

毛细管气相色谱法测定雷公藤中雷公藤甲素

饶毅¹, 魏惠珍¹, 席毅¹, 欧阳辉², 吕爱平¹, 杨世林¹

(1. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西南昌 330006; 2. 江西中医学院, 江西南昌 330004)

雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 又名黄藤、黄藤木、黄腊藤等, 属卫茅科植物, 是目前临床治疗类风湿关节炎的中药材。雷公藤甲素(tripdiolide)是从雷公藤中分离的二萜内酯化合物, 是治疗类风湿关节炎的主要活性成分之一。目前雷公藤甲素测定方法主要采用 HPLC 法^[1,2]。本实验采用柱前衍生化气相色谱法对雷公藤甲素进行测定研究, 方法操作简便、重复性好、结果准确。

1 仪器与试剂

Agilent 6890N 气相色谱仪(包括⁶³Ni 电子捕获检测器, 安捷伦色谱工作站); HP-5 弹性石英毛细管柱(30 m×0.32 mm×0.25 μm, J&W, Temperature Limits: -60~325 °C); KQ-250DB 型数控超声清洗器(昆山超声仪器有限公司); Metler AB104-N 分析天平(梅特勒-托利多仪器有限公司); 雷公藤甲素对照品(中国药品生物制品检定所, 批号: 1566-200201); 氮气(体积分数 99.999%, 江西华东特种气体研究所); 雷公藤药材, 购于江西益民大药房, 产地江西, 经江西中医学院中药鉴定教研室葛菲教授鉴定。

2 方法与结果

2.1 衍生化的原理: 雷公藤甲素有一个羟基, 极性较大, 导致其气相直接分离不是很好, 通过与三氟乙酐(TFAA)进行衍生化, 产生三氟乙酐酯, 雷公藤甲素峰分离效果得到改善, 和其他共存物分离良好。

2.2 色谱条件与系统适应性实验: 进样口温度 290 °C, 检测器温度 320 °C, 柱升温程序为初始温度 100 °C, 保持 1 min, 以 30 °C/min 升至 290 °C, 保持 15 min; 分流比 50:1, 载气为高纯氮, 进样量 1 μL, 外标法定量。理论塔板数不低于 1×10^6 , 两个相邻色谱峰的分离度应大于 1.5。

2.3 对照品溶液的制备: 精密称取经干燥至恒重的雷公藤甲素对照品适量, 加乙腈制成 0.1 mg/mL 的对照品溶液。精密移取对照品溶液 0.3 mL 于具塞

离心管中, 氮气吹干, 加入 100 μL 四氢呋喃, 40 μL 三氟乙酐, 密闭。常温下反应 35 min, 氮气吹干, 精密加甲苯 1 mL 溶解, 即得。

2.4 供试品溶液的制备: 取雷公藤药材粉末 2 g, 精密称定, 置 100 mL 具塞锥形瓶中, 精密加入醋酸乙酯 50 mL, 称质量, 超声处理 45 min, 放冷, 再称定质量, 用醋酸乙酯补足减失质量, 滤过, 精密量取续滤液 25 mL, 水浴上浓缩至 1~2 mL, 过中性氧化铝柱(干法)(100~200 目, 3 g, 内径 1~1.5 cm), 用 50 mL 醋酸乙酯洗脱, 收集洗脱液浓缩至 1~2 mL, 转移到具塞刻度离心管内, 氮气吹干, 加四氢呋喃 100 μL, 三氟乙酐 40 μL, 密闭, 衍生化 35 min, 氮气吹干, 以甲苯 1 mL 溶解, 进样。以同法不加入样品进行衍生化制得空白样品, 进样, 空白无干扰。色谱图见图 1。

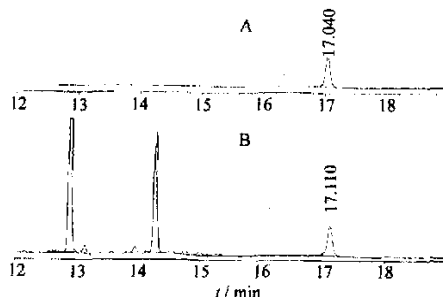


图1 雷公藤甲素(A)和雷公藤药材(B)气相色谱图

Fig. 1 GC Chromatograms of tripdiolide (A) and *T. wilfordii* (B)

2.5 线性关系考察: 分别取质量浓度为 0.1 mg/mL 对照品溶液 2.5、5、10、40、80、100 μL 于 5 mL 具塞刻度离心管内, 氮气吹干, 加四氢呋喃 100 μL, 三氟乙酐 40 μL, 密闭, 衍生化 35 min, 氮气吹干, 以甲苯 1 mL 溶解, 进样。以进样量为横坐标(X), 峰面积为纵坐标(Y), 绘制标准曲线, 得回归方程 $Y = 136.0451X + 115795$, $r = 0.9998$, 表明雷公藤甲素线性范围为 0.0062~0.2480 ng。

收稿日期: 2005-03-15

基金项目: 国家 863 计划(2003AA223514)

作者简介: 饶毅(1964-), 男, 江西南昌人, 教授, 硕士生导师, 生命分析化学专业博士研究生, 研究方向为药物质量控制与新药开发。

Tel: (0791)7119609 E-mail: raoyi99@tsinghua.org.cn

2.6 检测限的确定:用雷公藤甲素对照品溶液逐级稀释后进样,用峰高相当于3倍噪音时对照品的质量浓度表示,最低检测限为2.7 ng/mL。

2.7 重现性试验:取同一批号药材6份,制备供试品溶液,按上述色谱条件进样分析,测定,计算雷公藤甲素的质量分数,结果其RSD为2.66%($n=6$)。

2.8 精密度试验:精密吸取对照品溶液重复进样6次,每次进样1 μ L(分流比50:1),测定雷公藤甲素峰面积,计算得其RSD为0.94%($n=6$)。

2.9 稳定性试验:取供试品溶液,分别在0、2、4、8、16、24 h进样,每次进样1 μ L(分流比50:1),测定峰面积,结果雷公藤甲素峰面积RSD为1.78%,表明供试品溶液在24 h内稳定。

2.10 加样回收率试验:精密称取含雷公藤甲素7.79 μ g/g的药材粉末1 g,共6份,按80%、100%、120%水平分别精密加入雷公藤对照品,按供试品溶液制备方法操作,按上述色谱条件进行测定,计算回收率,结果雷公藤甲素的平均回收率为95.45%,RSD为2.15%($n=6$)。

2.11 样品测定:分别取不同批次的雷公藤药材约2 g,制备供试品,按上述色谱条件进行测定,3批药材中雷公藤甲素的测定结果见表1。

表1 雷公藤中雷公藤甲素的测定结果($n=3$)

Table 1 Determination of triptolidide in sample ($n=3$)

批次	雷公藤甲素/(μ g $\cdot$ g $^{-1}$)
1	8.41
2	8.76
3	7.79

3 讨论

3.1 色谱方法的选择:雷公藤甲素在药材中的量较

少,最大吸收波长为218 nm,由于杂质干扰,很难采用HPLC法做高灵敏度的检测,通过GC柱前衍生法后进样,发现雷公藤甲素峰能达到较好的分离,灵敏度明显增加,故采用柱前衍生法。

3.2 提取条件的选择:根据雷公藤甲素的性质,提取方式考察了超声,索氏提取等方法,并对不同溶剂、提取时间、洗脱液用量进行了综合考察,同时考察了过氧化铝色谱柱和不过氧化铝色谱柱对样品测定的影响,最后确定了采用醋酸乙酯超声45 min,过氧化铝柱,洗脱液用量为50 mL为最佳提取方案。

3.3 反应溶剂的考察:通过文献查找,采用四氢呋喃和乙醚作为反应溶剂较多,本实验主要考察两者效果间的差异。结果反应溶剂四氢呋喃明显优于乙醚。

3.4 衍生时间的考察:雷公藤甲素与三氟醋酐在很短的时间内就能达到很高的转移率,通过对雷公藤甲素在衍生时间为1 h内(5、10、20、30、40、60 min)量的变化情况比较,发现反应30 min基本达到平衡,最终把时间定为35 min。

3.5 升温程序选择:通过对升温程序的比较发现以本实验采用程序升温时,雷公藤甲素峰和其他成分分离良好,峰形较好。

References:

- [1] Cheng H B, Tu S H, Yang G. Improved RP-HPLC method of determination of triptolidide quantity in TWH F. tablets [J]. *Chin Arch Tradit Chin Med* (中医药学刊), 2004, 22 (11): 2013-2014.
- [2] Hu Y S, Zhang R, Tang Q H. Determination of triptolidide of *Tripterygium wilfordii* preparation with gradient elution by HPLC [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 1998, 18 (Suppl): 55-57.
- [3] Yang L L, Zhang X, Yuan Y S. Determination of triptolidide in human plasma by gas chromatography-electron capture detection [J]. *Chin J Chromatogr* (色谱), 2001, 19(1): 58-59.

(上接第1539页)

性结节的形成,造成前列腺增生。祖国医学认为前列腺增生的病机之一为肾虚与湿浊内蕴,病久而常有气滞与挟瘀,《医学心悟小便不通》曰:“癃闭与淋证不同。淋则便数而茎痛,癃闭则小便点滴而难通”。前列通片由薜荔、两头尖、泽兰、黄芪、肉桂、小茴香、黄柏、蒲公英、车前子、琥珀等10味中药组成。方中薜荔活血通经、消癥,利尿通淋;两头尖活血祛瘀;泽兰活血通经利尿;黄芪补气固本,配肉桂、小茴香通阳化浊。兼用黄柏、蒲公英、车前子、琥珀清热解暑、活血散瘀、利尿通淋以达到清利湿浊,化瘀散结的功效。现代药理研究表明黄芪有利尿作用,能够降低生理性尿蛋白的排泄。肉桂中桂皮醛有中枢及末梢性扩张血管的作用,增强血液循环;肉桂油有抗菌作用。蒲公英、车前

子有利尿作用,蒲公英还有较强的抗菌和杀菌作用。小茴香油可缓解痉挛、减少疼痛,还有抗菌作用。本实验结果表明前列通片3个剂量对丙酸睾酮诱发的小鼠前列腺增生和丙酸睾酮诱发的去睾大鼠前列腺增生有抑制作用,均可使前列腺的质量及前列腺指数降低,前列腺纤维组织增生减轻。其抑制前列腺增生作用机制尚待深入研究。

References:

- [1] Liu M, Zhang S Y. Experimental studies of Sanmiaoshan on model effects of prostatic hyperplasia in mice and rats [J]. *Primary J Chin Mater Med* (基层中药杂志), 2001, 16(4): 3-7.
- [2] Zhu H J, Nan X Y, Dang J G. Experimental study of the effects of *Sophora flavescens* Ait. and *Cucurbita pepo* L. on benign prostatic hyperplasia [J]. *Chin J Surg Integrated Tradit West Med* (中国中西医结合外科杂志), 1999, 5(4): 258-261.