

- (5): 471-473.
- [3] Liu X M, Xiao G S, Chen W D, *et al.* Advances in research and development of mulberry [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2001, 32 (6): 569-571.
- [4] Zhong G L, Qiu L M, Gao X M, *et al.* The effect of extracted liquid of alcohol in *Cortex Mori* on glucose and serum lipid in diabetic rats [L]. *Lab Anim Sci Manage* (实验动物科学与管理), 2003, 20 (2): 24-25.
- [5] Zou Y X, Liao S T, Liu X M, *et al.* Diabetic therapy effects of mulberry resources on diabetes mellitus [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2004, 16 (3): 265-268.
- [6] Lei X Y, Huang H H. The update on the pharmacological activities and synthetic methods of 1-deoxynojirimycin and its derivatives [J]. *J Shenyang Pharm Univ* (沈阳药科大学学报), 2000, 117 (16): 456-460.
- [7] Vogel H G, Vogel W H. *Drug Discovery and Evaluation—Pharmacological Assays* (药物发现与评价——药理研究) [M]. Beijing: Science Press, 2001.
- [8] Toshiyuki K, Kiyotaka N, Yuko S, *et al.* Determination of 1-deoxynojirimycin in mulberry leaves using hydrophilic interaction chromatography with evaporative light scattering detection [J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52: 1415-1418.
- [9] Mellor H R, Adam A, Platt F M, *et al.* High-performance cation-exchange chromatography and pulsed amperometric detection for the separation, detection, and quantitation of N-alkylated imino sugars in biological samples [J]. *Anal Biochem*, 2000, 284 (1): 136-142.
- [10] Kim J W, Kim S U, Lee H S, *et al.* Determination of 1-deoxynojirimycin in *Morus alba* L. leaves by derivatization with 9-fluorenylmethyl chloroformate followed by reversed-phase high-performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr A*, 2003, 1002: 93-99.

HPLC 法测定雷公藤及其片剂中雷公藤红素

夏 焱¹, 王文燕², 张彦文³, 贺江萍¹, 高文远¹, 段宏泉^{3*}

(1. 天津大学药学院, 天津 300027; 2. 天津药物研究院, 天津 300193; 3. 天津医科大学药学院, 天津 300070)

摘要:目的 建立雷公藤及其片剂中雷公藤红素的 HPLC 测定方法。方法 HPLC 外标法。Agilent Zorbax SC-C₁₈柱为色谱柱, 甲醇-1%醋酸溶液(87:13)为流动相, 检测波长为 425 nm, 体积流量为 1.0 mL/min。结果 雷公藤红素线性范围为 40.96~204.8 μg/mL ($r=0.999\ 6$), 药材的平均回收率为 98.37%, RSD 为 1.01% ($n=9$), 制剂的平均回收率为 98.59%, RSD 为 1.18% ($n=9$)。结论 本方法操作简便、准确, 可作为雷公藤类药物中雷公藤红素的定量分析方法。

关键词:雷公藤; 雷公藤红素; 高效液相色谱

中图分类号: R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2005)08-1154-03

Determination of tripterine in *Tripterygium wilfordii* and its tablets by HPLC

XIA Yan¹, WANG Wen-yan², ZHANG Yan-wen³, HE Jiang-ping¹,

GAO Wen-yuan¹, DUAN Hong-quan³

(1. College of Pharmaceutics and Biotechnology, Tianjin University, Tianjin 300072, China;

2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China; 3. College

of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract: **Objective** To determine the content of tripterine in *Tripterygium wilfordii* and its tablets by HPLC. **Methods** An external standard method by HPLC with Zorbax C₁₈ column as fixed phase and methanol-1% HAc (87:13) as mobile phase was adopted. The detection wavelength was 425 nm and the flow rate was 1.0 mL/min. **Results** The linear range for tripterine was 40.96~204.8 μg/mL ($r=0.999\ 6$). The average recovery of Chinese medicinal materials was 98.37% and RSD was 1.01% ($n=9$); the average recovery of preparation sample was 98.59% and RSD was 1.18% ($n=9$). **Conclusion** The method is simple and accurate, which can be adoptable for quantitative analysis of tripterine in the plants of *Tripterygium* L.

Key words: *Tripterygium wilfordii* Hook. f.; tripterine; HPLC

雷公藤系卫矛科雷公藤属植物, 其根茎为主要药用部位, 具有抗炎、抗免疫、抗肿瘤、抗 HIV 等多

种药理活性, 对类风湿性关节炎、慢性肾炎等自身免疫性疾病具有显著疗效^[1-2]。同属植物还包括昆明山

海棠、东北雷公藤等。由于此类药材毒性大,且缺乏有效的质量控制手段,因此应用受到很大影响。雷公藤红素是雷公藤类中药的主要毒性成分^[3],因此准确测定雷公藤红素对控制雷公藤药材及相关制剂的质量具有重要意义。本实验建立了雷公藤红素的HPLC测定方法,操作简单,结果稳定,可作为雷公藤类药材及其制剂中雷公藤红素的定量分析方法。

1 仪器与试剂

Agilent 1100 型高效液相色谱仪, G1311A 系列四元梯度泵, G1322A 脱气机, 手动进样器, G1314A VWD 可变波长紫外检测器, HP Rev. A. 0501 化学工作站(Agilent 公司)。

雷公藤红素对照品为本实验室自制, 质量分数为 98.97%(面积归一化法测得)。HPLC 流动相中甲醇为色谱纯, 冰醋酸为分析纯, 水为超纯水, 药材经天津大学药学院高文远教授鉴定。

2 方法与结果

2.1 色谱条件: 色谱柱: Agilent Zorbax SC-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 甲醇-1%醋酸溶液(87:13); 检测波长: 425 nm; 柱温: 25℃; 体积流量: 1.0 mL/min。

2.2 对照品溶液的制备: 精密称取雷公藤红素对照品约 5 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 作为对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

2.3.1 药材供试品溶液的制备: 取 10 g 药材, 精密称定, 置索氏提取器中, 加入甲醇 100 mL, 回流提取 4 h, 浓缩至干。3 倍量硅藻土拌样, 挥尽溶剂, 氯仿超声提取 3 次, 每次 50 mL, 每次 30 min, 静置后, 滤取上清液, 浓缩至干。4.0 g 硅胶干法装柱(10 cm×1.5 cm), 以 1 mL 氯仿溶解样品, 上柱, 先取 50 mL 氯仿洗脱, 弃去, 再取氯仿-甲醇(95:5) 100 mL 洗脱, 回收溶剂, 浓缩至干。残渣用甲醇溶解, 移入 10 mL 量瓶中, 稀释至刻度, 摇匀, 作为药材供试品溶液。

2.3.2 制剂供试品溶液的制备: 取制剂 10 片压碎, 氯仿超声提取 3 次, 每次 50 mL, 每次 30 min, 静置, 滤取上清液, 浓缩至干。称 4.0 g 硅胶装柱(10 cm×1.5 cm), 以 1 mL 氯仿溶解样品, 上柱, 先取 50 mL 氯仿洗脱, 弃去, 再取氯仿-甲醇(95:5) 100 mL 洗脱, 回收溶剂, 浓缩至干。残渣用甲醇溶解, 移入 10 mL 量瓶中, 稀释至刻度, 摇匀, 作为制剂供试品溶液。

2.4 线性关系考察: 精密吸取雷公藤红素对照品溶

液 1、2、3、4、5 mL 于 5 mL 量瓶中, 加甲醇稀释至刻度, 摇匀, 分别吸取 20 μL 进样。以峰面积为纵坐标, 溶液质量浓度为横坐标作图, 得雷公藤红素的回归方程为 $Y = 2.1169 \times 10^4 X - 65.7$, $r = 0.9996$, 线性范围为 40.96~204.8 μg/mL。

2.5 精密度试验: 取 0.12 mg/mL 雷公藤红素对照品溶液, 连续重复进样 6 次, 测定雷公藤红素峰面积, 计算得其 RSD 为 0.33%。

2.6 重现性试验: 取湖南岳阳产雷公藤(带皮)制备供试品溶液, 平行操作 6 份, 测定峰面积, 计算得雷公藤红素的质量分数为 0.1050%, RSD 为 1.74%。

取三九黄石制药厂生产的雷公藤片制备供试品溶液, 平行操作 6 份, 测定峰面积, 计算得雷公藤红素的质量分数为 287.7 μg/片, RSD 为 0.88%。

2.7 稳定性试验: 取湖南岳阳产雷公藤(带皮)供试品溶液, 分别于 0、2、4、6、8 h 测定峰面积, 计算得雷公藤红素的质量分数为 0.1051%, RSD 为 1.15%。取三九黄石制药厂生产的雷公藤片供试品溶液, 分别于 0、2、4、6、8 h 测定峰面积, 计算得雷公藤红素的质量分数为 287.6 μg/片, RSD 为 0.70%。

2.8 回收率试验: 取湖南岳阳产雷公藤(带皮)约 10.2 g(含雷公藤红素约 10.0 mg), 分别按低、中、高 3 个水平精密加入 5.0、10.0、15.0 mg 雷公藤红素对照品, 制备供试品溶液, 进样测定雷公藤红素的峰面积, 计算其平均回收率为 98.37%, RSD 为 1.01% ($n=9$)。取三九黄石制药厂生产的雷公藤片约 1.0 g(含雷公藤红素约 2.8 mg), 分别按低、中、高 3 个水平精密加入 1.4、2.9、4.3 mg 雷公藤红素对照品, 制备供试品溶液, 进样测定雷公藤红素的峰面积, 计算其平均回收率为 98.59%, RSD 为 1.18% ($n=9$)。

2.9 样品测定: 吸取供试品溶液和对照品溶液分别进样, 进样量 20 μL, 以外标法进行测定, 结果见表 1 和 2。色谱图见图 1。

表 1 不同药材中雷公藤红素的测定结果 ($n=3$)

Table 1 Determination of tripteryrine in different medicinal plants of *Tripterygium* L. ($n=3$)

药材	品种	雷公藤红素/%	RSD/%
湖南岳阳产雷公藤(带皮)	<i>T. wilfordii</i>	0.1050	1.74
湖南岳阳产雷公藤(去皮)	<i>T. wilfordii</i>	2.256×10^{-3}	2.42
江苏瑞昌产雷公藤	<i>T. wilfordii</i>	5.410×10^{-3}	0.66
东北雷公藤饮片	<i>T. regelii</i>	2.437×10^{-5}	2.95
雷公藤饮片	<i>T. wilfordii</i>	1.798×10^{-3}	2.38
昆明山海棠	<i>T. hypoglaucum</i>	3.442×10^{-3}	0.54

3 讨论

雷公藤红素的UV吸收光谱, 其吸收主要集中在

表 2 不同剂片中雷公藤红素的测定结果 (n=3)
Table 2 Determination of tripteryine in various
tablets of *Tripterygium* L. (n=3)

药 品	厂 家	批 号	雷公藤红素 /(μg·片 ⁻¹)	RSD /%
雷公藤片	三九黄石制药厂	020201	287.7	0.88
雷公藤多苷片	上海复旦复华制药厂	021001	21.30	0.81
雷公藤多苷片	湖南株洲市制药三厂	20030101	4.193	1.19
雷公藤多苷片	浙江德恩得制药有限公司	0207113	86.33	1.77
昆明山海棠片	云南植物药业公司	20040204	32.58	1.80

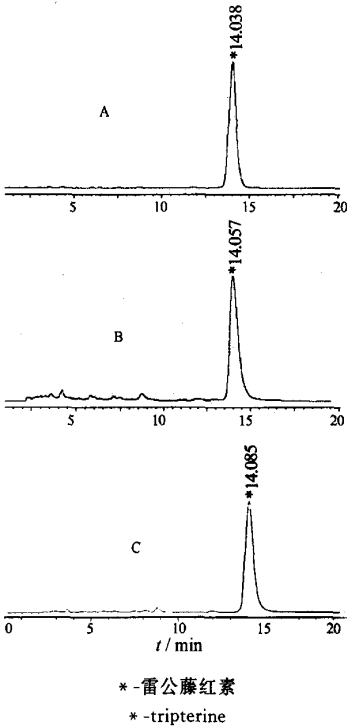


图 1 雷公藤红素对照品(A)、雷公藤药材(B)
和雷公藤片(C)HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatograms of tripteryine reference
substance (A), *T. wilfordii* (B), and tablets
of *T. wilfordii* (C)

在长波长处,选定最大吸收波长 425 nm 为测定波长。雷公藤红素中具有羧酸基团,因此 1%醋酸溶液为流动相,使其保持稳定的游离分子状态,峰形更好。本方法稳定可靠,准确度高。

在前处理过程中采用硅藻土拌样,是因硅藻土吸附性较低,既可作为固相萃取的固定相,又不会使所测定部分损失;用氯仿超声提取完全,效果好。采用氯仿-甲醇(95:5)作为流动相,通过薄层色谱结合预试验,既达到洗脱完全,又可除去其他极性的杂质,使雷公藤红素色谱峰分离无干扰,与其他峰分离度更好。

实验结果显示,不同产地的药材和不同厂家生产的制剂的雷公藤红素有很大差异,带皮的湖南产雷公藤中雷公藤红素量很高,而去皮的较低,也证实了雷公藤红素主要在皮部中,提示在选用药材时对雷公藤根皮的取舍应慎重对待。雷公藤红素毒性很大,危害远远超过其活性作用^[4]。雷公藤片中雷公藤红素最高的为 287.7 μg/片,大约是其主要有效成分雷公藤甲素标示量的 10 倍。目前国内市场上的雷公藤类口服制剂,多为原药材的乙醇粗提取物,仅有雷公藤多苷片是经过初步提纯的,而且毒性成分雷公藤红素既没有监控也没有测定标准,不能保证安全用药。因此对其进行监控,制定合理的质量控制标准势在必行。本实验只建立了雷公藤红素的测定方法,今后还应对其毒理研究进行深入细致和相关的探讨,为合理的雷公藤红素限量标准提供理论依据,使雷公藤类药物能达到疗效稳定、不良反应小的现代化中药的质量要求。

References:

[1] Yao W C, Nian H F. Medicated wine of *Tripterygium wilfordii* in treating rheumatoid arthritis in 392 patients [J]. *Chin J New Drugs Clin Rem* (中国新药与临床杂志), 2004, 23 (1): 37-39.
[2] Xu J Y, Zhao C G, Lu D P. *Tripterygium wilfordii* Hook f. used to treat hard nephritic syndrome in adults [J]. *Chin J Integrated Tradit West Nephrol* (中国中西医结合肾病杂志), 2004, 4 (17): 71-72.
[3] Zhu X M, Xiong R C, Zhang Y K, et al. Studies on immunosuppressive effect of tripteryine monomer on renal transplant mongrel drugs [J]. *Chin J Organ Transplant* (中华器官移植杂志), 1996, 17 (1): 21-22.
[4] Zhang L X, Yu F K, Zheng Q Y, et al. Immunosuppressive and antinflammatory activities of tripteryine [J]. *Acta Pharm Sin* (药学报), 1990, 25 (8): 573-577.

敬告读者

《中草药》杂志编辑部尚存部分过刊合订本,包括:1974-1975 年、1976 年、1979 年、1985—1994 年(80 元/年),1995—1997 年(110 元/年),1998 年(120 元/年)、1999 年(135 元/年)、2000 年(180 元/年)、2001—2003 年(200 元/年)、2004 年(220 元/年)。1996 年增刊(50 元)、1997 年增刊(45 元)、1998 年增刊(55 元)、1999 年增刊(70 元)、2000 年增刊(70 元)、2001 年增刊(70 元)、2002 年增刊(65 元)、2003 年增刊(65 元)、2004 年增刊(65 元)。欢迎订购。订购者请直接与《中草药》杂志编辑部联系。
电话:(022) 27474913 23006821 传真:(022) 23006821 E-mail:zcyzzbjb@tjipr.com