文章编号:1000-5404(2007)09-0843-03

论著

测定黄连中5种生物碱含量的高效液相色谱法研究

应 懿,何志红,周世文,汤建林,杨 雪,王 璐 (第三军医大学新桥医院临床药理基地,重庆 400037)

提 要:目的 建立高效液相色谱法测定黄连中生物碱含量的方法。**方法** 色谱柱为C_{18}柱(3.9 mm×300 mm,10 μm),流动相为乙腈:0.05 mol/L磷酸二氢钾(40:60,内含0.015 mol/L十二烷基磺酸钠),检测波长为345 nm。**结果** 在以上色谱条件下,小檗碱、巴马汀、黄连碱、表小檗碱和药根碱分离效果好。**结论** 方法灵敏度高,重现性好,可用于黄连等含小檗碱型生物碱中药材及制剂的质量控制。

关键词: 高效液相色谱法;黄连;生物碱;含量测定
中图法分类号: R282.71; R284.1 **文献标识码:** A

Determination of the alkaloids in *Rhizoma Coptidis* by HPLC

YING Yi, HE Zhi-hong, ZHOU Shi-wen, TANG Jian-lin, YANG Xue, WANG Lu (Department of Clinical Pharmacology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To establish an HPLC method for separation and determination of the alkaloids in *Rhizoma Coptidis*. Methods HPLC system consisted of C_{18} column (3.9 mm×300 mm, 10 μm), mobile phase was composed of acetonitrile solution of potassium phosphate (0.05 mol/L, 40:60, with 0.015 mol/L SDS), and the detection wavelength was 345 nm. Results Five kinds of berberine-type alkaloids which are jatrorrhizine, epiberberine, coptisine, palmatine and berberine could be separated completely. Conclusion HPLC is of high sensitivity and good reproducibility. It can be used for quality control of drug and Chinese crude drug containing alkaloids.

Key words: HPLC; *Rhizoma Coptidis*; alkaloids; assay

近年来,中药防治疾病的目标转向单味药物的筛选,以及有效部位或有效成分的获得。黄连具有泻火、解毒、清热、燥湿的功效,其主要有效成分生物碱,具有降血糖、保护缺血心肌、抗消化性溃疡等药理作用,临床应用广泛[1-3]。黄连药材所含的生物碱主要有小檗碱(berberine)、巴马汀(palmatine)、黄连碱(coptisine)、表小檗碱(epiberberine)和药根碱(jatrorrhizine)等小檗碱型生物碱,本研究建立了高效液相色谱法测定黄连中小檗碱型生物碱含量的方法,旨在对黄连药材或含黄连生物碱为主药制剂的质量控制,为临床应用优质黄连和含黄连生物碱为主药的制剂提供检测手段。

1 材料与方法

1.1 仪器

高效液相色谱仪(美国Beckman公司):System Gold 126多溶剂输送泵,System Gold 166紫外检测器,32Karat色谱工作站;UV-2450型紫外分光光度仪(日本岛津);AS3120A超声波清洗器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司)。

作者简介: 应 懿(1974-),女,浙江省绍兴市人,博士研究生,医师,主要从事药物临床试验方面的研究。电话:(023)68774761
通讯作者: 周世文,电话:(023)68755311
收稿日期: 2006-06-12;**修回日期:** 2007-01-24

1.2 试药

黄连为毛茛科植物味连 *Coptis chinensis Franch* 的干燥根(购于重庆中药材市场,经张诗平副主任药师鉴定);盐酸小檗碱、盐酸巴马汀、盐酸药根碱对照品购于中国药品生物制品检定所(批号依次为110713-200208、0732-200005、0733-200005),硫酸黄连碱、表小檗碱对照品由华西药学院生药教研室张浩教授提供(纯度分别为99.1%及98.5%)。乙腈为色谱纯,十二烷基磺酸钠、磷酸二氢钾、磷酸为分析纯。

1.3 溶液制备

1.3.1 对照品溶液的制备 精密称取60 ℃干燥到恒重的盐酸药根碱、表小檗碱、硫酸黄连碱、盐酸巴马汀、盐酸小檗碱对照品适量,分别置10 ml量瓶中,加入盐酸:甲醇(1:100)溶解并稀释至刻度,混匀,经0.45 μm滤膜过滤,备用。分别量取上述对照品溶液5.0 ml于25 ml量瓶中混匀,即得浓度依次为20、30、30.6、39.3、40 μg/ml的对照品储备溶液。

1.3.2 供试品溶液的制备 称取黄连粗粉(过20目筛)0.50 g,置100 ml量瓶中加入盐酸:甲醇(1:100)50 ml,具塞,称定重量。50 ℃水浴30 min,超声提取40 min,室温放置过夜,盐酸:甲醇(1:100)补足减失的重量,过滤。取续滤液0.5 ml置10 ml量瓶中,加入盐酸:甲醇(1:100)稀释20倍后作为供试品溶液。

1.4 色谱条件

色谱柱:C_{18}柱(3.9 mm×300 mm,10 μm);流动相:乙腈

0.05 mol/L磷酸二氢钾(40∶60,内含0.015 mol/L十二烷基磺酸钠);检测波长345 nm;柱温:37 ℃;流速:1.2 ml/min;进样量:20 μl。

1.5 线性范围考察

精密量取"1.3.1"项下对照品储备液0.25、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0 ml分别转移至10 ml量瓶中,流动相稀释至刻度,作为对照品供试液。在上述色谱条件下各进样20 μl,测定峰面积。

1.6 精密度试验

取上述对照品供试液,按上述色谱条件分别重复进样5次,测定峰面积。

1.7 重现性试验

取同一批黄连粗粉5份,各0.50 g,按上述供试品制备方法和色谱条件测定峰面积。

1.8 稳定性试验

取室温放置的黄连供试品溶液,于0、2、4、6、12、24、48 h按上述色谱条件分别测定峰面积。

1.9 加样回收试验

精密称取已知含量的黄连粗粉9份,每份约0.10 g,加入适量对照品,按上述供试品制备方法和色谱条件分别测定峰面积。

1.10 样品含量测定

取购入的两批黄连药材,按上述供试品制备方法和色谱条件测定峰面积,并计算其含量。

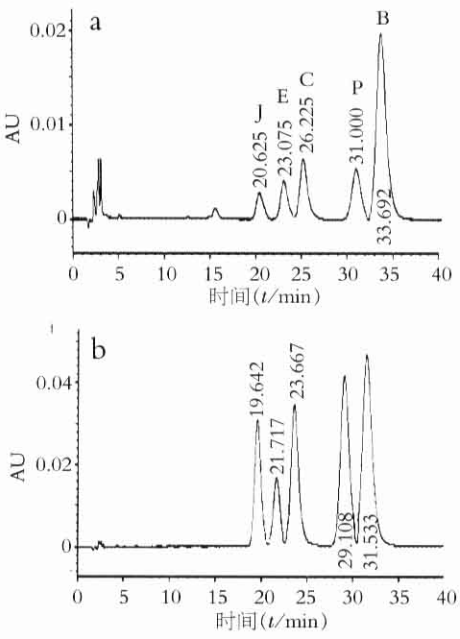
1.11 统计学处理

采用SPSS 10.0统计软件进行回归分析和相关性检验。

2 结果

2.1 色谱行为

小檗碱、巴马汀、黄连碱、表小檗碱和药根碱分离效果好,且峰形良好。见图1。



a:黄连供试品溶液;b:对照品溶液
J:药根碱;E:表小檗碱;C:黄连碱;P:巴马汀;B:小檗碱

图1 黄连供试品与对照品溶液高效液相色谱图

2.2 线性范围

以峰面积积分值(Y)对浓度(C,μg/ml)进行直线回归。盐酸药根碱、表小檗碱、硫酸黄连碱、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱的线性范围和回归方程结果见表1。

表1 线性范围考察结果

成分	回归方程	相关系数	线性范围(μg/ml)
盐酸药根碱	Y=49 311.56C+18 647.60	r=0.999 2	0.50~20.00
表小檗碱	Y=25 005.16C+10 003.01	r=0.999 1	0.75~30.00
硫酸黄连碱	Y=35 794.42C+9 853.63	r=0.999 6	0.76~30.60
盐酸巴马汀	Y=39 033.96C+14 024.44	r=0.999 4	0.98~39.30
盐酸小檗碱	Y=40 520.87C+5 626.34	r=0.999 5	1.00~40.00

2.3 精密度

盐酸药根碱、表小檗碱、硫酸黄连碱、盐酸巴马汀和盐酸小檗碱的平均峰面积分别为191 864、112 329、211 244、313 981、279 924,RSD依次为1.11%、0.47%、0.24%、0.56%、1.33%。结果表明,仪器精密度好,符合实验要求。

2.4 重现性

药根碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀和小檗碱的平均含量分别为1.02%、2.18%、2.61%、2.28%、9.02%,各成分的RSD分别为2.52%、2.29%、1.01%、2.00%、1.98%(n=5)。结果表明,方法重现性良好。

2.5 稳定性

室温放置0、2、4、6、12、24、48 h的黄连供试品溶液,测得药根碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀和小檗碱的含量分别为1.01%、2.22%、2.52%、2.30%、9.04%,RSD分别为2.04%、2.37%、1.59%、2.23%、0.97%(n=3)。结果表明,供试品溶液在48 h内基本稳定。

2.6 加样回收率

低浓度药根碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀和小檗碱的平均加样回收率分别为98.26%(RSD为1.38%)、98.77%(RSD为1.57%)、98.88%(RSD为0.59%)、97.70%(RSD为0.48%)、99.20%(RSD为1.96%)。中浓度药根碱、表小檗碱、黄连碱、巴马汀和小檗碱的平均加样回收率分别为97.89%(RSD为2.62%)、99.70%(RSD为0.58%)、98.75%(RSD为1.31%)、97.69%(RSD为1.12%)、99.31%(RSD为0.97%)。高浓度药根碱、巴马汀和小檗碱的平均加样回收率分别为98.64%(RSD为2.35%)、100.46%(RSD为0.36%)、98.77%(RSD为0.73%)。

2.7 样品含量

购入的两批黄连药材中5种生物碱的含量测定结果见表2。

表2 黄连中生物碱的含量测定结果(g/100 g生药,n=3)

样品	药根碱	表小檗碱	黄连碱	巴马汀	小檗碱	总计
1	1.04	2.23	2.65	2.31	8.02	16.25
2	0.94	1.98	2.40	2.06	7.27	14.65

3 讨论

黄连(味连)中检测出的5种生物碱,其含量由高到低的顺序为小檗碱>黄连碱>巴马汀≥表小檗碱>药根碱,它们之间的含量比例约为7.7∶2.5∶2.2∶2.1∶1。味连还具有1个未知峰(Und.的保留时间为15.6 min)。

由于没有足够的硫酸黄连碱、表小檗碱对照品，未能进行高浓度的黄连碱和表小檗碱加样回收试验。

本试验采用离子对高效液相色谱法，以十二烷基磺酸钠作为离子对试剂，可显著改善各组分的分离效果[4]。该色谱条件可同时分离和测定黄连中5种生物碱的含量，该方法灵敏、定量准确，可用于黄连等含小檗碱型生物碱中药材及制剂的质量控制，从而减少了黄连主要药用成分测定的工作量，提高了工作效率。

（致谢：感谢华西药学院生药教研室张浩教授、陈雏老师对实验的无私帮助！）

参考文献：

[1] 呼永河，李 静，武娜杰，等. 加味黄连温胆汤治疗糖尿病无症状心肌缺血的临床观察[J]. 中国中西医结合杂志，2005，25(9)：790－793.
[2] 国家药典委员会. 中国药典(一部)[S]. 北京：化学工业出版社，2000：250－251.
[3] 李 备，周岐新. 黄连抗消化性溃疡的药理学研究进展[J]. 中国药房，2005，16(14)：1107－1109.
[4] 晁若冰，张 浩，庄燕黎，等. 高效液相色谱法测定黄连药材中小檗碱型生物碱的含量[J]. 药物分析杂志，2003，23(5)：354－357.

（编辑 龙 亮）

文章编号：1000-5404(2007)09-0845-01

个案与短篇

腰3椎体恶性骨巨细胞瘤快速复发1例

谢 肇，吴雪晖，许建中 （第三军医大学西南医院骨科，全军矫形外科中心，重庆 400038）

患者，女性，50岁。因"腰痛1个月伴左大腿、膝部疼痛4 d"入院。2005年12月患者无明显诱因出现腰部持续性疼痛，夜间加剧。自服"芬必得"无明显缓解。2006年1月9日出现左大腿前侧、左膝内侧烧灼样疼痛、麻木伴活动受限。检查：腰3、4棘突、棘间及双侧椎旁压痛、叩痛阳性，无放射痛。左侧大腿前区感觉减退、麻木，股四头肌力Ⅲ级，膝反射减弱，股神经牵拉试验阳性。CT：腰3椎体不均匀破坏，无死骨，椎体后缘骨皮质结构不连续并向椎管膨出，硬膜囊受压。MRI椎体后缘见大量低信号(T_1、T_2)影突入椎管。术前穿刺活检结果提示转移性肿瘤可能。于2006年1月23日行经左侧前方入路腰3椎体切除、椎管减压、植骨融合内固定术。术中见腰3椎体皮质菲薄，椎体中央大量"鱼肉样"组织，向后呈浸润性生长，椎体后缘皮质已基本消失，硬膜囊受压，后纵韧带大部破坏，双侧椎弓根内可见"鱼肉样"组织。彻底清除，蒸馏水浸泡5 min后生理盐水冲洗。异体髂骨块植骨融合内固定。术后行抗炎、止血治疗。左大腿疼痛麻木逐渐消失，股四头肌力Ⅳ～Ⅴ级。术后病理报告：恶性骨巨细胞瘤。8 d后痊愈出院。患者在腰部支具保护下不扶拐行走。

术后17 d患者出现腰痛伴双大腿、膝关节疼痛，以右侧为重。止痛治疗无效后2006年2月14日再次入院。检查：切口甲级愈合。腰2、3、4棘突、棘间、椎旁压痛、叩痛阳性，腰3棘突最明显。双侧大腿前及膝感觉麻木，右侧股四头肌力Ⅳ级，左侧Ⅴ级，股神经牵拉试验阴性。行抗炎、脱水、神经阻滞、营养神经等治疗，疼痛仍有加重趋势。复查血常规、C-反应蛋白、C_3、C_4均无异常，腰椎X线显示内固定及植骨块位置良好。MRI检查提示肿瘤复发可能。2006年3月9日经原切口行探查术。术中见钢板固定确切、稳定，植骨块在原位。钢板及植骨块周围见大量"鱼肉样"组织生长，去除钢板植骨块，见椎管内大量"鱼肉样"组织生长，压迫L_2、L_3神经根。予以彻底清除，蒸馏水浸泡5 min后生理盐水冲洗。术后疼痛缓解，肌力逐渐恢复。病理报告为：恶性骨巨细胞瘤。术后第5天转肿瘤科进一步治疗。

讨论

骨巨细胞瘤多发于长骨骨骺，非长骨仅占20%。在脊柱中以骶尾部的发病率最高，其次为颈椎，以胸腰椎发病最低[1]。临床表现为局部疼痛及脊髓、神经受压症状。X线主要表现为溶骨性改变，多有椎体变形及软组织影。恶性骨巨细胞瘤是指呈浸润性生长的骨巨细胞瘤[2]。本例患者由于有乳房纤维腺瘤、子宫多发性肌瘤手术病史，术前穿刺活检病理报告提示骨转移瘤可能，第1次手术前诊断倾向于诊断骨转移性肿瘤。术后17 d患者症状复发，考虑有以下几种可能：①低毒性感染；②排异反应；③钛板与机体的相容性问题；④内固定失稳等。在进行检查以及诊断性抗炎治疗未见好转后基本排除以上可能性。在症状进行性加重，MRI提示局部肿瘤复发的情况下，进行了手术探查。术中见钢板固定稳定，钢板及植骨块周围见"鱼肉样"组织，椎管内大量鱼肉样组织生长，压迫L_2、L_3神经根。术后病理报告：恶性骨巨细胞瘤。这样患者第1次术后症状快速复发，进行性加重即有了较为确切的解释。骨巨细胞瘤属于良性肿瘤，在清除后有复发的可能。但本例患者在术后17 d即出现肿瘤复发引起的压迫症状，实为罕见。

关键词：腰3椎体；恶性骨巨细胞瘤；复发
中图法分类号：R738.1 文献标识码：B

参考文献：

[1] 马庆军，党耕町，刘中军，等. 脊柱骨巨细胞瘤36例诊断与治疗[J]. 北京大学学报：医学版，2002，34(6)：656－659.
[2] Sung H W, Kuo D P, Shu W P, *et al*. Giant cell tumor of bone. Analysis of two hundred and eight cases in Chinese patients[J]. J Bone Joint Surg Am, 1982, 64(5): 755－761.

（编辑 郭建秀）

作者简介：谢 肇(1965－)，男，安徽省颍上县人，博士，主治医师，讲师，主要从事骨科临床及骨质疏松等方面的研究，发表论文20余篇。电话：13308918029，E-mail：xiezhao54981@yahoo.com.cn
通讯作者：许建中，电话：(023)65340297
收稿日期：2006-09-11；修回日期：2006-09-19