

大鼠小肠循环液中酚红的双波长分光光度法的测定

吴 刚 孙长海 吴洪斌 方洪壮(佳木斯 154003 佳木斯大学第五校区药物分析教研室)

摘要 目的:建立大鼠小肠循环液中酚红的测定方法。方法:采用双波长分光光度法,以 0.1 mol/L NaOH 为溶剂, 558 nm 为测定波长, 570 nm 为参比波长。结果:线性范围为 $1 \sim 8 \mu\text{g/ml}$,回收率为 $99.88\% \sim 99.99\%$ ($n=5$),日内 RSD 为 $0.51\% \sim 1.27\%$ ($n=4$),日间 RSD 为 $0.58\% \sim 2.29\%$ ($n=4$)。结论:该法可用于大鼠小肠液中酚红的测定。

关键词 酚红;双波长分光光度法;大鼠小肠循环液

Determination of phenol red in rat small intestine circulation solution by dual wavelength spectrophotometry

Wu Gang(Wu G), Sun Changhai(Sun CH), Wu Hongbin(Wu HB), et al(Department of Pharmaceutical Analysis, The Fifth School of Jiamusi University, Jiamusi 154003)

ABSTRACT **OBJECTIVE:** To develop a spectrophotometric method for the determination of phenol red in rat small intestine circulation solution. **METHODS:** The absorption of solution was determined at 558 nm and 570 nm with 0.1 mol/ml NaOH as the solvent. **RESULTS:** The calibration curve was linear in the rang from 1 to $8 \mu\text{g/ml}$. The recovery was $99.88\% \sim 99.99\%$. The within day precision was $0.51\% \sim 1.27\%$ and the day to day precision was $0.58\% \sim 2.29\%$. **CONCLUSION:** This method can be used to determine phenol red in rat small intestine circulation.

KEY WORDS phenol red, dual wavelength spectrophotometry, rat small intestine circulation solution

在对药物小肠吸收研究中,通常用酚红来标示在体小肠吸收模型中循环液的体积变化^[1,2],对其在大鼠小肠循环液中的测定,采用的是可见分光光度法,溶剂为 1 mol/L NaOH ,测定波长为 550 nm ^[3]。基于这一方法存在着吸光度稳定性差,测定波长不在吸收峰以及小肠循环液有干扰等问题,我们采用了双波长分光光度法。该方法稳定、无干扰,测定结果满意。

1 材料与方法

1.1 仪器、试剂与动物

UV-VIS 756 型分光光度计(上分三厂),RDB-II 蠕动泵(沙洲仪器仪表厂);酚红和其他试剂均为分析纯;Wistar 大鼠($\delta 200 \sim 300 \text{ g}$ 佳木斯大学动物室提供)。

1.2 试液的制备

1.2.1 酚红母液 精密称取酚红 100 mg 置 200 ml 量瓶中,加适量水微热使其溶解,放置成室温后,加水至刻度。

1.2.2 酚红标准液 精密称取酚红母液 $1, 3, 4, 5, 6$ 和 8 ml 置 50 ml 量瓶中,加 Krebs-Ringer 营养液至刻度,配置系列浓度标准溶液。

1.2.3 空白肠循环液 按大鼠在体回流实验方法和要求^[3],装好循环装置加 50 ml Krebs-Ringer 营养液,加搅拌子搅拌,水浴(37 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$ 保温,进行循环。分别于 $1, 2, 3$ 和 4 h 后取样。

1.2.4 肠循环液 精密吸取酚红母液 $1, 4$ 和 8 ml 分别置于 50 ml 量瓶中,加 Krebs-Ringer 营养液至刻度,置大鼠小肠循环装置中,于搅拌、保温条件下,循环 4 h 后取样。

1.2.5 替硝唑肠循环液 取 Krebs-Ringer 营养液,加规定

剂量的替硝唑和酚红母液,配制酚红浓度为 $26.5 \mu\text{g/ml}$ 的循环液,置循环装置中,保温循环。分别于不同时间取样,同时补加一定体积 $26.5 \mu\text{g/ml}$ 的酚红溶液。

1.3 测定方法

精密吸取待测液 0.5 ml ,置具塞试管中,精密加入 0.1 mol/L NaOH 溶液 4.5 ml ,摇匀,以营养液的 0.1 mol/L NaOH 溶液($1 \sim 10$)为参比,在仪器上于 558 和 570 nm 处测定吸光度,代入工作方程进行计算。

2 实验结果

2.1 吸收光谱

酚红、空白肠循环液的可见吸收光谱(图1)表明:Krebs-Ringer 营养液无吸收。酚红的最大吸收波长为 558 nm ,空白肠循环液在可见光区有一定的吸收,经测定在 558 和 570 nm 具有等吸收。

2.2 吸光度稳定性

于不同时间测定酚红在 558 和 570 nm 吸光度。结果显示,酚红在 0.1 mol/L NaOH 溶液中吸光度 2 h 内无变化。

2.3 干扰试验

在测定的条件下,不同鼠的空白肠循环液在 4 h 内的 $\Delta A_{558-570}$ 均可视为零,未发现对测定有干扰。

2.4 线性与范围

由酚红的标准溶液测定得,在 $1 \sim 8 \mu\text{g/ml}$ 浓度范围内,酚红的吸光度差值 $\Delta A_{558-570}$ 与浓度 C 的线性关系良好。回归方程为: $C = -0.0961 + 22.74 \Delta A$, $r = 0.9999$ ($n = 6$)。

吴刚,男,33岁。1993年毕业于沈阳药科大学药学院,获硕士学位

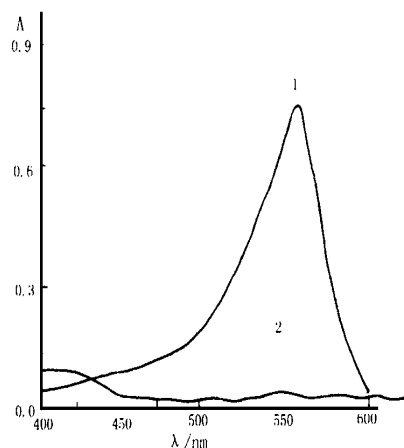


图 1 0.1 mol/L NaOH 中酚红及空白肠循环液的吸收光谱
1 - 酚红(5 μ g/ml);2 - 空白肠循环液(1 $\rightarrow$ 10)

2.5 回收率

分别取酚红母液适量,用空白肠循环液制备高中低 3 种浓度溶液各 5 份,进行测定,由工作方程求算回收率,结果见表 1。

表 1 回收率测定结果/ $n=5$

加入量/ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	测得量/ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	回收率/%	RSD/%
1.013	1.012	99.88	1.58
4.052	4.047	99.88	1.36
8.108	8.017	99.99	0.45

2.6 精密度

取高中低 3 种浓度的肠循环液各 4 份,按上述方法测定,计算日内精密度和日间精密度,结果见表 2。

表 2 精密度测定结果/ $n=4$

加入量/ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	日 内		日 间	
	测得量/ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	RSD/%	测得量/ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$	RSD/%
1.013	1.001	1.27	0.9954	2.29
4.052	4.043	1.02	4.037	1.25
8.108	7.097	0.51	7.064	0.58

2.7 样品测定

分别精密吸取不同鼠的替硝唑肠循环液 1.5 ml(其中 1.0 ml 留做替硝唑测定),按上述方法测定不同循环时间的酚红浓度,结果见表 3。

表 3 不同大鼠替硝唑循环液中酚红浓度/ $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$

时间/h	鼠 号				
	1	2	3	4	5
0.0	26.7	26.3	26.0	27.0	26.7
0.5	27.9	25.4	25.9	27.5	26.6
1.0	28.8	27.2	27.9	28.6	27.9
1.5	32.2	28.6	28.2	29.7	29.3
2.0	34.0	30.4	29.5	30.4	30.8
2.5	34.1	33.2	31.8	30.6	33.0
3.0	37.7	34.1	33.2	31.6	34.5

3 讨 论

3.1 对于空白肠循环液的 558nm 有数个等吸收波长,但在 570nm 附近空白肠循环液吸光度变化较小,且可保证酚红的 558 和 570nm 吸光度在 0.2~0.8 之间,吸光度差值($\Delta A_{558-570}$)较大,故选取 570nm 作为参比波长。

3.2 在碱性溶液中酚红的最大吸收波长为 558nm,而不是 550nm。酚红的 pka 为 7.8,酚红在 558nm 的吸收随着 pH 的增大而升高,试验中发现,在水及 0.01,0.1,0.2 和 1.0mol/ml NaOH 溶液中,2 μ g/ml 酚红溶液的吸光度分别为 0.129,0.291,0.299,0.319 和 0.352。酚红在 1mol/L NaOH 中的吸收虽然较大,但不稳定,当 NaOH 的浓度为 0.2mol/L 时亦不稳定,在 0.5,1.0,2.0 和 3.0h 后吸光度分别降至 0h 的 95.6%,91.2%,86.8%,82.4%和 98.0%,96.5%,95.4%,94.5%。综合考察吸光度的大小和吸光度的稳定性,当选取 0.1mol/L NaOH 为测定溶剂时,即可保证吸光度比较稳定且又有较大的值。

参考文献

- 孙淑英.在体小肠试验.见陆彬主编.药剂学试验.北京:人民卫生出版社,1994:132.
- 胡一桥,郑梁元,钱陈钦,等.离子型药物酚红的小肠吸收研究.中国药科大学学报,1996,27(6):355.
- 崔景斌,吴文惠,胡晋.拉马宁碱大鼠小肠吸收的研究.沈阳药学院学报,1994,11(2):79.