

## 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 Welch-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溶液, 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。

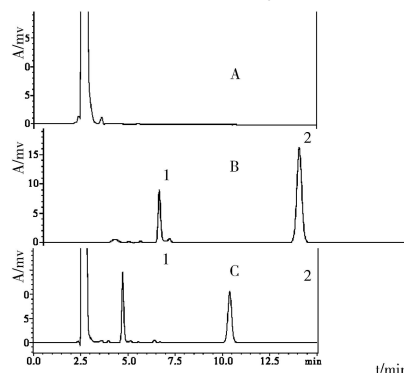


图 1 HPLC 色谱图

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。

