

## RP-HPLC 法测定雷公藤微乳中雷公藤内酯甲的含量

王志君, 尤本明, 孙华君, 宋洪杰, 刘继勇 (第二军医大学长海医院药学部, 上海 200433)

**[摘要]** 目的 采用 RP-HPLC 法测定雷公藤微乳中雷公藤内酯甲的含量。方法 液相色谱条件为: Hypersil C<sub>18</sub> 柱(150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 流动相为乙腈-水(90 : 10); 流速 1.0 ml/min; 柱温为室温; 检测波长 210 nm; 进样量 20 μl。结果 雷公藤内酯甲在 2.0 ~ 30.0 μg/ml 范围内线性关系良好( $r=0.9999$ ), 平均回收率为(100.16±0.56)% ( $n=9$ ), 3 批样品中雷公藤内酯甲的平均含量分别为标示量的(98.92±0.92)%。结论 该方法准确、灵敏, 专属性强, 重现性好, 可作为雷公藤微乳中雷公藤内酯甲的含量测定方法。

**[关键词]** 雷公藤; 微乳; 雷公藤内酯甲; 含量测定

**[中图分类号]** R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2011)04-0269-03

## Determination of Wilforlide in Tripterygium wilfordii multi-glucoside microemulsion by RP-HPLC

WANG Zhi-jun, YOU Ben-ming, SUN Hua-jun, SONG Hong-jie, LIU Ji-yong (Department of Pharmacy, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

**[Abstract]** **Objective** To develop a RP-HPLC method for the determination of Wilforlide in Tripterygium wilfordii multi-glucoside microemulsion. **Methods** The separation was performed on a Kromasil ODS C<sub>18</sub> analytical column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) with the mobile phase consisting of acetonitrile-water (90 : 10). The detection wavelength was 210 nm. The column temperature was room temperature. The flow rate was 1.0 ml/min and the sample injection volume was 20 μl. **Results** Wilforlide presented a good line relationship in the range of 2.0 ~ 30.0 μg/ml ( $r=0.9999$ ). The average recovery rate was (100.16±0.56)% ( $n=9$ ). The average contents of Wilforlide in three batch samples were(98.92±0.92)%. **Conclusion** It was a sensitive, selective and reliable method for the determination of Wilforlide in Tripterygium wilfordii multi-glucoside microemulsion.

**[Key words]** Tripterygium; microemulsion; Wilforlide; content determination

雷公藤 (Tripterygium) 为卫茅科植物雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f 的根、叶及花, 又名黄藤、断肠草。性味辛凉, 有大毒, 入肝经, 兼入脾肾经, 其主要功能为清热解毒、祛风除湿、舒筋活血通络、消肿止痛、杀虫止痒。雷公藤多苷为雷公藤的主要活性成分, 在临床上多与其他药物复方配伍应用, 目前上市的雷公藤制剂主要有雷公藤片、雷公藤双层片、雷公藤多苷片等<sup>[1]</sup>。但由于其口服存在着较大的毒性反应, 因此限制了其临床应用<sup>[1,2]</sup>。微乳 (microemulsion, ME) 是由水相、油相、表面活性剂和助表面活性剂按适当比例混和, 自发形成的各向同性、透明、热力学稳定的分散体系。具有增加药物的溶解度、提高药物稳定性、促进药物透皮吸收、延长药物作用时间等优点, 因此日益受到研究者的重

视<sup>[3-6]</sup>。本文研究了用高效液相色谱法测定雷公藤微乳中雷公藤内酯甲含量的方法, 现报道如下。

### 1 仪器与试剂

**1.1 仪器** LC-10A vp 高效液相色谱仪 (日本岛津制作所, 包括 LC-10ATvp 泵、SPD-10Avp 紫外检测器、CLASS vp 色谱工作站和 SCL-10Avp 系统控制器); 调温调湿箱 (上海实验仪器厂有限公司, 302A 型); FA-2004 电子天平 (万分之一, 上海天平仪器厂); 电子天平 (十万分之一, Sartorius); 精密酸度计 (上海天达仪器有限公司)。

**1.2 试剂** 雷公藤多苷原料药 (浙江得恩德制药有限公司, 雷公藤内酯甲含量 0.263%); 雷公藤内酯甲标准品 (批号 111597-200402, 纯度 > 98%, 中国药品生物制品检定所); Lecithin E200 (德国 Degussa 公司); 肉豆蔻酸异丙酯 (IPM, 国药集团化学试剂有限公司); 烷基葡萄糖苷 (APG, 中国日用化学工业研究院); 1,2-丙二醇 (上海制药有限公司); 中性氧化铝 (上海五四化学试剂有限公司); 甲醇和乙腈

**[基金项目]** 国家自然科学基金 (30801557); 上海市科委中药现代化学专项基金 (09DZ1971102)。

**[作者简介]** 王志君 (1982-), 女, 药师。Tel: (021) 81873732, E-mail: wl19521957@126.com。

**[通讯作者]** 刘继勇。Tel: (021) 81873724, E-mail: liujiyong@gmail.com。

(HPLC 级, Tedia 公司); 水为重蒸水; 其他试剂为分析纯。雷公微乳(自制, 雷公藤多苷含量 1.2%)。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液的制备

**2.1.1 对照品溶液的制备** 精密称取雷公藤内酯甲对照品 2 mg, 于 10 ml 量瓶中, 加甲醇溶解稀释至刻度, 得 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的储备液, 密封, 于 4  $^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。

**2.1.2 供试品溶液的制备**<sup>[7,8]</sup> 将制备好的雷公藤多苷微乳 5 g 加 15 ml 甲醇破乳, 超声 30 min, 将破乳的雷公藤多苷微乳加到已处理好含水分 3% 的中性氧化铝柱(100~200 目, 12 g, 内径 3 cm, 湿法装柱, 用适量三氯甲烷预洗)上, 用乙酸乙酯-丙酮(3:1)

50 ml 洗脱, 收集洗脱液, 蒸干, 残渣用甲醇溶解, 转移至 10 ml 容量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 即得。

**2.1.3 空白溶液的制备** 将不含雷公藤多苷样品的空白微乳制剂 5 g 加 15 ml 甲醇破乳, 超声 30 min, 将破乳的空白微乳按上述按 2.1.2 项下方法处理, 得空白体系溶液。

**2.2 色谱条件与系统适应性**<sup>[8]</sup> 色谱柱: Diamond  $\text{C}_{18}$  柱(4.6 mm $\times$ 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ); 流动相: 乙腈-水(90:10); 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 210 nm; 进样量: 20  $\mu\text{l}$ ; 柱温: 室温; 灵敏度: 0.01 AUFS。

上述溶液分别进样 20  $\mu\text{l}$ , 将所得色谱图进行比较。从图 1 可见, 辅料对雷公藤多苷的测定无干扰, 表明本方法专属性好。

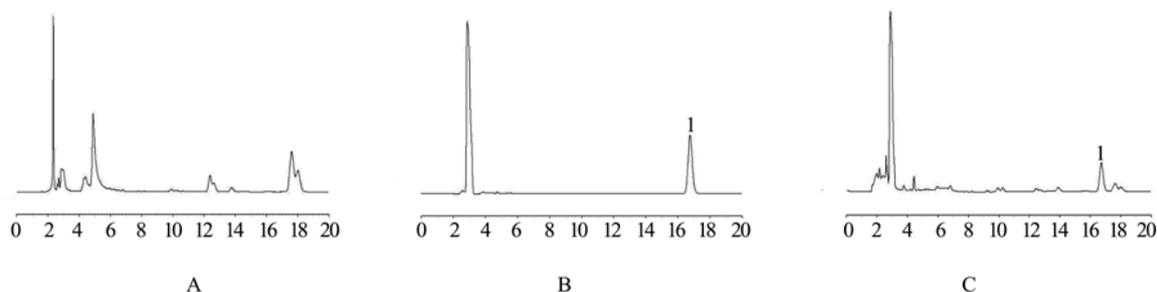


图 1 雷公藤微乳色谱图

A-空白微乳; B-对照品; C-样品; 1-雷公藤内酯甲

**2.3 标准曲线的绘制** 分别精密量取储备液 0.1、0.2、0.5、1.0、1.5 ml 置于 10 ml 容量瓶中, 用甲醇定容, 制备浓度分别为 2.0、4.0、10.0、20.0、30.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  的标准溶液。按上述色谱条件依次进样。以测得峰面积  $A$  与其浓度  $C$  线性回归, 得标准曲线方程  $A=9498.4C-1688.2$ ,  $r=0.9999$ , 线性范围为 2.0~30.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

**2.4 日内精密度** 分别取低、中、高 3 组浓度的混合对照品溶液各 20  $\mu\text{l}$ , 在上述色谱条件下, 重复进样 3 次, 每次进样间隔时间为 4 h, 记录峰面积, 计算峰面积变异系数。雷公藤内酯甲低、中、高 3 个浓度(2.0、10.0、20.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 峰面积的  $RSD$  分别为 0.40%、0.17% 和 0.28%, 表明所建立的 HPLC 方法重现性好。

**2.5 日间精密度** 分别取低、中、高 3 组浓度的混合对照品溶液各 20  $\mu\text{l}$ , 在上述色谱条件下, 重复进样 3 次, 每次进样间隔时间为 24 h, 记录峰面积, 计算峰面积变异系数。雷公藤内酯甲低、中、高 3 个浓度(2.0、10.0、20.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 峰面积的  $RSD$  分别为 1.77%、0.84% 和 1.74%, 表明所建立的 HPLC 方法重现性好, 且测定时间内样品溶液稳定性良好。

**2.6 稳定性试验** 在供试品溶液配制后的 8 h 内,

每隔 2 h 测定 1 次, 记录峰面积值, 其  $RSD$  值为 0.86% ( $n=5$ ), 表明供试品在处理 8 h 内稳定。

**2.7 重复性试验** 取雷公藤多苷微乳 5 份, 按 2.1.2 项下操作, 进样, 测定峰面积并计算含量, 雷公藤内酯甲的  $RSD$  为 0.98% ( $n=5$ )。

**2.8 回收率试验** 精密量取低、中、高 3 个浓度的雷公藤内酯甲标准品溶液加入到浓度已知的样品溶液中, 进样测定, 计算回收率。结果见表 1。

表 1 雷公藤微乳回收率测定结果( $n=9$ )

样品含量 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	加入量 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	测得量 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	回收率 (%)	平均回收率 (%)	$RSD$ (%)
3.578	2	5.586	100.40		
3.578	2	5.571	99.65		
3.578	2	5.564	99.30		
3.578	4	7.604	100.65		
3.578	4	7.622	101.10	100.16	0.56
3.578	4	7.584	100.15		
3.578	10	13.540	99.62		
3.578	10	13.612	100.34		
3.578	10	13.604	100.26		

**2.9 样品含量测定** 取 3 批样品, 依样品溶液处理方法制备成供试品溶液, 按 2.1.2 项下测定。用标

准曲线计算3批样品中雷公藤多苷的含量,其结果见表2。3批样品中雷公藤内酯甲的平均含量分别为标示量的(98.92±0.92)%,均在标示量的95%~105%之间,符合含量测定要求。

表2 雷公藤多苷微乳含量测定结果 (n=3)

批号	雷公藤内酯甲(μg/ml)	相当于标示量%	RSD%
1	3.09	97.91	1.23
2	3.13	99.17	0.44
3	3.15	99.69	1.18

### 3 讨论

本实验建立了测定雷公藤微乳中雷公藤内酯甲的反相高效液相色谱方法。经方法学研究表明,所建立的HPLC方法灵敏,专属性强、准确,重现性好。

雷公藤多苷中成分复杂,雷公藤内酯甲的含量仅为0.263%。含量测定时一般要先进行柱处理,除去部分杂质纯化样品,减少杂质对目标峰的影响,利于样品的分离测定。

测定微乳药物含量时一般需先破乳,再以适当的溶剂提取分离后测定。而本研究中雷公藤多苷微乳中

的肉豆蔻酸异丙酯溶于甲醇,故根据各成分的溶解特性,采用甲醇破乳,破乳后溶液呈澄清透明,无需提取分离,可直接过柱分离后进样测定,实验中发现采用乙腈、乙醚等破乳时均不能形成澄清透明溶液。

### 【参考文献】

- [1] 徐央丽. 雷公藤的研究进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2008, 17(12): 1914.
- [2] 金美子. 雷公藤研究进展[J]. 中国社区医师, 2007, 21: 34.
- [3] 寇欣. 微乳给药系统的研究进展[J]. 天津药学, 2005, 17(6): 52.
- [4] Peltola S, Saarinen-Savolainen P. Microemulsions for topical delivery of estradiol[J]. Int J Pharm, 2003, 254(2): 99.
- [5] Rhee YS, Choi JG. Transdermal delivery of ketoprofen using microemulsions[J]. Int J Pharm, 2001, 228(1-2): 161.
- [6] 王高森, 侯世祥, 毛生俊等. 丹参酮IIA微乳的制备与质量评价[J]. 华西药学杂志, 2007, 22(3): 279.
- [7] 谢道, 王实强, 刘可柔. 反相高效液相色谱法测定雷公藤多苷片中雷公藤内酯甲的含量研究[J]. 湖南中医杂志, 2007, 23(1): 79.
- [8] 刘法千, 鲍立曾, 熊仕强. HPLC法测定雷公藤多苷中雷公藤内酯甲的含量[J]. 中国药品标准, 2007, 8(4): 38.

[收稿日期] 2011-06-10

[修回日期] 2011-06-30

(上接第259页)

- [19] Wadenback J, von Arnold S, Egertsdotter U, et al. Lignin biosynthesis in transgenic Norway spruce plants harboring an antisense construct for cinnamoyl CoA reductase (CCR) [J]. Transgenic Res, 2008, 17(3): 379.
- [20] Abdulrazzak N, Pollet B, Ehltling J, et al. A coumaroyl-ester-3-hydroxylase insertion mutant reveals the existence of nonredundant meta-hydroxylation pathways and essential roles for phenolic precursors in cell expansion and plant growth[J]. Plant Physiol, 2006, 140(1): 30.
- [21] Sibout R, Eudes A, Mouille G, et al. Cinnamyl alcohol dehydrogenase-C and-D are the primary genes involved in lignin biosynthesis in the floral stem of Arabidopsis[J]. The Plant Cell Online, 2005, 17(7): 2059.
- [22] Leple J, Dauwe R, Morreel K, et al. Downregulation of cinnamoyl-coenzyme A reductase in poplar: multiple-level phenotyping reveals effects on cell wall polymer metabolism and structure [J]. The Plant Cell Online, 2007, 19(11): 3669.
- [23] Leple JC, Dauwe R, Morreel K, et al. Downregulation of cinnamoyl-coenzyme A reductase in poplar: multiple-level phenotyping reveals effects on cell wall polymer metabolism and structure [J]. Plant Cell, 2007, 19(11): 3669.
- [24] Rohde A, Morreel K, Ralph J, et al. Molecular phenotyping of the pal1 and pal2 mutants of Arabidopsis thaliana reveals far-reaching consequences on phenylpropanoid, amino acid, and carbohydrate metabolism[J]. Plant Cell, 2004, 16(10): 2749.
- [25] Halpin C, Boerjan W. Stacking transgenes in forest trees[J]. Trends Plant Sci, 2003, 8(8): 363.
- [26] Koutaniemi S, Warinowski T, Karkinen A, et al. Expression profiling of the lignin biosynthetic pathway in Norway spruce using EST sequencing and real-time RT-PCR[J]. Plant Molecular Biology, 2007, 65(3): 311.
- [27] Sablowski R, Baulcombe D, Bevan M. Expression of a flower-specific Myb protein in leaf cells using a viral vector causes ectopic activation of a target promoter[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1995, 92(15): 6901.
- [28] Sablowski R, Moyano E, Cullanez-Macia F, et al. A flower-specific Myb protein activates transcription of phenylpropanoid biosynthetic genes[J]. The EMBO Journal, 1994, 13(1): 128.
- [29] Tamagnone L, Merida A, Parr A, et al. The AmMYB308 and AmMYB330 transcription factors from Antirrhinum regulate phenylpropanoid and lignin biosynthesis in transgenic tobacco[J]. The Plant Cell Online, 1998, 10(2): 135.
- [30] Borevitz JO, Xia Y, Blount J, et al. Activation tagging identifies a conserved MYB regulator of phenylpropanoid biosynthesis[J]. Plant Cell, 2000, 12(12): 2383.
- [31] Kawaoka A, Kaohien P, Yoshida K, et al. Functional analysis of tobacco LIM protein Ntlm1 involved in lignin biosynthesis[J]. Plant J, 2000, 22(4): 289.

[收稿日期] 2010-06-07

[修回日期] 2010-12-14