

# HPLC 法测定昆明山海棠蜜中雷公藤甲素的含量\*

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

## Determine Triptolide in *Triptergium hypoglaucum* Honey by HPLC

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

(1. Eastern 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 *Triptergium 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 within 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; *Triptergium 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,但人食用后会导致中毒<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;旋转蒸发器。

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<sup>®</sup> 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@pubic.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 $^{\circ}\text{C}$  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 $^{\circ}\text{C}$  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。

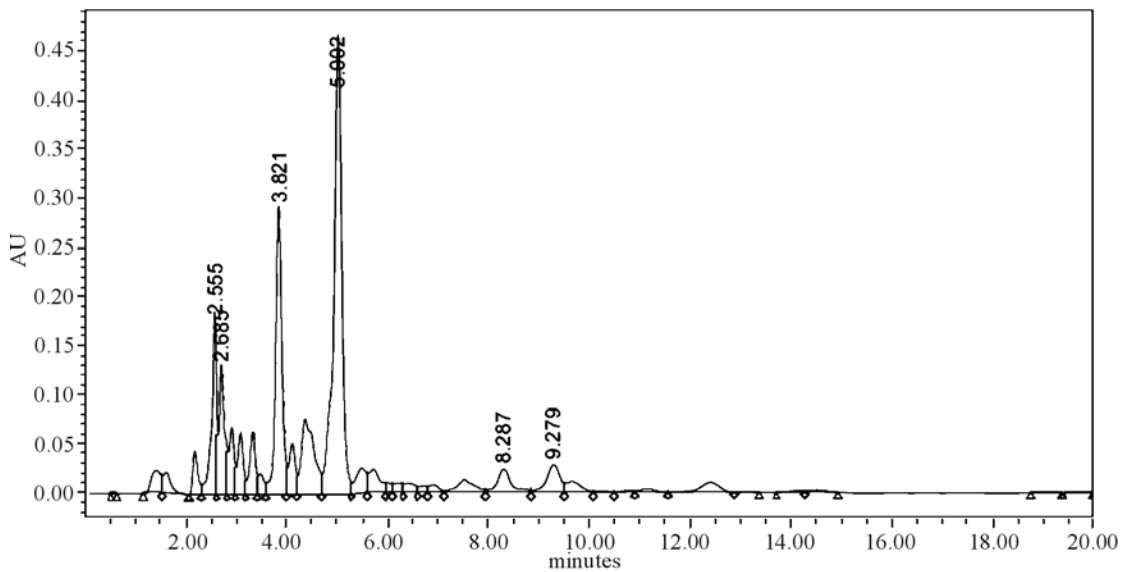


图1 昆明山海棠蜂蜜样品的高效液相图谱  
Fig. 1 Chromatogram of *Tripterygium hypoglaucum* honey

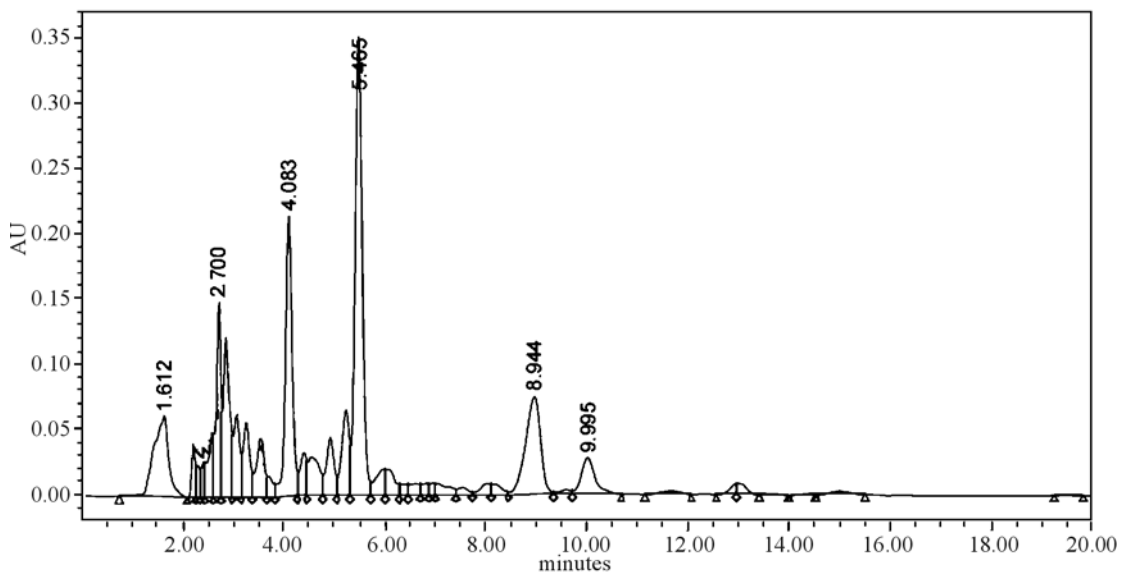


图2 昆明山海棠蜂蜜样品中添加雷公藤甲素标准品的图谱  
Fig. 2 Chromatogram of *Tripterygium hypoglaucum* honey added TW

[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.