维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)07-0862-02

RP-HPLC 法测定雷公藤甲素外用凝胶中雷公藤甲素的含量

李 燕,刘 新

(重庆医科大学药学院天然药物化学教研室 药物重庆市高校工程研究中心,重庆 400016)

【摘 要】目的:建立 RP-HPLC 法测定雷公藤外用凝胶中雷公藤甲素的含量。方法:采用 Diamonsil C_{18} 色谱柱(250mm × 4.6mm i.d,5 μm),检测波长为 220nm,流动相为甲醇 : 水(46 : 54),流速 1ml/min,柱温为室温。结果:在 10.24 ~ 51.20 μg/ml 间,雷公藤甲素的浓度与峰面积积分值呈良好的线性关系(r=0.999 7),方法回收率为 98.3%,RSD 为 0.23%(n=5)。结论:此方法准确、简便,可用于雷公藤甲素外用凝胶中雷公藤甲素的含量测定。

【关键词】高效液相色谱法;雷公藤甲素;凝胶

【中国图书分类法分类号】R917.7 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-10-23

RP-HPLC determination of triptolide in triptolide gel

LI Yan, et al

(*Department of Natural Medicinal Chemistry, College of Pharmacy, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To develop an HPLC method for the assay of the content of triptolide in triptolide gel. *Methods*: The content of triptolide was measured by HPLC on Diamonsil C_{18} column(250mm × 4.6mm i.d,5 μm)using methanol-water(46 : 54, v/v)as mobile phase, at a flow rate of 1.0ml/min. The UV detection was set at 220nm. *Results*: The calibration curve was proved to be linear in the range of 10.24~51.20 μg/ml with a regression coeficient of 0.999 7. The average recovery of the method was 98.3%; RSD was 0.23%(n=5). *Conclusion*: This method is found to be rapid and accurate for the measurement of triptolide in triptolide gel.

【Key words】 HPLC; Triptolide; Gel

雷公藤是卫矛科雷公藤属植物,含有萜类、生物碱、苷类等多种单体有效成分,其中雷公藤甲素为二萜内酯化合物,是治疗类风湿性关节炎的主要活性成分。雷公藤甲素外用凝胶是我实验室研制的治疗类风湿关节炎的外用制剂。雷公藤甲素是该制剂活性成分,但是又具有较强的毒副作用[1],因此为使药品安全有效,控制制剂中雷公藤甲素的含量十分必要。本实验建立了 RP-HPLC 法测定该制剂中雷公藤甲素的含量,用以制剂质量控制,现报道如下。

1 仪器与试剂

2010 高效液相色谱仪 (岛津);KQ2200B 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。雷公藤甲素对照品(福建省医学科学研究所提供);甲醇(色谱纯);双蒸水(本实验室自制);雷公藤甲素外用凝胶(本实验室自制)。

作者介绍:李 燕(1980-),女,硕士,
研究方向:中药制剂、中药质量标准。
通讯作者:刘 新,男,副教授,E-mail:liuxin8829@sina.com。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Diamonsil C_{18} 色谱柱(250mm × 4.6mm i.d,5 μm);流动相:甲醇 — 水(46 : 54);流速:1ml/min;检测波长:220nm;进样量:20 μl;柱温:室温。在上述条件下,雷公藤甲素峰与杂质峰分离完全,对称性好,分离度不小于 1.5,理论塔板以雷公藤甲素峰计不低于 7 000,对照品及样品的色谱图见图 1。

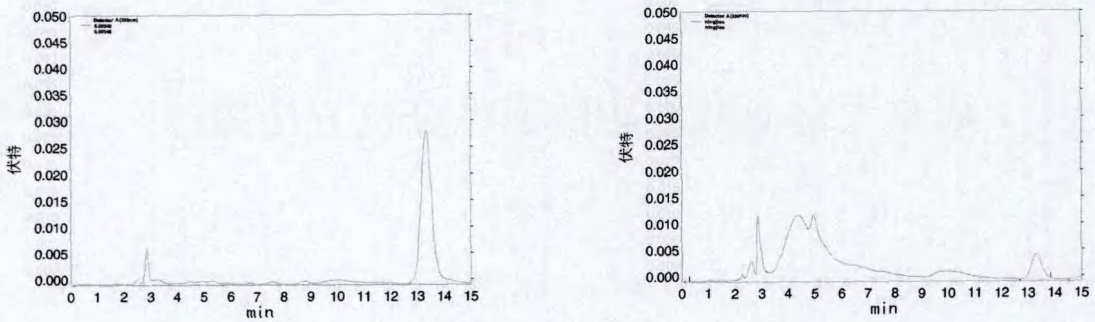
2.2 对照品溶液的制备

取雷公藤甲素适量,精密称定,用甲醇制成每 1ml 含 0.256mg 的溶液,作为对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取雷公藤甲素外用凝胶 4.5g,精密称定,用甲

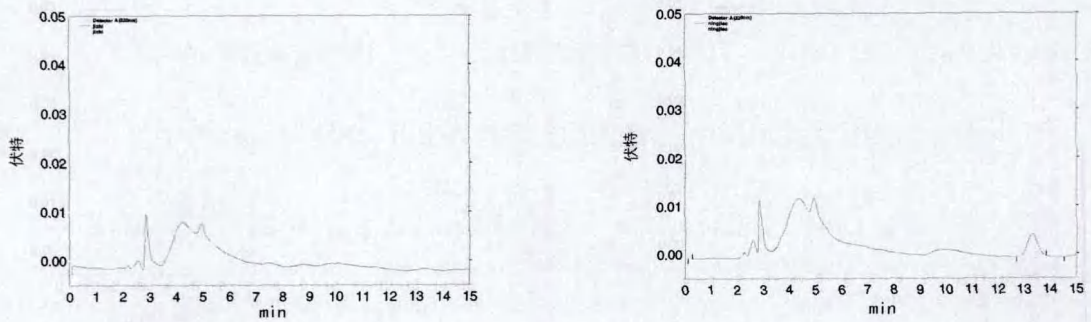
维普资讯 http://www.cqvip.com



A B

A. 对照品；B. 样品

图 1 高效液相色谱图



C D

C. 空白凝胶；D. 样品

图 2 高效液相色谱图

醇溶解，转移至 50ml 容量瓶中，定容，超声萃取 15min，放冷至室温，补充甲醇至刻度，摇匀，取适量，0.45μm 微孔滤膜滤过，取续滤液做为供试品溶液。

2.4 空白试验

取按处方制备不含雷公藤甲素的空白凝胶基质，同 2.3 项下处理，制成空白供试液，注入高效液相色谱仪。结果其色谱图中在与雷公藤甲素相应的位置无色谱峰，即基质对检测无干扰，见图 2。

2.5 线性关系及线性范围

分别精密吸取雷公藤甲素对照品溶液，制成浓度分别为 10.24 μg/ml、20.48 μg/ml、30.72 μg/ml、40.96 μg/ml 和 51.20 μg/ml 的对照品甲醇溶液，依法分别进样测定。以雷公藤甲素峰面积积分值(Y)对浓度(X)进行线性回归分析，求出线性回归方程为：Y=4E+07X+19 884，r=0.999 7，表明在 10.24～51.20 μg/ml 范围内雷公藤甲素的浓度与其峰面积积分值呈良好的线性关系，在信噪比为 10∶1 时测得最低检测限为 51.20ng/ml。

2.6 精密度试验

精密吸取同一供试品溶液，连续进样 5 次，测定雷公藤甲素的峰面积，计算其 RSD=0.38%，表明精密度良好。

2.7 稳定性试验

取同一份供试品溶液，分别在 0、2、4、8、12h 依法测定雷公藤甲素峰面积，计算 RSD=2.33%。表明供试品溶液在 12h 内稳定性良好。

2.8 重现性试验

取同一批次样品 5 份，按照 2.3 方法处理制备供试液，按以上色谱条件测定雷公藤甲素峰面积，计算其 RSD=1.17%。表明方法重复性较好，方法可行。

2.9 方法回收率试验

精密称取凝胶基质 5 份，每份精密加入对照品，按照 2.3 项下方法处理制备供试液，测定，计算

(下转第 867 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

织,这是目前大多文献采用的方法。而本实验中的实验组则是按照每隔 1min 为一个时间点剪取心肌组织(以心尖部为主),取 10 个时间点,切记注意不要剪破心腔以免影响灌流。即使一小块心肌组织(1mm × 1mm) 也可分离出大量状态很好的心肌细胞。本实验结果显示实验组的心肌细胞活性明显较对照组高($P<0.05$)。由于成年大鼠心肌细胞分离操作复杂、影响因素多,且各实验室实验条件不同、实验者对成年大鼠心肌细胞急性分离技术掌握的熟练程度不同,故很难获得高质量又高数量的心肌细胞。分多个时间点多个部位有选择性采集心肌组织可以保证心脏能稳定地获得高质量高数量的心肌细胞,这为膜片钳实验的成功提供了良好的标本。

以上是笔者经过本实验的个人体会,现总结如下:(1)消化酶采用 Warshington 公司的胶原酶Ⅱ对心肌细胞分离效果较好,酶浓度为 0.6mg/ml。(2)确保离体心脏在灌流装置的悬挂端的温度是 37℃,心肌细胞的贮存温度以 4℃为宜。(3)形态好,横纹清晰,折光好的心肌细胞不需梯度复钙,可直接置于细胞外液中进行下一步实验。(4)按照每隔 1min 为一个时间点,分多个时间点采集心肌组织(以心尖部为主),可较稳定地获得高质量高数量的心肌细胞。最后,心肌细胞分离的每一步都很重要,在实验中要认真仔细,手法得当,否则都可能影响到心肌细胞的获得。

参 考 文 献

[1] Li YG,Shi YK,Chen HW,et al. Isolation and culture of adult rat ventricular cardiomyocytes[J]. West China Medical Journal,2005;20(2):308-309.

[2] Tytgat J.How to isolate cardiac myocytes[J]. Cardiovasse Res,1994;28(2):280-286.

[3] 刘恭鑫,顾全堡,郭 棋,等.大鼠、豚鼠心肌细胞的简单、快速分离[J]. 中国应用生理学杂志,1997;13(4):361-362.

[4] Wolska BM,Solaro RJ.Method for isolation of adult mouse myosytes for studies for contraction and microfluorimentrey[J]. Am J Physiol,1996;271(3):1250-1255.

[5] Dow JW,Harding NG,Powell T.Isolated cardiacmy-ocytes.I. Preparation of adlt myocytes and their homology with the intact tissue[J]. CardiovascRes,1981;15(9):483-514.

[6] Xu H,Tao J,Chen J,et al. Isolation of Ca^{2+} tolerant cardiomyocytes from a adult rats for patch clamp studies[J]. J Nanjing Med Univ,2004;18(1):4-6.

(责任编辑:关蕴良)

(上接第 863 页)

回收率,结果平均回收率为 98.3%,RSD=0.23%。由结果可知回收率较好,方法可行。

2.10 凝胶中雷公藤甲素的含量测定

分别精密吸取对照品溶液和供试品溶液 20μl,注入高效液相色谱仪,依法测定,3 批雷公藤甲素外用凝胶的含量测定结果见表 1。

表 1 雷公藤甲素外用凝胶中雷公藤甲素的含量

批次	含量 mg/(g 凝胶)	平均值 mg/(g 凝胶)
20070701	0.027 9	
20070702	0.027 8	0.027 8
20070703	0.027 8	

3 讨 论

笔者曾用文献报道的高效液相色谱条件[2-4]行制剂中的雷公藤甲素的分离测定,发现雷公藤甲素的色谱峰不能与杂质峰很好的分离,分离度不符合要求。通过实验,从甲醇 - 水的 40:60,45:55,46:54,55:45,60:40 比例中最后确定 46:54 的甲醇 - 水为流动相,使雷公藤甲素色谱峰与其它杂质峰可以得到很好的分离,且保留时间合适。

参 考 文 献

[1] 韦登明,黄光照.雷公藤及其单体的药理和毒理病理学进展[J]. 中药材,2003;26(12):894-897.

[2] 申 琳,邹爱英.HPLC 法测定雷公藤粗制品中雷公藤甲素的含量[J]. 天津药学,2005;17(4):28-29.

[3] 王 琳,蔡宝昌,王曙东,等.RP-HPLC 法测定雷公藤甲素缓释片的释放度[J]. 中国新药志,2005;14(12):1438-1440.

[4] 婧 会,赵惠茹,张宇洁,等.RP-HPLC 法测定雷公藤甲素脂质体中雷公藤甲素的含量[J]. 陕西中医学院学报,2006;29(1):57-58.

(责任编辑:冉明会)