

# HPLC法测定不同产地雷公藤药材中雷公藤内酯甲的含量<sup>Δ</sup>

张贺<sup>1\*</sup>, 江莹<sup>1</sup>, 孟楣<sup>1,2#</sup>, 唐利宇<sup>1</sup>, 王芳<sup>1</sup>, 张静<sup>1</sup> (1. 安徽中医药大学研究生部, 合肥 230038; 2. 安徽中医药大学第一附属医院/国家中医药管理局中药制剂三级实验室, 合肥 230031)

中图分类号 R284.1; R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)31-2916-03

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.31.13

**摘要** 目的: 建立测定不同产地雷公藤药材中雷公藤内酯甲含量的方法。方法: 采用高效液相色谱法。色谱柱为 Welch material Inc C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为甲醇-0.1%磷酸溶液(含0.2%三乙胺)(85:15, V/V), 检测波长为210 nm, 流速为1.0 ml/min, 柱温为25 ℃。结果: 雷公藤内酯甲的进样量在0.20~2.00 μg范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系( $r=0.999\ 9$ ); 精密度、稳定性、重复性试验的RSD<1%; 平均加样回收率为97.86%, RSD=1.34% ( $n=6$ )。结论: 该方法简便、准确、重复性好, 适用于雷公藤药材及其制剂中雷公藤内酯甲的含量测定与质量控制。

**关键词** 高效液相色谱法; 雷公藤; 雷公藤内酯甲; 含量测定

## Content Determination of Wilforlide in *Tripterygium wilfordii* from Different Producing Areas by HPLC

ZHANG He<sup>1</sup>, JIANG Ying<sup>1</sup>, MENG Mei<sup>1,2</sup>, TANG Li-yu<sup>1</sup>, WANG Fang<sup>1</sup>, ZHANG Jing<sup>1</sup> (1. Graduate Division, Anhui University of TCM, Hefei 230038, China; 2. The First Affiliated Hospital of Anhui University of TCM/Three Level Laboratory of TCM Preparation, State Administration of TCM, Hefei 230031, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To establish the method for the content determination of wilforlide in *Tripterygium wilfordii* from different producing area. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on Welch material Inc C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm) column with mobile phase consisted of methanol-0.1% phosphate (containing 0.2% triethylamine, 85:15, V/V) at the flow rate of 1.0 ml/min. The detection wavelength was set at 210 nm, and the column temperature was 25 ℃. RESULTS: The linear range of wilforlide was 0.20-2.00 μg ( $r=0.999\ 9$ ) with an average recovery of 97.86% (RSD=1.34%,  $n=6$ ). RSDs of precision, stability and reproducibility tests were lower than 1%. CONCLUSIONS: The method is simple, accurate, reproducible and suitable for the content determination and quality control of wilforlide in *T. wilfordii* and related preparations.

**KEYWORDS** HPLC; *Tripterygium wilfordii*; Wilforlide; Content determination

雷公藤 (*Tripterygium wilfordii* Hook. f.) 系卫矛科 (Celastraceae) 雷公藤全株或去皮木质部的藤本植物, 药用部位为全根或去皮根木质部, 具有清热解毒、祛风除湿、舒筋活血通络、消肿止痛、杀虫止痒的作用<sup>[1]</sup>。现代药理及临床研究发现, 雷公藤具有抗炎、免疫调节、抗肿瘤及抗生育、抗氧化等多种生物活性<sup>[2-3]</sup>; 特别是近几年来, 其具有的抗 HIV 病毒作用和对阿尔茨海默病的治疗作用引起了广大学者的注意<sup>[4]</sup>。尽管雷公藤已经得到了广泛的应用, 但 2010 年版《中国药典》尚未收载它, 且不同产地、不同来源、不同提取方法等都会对其质量产生显著影响<sup>[5-6]</sup>, 直接影响药材的临床疗效和用药安全。雷公藤主要含生物碱类和萜类成分, 其中萜类是发挥其药理活性的主要成分, 尤其是雷公藤甲素和雷公藤内酯甲。近年来, 采用不同方法测定雷公藤药材及其制剂中雷公藤甲素的含量已有报道<sup>[7-8]</sup>, 而对雷公藤内酯甲含量测定的报道相对较少。因此, 笔者采用高效液相色谱 (HPLC) 法测定了不同产地雷公藤药材中雷公藤内酯甲的含量, 以期对雷公藤药材的质量控制

和临床用药的安全、合理性提供参考依据。

## 1 材料

### 1.1 仪器

1100 型 HPLC 仪, 包括二元泵、恒温自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器等 (美国 Agilent 公司); KQ-250DB 型数控超声波清洗器 (昆山市超声仪器有限公司); HHS 型电热恒温水浴锅 (上海博迅实业有限公司医疗设备厂); BP211D 型十万分之一电子天平 (德国 Sartorius 公司)。

### 1.2 试剂

雷公藤内酯甲对照品 (北京盛世康普化工技术研究院, 批号: 20130816, 纯度 >98%); 甲醇为色谱纯, 水为超纯水, 其他试剂均为分析纯。

### 1.3 药材

雷公藤药材分别采自贵州、湖北、浙江等地, 经安徽中医药大学李立华教授鉴定为卫矛科植物雷公藤 *T. wilfordii* Hook. f. 的干燥根。

## 2 方法与结果

### 2.1 色谱条件与系统适用性试验

色谱柱: Welch material Inc C<sub>18</sub> (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇:0.1%磷酸溶液(含0.2%三乙胺)=85:15(V/V); 流速: 1.0 ml/min; 检测波长: 210 nm; 柱温: 25 ℃; 进样量: 10 μl。在此色谱条件下, 雷公藤内酯甲与其他色谱峰可达到基线

<sup>Δ</sup> 基金项目: 国家科技支撑计划“新安医学传承与发展研究项目” (No.2012BAI26B03)

\* 硕士研究生。研究方向: 中药新药研发。E-mail: 1003977361@qq.com

# 通信作者: 主任药师, 硕士研究生导师。研究方向: 中药新药研发。电话: 0551-2838558。E-mail: ahzyymm@163.com

分离,理论板数按雷公藤内酯甲峰计算应 $>10\,000$ ,分离度为3.5;供试品中其他成分对雷公藤内酯甲的测定无干扰。色谱见图1。

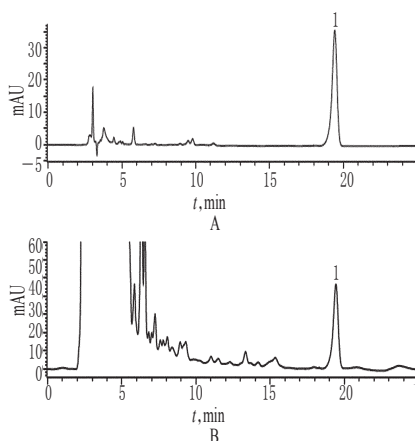


图1 高效液相色谱图

A.雷公藤内酯甲对照品;B.供试品;1.雷公藤内酯甲

Fig 1 HPLC Chromatogram

A. wilforlide control; B. test sample; 1. wilforlide

## 2.2 溶液的制备

2.2.1 对照品溶液的制备 精密称取雷公藤内酯甲对照品适量,置于10 ml量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得质量浓度为0.10 mg/ml的对照品溶液。

2.2.2 供试品溶液的制备 取雷公藤药材,干燥后打成细粉(过三号筛),取药材粉末20 g,精密称定质量,置锥形瓶(具塞)中,加甲醇-乙腈(1:1, V/V)加热回流提取2次(每次2 h、200 ml),放冷,再次精密称定质量,用甲醇-乙腈(1:1, V/V)补足缺失的质量,滤过,合并2次滤液,浓缩至干,加水15 ml使溶解,过预先用30 ml甲醇预洗的中性氧化铝柱,用二氯甲烷-甲醇(10:1, V/V)100 ml洗脱,收集洗脱液,浓缩至干,用甲醇溶解并稀释定容至10 ml量瓶中,作为供试品溶液。进样前过0.22 μm微孔滤膜。

## 2.3 线性关系考察

精密吸取对照品溶液2.0、4.0、6.0、8.0、10.0、20.0 μl,按上述色谱条件进样测定,记录峰面积。以进样量(x, μg)为横坐标,峰面积积分值(y)为纵坐标,进行线性回归,得回归方程为 $y=760.3x-19.246$ ( $r=0.999\,9$ ,  $n=6$ )。结果表明,雷公藤内酯甲的进样量在0.20~2.00 μg范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系。

## 2.4 精密度试验

精密吸取对照品溶液10 μl,按上述色谱条件连续进样测定6次,记录雷公藤内酯甲的峰面积。结果, $RSD=0.37\%$ ( $n=6$ ),表明仪器精密度良好。

## 2.5 稳定性试验

精密吸取同一供试品溶液10 μl,分别于0、2、4、6、8、12、24 h按上述色谱条件进样测定,记录雷公藤内酯甲的峰面积。结果, $RSD=0.98\%$ ( $n=7$ ),表明供试品溶液在24 h内稳定。

## 2.6 重复性试验

取同一批雷公藤药材粉末6份,各约20 g,精密称定,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,记录雷公藤内酯甲的峰面积并计算样品含量。结果,样品中雷公藤内酯甲的平均质量分数为0.001 9%, $RSD=0.12\%$ ( $n=6$ ),表明本方法重复性良好。

## 2.7 加样回收率试验

称取已知含量的雷公藤药材粉末约10 g,共6份,精密称定,分别精密加入与样品含量等量的雷公藤内酯甲对照品,按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,计算加样回收率,结果见表1。

表1 加样回收率试验结果( $n=6$ )

Tab 1 Results of recovery tests( $n=6$ )

编号	称样量,g	样品含量,mg	加入量,mg	测得量,mg	回收率,%	$\bar{x}$ ,%	RSD,%
1	10.012 5	0.188 5	0.185 1	0.371 3	98.76		
2	10.005 2	0.189 2	0.184 2	0.368 9	97.56		
3	10.004 5	0.187 9	0.184 3	0.369 3	98.43	97.86	1.34
4	10.001 7	0.188 1	0.183 8	0.371 1	99.56		
5	10.010 5	0.188 8	0.185 6	0.368 5	96.82		
6	10.012 2	0.189 6	0.185 6	0.367 8	96.01		

## 2.8 样品含量测定

取不同产地雷公藤药材粉末各3份,每份约20 g,精密称定,分别按“2.2.2”项下方法制备供试品溶液,再按上述色谱条件进样测定,记录峰面积,将峰面积代入标准曲线计算雷公藤内酯甲的含量,结果见表2。

表2 不同产地雷公藤药材中雷公藤内酯甲的含量测定结果( $n=3$ )

Tab 2 Content determination of triptolide in *T. wilfordii* from different producing areas( $n=3$ )

产地	质量分数,%	RSD,%
贵州	0.001 9	1.32
湖北	0.001 9	1.58
浙江	0.001 8	1.43

## 3 讨论

雷公藤内酯甲是雷公藤药材中的主要有效成分之一,具有很强的药理活性,如抗肿瘤、抗炎及免疫抑制等。考虑到雷公藤内酯甲在雷公藤药材的药理活性中扮演着不可或缺的角色,而且其含量的高低影响着雷公藤药材有效性与毒性之间的关系,因此本试验展开了对雷公藤药材中雷公藤内酯甲的含量测定研究。

### 3.1 提取溶剂的选择

目前,国内外对雷公藤的研究主要采用水、乙醇或甲醇提取,氯仿或乙酸乙酯萃取的方法。本试验分别考察了乙腈、甲醇、甲醇-乙腈(1:1, V/V)3种提取溶剂的提取效率,发现甲醇-乙腈(1:1, V/V)对雷公藤内酯甲的提取效果最好,故选其作为提取溶剂。

### 3.2 提取方法的选择

雷公藤所含化学成分复杂、含量甚微,常需要纯化富集,故本试验选择样品经甲醇-乙腈(1:1, V/V)提取后再过中性氧化铝柱,取得了较好的分离与富集效果。同时,还对洗脱方法进行了优选:当用二氯甲烷作为洗脱液时,洗脱速度较慢;稍稍加入甲醇至二氯甲烷中,洗脱速度变快,非极性的雷公藤内酯甲被洗脱下来;为了完全洗脱,最终采用了用量为100 ml的二氯甲烷-甲醇(10:1, V/V)作为洗脱液。

### 3.3 色谱条件的优化

本试验在参考文献<sup>[9]</sup>的基础上,对流动相进行了筛选,最终选择以甲醇:0.1%磷酸溶液(含0.2%三乙胺)=85:15(V/V)为流动相进行洗脱,所得色谱图中雷公藤内酯甲与其他成分色谱峰分离效果较好、基线稳定、峰形对称。另外,笔者还分别考察了210、218、225 nm波长下雷公藤内酯甲的吸收峰面积,并结合全波长扫描,发现雷公藤内酯甲在210 nm波长下分

# HPLC法同时测定益气祛白颗粒中2种成分的含量<sup>Δ</sup>

康雷\*, 顾圣莹, 朱冠华, 杨秋娅, 王玉珠, 吴佳琪, 李晓宇<sup>#a</sup>, 刘皋林<sup>#b</sup> (上海交通大学附属第一人民医院临床药学科, 上海 200082)

中图分类号 R283.627; R927.2 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2014)31-2918-03  
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2014.31.14

**摘要** 目的: 建立同时测定益气祛白颗粒中黄芪甲苷IV和木通皂苷D含量的方法。方法: 采用高效液相色谱法。色谱柱为YMC-Pack ODS-AM(150 mm×4.6 mm, 3 μm), 流动相为乙腈-水(梯度洗脱), 流速为0.8 ml/min, 检测波长为203 nm。结果: 黄芪甲苷IV和木通皂苷D的质量浓度分别在10~500、2.5~250 μg/ml范围内与各自峰面积积分值呈良好的线性关系( $r$ 分别为0.999 9和0.999 7); 平均加样回收率分别为106.09%、99.45%, RSD分别为1.81%、3.24% ( $n$ 均为6)。结论: 所建方法简单、稳定, 结果准确、可靠, 可为益气祛白颗粒的体内药动学研究提供依据。

**关键词** 益气祛白颗粒; 高效液相色谱法; 含量测定; 黄芪甲苷IV; 木通皂苷D

## Simultaneous Determination of 2 Compounds in Yiqi Qubai Granules by HPLC

KANG Lei, GU Sheng-ying, ZHU Guan-hua, YANG Qiu-ya, WANG Yu-zhu, WU Jia-qi, LI Xiao-yu, LIU Gao-lin (Dept. of Clinical Pharmacy, The First Affiliated People's Hospital of Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200082, China)

**ABSTRACT** OBJECTIVE: To develop a method for simultaneous determination of astragaloside IV and akebia saponin D in Yiqi Qubai granules. METHODS: HPLC method was adopted. The determination was performed on a YMC-Pack ODS-AM (150 mm×4.6 mm, 3 μm) column with mobile phase consisted of acetonitrile-water (gradient elution) at the flow rate of 0.8 ml/min. The detection wavelength was set at 203 nm. RESULTS: The linear ranges were 10-500 μg/ml for astragaloside IV ( $r=0.999\ 9$ ) and 2.5-250 μg/ml for akebia saponin D ( $r=0.999\ 7$ ). The average recoveries were 106.09% (RSD=1.81%,  $n=6$ ) and 99.45% (RSD=3.24%,  $n=6$ ), respectively. CONCLUSIONS: The established method is convenient, stable, accurate and reliable, and can provide reference for pharmacokinetic study of Yiqi qubai granules *in vivo*.

**KEYWORDS** Yiqi qubai granules; HPLC; Content determination; Astragaloside IV; Akebia saponin D

离效果较好、含量较高, 故选择210 nm作为检测波长。

本试验测定了贵州、湖北、浙江3个产地的雷公藤药材, 发现不同产地的雷公藤药材中雷公藤内酯甲的含量差别不大, 尚需更大样本量的试验来证明此结果的准确性。本方法简便、准确、重复性好, 适用于雷公藤药材及其制剂中雷公藤内酯甲的含量测定与质量控制。

### 参考文献

- [1] 齐晓娟, 刘志敏, 赵红晔. 雷公藤提取液对荷S180小鼠的抑瘤作用及其对IL-2活性的影响[J]. 中医学报, 2004, 32(4): 53.
- [2] Jang SY, Jang SW, Ko J. Celastrol inhibits the growth of estrogen positive human breast cancer cells through modulation of estrogen receptor alpha[J]. *Cancer Lett*, 2011,

300(1): 57.

- [3] Liu Y, Chen HL, Yang G. Extract of *Tripterygium wilfordii* Hook. f. protect dopaminergic neurons against lipopolysaccharide-induced inflammatory damage[J]. *Am J Chin Med*, 2010, 38(4): 801.
- [4] Luo XL, Shao Q, Qu HB, et al. Simple method for determination of five terpenoids from different parts of *Tripterygium wilfordii* and its preparations by HPLC coupled with evaporative light scattering detection[J]. *J Sep Sci*, 2007, 30(9): 1 284.
- [5] 蔡皓, 池玉梅, 姜海英, 等. 雷公藤药材存贮期间成分变化的研究[J]. 南京中医药大学学报, 2006, 22(4): 265.
- [6] 杨春欣, 周庭川. 雷公藤内酯醇不同季节的含量变化[J]. 中国医院药学杂志, 2001, 21(1): 25.
- [7] 高丽, 聂中标, 岳晓华, 等. 不同产地雷公藤药材中雷公藤甲素含量测定[J]. 山西中医, 2012, 28(8): 42.
- [8] 张勇, 幸勇. 2种处理方法对雷公藤饮片中雷公藤内酯醇含量测定的影响比较[J]. 中国药房, 2006, 17(4): 299.
- [9] 何昱, 石森林, 张茹萍, 等. 雷公藤多苷主要有效成分的含量研究[J]. 药物分析杂志, 2013, 33(2): 197.

(收稿日期: 2014-05-04 修回日期: 2014-07-17)

<sup>Δ</sup> 基金项目: “重大新药创制”科技重大专项“十二五”项目子课题(No.2011ZX09302-007-02); 上海市科研计划项目课题(No.09dZ1974600)

\* 药师, 硕士。研究方向: 临床药动学及药物代谢组学。电话: 021-37798313。E-mail: yuanlisjzz@163.com

<sup>#a</sup> 通信作者: 副主任药师, 硕士研究生导师。研究方向: 临床药理学。电话: 021-37798312。E-mail: xyljaylxb@163.com

<sup>#b</sup> 通信作者: 教授, 博士研究生导师。研究方向: 临床药理学。电话: 021-63240090-4200。E-mail: gaolinliu@aliyun.com