26 (1) : 80-83.

收稿日期 : 2008-06-19