

# 以 DL-樟脑-10-磺酸为离子对试剂反相高效液相 色谱测定血浆中小檗碱的含量

余琛 洪有采 张慧

(上海市徐汇区中心医院, 200031)

徐修容

(中国科学院上海药物研究所, 200031)

小檗碱(Berberine)属季铵型异喹啉类生物碱。系黄连、黄柏、三颗针等中草药的主要有效成分,具有抗菌消炎作用。近年来发现小檗碱具有抗心律失常和正性肌力等心血管药理作用<sup>[1,2]</sup>。生物样品中小檗碱的测定方法有纸色谱法<sup>[3]</sup>,纸色谱-分光光度法<sup>[4]</sup>,同位素标记法<sup>[5]</sup>,气相色谱-质谱法<sup>[6]</sup>。DL-樟脑-10-磺酸(CSA)是一种手性离子对试剂,曾用于生物胺的测定取得了良好的结果<sup>[7]</sup>。我们用 CSA 作离子对试剂,建立了血浆中小檗碱的反相离子对色谱测定方法,并对 CSA 的色谱行为及方法的优化作了探讨。

## 实验部分

### (一)仪器与试剂

1. 仪器 Beckman334 HPLC,包括 110B 泵,340 进样阀,163 可变波长紫外检测器,427 积分仪。CQ50 超声波清洗器(上海超声波仪器厂)。TGLL-18A 台式高速冷冻离心机(江苏太仓医疗器械厂)。

2. 试剂 盐酸小檗碱(东北制药总厂赠送),碘化 13-甲基小檗碱,内标,自行合成。丙酮、二乙胺、冰醋酸、乙腈、无水乙醇均为分析纯。水为超纯水。DL-樟脑-10-磺酸(CSA)购自中国科学院上海分院中科技技术装备公司。

### (二)色谱条件

分离柱:Nora-Pak C<sub>8</sub>(4μ)15cm×3.9mm,丙酮-水-CSA-二乙胺-冰醋酸(20:80:0.464:0.5:0.7)为流动相,pH=4.8。流速 1.0ml/min。柱温 40℃。检测波长 345nm。灵敏度 0.01AUFS。小檗碱和内标分别用无水乙醇和乙腈配制,浓度为 0.12mg/ml 与 0.9μg/ml。

### (三)样品处理

取血浆 0.2ml,置 1.5ml 塑料具塞离心管中,沿管壁缓缓加入内标乙腈溶液 0.4ml,塞塞后置超声波清洗器中超声处理约 1 分钟。高速离心(19000g, 10min)后取上清液 0.2ml,加流动相 0.2ml 后再次离心(19000g,5min),取 100μl 进样。

## 结果与讨论

### (一)色谱条件的优化

实验结果表明流动相中 CSA 的浓度增大可使小檗碱的保留值增加,在较大的浓度范围内(5~30mmol)呈现同样的趋势。

为了改善峰拖尾现象,我们在流动相中添加了不同浓度的二乙胺。结果表明,二乙胺的加入会使小檗碱的保留值下降,但其 5σ 峰宽明显减小,柱效大大提高,峰形可得到明显的改善(图 1)。

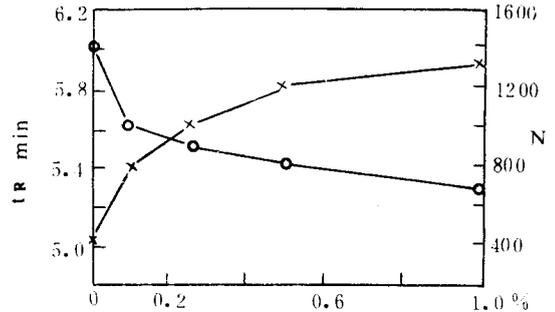


图 1 二乙胺对小檗碱保留时间及柱效的影响

综合考虑小檗碱与内标的分离度及生物样品中的杂质和溶剂负峰的干扰作用,我们选择 CSA 的浓度为 20mmol,并在流动相中添加了 0.5% 的二乙胺。在此条件下,可完全避免各种杂质的干扰,小檗碱与内标可得到完全的分离,保留时间分别为 5.41min 和 7.53min(图 2)。与之相比,用庚烷磺酸和十二烷基磺酸钠(SDS)为离子对试剂均不能在这样短的时间内使小檗碱和 13 甲基小檗碱完全分离。

丙酮具有粘度低、价廉、无毒等优点,在溶剂选择性的分组上与乙腈同属 VI 组<sup>[8]</sup>,但因其紫外截止波长为 330nm,限制了其应用范围。小檗碱在 345nm 处具有最大吸收,故我们以丙酮取代乙腈配制流动相,取得了良好的效果。

### (二)工作曲线和检测限

取健康人血浆配制含小檗碱的血浆标准液。在浓度为 0.272~4.353 $\mu\text{g}/\text{ml}$  间,峰高比与浓度间有良好的线性关系。回归方程为  $y = -0.0056 + 1.1751x$ , 相关系数为 0.9999。小檗碱的检测限为 4.5ng。信噪比大于 5 : 1。

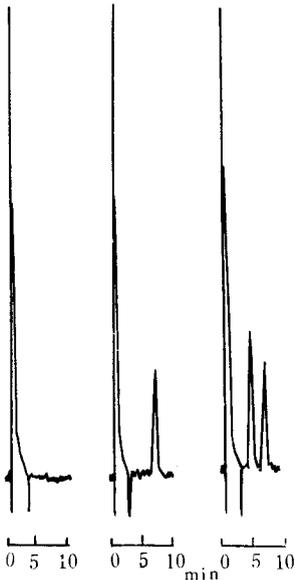


图 2 血浆样品分离图谱

a. 空白血浆, b. 含内标血浆, c. 含小檗碱及内标血浆。

(三) 精密性与回收率试验

取健康人血浆添加一定量的小檗碱后按样品处理方法处理后测定。分别对样品进行日内误差、日间误差及回收率试验。结果见表 1、2。样品的日内平均误差为 2.00%, 日间平均误差为 2.56%, 平均回收率为 99.94%。

表 1 精密度试验

加标量 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	日内 (n=6)		日间 (n=4)	
	测定量 ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ )	CV (%)	测定量 ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ )	CV (%)
1.088	1.096 $\pm$ 0.023	2.10	1.086 $\pm$ 0.022	2.00
2.177	2.180 $\pm$ 0.055	2.55	2.168 $\pm$ 0.080	3.66
3.265	3.239 $\pm$ 0.044	1.35	3.246 $\pm$ 0.066	2.01
		2.00		2.56

表 2 回收率试验 (n=3)

加标量 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	测定量 ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ )	回收率* ( $\bar{x} \pm \text{SD}$ )
0.272	0.269 $\pm$ 0.009	98.93 $\pm$ 3.22
0.544	0.545 $\pm$ 0.008	100.10 $\pm$ 1.47
1.088	1.100 $\pm$ 0.018	101.12 $\pm$ 1.66
2.177	2.170 $\pm$ 0.043	99.66 $\pm$ 1.98
3.265	3.253 $\pm$ 0.068	99.61 $\pm$ 2.10
4.354	4.364 $\pm$ 0.089	100.24 $\pm$ 2.03

\* 平均回收率为 99.94%

(四) 生物样品的预处理

本法在乙腈沉淀血浆蛋白的过程中采用了超声处理法。与常用的旋涡混合法相比,可避免因沉淀反应过快而造成部分药物被变性蛋白包裹的可能,并可使药物充分释出,有利于提高方法的操作精度与回收率。乙腈沉淀蛋白后直接进样的方法,具有简便易行的优点。但因试样被蛋白沉淀剂稀释,检测灵敏度下降,如何解决血浆中小檗碱的净化富集问题,尚有待进一步探讨。

**致谢** 实验中曾得到上海市药品检验所张叔良老师、武汉市药品检验所周元瑞老师的指导和帮助,在此一并致谢。

参 考 文 献

- [1] 黄伟民等, 实用内科杂志, 5(16), 587(1985).
- [2] Marin Neto JA et al., Clin. Cardiol, 11(4), 253(1988).
- [3] 古家敏夫, 大阪医科大学杂志(日), 17(1), 19(1957).
- [4] Kouakewski Zdzislaw et al., Herba pol, 24(4), 193(1978).
- [5] 樱井修一等, 应用药理(日), 11(3), 351(1976).
- [6] Miyazaki Hiroshi et al., J Chromatogr. 152(1), 79(1978).
- [7] 徐修容等, 中国药理学报, 8(2), 113(1987).
- [8] L. R. Snyder, J Chromatogr. Sci., 16, 233(1978).

(收稿日期: 1990年5月22日)

**DL-Camphor-10-Sulfonic Acid as an Ion-Pair Reagent for Determination of Berberine in Plasma by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography** Yu Chen, Hong Youcai and Zhang Hui, Xuhui District Central Hospital, Shanghai 200031; Xu Xirong, Shanghai Institute of Materia Medica, Academia Sinica, 200031

Plasma (0.2ml) was mixed with acetonitrile (0.4ml) containing 13-methylberbere (0.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; internal standard) and centrifuged at 19000g for 10 min. The supernatant (0.2ml) was mixed with equal volume of mobile phase and centrifuged at 19000g for 5min. The supernatant solution (100 $\mu\text{l}$ ) was analysed by HPLC on Nova-Pak  $\text{C}_{18}$  (4 $\mu\text{m}$ ) column (15cm  $\times$  3.9mm) with acetone, water, dl-camphor-10-sulfonic acid, diethyl amine, acetic acid (20 : 80 : 0.464 : 0.5 : 0.7) as mobile phase (pH 4.8, Flow 1ml/min), and detected at 345nm. The calibration graphs were rectilinear from 0.272 to 4.354  $\mu\text{g}/\text{ml}$  plasma. The detection limit of berberine was 4.5ng. The coefficient of variation of within-day and between-day were 2.00% (n=6) and 2.56% (n=4) respectively. Mean recoveries were 99.94%.