

反相高效液相色谱法测定兔血清中小檗碱浓度

厉将斌¹, 张 壮², 李曰庆², 闫彦芳², 张志宏¹, 那彦群¹, 郭应禄¹

(1 北京大学第一医院泌尿外科, 北京大学泌尿外科研究所 100034; 2 北京中医药大学东直门医院 100700)

摘要:目的: 建立前列腺中小檗碱兔血清药物浓度的反相高效液相色谱定量分析方法。方法: 色谱条件为: 固定相: Platinum EPS 柱(C8 100A 3 μ , 150mm \times 4.6mm), 流动相: 乙腈~ 1/12N 磷酸盐缓冲液(70: 30, v/v), 流速: 0.8ml \cdot min⁻¹, 检测波长 345nm, 柱温 40 $^{\circ}$ C, 外标法为定量测定法。结果: 血清小檗碱浓度在 0.72 μ g \cdot L⁻¹ ~ 578.98 μ g \cdot L⁻¹ 的范围内线性关系良好, 检测限 0.36 μ g \cdot L⁻¹, 回收率(96.06 \pm 4.74)%, 日内、日间精密度为 1.16% ~ 2.18% .0.99% ~ 3.04%。结论: 本法准确性、灵敏度、专一性高, 可为小檗碱的体内血清药物浓度分析提供有意义的方法学参考。

关键词: 反相高效液相色谱法(RP-HPLC); 小檗碱; 前列腺; 血药浓度

中图分类号: R285.5 文献标识码: B 文章编号: 1005-9903(2003)01-0027-03

To Determine the Serum Concentration of Berberine in Rabbits in RP-HPLC

LI Jiang-bin¹, ZHANG Zhuang², LI Yue-qing², YAN Yanfang², ZHANG Zhi-hong¹, NA Yan-qun¹, GUO Ying-lu¹

(1 Department of Urology, The First Hospital of Peking University, Institute of Urology, PeKing University, 100034

2 The Dongzhimen Hospital of Beijing University of Traditional Chinese Medicine, 100700)

Abstract: Objective: To create a quantitative analysis method of RP-HPLC to determine the serum concentration of berberine from QLS in rabbits. Methods: The conditions of chromatography: stationary phase: Platinum EPS column (C8 100A 3 μ , 150mm \times 4.6mm), mobile phase: acetonitrile~ 1/12N phosphate buffer solution(70: 30, v/v), flow rate: 0.8ml \cdot min⁻¹, detection wavelength was 345 nm, temperature of column was 40 $^{\circ}$ C, external standard method was quantitative analysis method. Results: The linear relationship of serum concentration of berberine was shown well in the range of 0.72 μ g \cdot L⁻¹ ~ 578.98 μ g \cdot L⁻¹, the detectability was 0.36 μ g \cdot L⁻¹, recovery ratio was (96.06 \pm 4.74)%, degree of precision of within the day and among the day were 1.16% ~ 2.18% .0.99% ~ 3.04% respectively. Conclusion: This method was shown with good accuracy, good sensitivity and good specificity, can provide a valuable method for serum concentration detection of berberine.

Key words: reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC); Berberine; qianlieshuan (QLS); serum concentration

高效液相色谱法(HPLC) 由于具有灵敏度、专一性、准确性等特点, 已成为中药复方成分的生物体内分析的主流方法。我们在对中药复方前列腺^[1] 的药代研究中, 利用反相高效液相色谱法测定兔体内前列腺来源小檗碱的血浆浓度, 建立了较好的方法学。现介绍如下。

1 材料

1.1 药物与试剂 前列腺栓剂, 规格: 2克/栓, 每粒栓剂小檗碱的最低含量为 34mg, 由北京中医药大学东直门医院药剂科提供; 盐酸小檗碱标准品, 每瓶约

30mg, 含量 98.14% (供含量测定用), 购自中国药品生物制品检定所, 经本实验用 HPLC 系统测定为单一色谱峰; 乙腈、色谱纯: 磷酸氢二钠(Na₂HPO₄)、磷酸二氢钾(KH₂PO₄)、乙醚、乙醇均为分析纯; 氢氧化钠, 分析纯, 使用前配制成 0.2N 的氢氧化钠溶液; 三蒸水, 甲醇为优级纯。

1.2 受试动物 日本大耳白兔, 12 只, 雄性, 日龄 90~ 120d, 30 代次, 体重 2.5 \pm 0.3kg。

1.3 仪器 HP-1100 型 HPLC 系统, 紫外/可见可变

波长检测器, JS-3030 型江申通用汉字色谱工作站, 分析柱采用 Alltech, Platinum EPS 柱, C8 100A 3 μ , 150mm \times 4.6mm。

2 方法

2.1 色谱条件 经预试验确定流动相如下: 乙腈~1/12N 磷酸盐缓冲液(70:30, v/v), 使用前经超声波脱气 10min, 流速: 0.8ml/min, 柱温 40 $^{\circ}$ C, 检测波长: 345nm, 灵敏度: 0.01 AUFS, 柱压 70 \pm 1Kgf \cdot (cm 2) $^{-1}$ 。采用外标法定量测定血清小檗碱浓度。具体色谱图附于后。

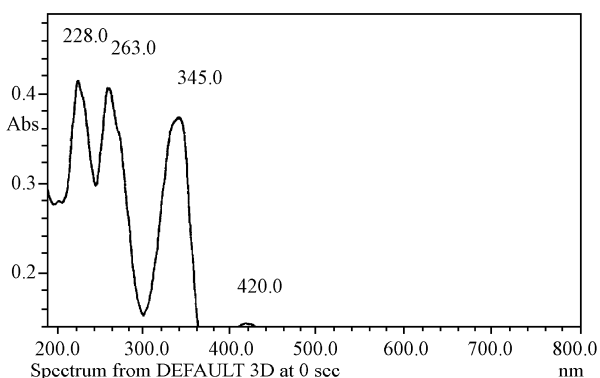


图1 小檗碱标准品的紫外/可见分光光度计检测图

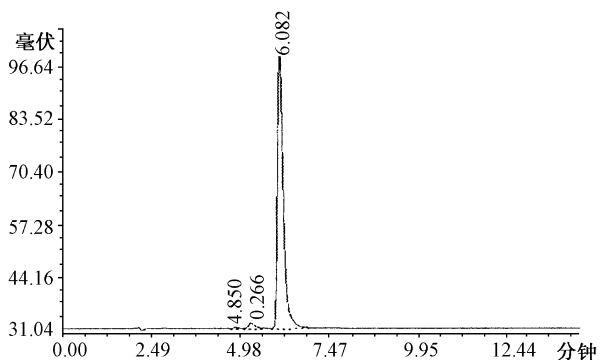


图2 标准品经本试验用 HPLC 系统测定的色谱图

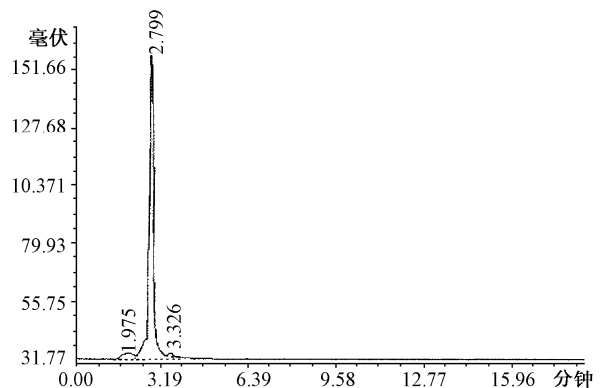


图3 空白血清的色谱图

2.2 标准液的配制与保存 精密称取标准品 20mg,

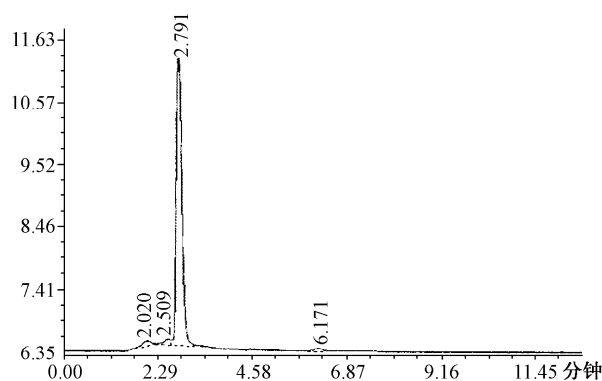


图4 含药血清的色谱图

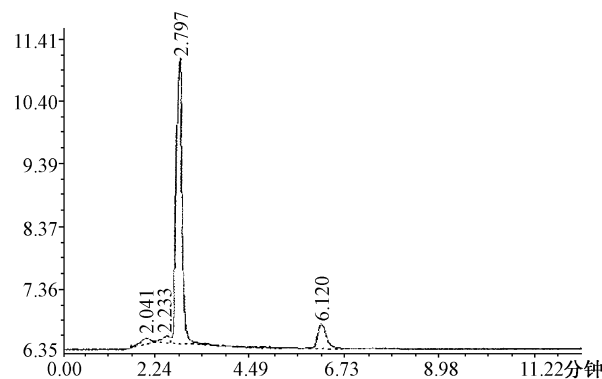


图5 含药血清加小檗碱标准品色谱图

图1: 小檗碱标准品经二极管阵列分光光度计扫描的吸收波长图, 有 228nm, 263nm, 345nm, 3 个主要吸收波长。图 2: 小檗碱标准品色谱图, 色谱图显示盐酸小檗碱标准品的色谱峰均一, 经定量为 98.3%, 保留值为 Tr= 6.082min。图 3: M 兔的空白血清色谱图, 从图中可以看出, 血清中杂质峰基本集中在前数分钟, 在小檗碱保留时间段前后色谱图十分纯净, 无明显干扰性杂峰。图 4: 为 L 兔经肛塞途径给药后 18h 时点的含药血清色谱图, 小檗碱的保留时间为 Tr= 6.171min。图 5: 为 L 兔含药血清加小檗碱标准品的色谱图, 小檗碱的保留时间为 Tr= 6.190min。

以三蒸注射用水溶解于 100ml 容量瓶中, 成为 200mg/L 的母液, 再稀释配制成浓度为 20mg/L, 2mg/L, 0.4mg/L 的子液, 分装于各个密封的小容量瓶中, 密封后于 - 20 $^{\circ}$ C 冰箱保存。临用前置室温 2h。

2.3 样本血清预处理方法 精取含药兔子血清 500 μ l, 加入 0.2N 的氢氧化钠 100 μ l, 混匀。取乙醚 6ml 分两次提取, 每次旋混 60s, 取尽乙醚层共置于另一试管中。于 40 $^{\circ}$ C 水浴中, 自然蒸发至干, 精取 280 μ l 流动相溶解定容, 进样 100 μ l。

2.4 实验方案 兔肛塞前禁食 12h, 在清醒状态下肛塞前列腺 2 粒, 随即将兔肛门荷包缝合, 6h 后拆除缝线。然后分别于给药后 0min、5min、10min、20min、30min、60min、90min、120min、180min、360min、540min、

1440min 时点从耳缘静脉穿刺取血, 取血量 2ml/次, 分离血清。将血清样本预处理后, 进行 HPLC 分析测定, 拟合药代动力学模型并计算参数。

2.5 数据处理 应用中国药理学学会数学药理委员会编制(张文贵编)的 3P97 药代动力学计算软件处理数据。

3 结果

3.1 标准曲线 精取混合空白兔血清 500 μ l \times 9 份, 加入不等量的盐酸小檗碱标准品, 成为血清小檗碱浓度分别为 0.72 μ g/L, 3.62 μ g/L, 7.24 μ g/L, 18.09 μ g/L, 36.19 μ g/L, 72.37 μ g/L, 144.75 μ g/L, 289.49 μ g/L, 578.98 μ g/L 的系列药物浓度血清。经预处理后进行 HPLC 测定, 得到小檗碱的面积(A_{bb})。以 A_{bb} 值作为 Y 轴, 以血清小檗碱浓度 C_{bb} 为 X 轴, 作线性回归分析, 得相关系数 r 及平均标准曲线回归方程: $A_{bb} = 1451.48C_{bb} - 613.095$ (实际系数 $r = 0.9986$, 校正系数 $r = 0.9983$)。结果表明, 血清小檗碱浓度在 0.72 μ g/L ~ 578.98 μ g/L 的范围内, 线性关系良好, 可满足动物实验血清药物浓度定量分析的要求。

3.2 方法回收率 取小檗碱标准品溶液分别加入 500 μ l 混合空白兔血清中, 形成小檗碱浓度分别为 10.86 μ g/L, 108.56 μ g/L, 434.24 μ g/L 的 3 个为 1 组的高中低浓度血清, 在 10d 内共做 6 组, 经预处理后, 进行 HPLC 测定 C'_{bb} (实测值), 同时根据平均标准曲线计算 3 个浓度所对应的 C_{bb} (理论值), 计算相对回收率 $RC = C'_{bb}/C_{bb}$ 。结果分别为 91.32% \pm 3.33%、97.25% \pm 1.44%、99.06% \pm 1.00%, 符合定量分析要求。

3.3 日内、日间精密度 3 个 1 组含小檗碱高中低浓度血清 10.86 μ g/L、108.56 μ g/L、434.24 μ g/L, 在 1 日内测定 6 组, 计算 A 值的平均值 \bar{x} 和标准差 S, 计算 $RS = S/\bar{x}$ (相对标准差), 结果日内差分别为 2.47%、1.32%、0.93%。在 10 日内不同天内测定 6 次, 计算 RS (相对标准差), 结果日间差分别为 3.33%、1.44%、1.00%。

3.4 检测限 以信噪比(S/N)为 3 时的小檗碱标准品浓度为本 HPLC 分析方法的检测限, 取浓度为 0.4 μ g/L 的盐酸小檗碱标准液 0.5 μ l, 1 μ l, 1.5 μ l, 2 μ l, 4 μ l, 6 μ l, 8 μ l, 10 μ l, 分别加入到 0.5ml 混合血清中, 经预处理后进样分析。结果本法的检测限为 0.36 μ g/L。

3.5 专一性 由色谱图可以看出, 兔血清内源性物

质与小檗碱能很好地分离, 均已达到基线分离效果。在兔肛塞前列栓后的含小檗碱血清, 经预处理后用流动相定容, 并在其中加入盐酸小檗碱标准液, 只有在保留时间 6.001~ 6.211min 处的色谱峰加宽增高。表明专一性良好, 成为外标法定量分析兔血清小檗碱浓度的前提。

3.6 血药浓度 根据标准曲线计算得到兔经时血清小檗碱平均浓度如下。

表 1 兔肛塞前列栓 4 克的血清小檗碱平均浓度(μ g/L)

取血时间	5min	10min	20min	30min	1h	1.5h	2h	3h	6h	9h	12h	24h
均值	29.3	66.3	132.7	151.6	104.2	81.1	87.4	53.7	29.9	21.8	15.4	15.6
均差	18.2	43.2	92.4	106.6	70.6	58.2	69.2	33.6	21.1	12.6	7.5	7.3

4 讨论

小檗碱是异喹啉类生物碱, 在小檗属植物中含量较丰, 主要可从黄柏、黄连等的根茎中提取得到。传统上常用于治疗肠道感染, 现又有研究者发现其具有多方面的活性, 如抗炎^[2], 抗心率失常^[3], 松弛平滑肌^[4], 抗血小板聚集^[5]等。因此, 其仍被不断进行各方面的研究。

在中药的药代研究中, 小檗碱常被作为单味药或复方的检测指标。我们在对小檗碱的药代研究中也将其列为一个检测指标, 并建立了较满意的方法学。本方法具有较高的敏感度, 检测限达到 0.36 μ g/L; 在近 2 个数量级的跨度范围内具有较好的线性关系, 专一性和精密度达到体内定量要求。并且预处理较为简便, 是一个较为成功的方法学。

参考文献:

[1] 贾玉森, 李曰庆, 孙明杰, 等. 前列腺炎栓治疗非特异性慢性前列腺炎(湿热夹瘀证) 104 例临床与实验研究[J]. 中医杂志. 1999, 40(2): 98-99.

[2] 吕燕宁, 邱全璞. 小檗碱对小鼠 DTH 及其体内几种细胞因子的影响[J]. 中国免疫学杂志. 2000, 16(3): 139-141.

[3] 汪永孝, 谭月华, 盛宝恒. 小檗碱抗缺血性心率失常作用及其机理[J]. 中国药理学与毒理学杂志. 1993, 7(2): 108-111.

[4] 王文雅, 陈克敏, 关永源. 盐酸小檗碱对毒覃碱型受体的作用[J]. 药学报. 1999, 34(4): 260-263.

[5] 吴俊芳, 刘天培. 小檗碱对局灶性脑缺血大鼠血小板聚集及血浆 TXB2 和 6-keto-PGF1 α 水平的影响[J]. 药学报. 1995, 30(2): 98-102.