

雷公藤制剂 UPLC 指纹图谱研究及 4 种效应成分的含量测定*

邓金宝¹, 徐方方¹, 徐鹏¹, 毛炜¹, 邓远辉¹, 刘博^{1,2}

(1. 广州中医药大学第二附属医院, 广东 广州 510006;

2. 中国科学院上海药物研究所, 上海 201203)

摘要: 为建立不同厂家雷公藤制剂的 UPLC 指纹图谱, 并同时测定制剂中 4 种效应成分的含量, 为雷公藤制剂的质量控制提供参考和快速的检测方法。采用超高效液相色谱 (UPLC) 法进行分析, 色谱柱: BEH Shield RP18 (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm), 乙腈-水为流动相梯度洗脱, 流速: 0.25 mL/min, 柱温 35 °C, 在 220 nm 波长下进行测定; 分别从定性和定量 2 个方面对不同厂家雷公藤制剂的 UPLC 指纹图谱进行相似性评价。结果显示不同厂家雷公藤制剂的指纹图谱明显不同, 4 种效应成分的含量差异显著。表明采用 UPLC 法测定雷公藤制剂指纹图谱专属性强, 检测速度快, 分离度好, 可结合 4 种效应成分的含量测定全面控制雷公藤制剂的质量, 确保临床用药安全与有效。

关键词: 雷公藤制剂; 雷公藤内酯醇; 指纹图谱; 超高效液相色谱法 (UPLC)

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 0529-6579 (2015) 02-0092-09

Fingerprints and Content Determinations of Four Active Components of *Tripterygium* Preparations by UPLC

DENG Jinbao¹, XU Fangfang¹, XU Peng¹, MAO Wei¹, DENG Yuanhui¹, LIU Bo^{1,2}

(1. The Second Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China;

2. Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China)

Abstract: To establish fingerprints of *Tripterygium* preparations from different manufacturers, and to simultaneously determine the contents of four active components by ultra performance liquid chromatography (UPLC), providing a rapid detection method for quality control of *Tripterygium* preparations. UPLC separation was performed on a BEH Shield RP 18 column (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) with a mobile phase of acetonitrile-water under gradient elution, the flow rate was 0.25 mL/min and the column temperature was 35 °C, the detection wavelength was set at 220 nm. The similarity of UPLC fingerprints was evaluated by qualitative and quantitative analysis, respectively. The results showed that the fingerprints of *Tripterygium* preparations from different manufacturers were found to be in great diverse, while the contents of four active components were significantly different. So, this method is specific, fast, and with good resolution for the determination of UPLC fingerprint of *Tripterygium* preparations. The simultaneous determination of contents of four active components can be used for the quality control of *Tripterygi-*

* 收稿日期: 2014-07-02

基金项目: 国家自然科学基金青年科学基金资助项目 (81202398); 国家中医药管理局基地科研专项资助项目 (JDZX2012010); 中科院上海药物研究所新药研究国家重点实验室开放研究课题资助项目 (SIMM1106KF-12); 广州市科技攻关资助项目 (201300000147)

作者简介: 邓金宝 (1989 年生), 男; 研究方向: 中药新药研究与开发; 通讯作者: 刘博, 邓远辉; E-mail: doctliu@263.net; yhdeng62@126.com

um preparations to ensure the safety and utility in clinical medication.

Key words: *Tripterygium* preparation; triptolide; fingerprint; UPLC

雷公藤多苷 (tripterygium glycosides) 是以卫矛科植物雷公藤的根为原料提取精制而成的一种脂溶性混合物。药理研究证明, 雷公藤多苷具有较强的抗炎及免疫抑制作用^[1-3], 是目前临床上使用较多的非甾体类免疫抑制剂, 被广泛用于类风湿性关节炎、红斑狼疮、肾小球肾炎等疾病的治疗^[4]。但是, 雷公藤多苷也具有明显的毒副作用, 如: 肝毒性^[5]、肾毒性及生殖毒性等^[6-7]。由于药材部位、来源、采收期和生产工艺的不同和不稳定性, 导致目前市售雷公藤制剂的质量差异较大, 从而影响了临床使用的有效性与安全性^[8]。目前, 《中国药典》2005 和 2010 版均没有收载雷公藤药材和雷公藤制剂的质量控制标准, 中药成方制剂标准使用薄层扫描法进行含量测定, 该法准确性较差。而在中药雷公藤质量的整体评价方面, 尽管雷公藤药材特征图谱的研究报道并不罕见^[8-13], 但有关雷公藤制剂的化学成分的整体系统分析控制研究和实际应用却比较少^[8], 且多是利用 HPLC 进行检测, 该方法虽然比较稳定, 但检测时间较长 (通常需 2 h 左右), 分离度较差^[8-13], 难以保证检测的准确性。因此, 对于活性与毒性都很强的雷公藤制剂必须建立一种快速、准确、全面的质量评价与检测的方法, 以保证雷公藤制剂的有效性及安全性。

近年来, 超高效液相色谱仪 (UPLC) 的应用越来越广泛^[14-16], 相比 HPLC 法其分析速度更快, 分离度更好, 并能节约分析时间, 提高工作效率。本研究将采用超高效液相色谱仪, 旨在建立一种全

面、快速、准确的评价雷公藤制剂质量的 UPLC 指纹图谱分析方法, 并利用该方法建立不同厂家雷公藤制剂的指纹图谱, 并同时测定制剂中主要有效成分的含量, 为市售雷公藤制剂质量的整体控制提供参考和快速地检测方法, 以保障临床用药的安全。

1 仪器与试药

1.1 仪器

组合高分辨质谱联用仪 (LTQ Orbitrap XL, Thermo 公司); 超高效液相色谱仪 (Waters Acquity, Waters 公司); 旋转蒸发仪 (RV 10 basic V, IKA 公司); 低速台式自动平衡离心机 (DT5-3, 北京时代北利离心机有限公司); 超纯水机 (Millipore)。

1.2 试剂

无水乙醇、甲醇、乙酸乙酯、石油醚 (60 ~ 90 °C) 均为分析纯 (天津市百世化工有限公司); 中性氧化铝 (上海五四化学试剂有限公司); 乙腈为色谱纯 (Fisher 公司)。

1.3 药品

雷公藤制剂来源信息见表 1, 实验研究用的化学对照品信息见表 2。所有对照品都经过核磁、傅里叶红外及组合高分辨质谱联用仪 (LTQ Orbitrap XL) 检测确证了结构, 并用超高效液相 (UPLC) 检测纯度, 应用峰面积归一化法比较, 6 个对照品的纯度均在 98% 以上。6 个对照品 UPLC 色谱图见图 1 (色谱条件同 “2.3”)。

表 1 雷公藤制剂来源

Table 1 Origin of *Tripterygium* preparations

样品号	厂 家	批 号
1	黄石飞云制药有限公司 (Huangshi Feiyun Pharmaceutical Co, Ltd.)	20130601
2	朝阳德远药业有限公司 (Chaoyang Deyuan Pharmaceutical Co, Ltd.)	20120901
3	安徽新陇海药业有限公司 (Anhui XLH Pharmaceutical Co, Ltd.)	130201
4	浙江得恩德制药有限公司 (Zhejiang DND Pharmaceutical Co, Ltd.)	1210130
5	江苏美通制药有限公司 (Jiangsu MeiTong Pharmaceutical Co, Ltd.)	130228
6	浙江普洛康裕天然药物有限公司 (Zhejiang Apeloa Natural Medicine Co, Ltd.)	120503
7	福建汇天生物药业有限公司 (Fujian Huitian Biological Pharmacy Co, Ltd.)	121201
8	上海复旦复华药业有限公司 (Shanghai Fudan Fuhua Pharmaceutical Co, Ltd.)	130402
9	湖南协力药业有限公司 (Hunan Xieli Pharmaceutical Co, Ltd.)	20130102
10	湖南千金协力药业有限公司 (Hunan Qianjin Xieli Pharmaceutical Co, Ltd.)	20130502
11	华润三九药业有限公司 (Huarun Sanjiu Pharmaceutical Co, Ltd.)	1209002Z

表 2 雷公藤对照品的基本信息

Table 2 Information of *Tripterygium wilfordii* Hook f. reference substance

序号	品名 ¹⁾	分子式	预测值 m/z	实测值 m/z	误差 $Err/10^{-6}$
1	雷公藤内酯三醇 (tripteriolide) ^a	$C_{20}H_{26}O_7$	$[M-H]^{-} 377.1595$	$[M-H]^{-} 377.1598$	0.823
2	雷公藤内酯醇 (triptolide) ^a	$C_{20}H_{24}O_6$	$[M+H]^{+} 361.1646$	$[M+H]^{+} 361.1652$	1.648
3	雷公藤内酯酮 (triptonide) ^a	$C_{20}H_{22}O_6$	$[M+H]^{+} 359.1489$	$[M+H]^{+} 359.1495$	1.741
4	山海棠二萜内酯 A (tripterfordin) ^b	$C_{20}H_{30}O_3$	$[M+H]^{+} 319.2268$	$[M+H]^{+} 319.2269$	0.403
5	雷酚内酯 (triptophenolide) ^b	$C_{20}H_{24}O_3$	$[M-H]^{-} 311.1642$	$[M-H]^{-} 311.1642$	0
6	雷公藤内酯甲 (wilforlide A) ^b	$C_{30}H_{46}O_3$	$[M+H]^{+} 455.3520$	$[M+H]^{+} 455.3523$	0.633

1) a: From the Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences

b: From the Nanjing Jing Zhu Biological Technology Co., Ltd.

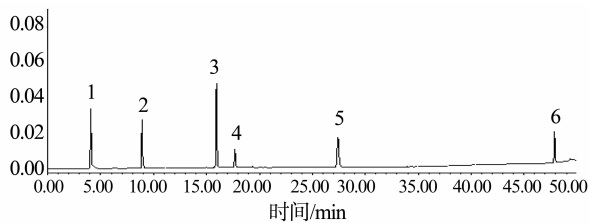


图 1 6 个对照品的 UPLC 色谱图

Fig. 1 UPLC chromatogram of six reference substances

1: 雷公藤内酯三醇; 2: 雷公藤内酯醇; 3: 雷公藤内酯酮; 4: 山海棠二萜内酯 A; 5: 雷酚内酯; 6: 雷公藤内酯甲

2 溶液的制备与色谱条件

2.1 供试品溶液的制备

取雷公藤制剂 10 片, 研细, 取细粉适量, 精密称定, 置 50 mL 离心管中, 精密加入无水乙醇 10 mL, 称量, 超声提取 30 min, 冷至室温, 加无水乙醇补至原质量, 离心 (3 000 r/min) 10 min, 取上清液保留, 药渣再按上述方法提取 1 次, 合并上清液。精密量取上清液 10 mL, 置中性氧化铝柱中 [中性氧化铝 5.0 g, 用石油醚 (60~90 °C) - 乙酸乙酯 (1:4) 5 mL 预洗], 再用石油醚 - 乙酸乙酯 (1:4) 20 mL 洗脱, 收集洗脱液, 60 °C 以下浓缩至近干, 立即加乙腈 - 水 (1:1) 定容至 2 mL, 摇匀, 0.22 μm 滤膜滤过, 即得。

2.2 对照品溶液的制备

取雷公藤内酯醇、雷公藤内酯酮、雷酚内酯、雷公藤内酯甲适量, 精密称定, 精密加入乙腈 - 水 (1:1) 配成质量浓度分别为 0.137、2.82、1.22、1.74 mg/mL 的储备液。取上述储备液适量, 分别加乙腈 - 水 (1:1) 等比稀释配制成 10 个质量浓度梯度的对照品溶液, 用于标准曲线的测定。

2.3 色谱条件及系统适应性试验

色谱柱: BEH Shield RP18 (2.1 mm × 100

mm, 1.7 μm); 流动相: 乙腈 - 水体系; 梯度洗脱条件见表 3; 流速: 0.25 mL/min; 检测波长: 220 nm; 柱温: 35 °C; 进样体积: 4 μL。在该色谱条件下, 雷公藤内酯醇、雷公藤内酯酮、雷酚内酯、雷公藤内酯甲的分离度均大于 1.5, 理论板数均在 8 000 以上。

表 3 梯度洗脱程序

Table 3 Gradient elution program

时间/min	0	5	6	10	14	20	33	40	45	48	50
φ (乙腈)/%	15	25	27	30	37.5	39	46	62	70	90	100
φ (水)/%	85	75	73	70	62.5	61	54	38	30	10	0

3 指纹图谱的建立

3.1 测定方法

在上述“2.3 项”条件下检测样品, 以雷公藤内酯醇的保留时间和峰面积为参比计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。

3.2 共有峰的确定

分别测定各厂家雷公藤制剂的 UPLC 指纹图谱, 经“中药色谱指纹图谱相似度评价软件 2004 A”版分析匹配, 匹配数目为 11 的峰即为此 11 个厂家的主要共有峰, 确定制剂中的共有峰为 38 个。图 2 为雷公藤制剂典型的 UPLC 指纹图谱。以雷公藤内酯醇的峰 (2 号峰) 为参照峰。

3.3 特征峰的识别

经过与对照品比对并结合 PDA 光谱图可知: 共有峰中 1 号峰为雷公藤内酯三醇, 2 号峰为雷公藤内酯醇, 4 号峰为雷公藤内酯酮, 7 号峰为山海棠二萜内酯 A, 22 号峰为雷酚内酯, 37 号峰为雷公藤内酯甲。如图 3。

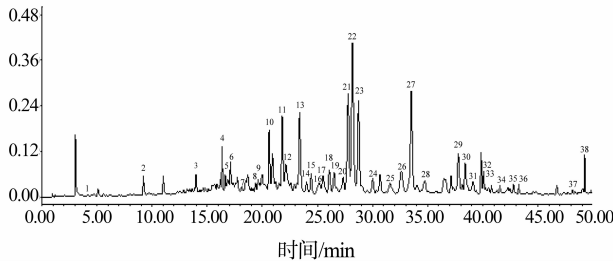


图 2 湖南千金协力药业有限公司的雷公藤多苷片 UPLC 指纹图谱

Fig. 2 UPLC fingerprint of *Tripterygium glycoside* tablet from Hunan Qianjin Xieli Pharma Co., Ltd.

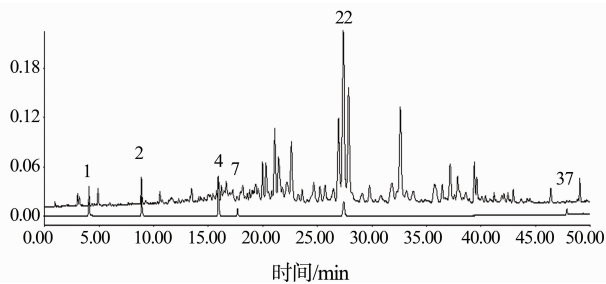


图 3 雷公藤 6 个对照品与湖南千金协力药业多苷片的 UPLC 图

Fig. 3 UPLC of Six reference substances of *Tripterygium wilfordii* Hook f. and glycoside tablet from Hunan Qianjin Xieli Pharmaceutical Co., Ltd.

3.4 精密度试验

取上海复旦复华药业有限公司生产的雷公藤制剂(批号: 130402), 按“2.1 项”的方法制备供试品溶液, 对同一供试品溶液, 按“2.3 项”色谱条件连续测定 6 次。结果: 以雷公藤内酯醇为参比, 各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.09%, 相对峰面积的 RSD 均小于 2.0%。表明仪器在该色谱条件下的精密度良好。

3.5 稳定性试验

取上海复旦复华药业有限公司生产的雷公藤制剂(批号: 130402), 按“2.1 项”的方法制备供试品溶液, 对同一供试品溶液分别放置 0、2、4、8、12、24 h 分别测定, 以雷公藤内酯醇为参比, 考察供试品溶液的稳定性。结果: 各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.35%, 相对峰面积的 RSD 均小于 5.0%。表明该供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

3.6 重复性试验

取同一批次的上海复旦复华药业有限公司生产的雷公藤制剂(批号: 130402) 6 份, 平行制备 6

份供试品溶液, 分别测定, 考察重复性。结果: 以雷公藤内酯醇为参比, 各共有峰相对保留时间的 RSD 均小于 0.18%, 相对峰面积的 RSD 均小于 5.0%。表明该方法重复性良好。

3.7 样品测定

按“2.1 项”的方法分别制备各厂家雷公藤制剂的供试品溶液, 在“2.3 项”色谱条件下测定。将测定结果导入“中药色谱指纹图谱相似度评价软件 2004 A”版(国家药典委员会推荐)进行相似度分析, 相似度结果分别为: 0.797、0.777、0.759、0.557、0.876、0.885、0.927、0.934、0.883、0.899、0.875。各厂家样品的 UPLC 指纹图谱见图 4, 共有峰的相对保留时间和相对峰面积见表 4 和表 5。

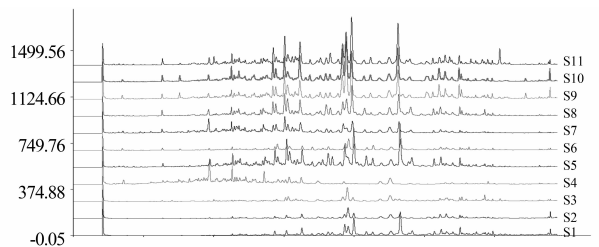


图 4 11 个厂家雷公藤制剂的 UPLC 指纹图谱 (S1 - S11 为样品编号, 同表 1)

Fig. 4 UPLC fingerprints of *Tripterygium* preparations from eleven manufacturers (S1 - S11 is sample No., same as table 1)

3.8 不同厂家雷公藤制剂指纹图谱的分析比较

从色谱图和所得数据可知: 11 个厂家雷公藤制剂的指纹图谱存在显著差异。①相似度: 11 个厂家雷公藤制剂指纹图谱的相似度有较大差异, 尤其以 4 号样品特别显著(相似度 = 0.557)。其中相似度较好的是 7 号和 8 号样品, 其次是 5、6 及 9 - 11 号样品。②共有峰的相对峰面积: 11 个厂家的雷公藤制剂中共有峰的峰面积差异极为显著, 相对峰面积 RSD 变化范围为 41.94% ~ 263.92%。③色谱图: 从 11 个厂家雷公藤制剂的指纹图谱上可看出, 9 号与 10 号样品的指纹图谱十分相似; 1 号样品的指纹图谱前 20 min 几乎无色谱峰, 4 号样品的色谱峰主要集中在前 25 min。这些显著差异可能与各厂家雷公藤原药材的产地来源、用药部位、采收时期和生产工艺的不同有关, 该结果清晰的说明了各厂家雷公藤制剂的质量存在显著差异。

表 4 11 个厂家雷公藤制剂共有峰的相对保留时间计算结果¹⁾Table 4 The results of relative retention time of coincident peaks in *Tripterygium* preparations from eleven manufacturers

峰号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	RSD/%
1 *	0.451	0.451	0.451	0.457	0.455	0.453	0.455	0.455	0.455	0.453	0.456	0.47
2 * *	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.00
3	1.524	1.523	1.525	1.521	1.526	1.524	1.527	1.523	1.520	1.518	1.523	0.19
4 *	1.778	1.780	1.782	1.775	1.778	1.783	1.783	1.780	1.778	1.775	1.777	0.15
5	1.810	1.811	1.814	1.805	1.810	1.815	1.814	1.810	1.808	1.807	1.808	0.18
6	1.863	1.865	1.869	1.858	1.863	1.868	1.866	1.863	1.861	1.858	1.860	0.20
7 *	1.982	1.977	1.985	1.971	1.981	1.984	1.984	1.980	1.974	1.969	1.974	0.28
8	2.111	2.114	2.115	2.109	2.114	2.120	2.115	2.109	2.107	2.103	2.105	0.23
9	2.173	2.177	2.178	2.175	2.178	2.191	2.183	2.179	2.175	2.172	2.175	0.25
10	2.250	2.252	2.255	2.240	2.251	2.261	2.253	2.248	2.244	2.239	2.241	0.31
11	2.382	2.384	2.387	2.371	2.382	2.393	2.384	2.377	2.374	2.368	2.370	0.33
12	2.411	2.414	2.417	2.411	2.413	2.425	2.417	2.411	2.407	2.403	2.404	0.26
13	2.553	2.556	2.565	2.547	2.554	2.568	2.559	2.552	2.546	2.539	2.541	0.37
14	2.619	2.621	2.623	2.594	2.621	2.630	2.626	2.618	2.613	2.607	2.609	0.39
15	2.666	2.666	2.671	2.658	2.666	2.682	2.671	2.664	2.659	2.653	2.654	0.32
16	2.738	2.740	2.747	2.733	2.742	2.754	2.750	2.743	2.740	2.732	2.735	0.26
17	2.782	2.784	2.786	2.768	2.782	2.800	2.788	2.781	2.776	2.770	2.770	0.34
18	2.846	2.846	2.854	2.841	2.844	2.861	2.853	2.847	2.839	2.831	2.835	0.31
19	2.893	2.895	2.901	2.880	2.890	2.910	2.901	2.893	2.887	2.878	2.879	0.35
20	2.982	2.982	2.989	2.972	2.979	3.000	2.990	2.983	2.975	2.967	2.969	0.33
21	3.032	3.033	3.029	3.023	3.029	3.051	3.041	3.034	3.024	3.016	3.018	0.33
22 *	3.070	3.072	3.081	3.064	3.051	3.088	3.079	3.075	3.068	3.060	3.060	0.35
23	3.134	3.135	3.144	3.121	3.129	3.154	3.145	3.136	3.127	3.119	3.118	0.37
24	3.274	3.273	3.268	3.258	3.269	3.293	3.285	3.278	3.268	3.260	3.260	0.34
25	3.438	3.437	3.449	3.430	3.438	3.457	3.454	3.449	3.439	3.431	3.431	0.28
26	3.548	3.547	3.562	3.539	3.544	3.567	3.566	3.558	3.551	3.540	3.539	0.30
27	3.653	3.653	3.667	3.645	3.644	3.674	3.670	3.663	3.649	3.638	3.638	0.34
28	3.787	3.782	3.790	3.764	3.778	3.804	3.803	3.795	3.778	3.772	3.772	0.35
29	4.111	4.104	4.123	4.118	4.103	4.122	4.139	4.133	4.113	4.102	4.104	0.30
30	4.170	4.170	4.190	4.159	4.162	4.187	4.198	4.193	4.183	4.170	4.167	0.32
31	4.241	4.244	4.263	4.232	4.234	4.262	4.273	4.268	4.258	4.245	4.243	0.33
32	4.346	4.350	4.371	4.343	4.338	4.365	4.380	4.375	4.365	4.351	4.350	0.32
33	4.395	4.398	4.420	4.393	4.388	4.413	4.430	4.424	4.412	4.400	4.400	0.32
34	4.504	4.507	4.531	4.502	4.496	4.522	4.540	4.534	4.525	4.511	4.510	0.32
35	4.639	4.641	4.667	4.635	4.631	4.657	4.676	4.671	4.661	4.646	4.646	0.33
36	4.689	4.692	4.717	4.697	4.682	4.708	4.728	4.722	4.712	4.697	4.697	0.31
37 *	5.213	5.219	5.246	5.212	5.205	5.235	5.257	5.250	5.243	5.226	5.225	0.33
38	5.332	5.338	5.366	5.324	5.325	5.354	5.378	5.371	5.364	5.346	5.346	0.35

1) * : Identified peak; * * : Reference peak

表 5 11 个厂家雷公藤制剂共有峰的相对峰面积计算结果¹⁾Table 5 The results of relative peak area of coincident peaks in *Tripterygium* preparations from eleven manufacturers

峰号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	RSD/%
1*	0.07	0.11	0.14	0.68	0.34	0.08	0.23	0.20	0.14	0.10	0.23	83.72
2**	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00
3	2.96	1.64	0.62	21.31	2.71	0.86	4.15	1.29	1.18	1.08	1.36	167.97
4*	12.13	4.96	1.12	9.19	3.51	1.20	2.12	1.13	1.30	1.76	1.34	103.41
5	2.28	0.55	0.99	3.53	2.12	0.30	1.44	0.68	0.65	0.80	0.55	78.68
6	14.40	2.23	0.97	4.41	3.55	0.42	1.89	1.10	0.77	1.83	0.62	136.84
7*	3.04	0.32	0.48	1.27	0.84	0.16	0.51	0.30	0.42	0.33	0.27	114.97
8	9.10	0.76	1.07	0.28	2.28	0.14	0.87	1.04	0.76	0.40	0.92	159.33
9	9.00	1.89	0.31	1.52	3.08	1.06	1.25	1.07	2.08	1.02	1.38	110.66
10	50.42	7.06	1.31	1.17	7.71	1.92	2.36	3.10	3.15	3.76	3.30	184.64
11	56.91	12.39	6.07	3.05	12.90	2.57	5.47	5.53	6.94	5.65	6.18	137.82
12	1.91	5.47	10.08	7.00	10.67	3.06	3.66	5.65	6.21	3.47	3.36	51.86
13	111.72	20.26	2.87	5.89	10.35	3.01	4.51	4.70	6.94	6.86	5.98	191.66
14	6.85	1.60	0.63	0.33	1.11	0.51	0.05	0.31	1.16	1.09	0.19	152.40
15	20.57	1.05	0.20	0.43	2.32	2.07	0.57	0.46	1.11	1.42	1.11	207.84
16	43.63	8.97	4.63	4.88	3.15	1.18	2.04	1.31	1.40	1.57	1.58	184.30
17	23.49	1.96	1.46	0.88	2.44	1.42	0.71	1.28	1.77	2.04	2.15	183.77
18	57.19	3.16	0.92	0.61	6.93	2.62	1.86	3.61	1.70	1.93	1.99	220.84
19	40.39	3.26	1.58	0.16	4.04	0.55	0.98	2.24	1.49	1.71	3.39	214.51
20	22.39	4.38	1.52	0.66	2.33	0.44	1.25	1.84	1.67	1.19	1.91	175.53
21	183.14	22.14	10.60	2.57	10.67	6.32	3.63	4.44	8.78	8.61	5.59	218.65
22*	201.93	64.33	33.58	0.23	5.68	10.70	2.70	7.14	21.61	14.37	8.07	174.50
23	296.82	24.14	7.24	0.35	18.69	5.00	4.55	9.47	11.36	7.12	13.38	239.56
24	60.90	3.49	1.78	0.48	5.72	1.78	1.51	2.51	1.33	1.32	1.52	237.43
25	36.71	12.35	6.90	4.64	2.10	1.26	1.58	1.12	1.45	1.37	1.14	165.66
26	102.04	33.14	19.53	11.40	6.06	3.99	4.06	3.18	4.77	3.25	2.90	167.06
27	431.85	25.23	4.66	0.10	25.60	9.96	4.60	5.57	12.14	10.55	12.58	257.58
28	73.70	3.87	1.31	0.69	5.06	0.74	1.42	3.12	1.50	1.36	1.52	252.52
29	71.95	15.70	4.50	0.60	3.74	2.65	0.95	2.29	4.27	3.23	2.26	204.89
30	50.32	21.22	10.50	0.92	0.65	1.60	0.42	0.51	3.83	2.68	2.92	174.44
31	46.42	9.22	3.10	1.58	1.80	1.23	0.78	0.77	1.60	1.21	1.10	216.41
32	20.37	5.70	6.13	0.45	0.99	0.79	0.30	0.92	1.47	1.19	0.37	169.58
33	18.17	4.61	3.39	0.88	0.59	0.79	0.34	0.50	0.35	0.40	0.29	192.70
34	29.72	2.53	1.08	0.67	0.54	0.50	0.10	0.24	0.56	0.37	0.50	262.15
35	26.20	3.62	1.68	1.33	0.54	0.19	0.24	0.41	0.91	0.57	0.88	230.17
36	34.08	1.74	1.91	0.32	0.71	0.84	0.13	0.44	0.78	0.38	0.58	263.92
37*	7.06	0.78	0.94	0.60	0.44	0.36	0.25	0.18	0.31	0.22	0.21	195.37
38	38.88	12.95	1.20	0.04	0.13	0.56	0.05	0.08	1.56	1.34	0.51	226.10

1) *: Identified peak; **: Reference peak

4 4 种效应成分的含量测定

在上述指纹图谱中, 通过对照品的比对确定了其中 6 个成分, 为了能更全面的反映雷公藤制剂的质量, 以下将对雷公藤内酯醇、雷公藤内酯酮、雷酚内酯、雷公藤内酯甲这 4 个效应成分同时进行含量测定 (由于雷公藤内酯三醇的含量较低, 山海

棠二萜内酯 A 的分离度较差, 不易测定, 所以, 不对其进行含量测定)。

4.1 线性关系的考察

对“2.2 项”下各质量浓度梯度的对照品溶液按“2.3”色谱条件测定。以对照品的质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y), 进行回归分析。结果见表 6。

表 6 雷公藤制剂中 4 个效应成分的线性关系

Table 6 Linear relationships of four active components in *Tripterygium* preparations

成分	线性方程	相关系数 r	线性范围/ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)
雷公藤内酯醇 (triptolide)	$y = 32\ 581.0x - 238.2$	0.999 9	0.125 ~ 16.002
雷公藤内酯酮 (triptonide)	$y = 35\ 762.0x - 358.4$	0.999 6	0.502 ~ 32.148
雷酚内酯 (triptophenolide)	$y = 64\ 405.0x - 3830.5$	0.999 9	0.250 ~ 128.100
雷公藤内酯甲 (wilforlide A)	$y = 293.3x - 364.4$	0.999 8	12.495 ~ 399.852

4.2 精密度试验

取上海复旦复华药业有限公司生产的雷公藤制剂 (批号: 130402), 按“2.1”的方法制备供试品溶液, 对同一供试品溶液, 按“2.3”色谱条件连续测定 6 次。结果: 4 种效应成分含量的精密度 RSD 分别为 1.17%、1.24%、0.85%、1.73%。表明仪器在该色谱条件下的精密度良好。

4.3 稳定性试验

取上海复旦复华药业有限公司生产的雷公藤制剂 (批号: 130402), 按“2.1”的方法制备供试品溶液, 对同一供试品溶液分别放置 0、2、4、8、12、24 h 分别测定, 考察 4 种效应成分的稳定性。结果: 4 种效应成分含量的稳定性 RSD 分别为 1.16%、2.37%、3.83%、3.21%。表明这 4 种效应成分在 24 h 内稳定性良好。

4.4 重复性试验

取同一批次的上海复旦复华药业有限公司生产

的雷公藤制剂 (批号: 130402) 6 份, 平行制备 6 份供试品溶液, 分别测定, 考察重复性。结果: 4 种效应成分含量的重复性 RSD 分别为 3.29%、1.61%、2.68%、3.17%。表明该方法重复性良好。

4.5 回收率实验

精密称取已测知雷公藤内酯醇、雷公藤内酯酮、雷酚内酯、雷公藤内酯甲含量的上海复旦复华药业有限公司生产的雷公藤制剂 (批号: 130402) 样品 9 份, 分别加入相当于样品中雷公藤内酯醇、雷公藤内酯酮、雷酚内酯、雷公藤内酯甲已知含量的 80%、100% 和 120% 的对照品溶液后, 分别按“2.1”与“2.3”的方法制备低、中、高质量浓度的供试品溶液各 3 份并测定, 计算平均回收率。结果见表 7。

表 7 雷公藤制剂中 4 个效应成分的回收率实验 ($n=3$)Table 7 Recovery experiments of four active components in *Tripterygium* preparations ($n=3$)

效应成分	低质量浓度 (80%)		中质量浓度 (100%)		高质量浓度 (120%)	
	平均回收率/%	RSD/%	平均回收率/%	RSD/%	平均回收率/%	RSD/%
雷公藤内酯醇 (triptolide)	96.86	3.35	97.20	1.25	103.02	1.31
雷公藤内酯酮 (triptonide)	96.46	2.49	104.51	3.58	97.32	1.11
雷酚内酯 (triptophenolide)	97.46	1.02	98.24	1.42	98.97	1.02
雷公藤内酯甲 (wilforlide A)	103.73	2.28	99.52	0.48	96.96	2.63

4.6 样品测定

按“2.1”的方法分别制备各厂家雷公藤制剂的供试品溶液, 在“2.3”色谱条件下测定, 以外标准曲线法计算各厂家雷公藤制剂中 4 种效应成分的含量, 结果见表 8。

4.7 含量测定结果的分析

以上数据显示: 11 个厂家雷公藤制剂中的 4 种效应成分含量有显著地差异, 制剂中 4 种效应成

分的最高与最低含量分别相差 64.0、15.5、250.5、6.0 倍。其中 8-11 号样品中 4 种效应成分的含量都较高, 1-2 号样品中 4 种效应成分的含量均较低。部分样品含量参差不齐, 如: 4 号样品中雷公藤内酯酮的含量最高, 而雷酚内酯的含量却最低。这些主要的活性与毒性成分的含量参差不齐, 表明目前市售雷公藤制剂的质量差异较大, 可能会影响临床使用的有效性与安全性。

表 8 雷公藤制剂中 4 个效应成分的含量测定结果 ($\bar{x} \pm SD$, $n=3$, 样品编号与表 1 相同)Table 8 Assay results of four active components in *Tripterygium* preparations ($\bar{x} \pm SD$, $n=3$, sample No. same as Table 1)

样品号	雷公藤内酯醇	雷公藤内酯酮	雷酚内酯	雷公藤内酯甲
1	0.81 ± 0.04	8.65 ± 0.22	79.78 ± 3.16	616.73 ± 11.40
2	2.57 ± 0.09	11.48 ± 0.17	82.63 ± 1.75	226.36 ± 7.87
3	6.34 ± 0.17	6.50 ± 0.11	107.46 ± 4.54	662.40 ± 8.32
4	12.09 ± 0.17	100.97 ± 0.25	1.69 ± 0.31	807.90 ± 13.80
5	26.04 ± 0.58	83.27 ± 1.42	75.04 ± 0.71	1 285.57 ± 15.40
6	16.08 ± 0.40	17.57 ± 0.30	87.14 ± 0.83	653.30 ± 10.61
7	31.28 ± 0.35	60.44 ± 0.39	42.95 ± 0.74	861.55 ± 15.76
8	45.34 ± 0.79	46.48 ± 0.89	163.98 ± 1.80	901.40 ± 9.69
9	38.74 ± 0.67	45.97 ± 0.61	423.38 ± 1.20	1 347.48 ± 8.04
10	51.85 ± 1.76	83.34 ± 1.67	376.94 ± 2.48	1 252.07 ± 9.80
11	50.01 ± 1.54	61.26 ± 1.02	204.24 ± 2.84	1 169.99 ± 8.99

5 讨论

5.1 UPLC 色谱条件的选择

在参考文献 [8-12, 17] 的基础上, 本研究分别摸索了 BEH Shield RP18 (2.1 × 100 mm, 1.7 μm)、XSELECT CSH C18 (2.1 mm × 100 mm, 2.5 μm)、Hypersil GOLD C18 (2.1 mm × 100 mm, 5.0 μm) 色谱柱, 乙腈-水、甲醇-水、乙腈-0.1% 甲酸 (φ) 水、甲醇-0.1% 甲酸 (φ) 水的流动相, 215、220、225、230、264 nm 的检测波长, 梯度与等度的洗脱程序等, 根据各条件下的出峰时间、分离度和色谱峰形, 最终确定了以 BEH Shield RP18 (2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm) 为色谱柱、乙腈-水为流动相、220 nm 为最佳检测波长、梯度洗脱等为 UPLC 指纹图谱及 4 个效应成分含量测定的色谱条件。

5.2 样品处理方法的选择

5.2.1 提取溶剂的选择 在雷公藤制剂提取时, 参考以往文献, 考察了无水乙醇提取 2 次、乙酸乙酯提取 2 次、乙酸乙酯和甲醇各提取 1 次对制剂中化学成分的提取率, 结果表明: 以无水乙醇为提取溶剂, 提取 2 次, 主要成分提取较完全。

5.2.2 溶解样品溶剂的选择 由于雷公藤制剂中成分的极性差别较大, 加之梯度洗脱初始比例为 15% 乙腈 (φ) - 水, 用纯乙腈溶解样品的色谱图峰形较差。因此, 本实验研究比较了用 50% 乙腈 (φ) - 水, 75% 乙腈 (φ) - 水, 100% 乙腈 (φ) 来溶解样品。结果表明, 用 50% 乙腈 (φ) - 水来溶解样品的色谱图峰形最佳, 且雷公藤内酯醇及主要成分的峰面积较大。

5.3 特征参照峰的选择

雷公藤内酯醇是雷公藤药材及制剂中已知主要的有效成分之一, 亦是有毒成分之一。在以往文献中, 雷公藤内酯醇也常作为雷公藤药材及制剂质量检测的指标。在本课题建立的色谱条件下, 雷公藤内酯醇峰形良好, 与相邻色谱峰分离度较好, 且雷公藤内酯醇的对照品容易获得。因此, 选择雷公藤内酯醇作为特征参照峰。

6 总结

本研究在以往的基础上建立了一种可快速检测雷公藤制剂质量的 UPLC 检测方法, 并利用该方法对 11 个厂家的雷公藤制剂进行指纹图谱研究及制剂中主要有效成分的含量进行测定, 发现不同厂家雷公藤制剂中的指纹图谱和主要有效成分的含量都有显著地差异。该方法既快速又准确, 可为市售雷公藤制剂质量的整体控制提供更全面的评价和参考。

参考文献:

- [1] XUE M, JIANG Z Z, WU T, et al. Anti-inflammatory effects and hepatotoxicity of *Tripterygium*-loaded solid lipid nanoparticles on adjuvant-induced arthritis in rats[J]. *Phytomedicine*, 2012, 19(11): 998-1006.
- [2] WAN L, LIU J, HUANG C B, et al. Effect of tripterygium glycosides on pulmonary function in adjuvant arthritis rats [J]. *J Chin Med Assoc*, 2013, 76(12): 715-723.
- [3] DU Y, HOU L, ZHAO C G, et al. Treatment of children with Henoch-Schonlein purpura nephritis with mycophenolate mofetil [J]. *Pediatr Nephrol*, 2012, 27(5): 765-771.

- [4] 杨辉,严鲁萍. 雷公藤多苷对免疫影响的研究进展[J]. 贵阳中医学院学报,2004,26(2): 55-58.
- [5] WAN Y G, ZHAO Q, SUN W, et al. Contrasting Dose-Effects of Multi-glycoside of *Tripterygium wilfordii* Hook f. on glomerular inflammation and hepatic damage in two types of anti-Thy1.1 glomerulonephritis[J]. J Pharmacol Sci,2012,118(4): 433-446.
- [6] DAN H, PENG R L, AO Y, et al. Segment-specific proximal tubule injury in *Tripterygium Glycosides* intoxicated rats [J]. J Biochem Mol Toxicol,2008,22(6): 422-428.
- [7] 杨小红,张伟程. 雷公藤制剂的应用及其副作用[J]. 中医药临床杂志,2004,16(5): 511.
- [8] 高旋,宋敏,庄莹,等. 雷公藤药材及制剂的 HPLC 指纹图谱研究[J]. 药物分析杂志,2009,29(5): 702-709.
- [9] 黄文华,郭宝林,斯金平,等. 雷公藤药材 HPLC 指纹图谱研究[C]//第五届全国雷公藤学术会议论文汇编. 泰宁,2008.
- [10] 董林毅,张庆伟,段宏泉,等. 雷公藤药材 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 中国药学杂志,2009,44(6): 422-426.
- [11] 库尔班江,赛得合买提,张焱,等. 雷公藤药材高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 喀什师范学报,2009,30(3): 48-52.
- [12] 林文津,于虹敏,徐榕青,等. 雷公藤根木质部与根皮 HPLC 指纹图谱比较研究[J]. 药物分析杂志,2013,33(3): 419-423.
- [13] 邵莉,谢培山. 雷公藤色谱指纹图谱方法学研究及质量评价[J]. 中药新药与临床药理,2013,24(3): 289-293.
- [14] ZHUO R G, ZHANG L X, WANG L, et al. Rapid simultaneous quantitative determination of terpenoids in *Tripterygium wilfordii* Hook f. by ultra high-performance liquid chromatography coupled with quadrupole time-of-flight mass spectrometry [J]. Anal Methods, 2013, 5(8): 2046-2052.
- [15] MEUSSEN B J, VAN ZEELAND A N T, BRUINS M E, et al. A fast and accurate UPLC method for analysis of proteinogenic amino acids [J]. Food Anal Methods, 2014, 7(5): 1047-1055.
- [16] KUMAR M, SHARMA G, SINGLA D, et al. Development of a validated UPLC method for simultaneous estimation of both free and entrapped (in solid lipid nanoparticles) all-trans retinoic acid and cholecalciferol (vitamin D-3) and its pharmacokinetic applicability in rats [J]. J Pharm Biomed Anal, 2014, 91, 73-80.
- [17] 林惠贞,刘文浩,韦玮,等. 鸡血藤药材中原儿茶酸的含量测定[J]. 中山大学学报:自然科学版,2014,53(1):89-92.