

## 中药研究

# HPLC同时测定大鼠肠循环液中盐酸小檗碱和酚红的浓度

胡慧玲<sup>1</sup> 王战国<sup>2</sup> 刘芳<sup>2</sup> 杜青青<sup>2</sup> 何瑶<sup>1</sup>

(1. 成都中医药大学, 四川 成都 610075; 四川大学华西药学院, 四川 成都 610041)

**摘要:** 目的: 同时测定大鼠肠循环液中盐酸小檗碱和酚红的浓度。方法: 采用 RP-HPLC 法, 色谱柱为 Welchum-C18 (5  $\mu$ m, 250 mm  $\times$  4.6 mm), 流动相为乙腈-水-磷酸-三乙胺 (30: 70: 0.2: 0.1), 柱温 30 $^{\circ}$ C, 流速 1.0 mL/min, 检测波长 270 nm。结果: 方法精密度及线性关系良好, 盐酸小檗碱和酚红低、中、高浓度的回收率分别为 99.66% ( $RSD = 0.49\%$ )、99.26% ( $RSD = 0.68\%$ )、99.69% ( $RSD = 0.62\%$ ); 99.85% ( $RSD = 0.70\%$ )、99.44% ( $RSD = 0.86\%$ )、99.72% ( $RSD = 1.32\%$ )。结论: 该法操作简便, 结果准确, 灵敏度高。

**关键词:** 盐酸小檗碱; 酚红; 在体肠循环; 高效液相色谱法

中图分类号: R285 R969.1 文献标识码: A 文章编号: 1004-0668 (2008) 04-0067-03

## Simultaneous determination of berberine and phenolsulfonphthalein in the solution of in situ intestinal loop by HPLC

HU Hui-ling<sup>1</sup>, WANG Zhan-guo<sup>2</sup>, LIU Fang<sup>2</sup>, et al

(1 Chengdu University of TCM, Chengdu 610075, China; 2 West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

**Abstract Objective** To determine the concentrations of berberine and phenolsulfonphthalein in the solution of in situ intestinal loop simultaneously. **Method** An RP-HPLC method was established with a Welchum-C18 (5  $\mu$ m, 250 mm  $\times$  4.6 mm). The mobile phase was acetonitrile-water-phosphoric acid-triethylamine (30: 70: 0.2: 0.1) and the column temperature was set at 30 $^{\circ}$ C. The flow rate was 1.0 mL/min with detective wavelength of 270 nm. **Results** The precision and the linear relation of this method were acceptable. The recoveries of berberine and phenolsulfonphthalein were 99.66% ( $RSD = 0.49\%$ ), 99.26% ( $RSD = 0.68\%$ ), 99.69% ( $RSD = 0.62\%$ ); 99.85% ( $RSD = 0.70\%$ ), 99.44% ( $RSD = 0.86\%$ ), 99.72% ( $RSD = 1.32\%$ ) with low, middle, high concentration respectively. **Conclusion** This method is simple, accurate and high sensitivity.

**Key words** Berberine, Phenolsulfonphthalein, Intestinal loop in situ, HPLC

大鼠原位肠循环灌注实验法<sup>[1]</sup>是研究药物肠吸收的重要实验方法。盐酸小檗碱是黄连、黄柏、三颗针等常用中药的主要成分之一。文献报道<sup>[2-4]</sup>, 盐酸小檗碱在比格犬、小鼠、家兔的肠道吸收情况不统一。本文采用大鼠原位肠循环灌注实验法研究其在大鼠小肠的吸收情况, 同时参考文献<sup>[5]</sup>, 我们建立了 HPLC 法同时测定盐酸小檗碱和酚红的含量, 并简化了酚红的测定 (文献常采用分光光度法单独测定<sup>[6]</sup>)。

### 1 实验部分

#### 1.1 仪器与试剂

LC-2010C HT 高效液相色谱系统 (由四元梯度泵、脱气单元、紫外可见检测器、柱温箱、自动进样器、系统控制器等构成, Shimadzu, Japan); HL-2 型恒流蠕动泵 (上海青浦沪西仪器厂); BP211D 型天平 (Sartorius 公司); CQ-205 型超声清洗仪 (上海超声波仪器厂); 恒温水浴锅 (上海医疗设备总厂); Votex Genius 3 旋涡混合仪, 德国 IKA 公司

基金项目: 成都中医药大学科研基金项目 (编号: ZKyB2007031)

作者简介: 胡慧玲, 女, 1978 年 12 月生, 讲师, 研究方向: 中药炮制原理、中药新剂型新技术研究。

(KA, Germany); TDL-5 台式离心机 (上海安亭科学仪器厂)。盐酸小檗碱对照品 (berberine BBR, 中国药品生物制品检定所, 批号: 110713-200609); 酚红 (phenolphthalein PP, 天津科密欧化学试剂开发中心, 批号: 20040111); 盐酸小檗碱提取物 (四川升和制药有限公司, 批号: 060204 含量  $\geq 95\%$ ); 乙腈为色谱纯; 水为超纯水; 其他试剂均为分析纯。

### 1.2 方法与结果

#### 1.2.1 色谱条件

色谱柱为 Welchrom-C18 (5 $\mu$ m, 250 mm  $\times$  4.6 mm), 流动相为乙腈-水-磷酸-三乙胺 (30:70:0.2:0.1), 柱温 30 $^{\circ}$ C, 流速 1.0 mL/min, 检测波长 270 nm。

#### 1.2.2 大鼠原位肠循环灌注实验法

取实验前禁食 12 h (自由饮水) 的 SD 大鼠, 腹腔注射戊巴比妥钠 30 mg/kg 麻醉后固定。沿腹中线打开腹腔 (约 2.5 cm), 结扎胆管, 在实验肠管两端各切一小口, 在上端小口处插入直径为 0.3 cm 的玻璃管, 并用线扎紧。用注射器将 37  $\pm$  0.5 $^{\circ}$ C 的生理盐水缓缓注入肠管, 洗去肠管内容物至净。然后在实验肠管下端小口处插入玻璃管, 并用线扎紧。将肠管两端的玻璃管与蠕动泵的胶管连接, 形成回路, 开动蠕动泵。以 5 mL/min 流速循环 10 min 后, 将流速调节为 2.5 mL/min, 立即自装有灌注液锥形瓶中取样 0.5 mL, 作为测定零时间药物浓度和酚红浓度的样品, 另向锥形瓶中补加酚红 K-R 液 0.5 mL, 其后每隔 15 min 亦按同法取样并补加酚红 K-R 液, 循环 3 h 后中止实验。

#### 1.2.3 溶液的配制

KR 试液 (pH 7.4): 称取 NaCl 17.80 g, KCl 10.35 g, CaCl<sub>2</sub> 0.37 g, NaHCO<sub>3</sub> 1.37 g, NH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.32 g, MgCl<sub>2</sub> 0.02 g, 葡萄糖 1.40 g, 加水定容至 1 L。

KR 试液 (含维生素 C): 精密称取维生素 C 2.0 g, 用 KR 试液定容至 1 L。

盐酸小檗碱和酚红 KR 试液 (含维生素 C): 精密称取盐酸小檗碱提取物 10.00 mg, 酚红 20.00 mg, 维生素 C 2.00 g, 用 KR 试液稀释定容至 1 L。

空白肠循环灌注液: 照 “1.2.2” 方法, 将 K-R 液 (含维生素 C) 循环 3 h, 中止实验, 即得空白肠循环灌注液。

肠循环灌注样品液 (盐酸小檗碱和酚红): 照 “1.2.2” 方法, 将盐酸小檗碱和酚红 KR 试液 (含维生素 C) 循环 3 h, 中止实验, 即得肠循环灌注样品液。

混合对照品储备液: 取盐酸小檗碱、酚红对照品分别为 11.80 mg, 10.10 mg, 精密称定, 置 100 mL 容量瓶中, 甲醇溶解, 稀释定容至刻度, 摇匀, 4 $^{\circ}$ C 冷藏保存, 作为混合对照品储备液。

混合对照品系列标准工作液: 分别精密吸取混

合对照品储备液适量, 用 50% 甲醇溶液稀释成混合对照品系列标准工作溶液, 盐酸小檗碱浓度: 0.59 ~ 11.80  $\mu$ g/mL, 酚红浓度: 0.51 ~ 10.10  $\mu$ g/mL。

盐酸小檗碱和酚红 KR 试液 (含维生素 C): 分别精密称取盐酸小檗碱提取物 (5.00, 10.00, 20.00 mg)、酚红 20.00 mg, 维生素 C 2.00 g, 用 KR 试液稀释定容至 1 L。

1.2.4 专属性考察 分别取空白肠循环灌注液 (按 “1.2.9” 方法处理)、混合对照品溶液 (盐酸小檗碱浓度: 5.90  $\mu$ g/mL, 酚红浓度: 5.05  $\mu$ g/mL)、肠循环灌注液样品 (按 “1.2.9” 方法处理), 在 “1.2.1” 条件下, 进样 10  $\mu$ L, 测定, 色谱图见图 1。结果表明, 酚红、盐酸小檗碱的保留时间分别为 4.6, 10.2 min。肠循环灌注液样品中 2 种物质的保留时间与对照品的一致。供试液中其他成分在色谱条件下不干扰测定。

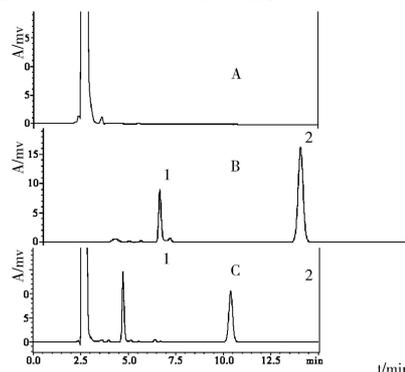


图 1 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms (1PP; 2 BBR)

(A: Blank circum fusion solution; B: Reference solution with BBR + PP; C: Circum fusion sample)

#### 1.2.5 线性关系与方法灵敏度考察

分别取混合对照品系列标准工作液, 在 “1.2.1” 条件下, 进样 10  $\mu$ L, 以色谱峰面积 (A) 为纵坐标, 浓度 (C) 为横坐标, 绘制标准曲线, 采用 SPSS 10.0 软件, 以最小二乘法求得各自的加权回归方程, 盐酸小檗碱的回归方程:  $A = 40355.16C + 828.32$  ( $r = 0.9999$ ), 最低定量浓度为 0.59  $\mu$ g/mL; 酚红的回归方程:  $A = 14497.17C - 237.18$  ( $r = 0.9999$ ), 最低定量浓度为 0.51  $\mu$ g/mL。

#### 1.2.6 精密度的测定

日内精密度分别吸取高、中、低 3 个不同浓度的混合对照品溶液, 在 “1.2.1” 条件下, 进样 10  $\mu$ L, 重复进样 5 次, 根据回归方程计算各对照品浓度, 计算各自的相对标准偏差 (RSD %)。结果见表 1。

日间精密度分别在 1d, 2d, 3d 分别吸取高、中、低 3 个不同浓度的混合对照品溶液, 在 “1.2.1” 条件下, 进样 10  $\mu$ L, 重复进样 5 次, 根据回归方程计算各样品浓度, 计算各自的相对标准偏差 (RSD %)。结果见表 1。结果表明, 盐酸小檗碱和酚红的日内和日间精密度均良好。

表 1 盐酸小檗碱和酚红的日内精密性 ( $n=5$ ) 和日间精密性 ( $n=15$ )

组别	Conc. Added $\mu\text{g/mL}$	inter-day ( $n=5$ )		intra-day ( $n=15$ )	
		Mean conc. found $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ( $\bar{x}\pm s$ )	RSD (%)	Mean conc. found	RSD (%)
BBR	1.18	1.19 $\pm$ 0.01	1.05	1.18 $\pm$ 0.01	0.94
	2.95	2.92 $\pm$ 0.01	0.26	2.92 $\pm$ 0.02	0.66
	8.85	8.84 $\pm$ 0.02	0.23	8.82 $\pm$ 0.06	0.70
PP	1.01	1.00 $\pm$ 0.01	0.92	1.00 $\pm$ 0.01	1.01
	2.53	2.50 $\pm$ 0.03	1.23	2.50 $\pm$ 0.03	1.01
	7.58	7.51 $\pm$ 0.04	0.54	7.53 $\pm$ 0.06	0.84

### 1.2.7 稳定性考察

KR 溶液和肠循环灌注液样品在 37°C 水浴 3 h 的稳定性取取盐酸小檗碱适量, 分别加入含酚红的空白肠循环液溶解后, 置 37°C 水浴中孵育, 分别于 0、3 h 取样按“1.2.9”项下处理, 在“1.2.1”条件下, 进样 10  $\mu\text{L}$ 。

甲醇处理后样品溶液的稳定性 取盐酸小檗碱适量, 分别加入含酚红的空白肠循环液溶解后, 置 37°C 水浴中孵育, 按“1.2.9”样品处理方法处理样品, 在进样室 (室温) 中, 分别于 0、48 h 考察, 在“1.2.1”条件下, 进样 10  $\mu\text{L}$ 。根据回归方程计算各样品浓度, 以药物剩余百分比表示药物稳定性, 结果见表 2。

表 2 盐酸小檗碱和酚红的稳定性 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ )

组别	37°C				Room temperature		
	KR-solution		Circum fusion-solution		Remaining % (48 h)	RSD %	
	Remaining % (3 h)	RSD %	Remaining % (3 h)	RSD %			
BBR	low	99.14 $\pm$ 0.56	0.56	98.71 $\pm$ 0.40	0.40	101.54 $\pm$ 1.16	1.14
	middle	99.76 $\pm$ 0.42	0.42	100.86 $\pm$ 1.69	1.68	100.43 $\pm$ 0.49	0.49
	high	99.34 $\pm$ 0.27	0.28	100.78 $\pm$ 2.64	2.62	100.44 $\pm$ 0.84	0.83
PP	low	98.89 $\pm$ 0.66	0.67	99.70 $\pm$ 0.79	0.80	100.15 $\pm$ 0.26	0.26
	middle	99.45 $\pm$ 1.03	1.03	102.55 $\pm$ 1.10	1.07	99.52 $\pm$ 0.15	0.15
	high	100.28 $\pm$ 1.11	1.10	99.09 $\pm$ 0.55	0.56	99.54 $\pm$ 1.03	1.04

### 1.2.8 回收率的测定

取混合对照品贮备液不同体积, 置 10 mL 容量瓶中, 用空白 K-R 液: 甲醇 (1:2 v/v) 溶液稀释定容至刻度, 摇匀, 得高、中、低三个浓度的对照品工作液。在“1.2.1”条件下, 进样 10  $\mu\text{L}$ , 测定, 记录色谱图与各组分峰面积, 根据回归方程计算各样品浓度。以测定浓度与加入浓度之比计算回收率, 结果见表 3。

表 3 盐酸小檗碱和酚红的回收率测定结果 ( $n=5$ )

组别	Conc. Added $\mu\text{g/mL}$	Mean conc. found) $\mu\text{g/mL}$ ( $\bar{x}\pm s$ )	RSD (%)	Recovery (%)
BBR	1.18	1.18 $\pm$ 0.01	0.49	99.66 $\pm$ 0.48
	2.95	1.18 $\pm$ 0.01	0.68	99.26 $\pm$ 0.68
	8.85	1.18 $\pm$ 0.01	0.62	99.69 $\pm$ 0.62
6PP	1.01	1.01 $\pm$ 0.01	0.70	99.85 $\pm$ 0.70
	2.53	2.51 $\pm$ 0.02	0.86	99.44 $\pm$ 0.85
	7.58	7.55 $\pm$ 0.10	1.32	99.72 $\pm$ 1.31

### 1.2.9 盐酸小檗碱大鼠小肠吸收试验结果

取 SD (雄性) 大鼠 15 只, 随机分成 3 组, 按

照“1.2.2”项下实验方法, 结扎胆管后, 自十二指肠肠上部及回盲肠末端插管, 分别用“1.3”项下“盐酸小檗碱和酚红 KR 试液 (含维生素 C)” 3 个剂量, 每个剂量循环初体积为 100 mL, 进行原位肠循环灌注, 定时取样。

样品处理方法: 取循环样品供试液, 用甲醇 1 mL 稀释, 旋混 1 min, 15000 r/min 离心 5 min, 取上清液 10  $\mu\text{L}$  进样, 记录色谱图, 用回归方程计算肠循环液中盐酸小檗碱和酚红的浓度。

统计计算: 根据量瓶中药物初始药量和终末药量之差 (初始浓度  $\times$  初始体积 - 终浓度  $\times$  终体积) 与循环时间的比值计算其每小时吸收率。根据 Fick 方程原理计算药物的吸收参数。采用 Oneway ANOVA 的 SN-K 和 LSD 检验, 考察盐酸小檗碱各组的  $k_a$  和 A 是否有统计学差异。盐酸小檗碱各组的肠吸收参数: 速率常数  $k_a$  吸收半衰期 ( $t_{1/2}$ ) 及每小时吸收率 (A%) 结果, 见表 4。

表 4 盐酸小檗碱大鼠小肠吸收参数 ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=5$ )

盐酸小檗碱剂量	$k_a$ ( $\text{h}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (h)	A (%)
2.5 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	0.0246 $\pm$ 0.0014	28.24 $\pm$ 1.52	2.5003 $\pm$ 0.2825
5.0 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	0.0249 $\pm$ 0.0041	28.51 $\pm$ 4.86	2.6480 $\pm$ 0.1470
10.0 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	0.0258 $\pm$ 0.0019	27.01 $\pm$ 2.08	2.8434 $\pm$ 0.6681

采用 Oneway ANOVA 的 SN-K 和 LSD 检验, 盐酸小檗碱在 2.5  $\text{mg}/\text{kg}$  ~ 10.0  $\text{mg}/\text{kg}$  的浓度范围各组肠吸收参数均无统计学差异 ( $P < 0.05$ )。

## 2 讨论

大鼠在体肠循环实验中, 由于肠道水分吸收可导致循环液体积变化, 故采用不易被吸收的酚红的浓度来计算循环液的体积, 并以此对药物浓度进行校正。而酚红通常采用紫外分光光度法另行测定。文中用 HPLC 法同时测定酚红与盐酸小檗碱, 既减少了实验的步骤, 又增加了数据的准确性。文中考虑到大鼠肠循环液中各种酶以及菌群可能对盐酸小檗碱的稳定性造成影响, 故分别对其中的稳定性进行考察, 并加入维生素 C 来增加药物的稳定性。

### 参考文献

- [1] 李高, 方超. 药物肠道吸收的生物学研究方法 [J]. 中国药学杂志, 2002, 37 (10): 726.
- [2] 盛美萍, 孙淇, 王宏. 盐酸小檗碱在 Beagle 狗静脉注射和口服药代动力学研究 [J]. 中国药理学通报, 1993, 9 (1): 64.
- [3] 熊程忆, 施绪保, 代宗顺, 等. 3H-小檗碱在家兔及小鼠体内的药代动力学研究. 中国药理学通报, 1989, 5: 293.
- [4] 胡晓鹏, 包丽华, 李宝馨, 等. 二氢小檗碱在家兔体内的口服药代动力学研究 [J]. 数理医药学杂志, 1997, 10 (4): 337.
- [5] Xueli Wang, Rufeng Wang, Dongning Xing et al. Kinetic difference of berberine between hippocampus and plasma in rat after intravenous administration of Coptidis rhizoma extract [J]. Life Sciences, 2005, 77: 3058.
- [6] 陆彬. 药剂学实验 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1994: 131.

(收稿日期: 2008-09-10)