

HPLC 法测定雷公藤及其片剂中雷公藤对醌 B

贺江萍¹, 王文燕², 高文远³, 张彦文¹, 张庆伟¹, 周 雯¹, 段宏泉^{1*}

(1. 天津医科大学药学院, 天津 300070; 2. 天津药物研究院, 天津 300193; 3. 天津大学药学院, 天津 300072)

摘要:目的 建立雷公藤及其片剂中雷公藤对醌 B 测定的 HPLC 法。方法 采用外标法。HiQ siL KYA-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱为固定相, 甲醇-1%冰醋酸水溶液 (66:34) 为流动相, 检测波长为 254 nm, 体积流量为 1.0 mL/min。结果 线性范围为 6.62~105.9 μg/mL ($r=0.9999$), 湖南产雷公藤平均回收率为 97.78%, RSD 为 1.09% ($n=9$), 昆明山海棠片平均回收率为 99.83%, RSD 为 1.76% ($n=9$)。结论 本方法准确、灵敏, 可作为雷公藤类药材及其片剂中雷公藤对醌 B 的定量分析方法。

关键词:雷公藤; 雷公藤制剂; 雷公藤对醌 B; 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(2006)04-0525-03

Quantitative determination of triptotoquinone B in *Radix Folium Seu Flos Tripterygii Wilfordii* and its tablets by HPLCHE Jiang-ping¹, WANG Wen-yan², GAO Wen-yuan³, ZHANG Yan-wen¹,ZHANG Qing-wei¹, ZHOU Wen¹, DUAN Hong-quan¹

(1. College of Pharmacy, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, Tianjin 300193, China; 3. College of Pharmaceutics and Biotechnology, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: **Objective** To establish an HPLC method for determination of triptotoquinone B in *Radix Folium Seu Flos Tripterygii Wilfordii* (RFFTW) and its tablets. **Methods** An external method with HiQ siL KYA-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) column as fixed phase and methanol-1% acetic acid solution (66:34) as mobile phase was adopted. The detective wave length was 254 nm and the flow rate was 1.0 mL/min. **Results** The linearity range was 6.62—105.9 μg/mL ($r=0.9999$), the average recovery of *T. wilfordii* from Hunan Province was 97.78%, RSD was 1.09% ($n=9$), and the average recovery of tablet of *T. hypoglaucom* was 99.83%, RSD was 1.76% ($n=9$). **Conclusion** The method is accurate and sensitive. It is adoptable for quantitative analysis of triptotoquinone B in RFFTW and its tablets.

Key words: *Radix Folium Seu Flos Tripterygii Wilfordii* (RFFTW); *Tripterygium wilfordii* preparations; triptotoquinone B; HPLC

雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook f. 系卫矛科雷公藤属植物, 同属植物还包括昆明山海棠 *T. hypoglaucom* Hutch.、东北雷公藤 *T. regelii* Sprague et Takeda 等。雷公藤早期用作杀虫剂及治疗类风湿性关节炎和某些皮肤病, 现临床广泛应用于多种免疫系统异常而致的疾病, 如治疗类风湿性关节炎、器官移植、肾脏疾病等, 其疗效显著^[1~3]。雷公藤有效成分研究表明雷公藤对醌 B 是其主要有有效成分之一, 具有抗炎、抗免疫作用^[4]。为了提高并完善雷公藤制剂的质量控制标准, 本实验建立了雷公藤对醌 B 的高效液相色谱测定法, 通过对药材和片剂的分析表明, 可以把雷公藤中有效成分雷公藤对醌 B 作为质量控制指标之一。

1 仪器与试剂

岛津 LC-10AD 高效液相色谱仪, SPD-10A 可变波长紫外检测器, C-R6A 色谱数据处理机。

雷公藤对醌 B 对照品为本实验室自制, 经制备 HPLC 纯化, 质量分数为 100% (面积归一法测得)。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: HiQ siL KYA-C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; 流动相: 甲醇-1%冰醋酸水溶液 (66:34); 检测波长: 254 nm; 体积流量: 1.0 mL/min。色谱图见图 1。

2.2 对照品溶液的制备: 精密称取对照品约 3 mg

收稿日期: 2005-06-09

基金项目: 教育部优秀青年教师资助计划项目

* 通讯作者 段宏泉 Tel: (022) 23542838 Fax: (022) 23528891 E-mail: duanhq@tjmu.edu.cn

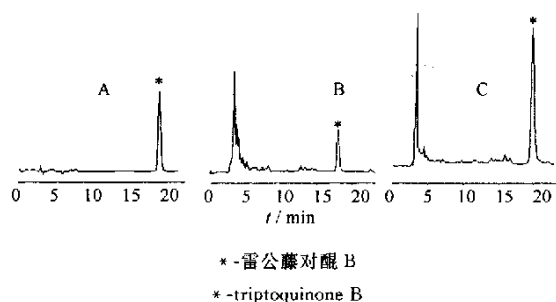


图 1 雷公藤对醌 B 对照品(A)、江西产雷公藤(B)和雷公藤多苷片(C)的 HPLC 色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of triptokinone B reference substance (A), *T. wilfordii* from Jiangxi Province (B), and Leigongteng Duogan Tablets (C)

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 雷公藤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 150 mL,回流提取 4.5 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。加 0.4 g 硅胶拌样,干法上样,5.0 g 硅胶装柱(12 cm×1.5 cm),先以 50 mL 正己烷-醋酸乙酯(9:1)洗脱,弃去,再以正己烷-醋酸乙酯(1:1) 100 mL 洗脱,回收溶剂,浓缩至干。残渣用甲醇溶解,移入 5 mL 量瓶中,稀释至刻度,摇匀,即得。

2.3.2 雷公藤片剂供试品溶液的制备:取片剂 10 片,压碎,以氯仿超声提取 3 次,每次 50 mL,每次 30 min,静置,滤取上清液,浓缩至干。加 0.4 g 硅胶拌样,干法上样,5.0 g 硅胶装柱(12 cm×1.5 cm),先以 50 mL 正己烷-醋酸乙酯(9:1)洗脱,弃去,再以正己烷-醋酸乙酯(1:1) 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,即得。

2.4 线性关系考察:精密吸取雷公藤对醌 B 对照品溶液 0.5、1、2、4、6、8 mL 于 10 mL 量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀,分别吸取 20 μ L 进行测定。以峰面积为纵坐标,质量浓度为横坐标做图,得雷公藤对醌 B 的回归方程为 $Y = 3.107 \times 10^5 X + 31.43$, $r = 0.9999$,线性范围为 6.62~105.9 μ g/mL。

2.5 精密度试验:取 52.96 μ g/mL 雷公藤对醌 B 对照品溶液,连续重复进样 6 次,测定雷公藤对醌 B 峰面积计算得其 RSD 为 0.60%。

2.6 重现性试验:取同一江西瑞昌产雷公藤 6 份,

制备供试品溶液,同法测定,测得雷公藤对醌 B 平均质量分数为 1.76×10^{-5} ,RSD 为 1.23%。

取同一昆明山海棠片 6 份,制备供试品溶液,同法测定,测得雷公藤对醌 B 平均质量分数为 23.07 μ g/片,RSD 为 0.93%。

2.7 稳定性试验:吸取同一江西瑞昌产雷公藤药材供试溶液 20 μ L,分别于 0、2、4、8、12、24 h 进行测定,测得雷公藤对醌 B 质量分数的平均值为 1.79×10^{-5} ,RSD 为 0.43%。结果表明样品溶液在 24 h 内稳定。

2.8 回收率试验:取江西瑞昌产雷公藤约 9.0 g(含雷公藤对醌 B 约 160 μ g),分别按低、中、高 3 个水平精密加入雷公藤对醌 B 对照品 105.9、158.9、211.8 μ g,制备供试品溶液,测定雷公藤对醌 B 的峰面积,计算其平均回收率为 97.78%,RSD 为 1.09%。

取云南植物药业公司的昆明山海棠片约 2.4 g(含雷公藤对醌 B 约 138 μ g),分别按低、中、高 3 个不同水平精密加入雷公藤对醌 B 对照品 68.85、137.7、206.5 μ g,制备供试品溶液,测得雷公藤对醌 B 的峰面积,计算其平均回收率为 99.83%,RSD 为 1.76%。

2.9 样品测定:将药材及片剂供试品溶液分别进行测定,进样量 20 μ L,测定结果见表 1。

表 1 雷公藤药材及其片剂中雷公藤对醌 B 的测定 ($n=3$)

Table 1 Determination of triptokinone B in RFFTW and its tablets ($n=3$)

药材或片剂	拉丁名或批号	产地或厂家	雷公藤对醌 B	RSD/%
雷公藤	<i>T. wilfordii</i>	湖南岳阳	1.05×10^{-5}	2.18
雷公藤	<i>T. wilfordii</i>	江西瑞昌	1.78×10^{-5}	0.46
东北雷公藤(饮片)	<i>T. regelii</i>	黑龙江佳木斯	2.82×10^{-7}	0.41
昆明山海棠	<i>T. hypoglauca</i>	云南植物药业公司	6.36×10^{-5}	0.99
雷公藤多苷片	021001	上海复旦复华制药厂	57.36 μ g/片	0.49
雷公藤片	020201	三九黄石制药厂	41.12 μ g/片	0.86
昆明山海棠片	040101	广东和平药业有限公司	76.75 μ g/片	1.25
昆明山海棠片	20040204	云南植物药业公司	23.04 μ g/片	0.72

3 讨论

3.1 经实验证明,在前处理过程中曾采用氯仿-甲醇(98:2)为流动相过硅胶柱,但色谱图显示杂质较多,无法基线分离。而先采用正己烷-醋酸乙酯(9:1)过硅胶柱除去部分杂质,再采用正己烷-醋酸乙酯(1:1)为流动相进行处理,结果杂质较少,可以基线分离,效果满意。

3.2 雷公藤制剂应用多年,对各种自身免疫性疾病疗效显著,但由于无有效质量控制手段,致使疗效和毒性不稳定,临床常有不良反应发生,甚至有中毒死

亡的病历发生^[5]。在此次分析中,不同厂家雷公藤制剂中雷公藤对醌B差异很大,说明质量控制的不规范是其疗效不稳定的原因之一。另外,东北雷公藤饮片中雷公藤对醌B质量分数很低(小于百万分之一),然而广东和平药业有限公司生产的昆明山海棠片中雷公藤对醌B质量分数却达到76.75 $\mu\text{g}/\text{片}$,因此在制剂选择原药材上应固定雷公藤原药材的品种来源、产地和采收季节。

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 Res* (中国新药与临床杂志), 2004, 23

(1): 37-39.

- [2] Xu X Y, Zhao C G, Lu D P. *Tripterygium wilfordii* Hook. f. used to treat hard nephritic syndrome in adults [J]. *Chin J Pract Chin Med* (中华实用中西医结合杂志), 2004 (17): 71-72.
- [3] Yang J W, Dai C S, Chen Z H, et al. Effects of triptolide on T bacteria and relationship between triptolide and Camp/PKA [J]. *Chin J Nephrol Dialysis Transplant* (肾脏病与透析肾移植杂志), 1998, 7 (2): 106-113.
- [4] Yoshitaka T, Kozo S, Noriko W, et al. Triptolide A and B, novel interleukin-1 inhibitors from *Tripterygium wilfordii* var. *regelii* [J]. *Tetrahedron Lett*, 1992, 33 (47): 7177-7180.
- [5] Wang M, Chen H Y, Hu X X, et al. Analysis of the dead reason of 83 patients from *Tripterygium wilfordii* Hook. f. [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 1999, 10 (2): 128-129.

乳腺丸中阿魏酸在兔体内的药动学研究

刘艳娟, 杜智敏*, 王 珍

(哈尔滨医科大学附属二院临床药物研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:目的 研究乳腺丸中阿魏酸在兔体内的药动学特性。方法 采用高效液相色谱法测定阿魏酸的血液浓度。以香豆素为内标, 甲醇-醋酸-水(38.0:0.5:61.5)为流动相, ODS Hypersil C_{18} 柱(150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm)为分析柱, 检测波长为320 nm。结果 阿魏酸在12.5~1 600.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ 呈线性, 血浆最低检测质量浓度为6.25 $\mu\text{g}/\text{L}$, 低、中、高3种质量浓度平均回收率分别为96.17%、99.80%、100.23%, 日内及日间RSD均 $\leq 6\%$, 5只兔单次ig乳腺丸后药-时曲线符合一室模型, 药动学参数分别为 $\text{AUC}_{0-4\text{h}}$ (855.29 $\pm$ 100.78) $\mu\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$, $\text{AUC}_{0-\infty}$ (1 051.99 $\pm$ 125.96) $\mu\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$, C_{max} (952.71 $\pm$ 119.04) $\mu\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$, t_{max} (0.5 $\pm$ 0.00) h, $t_{1/2}$ (1.61 $\pm$ 0.21) h, K_e (0.46 $\pm$ 0.05)/h。结论 本方法准确、重现性好, 适用于乳腺丸中阿魏酸血液浓度测定及药动学研究。

关键词: 乳腺丸; 阿魏酸; 药动学; 高效液相色谱

中图分类号: R285.61; R286.02

文献标识码: B

文章编号: 0253-2670(2006)04-0527-04

Pharmacokinetic study of ferulic acid in Ruxian Pill in rabbits *in vivo*

LIU Yan-juan, DU Zhi-min, WANG Zhen

(Institute of Clinic Drug, The Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150086, China)

Abstract: **Objective** To study the pharmacokinetics of ferulic acid in rabbits *in vivo* after ig administering Ruxian Pill. **Methods** The concentrations of ferulic acid in plasma were determined by HPLC. Taking coumarin as internal standard, a mixture of methanol-acetic acid-water (38.0:0.5:61.5) was used as the mobile phase, and UV detection was performed at 320 nm. The analytical column was ODS Hypersil C_{18} (150 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μm). **Results** The calibration curve was linear over the range of 12.5—1 600.0 $\mu\text{g}/\text{L}$ and the measurable limit of plasma detection was 6.25 $\mu\text{g}/\text{L}$. The recovery was 96.17%, 99.80%, 100.23%. The RSD of the intra-day and the inter-days was less than 6%. The plasma concentration-time curve was consistent with one-compartment model. The pharmacokinetic parameters were as follows: $\text{AUC}_{0-4\text{h}}$ (855.29 $\pm$ 100.78) $\mu\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$, $\text{AUC}_{0-\infty}$ (1 051.99 $\pm$ 125.96) $\mu\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$, C_{max} (952.71 $\pm$ 119.04) $\mu\text{g}/(\text{L}\cdot\text{h})$, t_{max} (0.5 $\pm$ 0.00) h, $t_{1/2}$ (1.61 $\pm$ 0.21) h, K_e (0.46 $\pm$ 0.05)/h. **Conclusion** The method is accurate and precise with better reproducibility, which can be used for the determination of plasma level of ferulic acid and the study of its pharmacokinetics for Ruxian Pill.

Key words: Ruxian Pill; ferulic acid; pharmacokinetics; HPLC

收稿日期: 2005-06-26

基金项目: 黑龙江省“十五”科技攻关课题(G99C20-4)

作者简介: 刘艳娟, 女, 在职研究生。Tel: (0451) 86863083 E-mail: liuyanjuan345@126.com

*通讯作者 杜智敏 Tel: (0451) 86605353 Fax: (0451) 86665559 E-mail: dzm@pharm-hrbmush.com