

# HPLC 法测定昆明山海棠蜜中雷公藤甲素的含量<sup>\*</sup>

郭艳红<sup>1</sup>, 谭 垦<sup>1\* \*</sup>, 宋启示<sup>2</sup>

(1. 云南农业大学东方蜜蜂研究所, 云南 昆明 650201;

2. 中国科学院西双版纳热带植物园昆明分部, 云南 昆明 650223)

摘要: 昆明山海棠蜜经萃取洗脱后, 采用反相 C<sup>18</sup>柱, 以乙腈-水 (30: 70) 为流动相, 以 218 nm 为检测波长, 检测昆明山海棠蜜中雷公藤甲素的含量。结果: 雷公藤甲素在 1 ~ 20 μg/g 范围内线性良好, r 为 0.999 9, 平均回收率为 103.06% (n=5), RSD 为 1.71%。

关键词: 高效液相色谱法; 昆明山海棠蜜; 雷公藤甲素

中图分类号: S 896.8 文献标识码: A 文章编号: 1004-390X(2007)03-0401-03

## Determination of Triptolide in *Tripterygium hypoglaucum* Honey by HPLC

GUO Yan-hong<sup>1</sup>, TAN Ken<sup>1</sup>, SONG Qishì<sup>2</sup>

(1. Eastem Bee Research Institute Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China

2. Kunming Department of Xishuangbanna Tropical Botanical Garden, Chinese Academy of Science, Kunming 650223, China)

**Abstract** After elute *Tripterygium hypoglaucum* honey, use reversed-phase C<sup>18</sup> column determine triptolide with acetonitrile-water (30: 70) as mobile phase, 218nm as determine wave. Result shows that Triptolide has a good linearity with in 1 μg/g ~ 20 μg/g, and the r-value is 0.999 9, the mean recovery is 103.06% (n=5), RSD is 1.71%.

**Key words** HPLC; *Tripterygium hypoglaucum* honey; Triptolide

昆明山海棠蜜是蜜蜂采集昆明山海棠的花蜜酿造而成的蜂蜜, 对蜜蜂不造成伤害, 但人食用后会导中毒<sup>[1]</sup>。昆明山海棠系卫矛科, 雷公藤属植物, 广泛分布于长江以南部分省区及西南地区, 是一种我国常见的有毒蜜源植物, 通常以根和皮作为药用。昆明山海棠作为中草药应用于我国传统医学, 主要用于杀虫、舒筋活络、清热解毒、祛风除湿等<sup>[2]</sup>。昆明山海棠与雷公藤成分相似, 含有生物碱类, 二萜类, 三萜类等多种成分, 其中二萜类成分雷公藤甲素是主要毒性成分<sup>[3]</sup>。但目前人们对昆明山海棠蜜的毒性只是有初步认识, 其中雷公藤甲素的含量测定尚未见报道。因此, 有必要建立快速、准确的雷公藤甲素的检测方法。本实验采用高效液相色谱法, 建立昆明山海棠蜜中雷公藤甲素含量的测定方法。结果表明, 本法操作简

便, 结果准确。

### 1 仪器与试剂

WATERS 高效液相色谱仪; WATERS 2487 紫外检测器; WATERS 1525 高压泵; Breeze 数据处理系统; 电子天平; 超声波清洗器; 离心机; 旋转蒸发仪。

乙腈为色谱纯; 水为超纯水; 甲醇、中性氧化铝、乙酸乙酯、石油醚为分析纯;

雷公藤甲素标准品 (福建省医学科学研究所提供), 昆明山海棠蜜 (采集于云南省楚雄州姚安县)

### 2 方法与结果

#### 2.1 色谱条件

色谱柱用 Symmetry C<sup>18</sup> (4.6 mm × 150 mm,

收稿日期: 2006-10-18

\* 基金项目: 云南省科技厅国际合作项目资助 (2004GH14)。\* \* 通讯作者 E-mail: Eastbee@public.km.yn.cn

作者简介: 郭艳红 (1979-), 女, 河南安阳人, 在读硕士, 主要从事有毒蜂蜜和蜜蜂行为学的研究。

5  $\mu\text{m}$ ); 流动相为乙腈 - 水 (30: 70); 流速: 1 mL/min; 检测波长为 218 nm; 柱温: 室温; 进样量: 20  $\mu\text{L}$ 。

## 2.2 样品处理

准确称取昆明山海棠蜂蜜样品 25 g 放入 200 mL 离心管中, 加入 40 mL 水使蜂蜜完全溶解, 加入 40 mL 乙酸乙酯, 30 mL 石油醚, 摇匀, 超声提取 10 min, 3 000 r/min 离心 10 min, 转移上清液至另一离心管中, 蜂蜜中再加入 30 mL 乙酸乙酯, 20 mL 石油醚, 重复提取 1 次, 合并上清液, 旋转蒸发至干。残渣用适量乙酸乙酯溶解, 过中性氧化铝柱 (乙酸乙酯湿法上柱, 3 g 200 目), 用 20 mL 乙酸乙酯洗脱, 收集洗脱液, 蒸干。精密吸取 1 mL 甲醇溶解残渣, 0.45  $\mu\text{m}$  微孔滤膜过滤, 备用。

## 2.3 对照品溶液制备

精密称取雷公藤甲素对照品 2.5 mg 用甲醇定容于 5 mL 容量瓶中, 得 0.5 mg/mL 的对照品溶液, 置于 4°C 冰箱备用。

## 2.4 标准曲线的绘制

对照品溶液分别进样 20  $\mu\text{L}$ , 10  $\mu\text{L}$ , 5  $\mu\text{L}$ , 2  $\mu\text{L}$ , 1  $\mu\text{L}$ 。以峰面积 ( $y$ ) 为纵坐标, 以含量 ( $x$ ) 为横坐标, 绘制标准曲线。得回归方程  $y =$

2 511 038 32  $x + 165 934 10$   $r = 0.999 9$  线性范围为 1 ~ 20  $\mu\text{g/g}$

## 2.5 精密度试验

精密吸取对照品溶液 (0.5 mg/mL), 定量环 20  $\mu\text{L}$  进样, 连续进样 6 次, 计算峰面积的 RSD 为 2.63%。

## 2.6 稳定性试验

吸取样品溶液, 每隔 0.5 h 进样 20  $\mu\text{L}$ , 连续进样 3 次, 发现保留时间和峰面积均稳定, 峰面积的 RSD 为 0.61%, 表明样品在 1.5 h 内稳定。之后样品黏度增大, 有絮状沉淀, 但过滤后仍可使用, 不影响测定结果。

## 2.7 重现性试验

称取 3 份样品, 按 2.2 项进行处理, 每份连续进样 2 次, 取平均值, RSD 为 0.78%。

## 2.8 回收率试验

称取不含雷公藤甲素的蜂蜜 3 份, 每份 25 g 置于 200 mL 离心管中, 分别添加 0.05 mg/mL 对照品溶液 0.25 mL, 1 mL, 5 mL。超声 30 min 用 2.2 项中的方法对其进行处理, 按上述色谱条件外标法测定, 计算回收率, 结果如下。

表 1 加样回收率试验结果

Tab 1 Determination and recoveries of three adding TW samples

加入量 / $\mu\text{g}$ added	本底值 / $\mu\text{g}$ base	测定值 / $\mu\text{g}$ measured	回收率 /% recovery	平均 /%	RSD /% mean
0.25	0	0.25	101.56		
0.25	0	0.25	101.53		
1.00	0	1.02	101.84	103.06	1.71
1.00	0	1.05	104.86		
5.00	0	5.28	105.53		
5.00	0	5.15	103.04		

## 2.9 样品含量测定

按 2.2 项进行处理样品, 连续进样 3 次, 取平均含量为 0.61  $\mu\text{g/g}$  RSD 为 0.78%。

## 3 讨论

(1) 由于雷公藤甲素在蜂蜜中的含量极低, 故样品处理时如蜂蜜有结晶一定要 60°C 以下水浴加热, 待其完全溶解后再称量。

(2) 中性氧化铝的活性会影响到对雷公藤甲素的吸附, 采用湿法上柱可以避免这种影响<sup>[4]</sup>。中性氧化铝的用量不需很多, 3 g 氧化铝, 直径 1 ~ 1.5 cm 的小柱即可。

(3) 很多文献报道流动相采用甲醇 - 水系统<sup>[5]</sup>, 本试验通过对比, 发现用乙腈 - 水系统, 图谱峰形分开程度好, 基线平稳。乙腈 - 水 (30: 70) 系统中, 雷公藤甲素的保留时间在 9 min 左右, 检测一份样品需 20 min 试验进度较快。

(4) 蜜蜂只有在干旱或蜜源缺乏的时期才会去采集有毒的花蜜, 并且把酿造后的有毒的蜂蜜放在蜂巢中特定的区域, 但养蜂人取蜜时难免会把有毒蜜和正常的蜂蜜混淆在一起, 而每一次的混合程度都不一样, 因此从含有昆明山海棠蜜的蜂蜜中检测雷公藤甲素的含量, 结果会因样品不同而有差别。

(5) 经过滤后的样品溶液放置 1 h 后会逐渐产

生絮状沉淀, 但过滤后不影响检测结果。

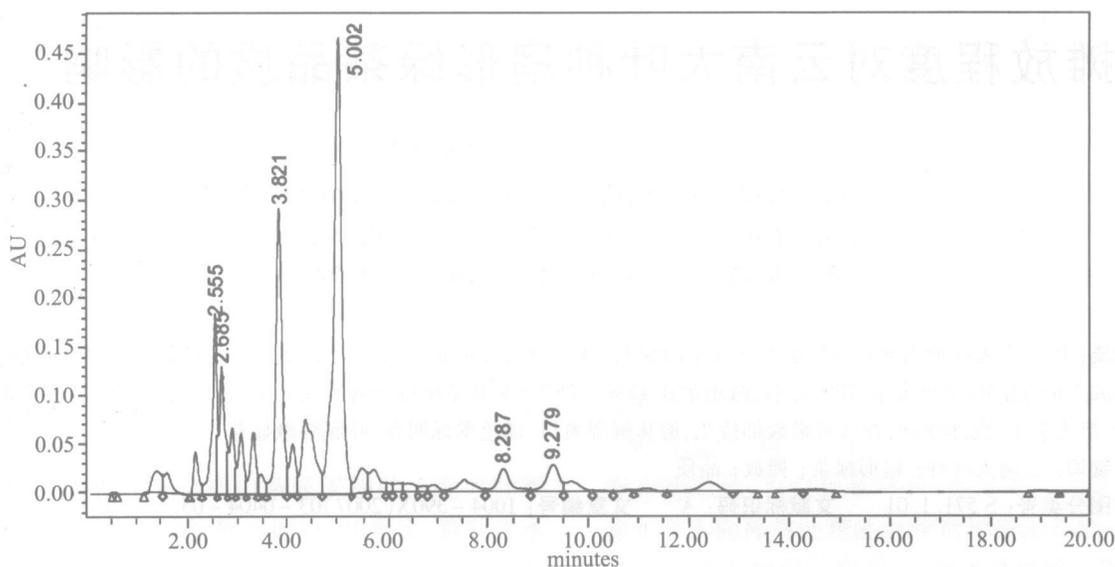


图 1 昆明山海棠蜂蜜样品的高效液相图谱

Fig. 1 Chromatogram of *Tripterygium hypoglaucum* honey

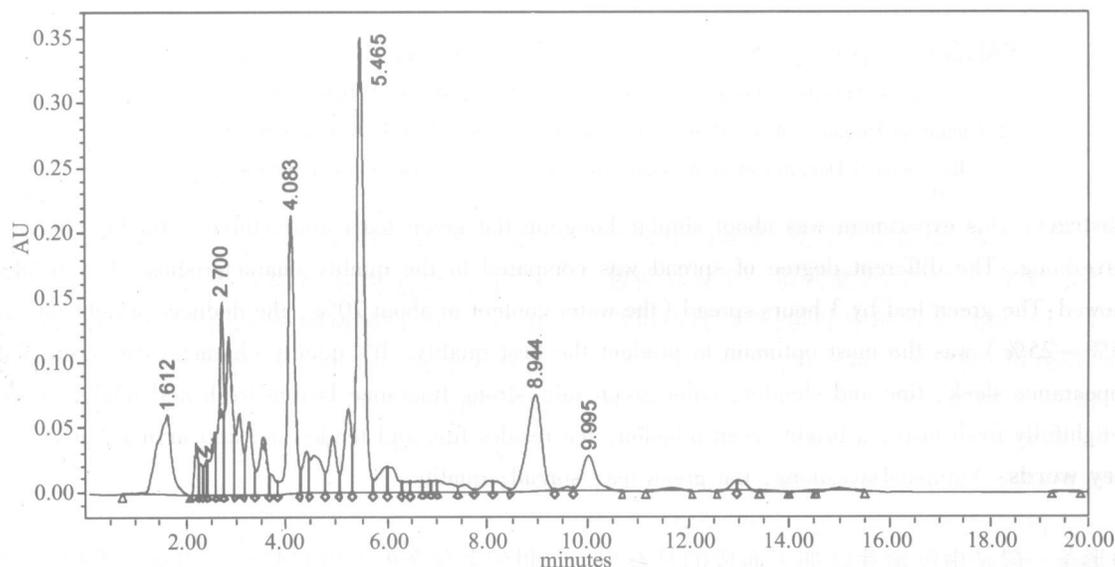


图 2 昆明山海棠蜂蜜样品中添加雷公藤甲素标准品的图谱

Fig. 2 Chromatogram of *Tripterygium hypoglaucum* honey added TW

#### [参考文献]

- [1] 陈冀胜, 郑硕. 中国有毒植物[M]. 北京: 北京科学出版社, 1987
- [2] 张航行, 耿会岭, 杨维霞. 昆明山海棠的化学成分及药理活性研究进展[J]. 动物医学进展, 2002, 23(6): 42-45
- [3] 雷晴, 万屏. 昆明山海棠毒性研究进展[J]. 云南中

医中药杂志, 2005, 26(5): 46-47.

- [4] 濮存海, 何明芳, 张晓骞, 等. HPLC测定雷公藤总萜片中雷公藤内酯醇的含量[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(4): 266-267.
- [5] 池玉梅, 文红梅, 许金国, 等. HPLC法测定雷公藤饮片中雷公藤甲素的含量[J]. 南京中医药大学学报(自然科学版), 2001, 17(1): 32-33.