

- 2000 ,23 (10) :657
[2] 郭素华. 高效液相法测定双黄连含片中连翘苷的含量[J]. 中国药学期刊 ,2003 ,38 (4) :295
[3] 张莉,陈大为. 法莫替丁大鼠在体小肠吸收动力学研究[J]. 沈
阳药科大学学报 ,2001 ,18 (3) :170
[4] 李晓燕. 中药连翘抗菌活性的考察[J]. 山东医药工业 ,1997 ,
16 (2) :46
收稿日期 :2005 - 02

HPLC 同时测定肠循环液中黄芩苷、黄芩素和酚红的浓度

刘太明 ,蒋学华 *

(四川大学华西药学院 ,四川 成都 610041)

摘要 : 目的 同时测定肠循环液中黄芩苷、黄芩素和酚红的浓度。方法 采用 RP - HPLC 法 ,色谱柱为 Dikma Diamasil[™] C₁₈ (5 μm , 150 mm ×4.6 mm) ,流动相为甲醇 - 水 - 磷酸 (59 41 0.2) ,柱温 35 ,流速 1.0 ml · min⁻¹ ,检测波长 276 nm。结果 方法精密度及线性关系良好 ,黄芩苷、黄芩素及酚红的回收率分别为 100.49 % (RSD = 1.48 %)、102.60 % (RSD = 1.76 %)、99.90 % (RSD = 2.80 %)。结论 该法操作简便 ,结果准确 ,灵敏度高。

关键词 : 黄芩苷 ;黄芩素 ;酚红 ;在体肠循环 ;高效液相色谱法

中图分类号 :R927.2

文献标识码 :A

文章编号 :1006 - 0103 (2005) 05 - 0390 - 03

Simultaneous determination of baicalin , baicalein and phenolsulfonphthalein in the solution of *in situ* intestinal loop by HPLC

LIU Tai - ming , JIANG Xue - hua *

(West China School of Pharmacy , Sichuan University , Chengdu 610041 , China)

Abstract : **OBJECTIVE** To determine the concentrations of baicalin , baicalein and phenolsulfonphthalein in the solution of *in situ* intestinal loop simultaneously. **METHODS** An RP - HPLC method was established with a Dikma Diamonsil[™] C₁₈ column (5 μm , 150 mm ×4.6 mm) . The mobile phase was methanol - water - phosphoric acid (59 41 0.2) and the column temperature was set at 35 . The flow rate was 1.0 ml · min⁻¹ with detective wavelength of 276 nm. **RESULTS** The precision and the linear relation of this method were acceptable. The recovery of baicalin , baicalein and phenolsulfonphthalein was 100.49 % (RSD = 1.48 %) , 102.60 % (RSD = 1.76 %) and 99.90 % (RSD = 2.80 %) , respectively. **CONCLUSION** This method is simple and accurate.

Key words : Baicalin ; Baicalein ; Phenolsulfonphthalein ; Intestinal loop ; HPLC

CLC number :R927.2

Document code :A

Article ID :1006 - 0103 (2005) 05 - 0390 - 03

在体肠循环是研究药物肠吸收的重要实验方法。黄芩苷是中药黄芩的主要成分 ,研究黄芩苷的在体肠吸收机理对于黄芩的开发具有重要意义。文献报道 ,黄芩苷属原型前体药物 ,即黄芩苷在肠道菌群作用下转化为黄芩素再被吸收 ,然后在小肠黏膜细胞内复原为黄芩苷^[1]。为了比较黄芩苷与黄芩素的小肠吸收情况 ,了解黄芩苷在肠道内的转化过程 ,并简化酚红的测定 ,参考文献^[3] ,我们建立了 HPLC 法 ,同时测定黄芩苷、黄芩素及酚红的含量。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Laballiance Series 型 HPLC 仪器 (Series 型 泵、Model 500 型 UV/Vis 检测器和 7725i 进样阀) ;

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) ; TDL - 5 台式离心机 (上海安亭科学仪器厂) 。黄芩苷和黄芩素对照品 (中国药品生物制品检定所 ,批号 :110715 - 200212、111595 - 200301) ;黄芩苷提取物 (成都福润德实业有限公司 ,批号 :041015 ,含量 ≥85 %) ;黄芩素提取物 (成都欧康植化科技有限公司 ,批号 :041128 ,含量 ≥95 %) ;甲醇为色谱纯 ;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 Dikma Diamasil[™] C₁₈ (5 μm , 150 mm ×4.6 mm) ,流动相为甲醇 - 水 - 磷酸 (59 41 0.2) ,柱温 35 ,流速 1.0 ml · min⁻¹ ,检测波

基金项目 :国家自然科学基金资助项目 (项目编号 30070935 ;30271614)

作者简介 :刘太明 (1980 -) ,男 ,正攻读药剂学专业硕士学位。

* 通讯作者 (Correspondent author) ,E - mail :jxh1013 @vip . 163 . com

长 276 nm。

1.2.2 溶液的配制 称取 NaCl 7.8 g、KCl 0.35 g、CaCl₂ 0.37 g、NaHCO₃ 1.37 g、NaH₂PO₄ 0.32 g、MgCl₂ 0.02 g、葡萄糖 1.4 g,加水定容至 1 L,即得 Krebs - Ringer 试液(KR 试液,pH 7.4)。

称取以上各物质,并再精密称取 Vit C 2.0 g,然后加入乙醇 20 ml 及 tween80 (10 %) 10 ml,用水定容至 1 L,即得阴性对照液。

于 50 ml 量瓶中加入精密称定的黄芩素对照品 3.37 mg,精密加入无水乙醇 1 ml,超声至完全溶解,精密加入 0.5 ml 10 % tween80,再精密加入酚红 2.08 mg、黄芩苷对照品 3.51 mg、Vit C 99.76 mg,用 KR 试液溶解并稀释至刻度,得对照品溶液。

精密称取黄芩苷提取物 33.8 mg、酚红 20.0 mg、Vit C 2.0 g,再精密加入无水乙醇 20 ml 及 tween80 (10 %) 10 ml,用 KR 试液稀释定容至 1 L,即得黄芩苷供试品溶液。

精密称取黄芩素提取物 80.1 mg,用无水乙醇稀释定容至 50 ml,即得黄芩素乙醇溶液。

精密吸取上述黄芩素乙醇溶液 20 ml,再精密加入 tween80 (10 %) 10 ml、酚红 20.0 mg、Vit C 2.0 g,用 KR 试液稀释定容至 1 L,即得黄芩素供试品溶液。

1.2.3 专属性考察 分别取阴性对照液、阴性对照液 + 黄芩苷、阴性对照液 + 黄芩素、阴性对照液 + 酚红和供试液进样,在“1.2.1”条件下分离测定,色谱图见图 1。可见黄芩苷、黄芩素酚红的保留时间分别为 4.5、10.2、8.5 min。样品中 3 种物质的保留时间与阴性对照液 + 对照品的一致。供试液中其他成分在此色谱条件下不干扰测定。

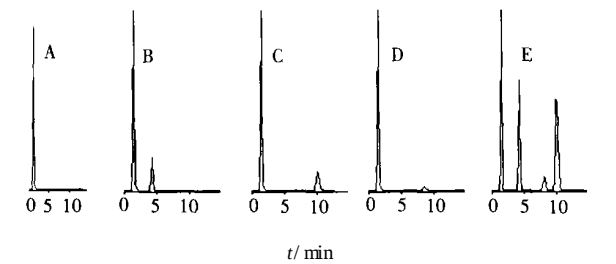


图 1 HPLC 色谱图

Fig 1 HPLC chromatograms

A. blank perfusate; B. blank perfusate + baicalin; C. blank perfusate + baicalein; D. blank perfusate + phenolsulfonphthalein; E. sample

1.2.4 线性关系与方法灵敏度考察 分别精密吸取对照品液适量,用阴性对照液稀释成黄芩苷、黄芩素和酚红系列浓度的溶液,进样 20 μl,以色谱峰面积(Y)为纵坐标,浓度(C)为横坐标,作线性回归。黄芩苷的回归方程为: $Y = 5.080 \times 10^4 C - 1.040 \times 10^4$ ($r = 0.9999$),最低定量浓度为 0.702 μg ml⁻¹;酚红的回归方程为: $Y = 2.159 \times 10^4 C - 5.867 \times 10^3$ (r

$= 0.9999$),最低定量浓度为 0.832 μg ml⁻¹;黄芩素的回归方程为: $Y = 7.667 \times 10^4 C - 3.645 \times 10^3$ ($r = 0.9998$),最低定量浓度为 0.1348 μg ml⁻¹。

1.2.5 稳定性考察 于 3.2 mg 黄芩苷提取物中,加入 1.574 mg ml⁻¹黄芩素乙醇液 2 ml、10 % tween80 1 ml、Vit C 0.2 g 和酚红 2 mg,用 KR 试液稀释定容至 100 ml。将混合液置 37 °C 水浴中 3 h,按“1.2.8”项下测定,以药物剩余百分比表示药物稳定性,可见 KR 试液中 3 种物质的稳定性良好(表 1)。

表 1 KR 试液中黄芩苷、黄芩素和酚红的稳定性考察(n = 3)

Table 1 The stabilities of baicalin, baicalein and phenolsulfonphthalein in KR solution(n = 3)

No.	Baicalin/ %	Phenolsulfonphthalein/ %	Baicalein/ %
1	101.55	98.86	106.88
2	102.08	99.84	105.50
3	98.50	98.12	96.44
$\bar{X}/ \%$	100.71	98.94	102.94
RSD/ %	1.92	0.87	5.51

1.2.6 回收率的测定 取不同体积的对照品溶液,置 10 ml 量瓶中,用阴性对照液稀释定容,得到高、中、低 3 个浓度的供试品溶液,进样 20 μl,在“1.2.1”项条件下分离测定。计算回收率(表 2)。

表 2 黄芩苷、黄芩素和酚红的回收率(n = 5)

Table 2 The recoveries of baicalin, baicalein and phenolsulfonphthalein (n = 5)

Dosage	Baicalin/ %	Baicalein/ %	Phenolsulfonphthalein/ %
High	99.60	100.63	99.32
Middle	99.66	104.20	97.43
Low	102.21	102.98	102.94
$\bar{X}/ \%$	100.49	102.60	99.90
RSD/ %	1.48	1.76	2.80

1.2.7 精密度的测定 取“1.2.6”项下供试品溶液进样测定,以日内 5 次测定结果计算日内 RSD,以一周内 5 d 测定结果计算日间 RSD。结果,日内 RSD ≤ 3.77 %,日间 RSD ≤ 3.23 %。

1.2.8 样品的测定 分别取黄芩苷、黄芩素供试液,按大鼠在体肠循环的方法循环并取样^[2],1 × 10⁴ r min 离心 5 min,取上清液 20 μl 进样,记录色谱图,用回归方程计算肠循环液中黄芩苷、黄芩素和酚红的浓度。

2 讨论

大鼠在体肠循环是研究药物肠吸收的重要实验方法,但只限于溶解性较好、能够以水溶液状态给药的药物。因黄芩素水溶性差,故选用了增溶的方法。即先用少量乙醇溶解,使黄芩素呈分子分散状态后再加入 0.1 % 增溶剂 tween80,再以 KR 试液稀释定容。以上步骤不能颠倒,尤其黄芩素应超声至完全溶解,否则增溶将失败。因溶液中含有 tween80,故

配制过程中不宜剧烈震摇,避免产生泡沫。

在 pH 7.4 的 KR 试液中,黄芩苷和黄芩素均易被氧化。在比较了避光、通 N₂、改变 pH 及使用抗氧化剂等方法后,使用 0.2 %Vit C 作为抗氧化剂来增加药物的稳定性。结果表明,Vit C 抗氧化效果良好。

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计另行测定^[2]。文中用 HPLC 法同时测定酚红与药物,即减少了实验的步骤,又增加了数据的准确性。另外,黄

芩苷与黄芩素同时测定,也简化了实验步骤,对研究黄芩苷和黄芩素的肠内转化过程具有重要的意义。

参考文献:

- [1] Kyoichi KoBASHI. Glycosides are natural prodrugs - evidence using germ - free and gnotobiotic rats associated with a human intestinal bacterium[J]. Medical and pharmaceutical society for WAKAN - YAKU, 1998,15 (1) :1
- [2] 陆彬. 药剂学实验[M]. 北京:人民卫生出版社,1994. 131
- [3] 张烜,周慧,邢建国,等. HPLC 测定消痰颗粒中黄芩苷的含量[J]. 华西药学期刊,2003,18 (4) :372

收稿日期:2005 - 02

重组人心房肽对高血压大鼠心肌肥大的抑制作用及其机制

刘荣韬¹,幸浩洋²,陈立国¹,肖 静¹,郭慧玲¹,王正荣^{1*}

(1. 四川大学华西医学中心生物医学工程研究室,四川 成都 610041;2. 四川大学物理科学与技术学院,四川 成都 610041)

摘要:目的 观察重组人心房肽(rhANP)对高血压大鼠心肌肥大的治疗效果,并探讨其作用机制。方法 建立两肾一夹(2K1C)高血压大鼠模型,通过在高血压大鼠腹腔植入微囊化人心房肽 cDNA 重组质粒转染细胞,形成稳定的体内心房肽给药系统。检测假手术正常血压对照组、高血压模型组、rhANP 治疗组大鼠的尾动脉收缩压(SBP)、血浆 rhANP 水平、心肌血管紧张素 II(AngII)含量、心肌重量指数(MWI)、左心室肥厚指数(LVWI)、心肌胶原含量和心肌纤维直径等指标。结果 rhANP 治疗组大鼠的血浆 rhANP 浓度为 $217.3 \pm 11.3 \text{ ng L}^{-1}$,显著高于另两组;高血压组大鼠的 SBP、心肌 AngII 含量、MWI、LVWI、心肌胶原含量和心肌纤维直径较对照组显著增加($P < 0.01$)。rhANP 治疗 45 d 后显著降低高血压大鼠 SBP、MWI、LVWI、心肌胶原含量、心肌纤维直径和心肌 AngII 含量($P < 0.01$)。结论 由微囊化 rhANP cDNA 质粒转染细胞产生和分泌的 rhANP 可抑制心肌细胞肥大及胶原增生,有效防治左室肥厚,此作用与 rhANP 降低高血压大鼠的血压和心肌 AngII 含量有关。此结果也为高血压的心房肽基因治疗提供了新途径。

关键词:重组人心房肽;高血压;心肌肥大;基因治疗;微囊化基因转染细胞

中图分类号:R96

文献标识码:A

文章编号:1006 - 0103(2005)05 - 0392 - 04

Suppressive effects of recombinant human atrial natriuretic peptide on myocardial hypertrophy in hypertensive rats and its mechanisms

LIU Rong - tao¹, XING Hao - yang², CHEN Li - guo¹, XIAO Jing¹, GUO Hui - ling¹, WANG Zheng - rong^{1*}

(1. Biomedical Engineering Unit, West China Medical Center of Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Medical Physics Unit, Physics and Technology School of Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: **OBJECTIVE** To investigate suppressive effects of recombinant human atrial natriuretic peptide (rhANP) on myocardial hypertrophy in hypertensive rats and its possible mechanisms. **METHODS** Two - kidney, one - clip (2K1C) rats were used to establish the model of hypertension. The sustained - release system of rhANP *in vivo* was fabricated by implanting encapsulated rhANP cDNA plasmid transfected cells into 2K1C hypertensive rats intraperitoneally. Systolic blood pressure (SBP), plasma rhANP level, AngII content in myocardium, myocardium weight index (MWI), left ventricular weight index (LVWI), myocardial collagen content and myocardial fiber diameter were determined among control group, hypertension group and rhANP group. **RESULTS** The concentration of rhANP in plasma was $217.3 \pm 11.3 \text{ ng L}^{-1}$ in rhANP group, higher than that in control group and hypertension group ($P < 0.01$). Compared with control group, the SBP, AngII content in myocardium, MWI, LVWI, myocardial collagen content and myocardial fiber diameter were significantly increased in hypertension group ($P < 0.01$). rhANP had an obvious suppressive effect on the indices mentioned above ($P < 0.01$). **CONCLUSION** rhANP produced and secreted by encapsulated gene transfected cells can effectively suppress myocardial cell hypertrophy and collagenous fiber hyperplasia by decreasing blood

基金项目:国家自然科学基金资助(No. 30070278, 39970275)

作者简介:刘荣韬,男,成都,助理研究员,正攻读生物医学工程专业的博士学位。

*通讯作者(Correspondent author), E - mail: wangzhengrong @126.com