

## HPLC法测定粉背雷公藤中雷公藤甲素的含量

陈岳祥<sup>1,2</sup>, 乔艳<sup>1</sup>, 乔化民<sup>1</sup>, 姚建忠<sup>2</sup> (1. 中国人民解放军第181医院药剂科, 广西 桂林 541002; 2. 第二军医大学药学院, 上海 200433)

**摘要** 目的:建立高效液相色谱法测定广西产粉背雷公藤中不同部位雷公藤甲素的含量方法。方法:采用C<sub>18</sub>色谱柱(250 mm ×4.6 mm, 5 μm),流动相为甲醇-水(45:55),检测波长217 nm,流速1 mL/min,柱温24℃,进样量为20 μL。结果:雷公藤甲素在0.5~10 μg/mL范围内呈良好的线性关系;平均加样回收率为99.61%,RSD为1.69%(n=5);粉背雷公藤根部和茎枝中雷公藤甲素的平均含量分别为14.98和3.64 μg/g。结论:本方法简便可行、定量准确、重现性好,可用于粉背雷公藤中雷公藤甲素的质量控制。

**关键词** 粉背雷公藤;雷公藤甲素;高效液相色谱法

中图分类号:R917 文献标识码:A 文章编号:1006-0111(2009)02-0134-03

### Determination of triptolide in *Tripterygium hypoglaucum* by HPLC

CHEN Yue-xiang<sup>1</sup>, QIAO Yan<sup>1</sup>, QIAO Hua-min<sup>1</sup>, YAO Jian-zhong<sup>2</sup> (1. Department of pharmacy, The 181th Hospital of PLA, Guilin 541002, China; 2. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**ABSTRACT Objective:** To develop a HPLC method for determining content of triptolide in different parts of *Tripterygium Hypoglaucum* (Levl) Hutch from Guangxi in China. **Methods:** The determination of triptolide was performed by reverse-HPLC on C<sub>18</sub> column (250 mm ×4.6 mm) using methanol-water(45:55) as mobile phase with a flow rate of 1 mL/min. The detecting wavelength was at 217 nm and the injection volume was 20 μL. **Results:** The linear range of triptolide was 0.5~10 μg/mL (r=0.9999). The average recovery was 99.61%, and RSD was 1.68%. The average content of triptolide in *Tripterygium Hypoglaucum* (Levl) Hutch was 14.98 μg/g in root and 3.64 μg/g in stem. **Conclusions:** The established method is simple, convenient, accurate, reproducible, and can be applied to the quality control of triptolide in *Tripterygium hypoglaucum* (Levl) Hutch.

**KEY WORDS** *Tripterygium hypoglaucum* (Levl) Hutch; triptolide; HPLC

雷公藤产于我国各地,为卫矛科雷公藤属植物。目前引起医学界重视的有两个品种:一是雷公藤,主要分布于我国长江流域以南及沿海各省;另一种叫昆明山海棠,其特点是叶背有白粉,也叫粉背雷公藤,学名 *Tripterygium hypoglaucum* (Levl) Hutch,主要分布于我国的云、贵、川等地<sup>[1~3]</sup>。

粉背雷公藤味苦、涩、性湿,具有清热解毒、祛风除湿、舒筋活络、消炎止痛等作用,所含化学成分有生物碱、皂苷、内酯和萜类等,其中,雷公藤甲素(triptolide,又名雷公藤内酯)是其主要活性成分,有较强的抗炎和免疫抑制等多种药理作用,临床主要用于治疗类风湿关节炎、强直性脊柱炎、红斑狼疮等多种自身免疫和炎性疾病;通常以根入药,已被制成煎剂、冲剂、片剂等剂型<sup>[4~6]</sup>。

本实验选择雷公藤甲素作为粉背雷公藤药效质量内控指标,采用高效液相色谱法比较测定广西产粉背雷公藤的根部和茎枝中雷公藤甲素的含量,为

粉背雷公藤中雷公藤甲素的质量控制和合理利用其茎枝资源入药提供科学依据。

### 1 仪器与试剂

**1.1 仪器** HP-1100型高效液相色谱仪;TU-1221型紫外分光光度计;PT中性氧化铝预处理柱(河北天津杨滤材厂)。

**1.2 试剂** 雷公藤甲素对照品(中国药品生物制品检定所,批号:111567-200502);甲醇(色谱纯);纯净水(自制);氯仿、醋酸乙酯为分析纯;粉背雷公藤(采自广西灌阳县,由本院乔化民副主任药师鉴定)。

### 2 方法与结果

**2.1 色谱条件** 色谱柱:C<sub>18</sub>柱(250 mm ×4.6 mm, 5 μm);流动相:甲醇-水(45:55);检测波长:217 nm;流速:1 mL/min;柱温:24℃;进样量:20 μL。

**2.2 对照品溶液的制备** 精密称取P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>真空干燥48 h的雷公藤甲素对照品2.5 mg,置50 mL容量瓶中,加甲醇溶解并加入流动相稀释至刻度,摇匀,即得50 μg/mL对照品溶液,备用。

**2.3 样品溶液的制备**<sup>[7]</sup> 分别取粉背雷公藤根部

基金项目:广西科技攻关与新产品试制项目(桂科攻 NO. 0719006-3-9)。

作者简介:陈岳祥(1965-),男,副主任药师。Tel:(0773)2081410,

E-mail:chenyx181@163.com。

通讯作者:姚建忠。Tel:(021)81871235, E-mail:yaojz@sh163.net

及茎枝,粉碎,过 20 目筛。分别精确称取 10 g 根部及茎枝样品,置 50 mL 具塞磨口三角瓶中,加甲醇 30 mL 浸泡 6 h,过滤;残渣再加甲醇 30 mL,浸泡 16 h 过滤,合并滤液,浓缩至干;残留物加 30 mL 纯净水溶解,离心,取上清液,用氯仿提取 3 次,每次 10 mL,合并提取液,浓缩至干;残留物用 2 mL 醋酸乙酯溶解,加入到 PT 中性氧化铝预处理柱中,用醋酸

乙酯 10 mL 洗脱,收集洗脱液,并用氮气吹干,残留物加甲醇分次洗至容量瓶中,再用流动相至刻度,摇匀,过 0.45 μm 微空滤膜,分别制得粉背雷公藤根部和茎枝样品溶液,备用。

2.4 系统适应性试验 对照品溶液及供试样品溶液按上述色谱条件下进样。结果表明,雷公藤甲素色谱峰与其他杂质峰达到基线分离,见图 1。

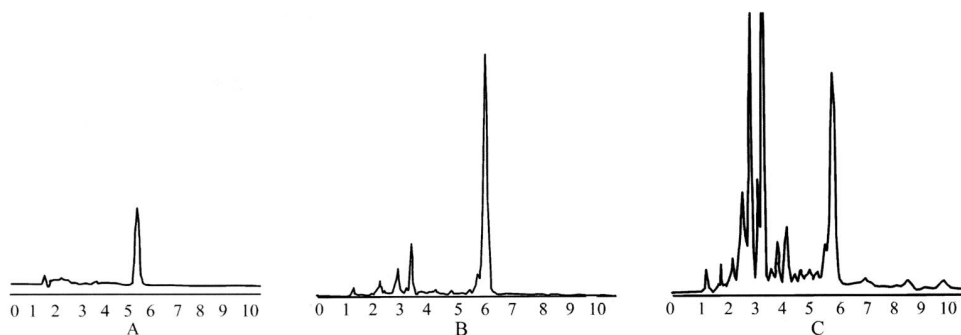


图 1 HPLC 色谱图

A 雷公藤甲素对照品; B 粉背雷公藤根部; C 粉背雷公藤茎枝

2.5 线性关系考察 取对照品溶液,加流动相制成 0.1、0.5、1、2、5、7.5、10、20 μg/mL 的溶液,分别经 0.45 μm 滤膜过滤,进样 20 μL,测定峰面积。以峰面积 (Y) 对溶液浓度 (X) 进行线性回归分析。雷公藤甲素回归方程为:  $Y = 58\,072.01X - 106.10$ ,  $r = 0.9999$ ; 结果表明雷公藤甲素在 0.5 ~ 10 μg/mL 范围内,线性关系良好。

2.6 精密度试验 精密吸取 5.0 μg/mL 对照品溶液 20 μL,连续进样 6 次,记录峰面积分别为 289939.2、293467.5、283654.9、281469.3、300656.4、293867.5。雷公藤甲素的平均峰面积为 290509.1,  $RSD = 2.44\%$  ( $n = 6$ ),结果表明,本仪器精密度良好。

2.7 重复性试验 精密称取粉背雷公藤茎枝样品 5 份,每份 10 g,按“2.3 项方法平行制得供试样品溶液 5 份,每份 25 mL。按上述色谱条件进样 20 μL,分别测定,计算雷公藤甲素含量分别为 3.15、3.11、3.10、3.07、3.20 μg/g,平均含量为 3.13 μg/g,  $RSD = 1.61\%$  ( $n = 5$ ),结果表明,本试验方法重复性良好。

2.8 回收率试验 精密称取已知雷公藤甲素含量的粉背雷公藤根部粗粉 5 份,每份 (雷公藤甲素的平均含量为 0.0015%) 10 g,按“2.3 项方法制得供试样品溶液 5 份,每份 25 mL,然后分别精密加入不同量的雷公藤甲素对照品溶液使每份总体积为 50 mL,再依 2.1 项色谱条件进样 20 μL,测定含量,并计算回收率。结果平均回收率为 99.61%,  $RSD = 1.69\%$  ( $n = 5$ ),如表 2 所示。

表 2 雷公藤甲素加样回收率试验结果 ( $n = 5$ )

样品号	样品含量 (mg)	加入量 (mg)	测得量 (mg)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	0.150	0.125	0.2709	98.51		
2	0.150	0.125	0.2698	98.11		
3	0.150	0.250	0.3957	98.93	99.61	1.69
4	0.150	0.250	0.4010	100.25		
5	0.150	0.250	0.4090	102.25		

2.9 样品测定 分别精密称取粉背雷公藤根部和茎粗粉各 5 份,每份 10 g,按“2.3 项方法分别制得粉背雷公藤根部和茎粗粉的样品溶液 25 mL,依“2.1 项色谱条件进样 20 μL,测定含量,结果见表 3。

表 3 粉背雷公藤根部和茎枝中雷公藤甲素含量测定结果 ( $n = 5$ )

样品号	根部含量 (μg/g)	平均值 (μg/g)	样品号	茎枝含量 (μg/g)	平均值 (μg/g)
1	14.094		1	3.074	
2	13.863		2	3.052	
3	16.862	14.977	3	4.074	3.643
4	15.436		4	4.673	
5	14.630		5	3.343	

2.10 稳定性试验 精密称取粉背雷公藤茎粗粉 10 g,按“2.2 项方法制成雷公藤茎粗粉待测液 10 mL。取 7 份,分别于 0、2、4、6、8、12、24 h 后,按“2.1 项色谱条件,均进样 20 μL,测得雷公藤甲素的峰面积分别为 194943.4、190334.0、181734.0、180771.0、180789.4、179889.6、177783.7,平均峰面积为 183749.3,  $RSD = 3.45\%$  ( $n = 7$ )。结果表明,供试样品待

测液中的雷公藤甲素在 48 h 内稳定性良好。

### 3 讨论

雷公藤甲素经紫外分光光度计检测扫描,其最大吸收峰波长为 217 nm,选择该波长为 HPLC 检测波长。雷公藤甲素提取液经 PT 中性氧化铝预处理柱后,可去除大部分杂质,减少干扰,满足 HPLC 检测要求<sup>[8]</sup>。该方法稳定、可靠,重现性好,可以用作雷公藤甲素的含量测定方法。

本法测定的粉背雷公藤根中雷公藤甲素含量高于茎枝中的含量。伍小燕<sup>[9]</sup>等对桂林产昆明山海棠多个药材部位如全根、全茎、茎皮和去皮茎蕊水煎剂 LD<sub>50</sub> 值进行比较,发现其 LD<sub>50</sub> 分别为 47、104、72、115 g/kg,全根的毒性大于全茎,提示雷公藤甲素是雷公藤属植物用于治疗风湿性关节炎和类风湿关节炎的主要有效成分和毒性成分之一,这与梅之南<sup>[10]</sup>报道的结果相一致。

从本试验对雷公藤甲素含量测定结果看,尽管粉背雷公藤茎枝中雷公藤甲素含量不及根部中的含量,但我院应用粉背雷公藤茎枝入药,用于治疗类风湿性关节炎、风湿性关节炎已达二十余年,疗效确切,只有少数病人有胃肠道不适、极个别妇女引起月经紊乱等不良反应,其毒性也相对较少,使用安全。因此,只要适当调整粉背雷公藤茎枝的服用剂量,完全

可以利用粉背雷公藤茎枝入药,从而有效提高粉背雷公藤药材资源的利用率。

### 参考文献:

- [1] 韦松基,刘寿养. 广西 21 种有毒药用植物的鉴别介绍 ( ) [J]. 中药材, 1990, 13 (3): 16.
- [2] 张 存. 桂林产粉背雷公藤的用法及体会 [J]. 广西中医药, 1990, 13 (4): 38.
- [3] 孙卓然,刘 园. 民族药昆明山海棠的生药学鉴定 [J]. 华西药学杂志, 2008, 23 (2): 174.
- [4] 全国中草药汇编编写组. 全国中草药汇编 (下册) [M]. 北京:人民卫生出版社, 1988: 538.
- [5] 陈江飞,胡毅坚,苗彩云. 雷公藤甲素药理作用的研究进展 [J]. 中国医药工业杂志, 2007, 38 (8): 604.
- [6] 张 莹,方勇飞,王 勇. 昆明山海棠药理作用及临床应用研究进展 [J]. 人民军医, 2008, 51 (7): 463.
- [7] 朱 烈,程敬丽. 雷公藤甲素提取方法研究 [J]. 浙江农业科学, 2005, 6: 485.
- [8] 陈红波,涂胜豪,杨 光. 反相高效液相色谱法测定雷公藤片中雷公藤甲素含量的改进方法 [J]. 中医学月刊, 2004, 11: 2013.
- [9] 伍小燕,黄莹娟,周 鸣. 桂林产昆明山海棠总生物碱、微量元素及 LD<sub>50</sub> 值测定 [J]. 时珍国药研究, 1996, 7 (3): 152.
- [10] 梅之南,杨祥良,徐辉碧. 雷公藤内酯醇的药理研究 [J]. 中国医院药学杂志, 2003, 23 (9): 557.

收稿日期: 2008-05-04

(上接第 122 页)

### 3 讨论

阿奇霉素属大环内酯类抗生素<sup>[2]</sup>,抗菌方式和抗菌谱与红霉素相似,但作用较红霉素强,并具有持续的抗生素后效应,疗程短且稳定性更好。它为氮杂内酯类抗生素,其作用机制是通过与敏感微生物的 50 s 核糖体的亚单位结合,从而干扰其蛋白质的合成。它对多种革兰阳性需氧微生物,如金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、溶血性链球菌感染及革兰阴性菌和其它病原体如支原体、衣原体感染有良好的抗菌作用,疗效很好。自 20 世纪 90 年代以来,随着病原学的变迁,肺炎支原体已成为小儿呼吸道感染的常见病原,所占比例越来越大,有报道称可占到 5% ~ 20% 或更高<sup>[3,4]</sup>,故它在临床应用中越来越广泛。虽然它对胃肠道刺激性比红霉素好一些,但在临床应用中仍有部分患儿有胃肠道刺激的副作用,影响了临床应用。阿奇霉素经静脉进入人体后,可使血浆中胃动素水平增高,与胃肠道平滑肌上的胃动力受体结合产生强烈的收缩,引起腹痛、腹泻、恶心、呕吐等胃肠道反应。铝碳酸镁为消化道抗酸与黏膜保护剂,对组胺、胆汁酸和盐酸诱导的胃溃疡有抑制作用<sup>[5]</sup>。阿奇霉素应用过程中,加用铝碳酸镁可消除或减轻这一副作用,其机制为:铝碳酸镁对病毒、细

菌及其毒素有较强的吸附作用和抑制作用,维持肠道正常的吸收和分泌功能,减轻炎症反应,减少肠细胞的运动失调,使水和电解质流失减少,亦为进食提供了保障。它能增强某些细胞保护因素并维持黏膜的完整性,加强黏膜的防御能力,增强了胃肠道黏膜的屏障作用,因而能有效地阻止病原体的攻击。与阿奇霉素合用在减轻胃肠道反应方面,疗效明显。目前应用阿奇霉素出现上述胃肠道症状后应用 654-2 针剂静滴能得到不同程度缓解。而应用铝碳酸镁预防后胃肠道反应均较轻微减慢滴速后即能缓解,这表明应用铝碳酸镁对预防阿奇霉素胃肠道反应有明显疗效。同时铝碳酸镁口感好,患儿易于接受,无副作用,此法安全有效,值得推广。

### 参考文献:

- [1] 袁 壮,董宗祈,叶启慈,等. 小儿肺炎支原体肺炎诊断治疗中的几个问题 [J]. 中国实用儿科杂志, 2002, 7 (17): 452.
- [2] 虞丽英,周唯敏. 注射用阿奇霉素治疗儿童下呼吸道感染的疗效分析 [J]. 浙江临床医学, 2008, 10 (6): 800.
- [3] 吴小秧,郑莉萍. 阿奇霉素与红霉素治疗儿童呼吸道支原体感染的比较 [J]. 实用临床医学, 2006, 7: 95.
- [4] 齐铭润,姜向明. 阿奇霉素治疗呼吸道感染 59 例疗效观察 [J]. 中国全科医学, 2003, 6: 864.
- [5] 陈新谦,金有豫,汤 光. 新编药理学 [M]. 第 15 版. 北京:人民卫生出版社, 2003, 5: 427.

收稿日期: 2008-11-19