

一种高灵敏度的小檗碱高效液相色谱分析方法

余 琛 洪有采 张 慧

(上海徐汇区中心医院 上海 200031)

徐修容

(中国科学院上海药物所 上海 200031)

提要 根据在卤代烃类溶剂中的小檗碱在紫外线的激发下可产生强烈的荧光这一特性,采用正相色谱-荧光检测的方法建立了小檗碱的高灵敏度检测方法。色谱柱为 Lichrosorb SI 60(5 μ)20cm \times 4.0mm i. d.。流动相为二氯甲烷-甲醇-二乙胺-冰醋酸(90:9:0.4:0.5)。荧光检测波长 Ex=365nm,Em=510nm。方法的检测限为0.2ng(S/N \geq 2.5),在0.2ng~20ng 范围内具有良好的线性关系。

关键词 小檗碱,高效液相色谱法

1 前言

小檗碱(Berberine)系中药黄连、黄柏的主要有效成分。除了具有抗菌消炎作用外,近年来又发现具有抗心律失常、抗血小板聚集等广泛的药理作用^[1,2]。为了了解小檗碱的体内过程,我们曾建立了用反相离子对高效液相色谱法测定生物样品中小檗碱的方法^[3],并考察了小鼠腹腔给药后心、肝、肾、血中的小檗碱浓度的动态变化^[4]。实验结果表明,由于小檗碱进入体内后迅速分布到组织、血浆中使药物的浓度较低。为了深入了解血浆中小檗碱浓度的动态变化,首先要有一个具有高灵敏度的、专一的小檗碱定量检测手段。为此,我们根据小檗碱的理化特性,试用正相色谱-荧光检测的方法建立了一种高灵敏度的小檗碱的高效液相色谱(HPLC)定量分析方法。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂

仪器 BECKMAN 110B 泵,340六通进样阀(Loop=20 μ L),427积分仪,Waters 420荧光检测器,岛津 RF-540荧光分光光度计。

试剂 盐酸黄连素标准品(东北制药厂赠送),盐酸黄连素标准液用无水甲醇配制(含盐酸黄连素100.0 μ g/mL),全部试剂均为分析纯。其中二氯甲烷、甲醇、二乙胺使用前经刺型分馏柱(L=40cm)分馏。

2.2 色谱条件

色谱柱:Lichrosorb SI 60(5 μ)20cm \times 4.0mm i. d.;流动相:二氯甲烷-甲醇-二乙胺-冰醋酸(90:9:

0.4:0.5);流速:1mL/min;荧光检测波长:Ex=365nm,Em=510nm;记录纸速:0.1cm/min;小檗碱的保留时间为8.97min,色谱图参见图1。

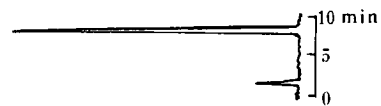


图1 BER 色谱图

在本实验条件下,小檗碱的检测限为0.2ng,信噪比优于2.5:1。

2.3 线性关系

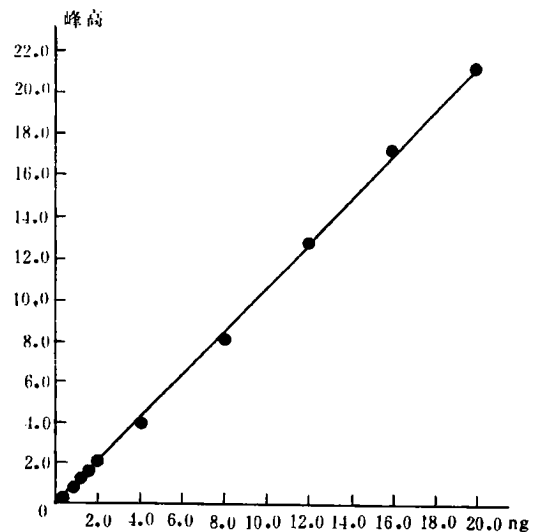


图2 BER 标准曲线

精确量取盐酸黄连素标准液适量,用无水甲醇精确稀释成含盐酸黄连素0.0100~1.000 μ g/mL后,分别取20 μ L进样。结果参见表1。以样品峰高为

纵坐标,样品量为横坐标作图,结果参见图2。线性回归方程为 $Y = 1.064C - 0.0570$ ($r = 0.9999$)。

表1 盐酸黄连素标准品测定结果

进样量(ng)	0.2000	0.4000	0.8000	1.200	1.600	2.000	4.000	8.000	12.00	16.00	20.00
峰高	0.2240	0.4080	0.7980	1.198	1.696	2.146	4.006	8.244	12.79	17.17	21.12

3 讨论

小檗碱属异喹啉类生物碱,具有 π 电子共轭结构。干燥的小檗碱在紫外光的激发下,可发出强烈的黄绿色荧光。小檗碱的这种特性在薄层色谱定量分析中已得到了广泛的应用^[5,6]。

在已报道的小檗碱的HPLC分析中大多采用UV检测器。小檗碱的检测限约为 $7 \sim 15 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 。基于荧光检测器的专一性较强,Misaki等^[8]在用乙腈为主要洗脱剂的反相离子对色谱分析中药汤剂中的小檗碱类生物碱时,曾用荧光检测来验证UV检测结

果的正确性。而在该色谱条件下,荧光检测的灵敏度与UV检测相仿。

在实验中我们发现,不同溶剂中小檗碱的荧光效率存在着很大的差异。我们分别以水、甲醇、乙腈、四氢呋喃、乙酸乙酯、二氯甲烷、二氯乙烷、戊烷为溶剂,配制成每毫升中含小檗碱100.0ng的供试液进行荧光测定,结果参阅表2。小檗碱在卤代烃类溶剂中的荧光强度远大于在其他溶剂中的荧光强度。这种现象可能是由于小檗碱在卤代烃类溶剂中其 π 电子共轭体系能得到较大程度的增大所致。

表2 不同溶剂中小檗碱的荧光强度($E_x = 358 \text{ nm}$, $E_m = 526 \text{ nm}$)

	水	甲醇	乙腈	四氢呋喃	乙酸乙酯	二氯甲烷	二氯乙烷	戊烷
空白荧光强度	0.0002	0.0000	0.0006	0.0110	0.0042	0.0004	0.1230	0.0060
测定值(100.0ng/mL)	0.0013	0.0088	0.0120	0.0418	0.0255	0.6527	0.6750	0.0079
小檗碱荧光强度	0.0011	0.0088	0.0114	0.0308	0.0213	0.6523	0.5520	0.0019

我们选择硅胶为固定相,用二氯甲烷为主配制流动相。在流动相中用甲醇为极性改性剂控制样品的保留时间,添加了少量的二乙胺以改善样品峰的拖尾现象,并用冰醋酸调节流动相的pH,实现了具有高灵敏度检测能力的小檗碱正相色谱-荧光检测方法。

以流动相为溶剂,进行小檗碱的荧光激发光谱和发射光谱扫描。结果表明小檗碱的荧光检测最佳条件为 $E_x = 358 \text{ nm}$, $E_m = 526 \text{ nm}$ 。但在此条件下,用分析纯试剂配制的流动相中存在的微量杂质对小檗碱的测定具有强烈的荧光背景干扰。为此,我们试用分馏法纯化试剂,获得了良好的效果。

实验结果表明,以二氯甲烷为流动相主要成分的小檗碱正相色谱-荧光检测方法的小檗碱定量测定线性动态范围大于100,检测灵敏度比已报道的小檗碱HPLC分析方法高1~2个数量级。本方法的小檗碱检测灵敏度与气相色谱-质谱法的检测水平相近^[10],而小檗碱无需衍生化预处理,整个样品分析过程更为简便。

本实验所用的荧光检测器属多波长荧光检测器,其单色器由滤光片组成,结构简单,性能较差。在实验中若能采用高性能荧光检测器,则可大大提高

检测灵敏度。目前我们进一步的实验结果已证实,如果采用Waters 470荧光检测器,那么小檗碱的检测限可再提高2个数量级,达到2pg的水平(信噪比优于5:1)。

参考文献

- 1 黄伟民,任建英,张伯寅等.实用内科杂志,1985;5(11):587
- 2 黄伟民,李宝珍,闫徐钧等.中华血液杂志,1989;10(5):228
- 3 余琛,洪有采,张慧等.色谱,1992;10(3):167
- 4 洪有采,余琛,张慧等.中国医药工业杂志,1991;22(8):356
- 5 Messerschmidt W. J Chromatogr,1969;39(1):90
- 6 张夕村,田秀丽,中草药,1987;18(9):10
- 7 赤田良信,河野贞子,棚濑弥一郎.药学杂志(日),1980;10(7):766
- 8 Misaki T, Sagara K, Ojima M *et al.* Chem Pharm Bull, 1982;30(1):354
- 9 邱晓星,伍朝萑,陈柏林.药学报,1986;21(6):458
- 10 Miyazaki H, Shirai E, Ishibashi M *et al.* J Chromatogr, 1978;152(1):79.

Analysis of Berberine by a Sensitive High Performance Liquid Chromatographic (HPLC) Method

Yu Chen, Hong Youcai and Zhang Hui

(Xuhui District Central Hospital, Shanghai, 200031)

Xu Xiurong

(Shanghai Institute of Materia Medica, the Chinese Academy of Sciences, Shanghai, 200031)

In halogenated solvents, strong fluorescence emits from berberine under UV radiation. According to this characteristic a sensitive assay method was developed by using normal phase HPLC and fluorescence detection. Silica gel (Lichrosorb SI 60 (5 μ)) was used as the stationary phase and a mixture of dichloromethane-methanol-diethyl amine-acetic acid (90:9:0.4:0.5) as the mobile phase. The filter of fluorometer was 510nm (excitation at 365nm). The limit of detection was 0.2ng ($S/N \geq 2.5$) and the range of linearity was 0.2~20ng with a correlation coefficient of 0.9999.

Key words berberine, high performance liquid chromatography

《第五届北京分析测试学术报告会及展览会》 在北京举行

由国家科委主持,中国分析测试协会承办的《第五届北京分析测试学术报告会及展览会》于1993年10月8日至10月13日在北京科学会堂和国贸大厦同时举行。北京分析测试学术报告会共分光谱、质谱、核磁、色谱、电化学和电镜六大部分。与会的专家学者共90余名,其中国内代表60余名,来自德、日、美、挪威、巴西和香港等国家和地区的专家26名。在学术报告会期间,还举行了第三次中德色谱学术报告会,由 A. Kettrup 教授带领的德方代表团参加了学术报告会。来自世界各地的色谱专家就液相色谱、气相色谱、毛细管电泳技术和联用技术进行了广泛的学术交流,对一些新的技术和领域进行了专题讨论。

同时,还对国内厂家生产的分析仪器进行评审,11种分析仪器获《第五届北京分析测试学术报告会及展览会》金奖。由国家色谱研究分析中心研制的 P100型高效液相色谱仪荣获金奖。

这次会议,反映了国内外仪器分析和技术发展的最新水平,并将对我国仪器分析的发展起到积极的推动作用。

(国家色谱研究分析中心)