

# 雷公藤多苷中雷公藤对醌 B 的 LC-MS 定性和 HPLC 定量分析

付辉政<sup>1</sup>, 钟瑞建<sup>1\*</sup>, 罗跃华<sup>1</sup>, 王栋<sup>1</sup>, 周国平<sup>1</sup>, 张东明<sup>2</sup>, 万凯化<sup>3</sup>

- (1. 江西省食品药品检验所, 南昌 330029;
2. 中国医学科学院 & 北京协和医学院药物研究所, 北京 100050;
3. 江西省药品不良反应监测中心, 南昌 330046)

**[摘要]** **目的:**建立雷公藤多苷中雷公藤对醌 B 定性分析和含量测定方法。**方法:**利用高效液相色谱-电喷雾-质谱 (HPLC-ESI-MS) 联用结合 LC-DAD 技术, 通过和标准化化合物雷公藤对醌 B 的保留时间、紫外吸收光谱以及质谱中的准分子离子峰  $[M + Na]^+$  相对照, 快速鉴定雷公藤多苷中的雷公藤对醌 B, 对其含量的测定则采用了高效液相色谱方法。**结果:**一级质谱扫描结果表明雷公藤多苷中保留时间  $t_R = 13.2$  min 的峰化合物结构为雷公藤对醌 B, 准分子离子峰  $[M + Na]^+$  为 353.1, 高效液相色谱结果表明雷公藤多苷中雷公藤对醌 B 在  $0.115 \sim 1.15 \mu\text{g}$  呈良好的线性关系 ( $r = 0.9999$ ), 平均回收率和 RSD 分别为 99.32%, 0.7%。**结论:**该方法简便、准确, 可作为雷公藤多苷中雷公藤对醌 B 的含量测定方法。

**[关键词]** 液相-质谱联用; 反相高效液相色谱; 雷公藤多苷; 雷公藤对醌 B; 含量测定

**[中图分类号]** R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)20-0084-04

**[doi]** 10.11653/syjf2013200084

## Determination of Triptoquinone B in Tripterygium Glycosides by LC-MS Analysis and HPLC

FU Hui-zheng<sup>1</sup>, ZHONG Rui-jian<sup>1\*</sup>, LUO Yue-hua<sup>1</sup>, WANG Dong<sup>1</sup>, ZHOU Guo-ping<sup>1</sup>,  
ZHANG Dong-ming<sup>2</sup>, WAN Kai-hua<sup>3</sup>

- (1. Jiangxi Institute for Food and Drug Control, Nanchang 330029, China; 2. Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China;
3. Center for ADR Monitoring of Jiangxi, Nanchang 330046, China)

**[Abstract]** **Objective:** To develop an analytic method for determination of triptoquinone B in tripterygium glycosides. **Method:** The HPLC-ESI-MS and HPLC-DAD methods were established. Triptoquinone B in tripterygium glycosides was quickly identified by comparing the retention time, UV absorption spectrum and quasi-molecular ion peak  $[M + Na]^+$  with the reference compound. The content of triptoquinone B in tripterygium glycosides was determined by HPLC. **Result:** One level mass spectrometry scanning results showed that the chromatographic peak of retention time  $t_R = 13.2$  min was identified as triptoquinone B, and its quasi-molecular ion peak  $[M + Na]^+$  was 353.1. The calibration curves of triptoquinone B was linear between  $0.115 \sim 1.15 \mu\text{g}$  ( $r = 0.9999$ ). The average recovery and the relative standard deviation were 99.32% and 0.7% respectively. **Conclusion:** The method is simple, accurate and could be used for determination of triptoquinone B in tripterygium glycosides.

**[Key words]** LC-MS; RP-HPLC; tripterygium glycosides; triptoquinone B; assay

**[收稿日期]** 20121113(003)

**[基金项目]** 国家药典委员会项目(TS-33)

**[第一作者]** 付辉政, 博士, 助理研究员, 从事天然产物活性成分及质量标准研究, Tel: 0791-86217386, E-mail: fhzhz620@sohu.com

**[通讯作者]** \* 钟瑞建, 主任药师, 从事中药活性成分及质量标准研究, Tel: 0791-88158786, E-mail: zhongrj@jxfda.gov.cn

雷公藤是卫矛科雷公藤属一年生藤本植物,主要化学成分是二萜、三萜、倍半萜、生物碱及糖等,目前从雷公藤中分离出的活性化学单体不下 70 种,临床应用广泛且疗效显著,但引起肝毒性的报道也时有发生,雷公藤有效成分研究结果显示雷公藤对醌 B 为其主要有效成分之一,具有抗炎、调节免疫的作用<sup>[1]</sup>。雷公藤多苷为雷公藤去皮根提取物,具有抗炎及抑制细胞免疫和体液免疫作用,用于类风湿关节炎、肾病综合症、自身免疫性肝炎等治疗<sup>[2]</sup>。雷公藤制剂应用多年,对各种自身免疫性疾病疗效显著,但临床常有不良反应发生,甚至有中毒死亡的病历发生<sup>[3]</sup>,因此,雷公藤制剂的减毒增效成为近年研究焦点,应用中药复方配伍、改变剂型及结合现代生物技术降低雷公藤制剂毒副作用有广阔的应用前景。研究表明,雷公藤多苷片有较强的抗炎及免疫抑制作用,是目前临床上使用较多的非甾体类免疫抑制剂,其生理活性是由多种成分(二萜内酯、生物碱、三萜等)协同产生的<sup>[4]</sup>。据文献报道,雷公藤多苷片与来氟米特联合使用在治疗大鼠类风湿性关节炎方面取得较好的临床效果<sup>[5]</sup>。雷公藤多苷作为雷公藤多苷片的原料,至今没有质量标准来控制其质量,为此,笔者在对 2010 年版《中国药典》雷公藤多苷质量标准研究中,除了将雷公藤多苷片中原有的雷公藤甲素和雷公藤内酯甲作为雷公藤多苷指标成分外,增加了雷公藤中有效成分雷公藤对醌 B 作为指标成分进行含量测定。本文利用 HPLC-ESI-MS 技术分离鉴定了雷公藤多苷中的雷公藤对醌 B 成分,对其含量的测定则采用了高效液相色谱方法,旨在通过方法学研究,建立高效液相色谱法测定雷公藤多苷中雷公藤对醌 B 含量的方法,为雷公藤多苷的质量控制提供定量分析方法。

## 1 材料

Agilent1100 series LC/MSD Trap 质谱仪(美国安捷伦科技有限公司),Agilent1100 高效液相色谱仪(包括 DAD 检测器,自动进样器,Agilent1100 化学工作站)(美国安捷伦科技有限公司),Sartorius 电子天平(德国赛多利斯公司),KQ3200 型超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

甲醇为色谱纯,水为纯净水,其他试剂均为分析纯。雷公藤对醌 B 对照品为本实验室自制,通过各种波谱学确证了其结构,并经中国药品生物制品检定所检定,质量分数为 100%(面积归一法测得);雷公藤多苷样品由江苏美通制药有限公司(批号 080509,080603,080418),浙江得恩德制药有限公司

(批号 0803701,0705701,0711701,0808701,0708702,0802701,0803701,0808701)和湖南协力药业有限公司(批号 20070806,20050501,20060302,20090302)提供。

## 2 方法与结果

### 2.1 定性分析

**2.1.1 实验条件** 液相色谱条件:流动相甲醇-水(54:46),柱温 25 ℃,检测波长 262 nm,流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>,进样量 5 μL。质谱条件:雾化气 40.0 psi,干燥气流量 9.0 L·min<sup>-1</sup>,喷雾电压 3.5 kV,温度 330 ℃,扫描方式,正离子扫描,扫描范围(*m/z*) 100~1 000。

**2.1.2 样品中雷公藤对醌 B 指标成分的确定** 选择甲醇-水(54:46),25 min 内可将各样品中组分较好分离,液相色谱图和总离子流图如图 1。其中样品中与雷公藤对醌 B 对照品保留时间相同的峰,紫外吸收光谱一致,并且在 262 nm 处均有最大吸收峰。

**2.1.3 样品中雷公藤对醌 B 分子量测定** 图 1E 为样品中保留时间  $t_R = 13.2$  min 质谱扫描图,图 1F 为雷公藤对醌 B 对照品保留时间  $t_R = 13.2$  min 质谱扫描图,两者的准分子离子峰离子峰  $[M + Na]^+$  相同均为 353.1。可看出两者质谱碎片扫描基本相同,可认定两者是同一成分。

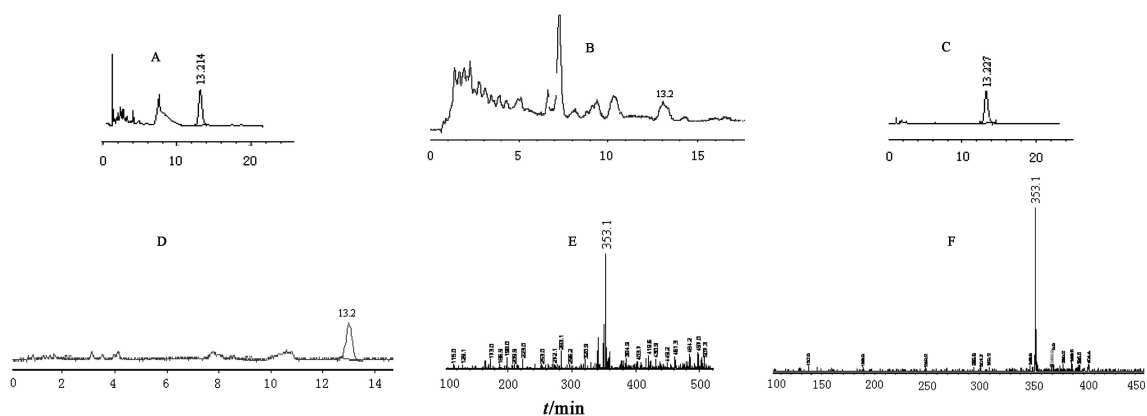
### 2.2 含量测定

**2.2.1 色谱条件** YMC-pack ODS-A C<sub>18</sub> 色谱柱(4.6 mm × 150 mm, 5 μm),流动相甲醇-水(54:46),流速 1.0 mL·min<sup>-1</sup>。理论板数以雷公藤对醌 B 计算不得低于 3 000。在以上色谱条件下,雷公藤多苷中雷公藤对醌 B 与其他组分的色谱峰分离度良好,见图 1。

**2.2.2 供试品溶液的制备** 取雷公藤多苷(批号 080603) 0.1 g,精密称定,用适量甲醇使溶解,加 0.5 g 硅胶拌样,干法上样至硅胶柱(6.0 g,160~220 目,内径 1.0 cm,正己烷-乙酸乙酯(5:1)湿法装柱),先用 50 mL 正己烷-乙酸乙酯(5:1)洗脱,弃去洗脱液,再用正己烷-乙酸乙酯(1:1)80 mL 洗脱,蒸干,残渣用甲醇使溶解并定量转移至 10 mL 量瓶中,摇匀,即得。

**2.2.3 对照品溶液的制备** 精密称取雷公藤对醌 B 对照品 10 mg,精密称定,置 100 mL 量瓶中,加甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

**2.2.4 线性关系考察** 精密吸取上述对照品溶液 1,2,3,4,5,10 μL,注入液相色谱仪,按 2.2.1 测



A. 样品 HPLC 色谱; B. 样品中主要成分总离子流色谱; C. 雷公藤对醌 B 对照品液相色谱; D. 雷公藤对醌 B 对照品总离子流色谱;  
E. 样品中保留时间  $t_R = 13.2$  min 的 MS; F. 雷公藤对醌 B 对照品的 MS

图 1 雷公藤 HPLC 色谱

定峰面积,以对照品进样量  $X$  ( $\mu\text{g}$ )为横坐标,峰面积积分值  $Y$ 为纵坐标,绘制标准曲线,回归方程为  $Y = 1\,274.9X + 9.0164$  ( $r = 0.999\,9$ ),表明雷公藤对醌 B 在  $0.115 \sim 1.15 \mu\text{g}$  与峰面积呈良好的线性关系。

**2.2.5 精密度试验** 精密吸取供试品溶液(批号 080603),按 2.2.1 条件,重复进样 6 次,雷公藤对醌 B 峰面积 RSD 0.8%。

**2.2.6 稳定性试验** 精密吸取供试品溶液(080603),按 2.2.1 条件,于配制后的 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 h 分别进样  $5 \mu\text{L}$ ,测定,供试品溶液中雷公藤对醌 B 在 12 h 内峰面积无明显变化,其雷公藤对醌 B 面积 RSD 0.9%。

**2.2.7 重复性试验** 取雷公藤多苷(批号 080603),照 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,按 2.2.1 条件,将样品重复测定 6 次,样品中雷公藤对醌 B 平均含量为  $9.498\,8 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ ,RSD 0.4%。

**2.2.8 加样回收率试验** 采用加样回收试验,取已知含量的雷公藤多苷(批号 080603)适量,研细,每份  $0.05 \text{ g}$ (含雷公藤对醌 B  $0.474\,94 \text{ mg}$ ),精密称定,分别按低、中、高 3 个不同水平精密加入雷公藤对醌 B 对照品溶液( $0.196 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )  $1.5, 2.5, 4.0 \text{ mL}$  各 3 份,制备供试品溶液,分别进样  $5 \mu\text{L}$ ,平均回收率为 99.32%,RSD 0.7%,见表 1。

**2.2.9 样品含量测定** 取批号不同的雷公藤多苷 15 批,照 2.2.2 项下方法制备供试品溶液,精密吸取雷公藤对醌 B 对照品溶液与供试品溶液各  $5 \mu\text{L}$ ,分别注入色谱仪,测定,计算雷公藤对醌 B 的质量分数,见表 2。

表 1 雷公藤多苷中雷公藤对醌 B 加样回收率试验

取样量 /g	样品中量 /mg	添加量 /mg	测得量 /mg	回收率 /%	平均回收率 /%	RSD /%
0.051 3	0.4873	0.294	0.7812	99.97		
0.051 6	0.490 1	0.294	0.779 8	100.24		
0.051 9	0.493 0	0.294	0.781 2	98.03		
0.051 0	0.484 4	0.490	0.969 9	99.08		
0.047 1	0.447 4	0.490	0.935 6	99.63	99.32	0.7
0.047 3	0.449 3	0.490	0.939 4	100.02		
0.046 3	0.439 8	0.784	1.211 7	99.22		
0.049 5	0.470 2	0.784	1.243 4	98.62		
0.050 8	0.482 5	0.784	1.259 1	99.06		

表 2 雷公藤多苷中雷公藤对醌 B 的测定 ( $n = 3$ )

批号	雷公藤对醌 B/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$	RSD/%
080603	9.498 8	0.4
080418	9.411 6	0.4
080509	10.220 6	0.2
0803701	1.812 0	1.6
0705701	2.853 0	0.4
0711701	1.713 4	2.0
0808701	2.793 2	2.0
0708702	4.851 6	1.5
0802701	1.541 6	1.8
0803701	1.130 6	1.7
0808701	1.685 3	2.0
20070806	4.084 1	1.7
20050501	3.559 6	0.7
20060302	3.559 0	0.5
20090302	4.615 0	1.6

### 3 讨论

**3.1 指标成分的选择** 雷公藤多苷作为雷公藤多苷片的原料,至今没有质量标准来控制其质量,雷公藤有效成分研究结果显示雷公藤对醌 B 为其主要有效成分之一,具有抗炎、调节免疫的作用。因此,选择雷公藤多苷中活性成分作为其质量控制指标成分,具有重要的意义。

**3.2 色谱条件优化** 质谱条件下选择多反应监测(MRM)进行质谱扫描,确定雷公藤对醌 B 在正离子模式响应更好。在流动相选择方面,甲醇-水系统的分离效果优于乙腈-水系统。

**3.3 雷公藤对醌 B 的准确性** 雷公藤对醌 B 为本实验室自制,通过各种波谱技术(包括一维和二维核磁共振谱以及质谱)确证了其结构,利用高效液相色谱-电喷雾-质谱(HPLC-ESI-MS)联用结合 LC-DAD 技术,通过和标准化合物雷公藤对醌 B 的保留时间、紫外吸收光谱以及质谱中的准分子离子峰  $[M + Na]^+$  相对照,快速鉴定雷公藤多苷中的雷公藤对醌 B,这样既保证了样品中雷公藤对醌 B 的准确性,同时也确证了样品中雷公藤对醌 B 不含其他杂峰,保证了峰的唯一性。

**3.4 提取方法的考察** 在样品含量测定中如用甲醇溶解直接进样,雷公藤对醌 B 峰能与前后杂质峰分开,且能达到基线分离,但前后杂质峰太多,导致分离效果佳的色谱图不能重现,因此,对样品提取方法进行了一些处理,采用 2.2.2 项下样品处理方法,结果发现样品经处理后杂质峰很少,且杂质峰对目标峰无干扰。

**3.5 溶剂用量的考察** 取雷公藤多苷 0.1 g,精密称定,用适量甲醇使溶解,加 0.5 g 硅胶拌样,干法上样至硅胶柱[6.0 g,160~220 目,内径 1.0 cm,正己烷-乙酸乙酯(5:1)湿法装柱],先用 50 mL 正己

烷-乙酸乙酯(5:1)洗脱,收集为 1 份,再用正己烷-乙酸乙酯(1:1)洗脱,分 3 段收集洗脱液,每段 40 mL,蒸干,残渣分别用甲醇使溶解并定量转移至 10 mL 量瓶中,摇匀,即得,见表 3。

由表 3 可知用正己烷-乙酸乙酯(5:1)50 mL 洗脱液对雷公藤对醌 B 没有影响,另外当用正己烷-乙酸乙酯(1:1)洗脱至第 3 份时已洗脱完毕。故选择正己烷-乙酸乙酯(1:1)80 mL 作为洗脱量。

表 3 洗脱液分段收集比较试验

收集 4 份	峰面积
正己烷-乙酸乙酯(5:1)50 mL 洗脱液第 1 份	0
正己烷-乙酸乙酯(1:1)第 2 份	595.9
正己烷-乙酸乙酯(1:1)第 3 份	102.4
正己烷-乙酸乙酯(1:1)第 4 份	0

### [参考文献]

- [1] Yoshihisa Takaishi, Kozo Shishido, Noriko Wariishi, et al. Tript quinone A and B novel interleukin-1 inhibitors from *Tripterygium wilfordii* var. *regelii* [J]. *Tetrahedron Lett*, 1992, 33 (47): 7179.
- [2] 国家卫生部. 卫生部药品标准中药成方制剂. 第 17 册[S]. 1995:275.
- [3] 薛璟,贾晓斌,谭晓斌,等. 雷公藤化学成分及其毒性研究进展[J]. *中华中医药杂志*, 2010, 25(5): 726.
- [4] 马哲,梁茂新,张颖. 中药雷公藤化学成分及药理作用研究进展[J]. *亚太传统医药*, 2011, 7(3): 157.
- [5] 于俊生,吴桂艳,卫艳玲,等. 益肾饮合雷公藤多苷对系膜增生性肾小球肾炎大鼠 TNF- $\alpha$  和 IL-6 蛋白表达的影响[J]. *中国中西医结合肾病杂志*, 2008, 9(3): 225.

[责任编辑 顾雪竹]