

· 中药工业 ·

# 不同企业雷公藤多苷片的制剂质量比较与评价<sup>△</sup>

汪祺, 王亚丹, 郑笑为, 文海若\*, 马双成\*

中国食品药品检定研究院, 北京 100050

**[摘要]** 目的: 依托国家药品评价抽验项目, 采用标准检验与探索性研究相结合的方法对雷公藤多苷片制剂进行质量评价及安全性研究。方法: 采用国家药品监督管理局颁标准(WS3-B-3350-98-2011)对10个企业171批次雷公藤多苷片进行标准检验, 综合评价产品质量, 发现标准存在的问题; 同时开展体外毒性实验, 初步探讨雷公藤多苷片中潜在肝毒性成分。结果: 实验发现, 现行标准存在项目设置不合理及设置不足的问题, 同时雷公藤多苷片产品质量参差不齐, 崩解时间差异大, 雷公藤甲素及雷公藤内酯甲含量相差悬殊。此外, 体外肝细胞毒性实验显示雷公藤多苷片中单体对珉B及雷公藤红素具有潜在肝毒性风险。结论: 雷公藤多苷片质量波动不稳定的主要原因是制剂生产工艺不统一、不固定导致, 建议统一该制剂生产工艺; 此外针对标准不合理项目建议修订薄层鉴别项下对照品使用浓度, 雷公藤甲素检查项增设下限控制, 同时增加潜在毒性成分对珉B及雷公藤红素的检查设置。

**[关键词]** 雷公藤多苷片; 质量标准; 国家抽验; 毒性

**[中图分类号]** R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1673-4890(2020)09-1534-05

**doi:**10.13313/j.issn.1673-4890.20190813004

## Quality Analysis of Leigongteng Duogan Tablets Based on National Drug Sampling and Inspection Work

WANG Qi, WANG Ya-dan, ZHENG Xiao-wei, WEN Hai-ruo\*, MA Shuang-cheng\*

National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China

**[Abstracts]** **Objective:** Supporting by the National Drug Evaluation and Sampling Project, the quality evaluation and safety study of Leigongteng Duogan Tablets were performed using a combined method of standard inspection and exploratory research. **Methods:** A total of 171 batches of Leigongteng Duogan Tablets from 10 companies were used in the standard inspection followed the standard WS3-B-3350-98-2011 issued by National Medical Products Administration. The qualities of products were comprehensively evaluated to investigate the problems in the existing standard. In the meanwhile, *in vitro* toxicity study was performed for a preliminary discussion on the potential toxic ingredients in the Leigongteng Duogan Tablets. **Results:** It has been found that the testing items listed in the current standard are unreasonable and insufficient. Also, the quality and the disintegration time of Leigongteng Duogan Tablets varies widely, and the contents of triptolide and wilforlide A differ greatly from products to products. In addition, the *in vitro* hepatocytes toxicity data showed that the monomers quinone B and tripterine in Leigongteng Duogan Tablets exhibited hepatotoxicity risks. **Conclusion:** The unstable quality of Leigongteng Duogan Tablets is mainly attribute to the inconsistency and instability of the manufacture processes of preparations, thus it is recommended to unify the production process of Leigongteng Duogan Tablets. In addition, for the unreasonable standard items, it is recommended to revise the concentrations of the reference substances of the thin-layer identification items, add a lower limit control to the triptolide inspection item, and increase the inspection items of quinone B and tripterine as potentially toxic components.

**[Keywords]** Leigongteng Duogan tablets; quality standard; national drug sampling and inspection work; toxicity

雷公藤为卫矛科雷公藤属植物, 药用部位多为 毒等功效, 临床应用范围较广, 适应症包括类风湿  
其干燥根<sup>[1]</sup>。其具有祛风除湿、活血通络、杀虫解 性关节炎、银屑病、红斑狼疮及器官移植后作为免

<sup>△</sup> [基金项目] 国家自然科学基金项目(81503347)

\* [通信作者] 马双成, 研究员, 研究方向: 中药质量控制及安全性评价; Tel: (010)67095282, E-mail: msc@nifdc.org.cn  
文海若, 副研究员, 研究方向: 毒理; Tel: (010)67876252, E-mail: wenhairuo@nifdc.org.cn

疫抑制剂使用<sup>[2-5]</sup>。雷公藤主要化学成分包括萜类,其中对二萜成分雷公藤甲素和三萜成分雷公藤红素药理研究较多,其被认为是雷公藤的主要药效成分;此外,雷公藤还含有倍半萜生物碱、倍半萜多醇酯及木脂素等<sup>[6-13]</sup>。随着雷公藤制剂的广泛使用,其临床不良反应及毒性逐渐凸显,主要表现为肝、肾毒性、血液系统及生殖系统损害。有研究显示,雷公藤甲素及雷公藤红素为其主要药效及毒性成分<sup>[14-15]</sup>。有研究针对不同厂家雷公藤多苷片制剂进行了指纹图谱及小鼠体内抗炎药效、毒性比较研究,结果发现,7个厂家的雷公藤多苷片化学成分差异显著,同时抗炎药效及肝肾毒性方面也存在较大差异。因此控制制剂质量,使其发挥药效的同时避免不良反应发生成为雷公藤制剂质控亟待解决的问题<sup>[16]</sup>。

本研究依托国家药品评价抽验工作,对全部雷公藤多苷片现行生产企业进行抽样测定,共涉及10个企业171批次样品,实验采取标准检验与探索性研究相结合的方法,首先对雷公藤多苷片质量进行整体评价,并发现该品种存在的问题;其次进行体外毒性实验,对制剂中含量较高的单体成分进行肝毒性考察,旨在为进一步完善该制剂安全性标准提供数据支持。

## 1 材料

### 1.1 仪器

Waters 2695-2996 PDA 型液相色谱系统;薄层色谱自动点样仪(卡玛公司);ZBS-6E 型智能崩解试验仪(天津市精拓仪器科技有限公司);VICTOR X5 型多功能酶标仪(PerkinElmer)。

### 1.2 试药

雷公藤甲素对照品(批号:111567-201404,纯度:99.8%)、雷公藤红素对照品(批号:111946-201501,纯度:97.0%)、雷公藤内酯甲对照品(批号:111597-200505,纯度:100%)购自中国食品药品检定研究院;对琨 B(纯度>98%)为中国医学科学院北京协和医学院药物研究所赠送;雷公藤次碱(批号:PL0078,纯度 $\geq$ 98.5%)、雷公藤春碱(批号:PL0077,纯度 $\geq$ 98.5%)、雷公藤晋碱(批号:PL0080,纯度 $\geq$ 99%)购自成都普利斯生物科技有限公司;二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO, Sigma);RPMI 1640 培养基(Hyclone);1%青链霉素混合液(南京凯基生物科技发展有限公司);胰蛋白

酶-EDTA 消化液(Life Technologies);胎牛血清(FBS, Gibco);细胞增殖-毒性检测试剂盒/CCK-8(日本同仁化学研究所);中性氧化铝(Agela Technologies, 200目);雷公藤多苷片(来自10个企业共171批次,企业分别用A~J代表);乙酸乙酯(分析纯,北京化学试剂厂);乙腈、甲醇均为色谱纯(Fisher公司)。

## 2 方法

### 2.1 崩解时限考察

按《中华人民共和国药典》2015年版一部附录XII A 崩解时限检查法测定171批次雷公藤多苷片崩解时间,标准规定供试品应在1 h内全部崩解。

### 2.2 薄层鉴别

参照国家药品监督管理局颁标准(WS3-B-3350-98-2011)项下雷公藤内酯甲薄层检查,制备质量浓度为 $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的雷公藤内酯甲对照品溶液。供试品溶液制备方法详见标准。以环己烷-丙酮(5:3)为展开剂展开,10%硫酸乙醇溶液显色,105℃加热至斑点显色清晰<sup>[17]</sup>。

### 2.3 雷公藤甲素检查

取雷公藤甲素适量,精密称定,加甲醇制成 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液;供试品溶液同[雷公藤内酯甲含量测定]项下供试品溶液制备方法,分别精密吸取对照品及供试品溶液各10  $\mu\text{L}$ 测定,以甲醇-水(43:57)为流动相,检测波长为218 nm<sup>[17]</sup>。

### 2.4 雷公藤内酯甲含量测定

参照国家药品监督管理局颁标准(WS3-B-3350-98-2011)项下雷公藤内酯甲含量测定项,取雷公藤内酯甲适量,甲醇溶解配制每1 mL含0.1 mg的对照品溶液;供试品溶液制备方法:雷公藤多苷片乙酸乙酯提取后经中性氧化铝处理,收集洗脱液,最终定容至5 mL量瓶。取对照品及供试品溶液各10  $\mu\text{L}$ 测定,以甲醇-乙腈-水(64:16:20)为流动相,检测波长为210 nm<sup>[17]</sup>。

### 2.5 体外肝细胞毒性研究

将HepaRG细胞接种于75 mL培养瓶内,以RPMI 1640完全培养基(含10% FBS和1%青链霉素混合液)于37℃、5% CO<sub>2</sub>的培养箱内培养。培养隔天更换,细胞贴壁生长,覆盖瓶底80%~90%时,用胰蛋白酶-EDTA消化液消化,并调整细胞密度为 $1 \times 10^5$ 个/mL。在96孔板中接种细胞悬液,每孔

100  $\mu\text{L}$ ，置于培养箱内培养，待细胞贴壁后更换含不同浓度药物的培养液。雷公藤甲素、雷公藤内酯甲给药浓度分别为 5、10、20、40、80、160、320  $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，雷公藤红素给药浓度分别为 0.15、0.3、0.6、1.2、2.4、4.8、9.6  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，对琨 B 给药浓度分别为 2.5、5、10、20、40、80、160  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，雷公藤春碱、雷公藤次碱、雷公藤晋碱给药浓度均分别为 5、10、20、40、80、160、320  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ，每个浓度设 3 个复孔，同时设 0.5% DMSO 作为溶媒对照，设不含细胞的培养基作为空白对照。给药后在培养箱内孵育 24 h，向每孔加入 10  $\mu\text{L}$  CCK-8 溶液后在培养箱内孵育 1~4 h，用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度值并计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = \frac{(A_{\text{给药}} - A_{\text{空白}})}{(A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})} \times 100\% \quad (1)$$

### 3 结果

#### 3.1 崩解时限检查结果

按标准检验所有样品崩解时限(1 h)均符合规定，但不同企业间崩解时间差异显著，部分企业样品崩解时间不足 1 min，而导致崩解时间差异显著的主要原因为制剂工艺不统一。结果见表 1。

表 1 10 个不同企业来源的雷公藤多苷片的崩解时间( $\bar{x} \pm s$ )

企业代号	检测批数	崩解时间区间/ min	平均崩解时间/ min
A	12	5~8	6.33 ± 0.98
B	13	25~54	37.62 ± 8.39
C	32	2~7	3.25 ± 1.50
D	6	4~10	6.50 ± 2.17
E	3	1~5	2.33 ± 2.31
F	31	1~8	1.65 ± 1.43
G	16	3~7	4.56 ± 1.15
H	30	3~10	6.07 ± 1.41
I	27	4~7	5.11 ± 1.25
J	1	22	22

注：崩解时限均为 60 min，所有样品均合格。

#### 3.2 薄层鉴别检查结果

按标准进行薄层检查(见图 1)，171 批次样品均可检出雷公藤内酯甲相对应斑点，但现行标准中对对照品配制浓度与样品中雷公藤内酯甲实际含量相差较大，建议调整该标准中对对照品使用浓度。

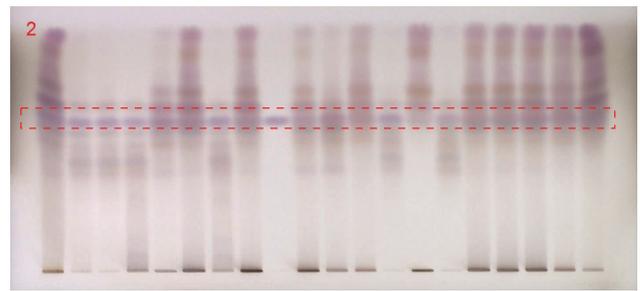
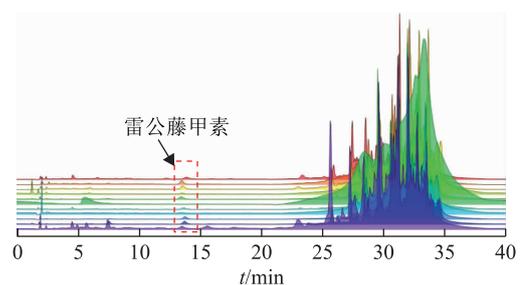


图 1 雷公藤多苷片薄层鉴别  
注：1~8、10~20.10 个企业中随机抽取样品各 1 个批次；9. 雷公藤内酯甲对照品。

图 1 雷公藤多苷片薄层鉴别

#### 3.3 雷公藤甲素检查结果

10 个企业随机抽取 1 个批次样品进行测定，结果见图 2。液相色谱图显示，不同企业间雷公藤多苷片所含化学成分存在明显差异；此外通过对 171 批次样品测定发现(见表 2、图 2)，虽然 10 个企业雷公藤甲素含量均符合标准规定，每片含雷公藤甲素不超过 10  $\mu\text{g}$ ，但不同企业及相同企业不同批次间，雷公藤甲素含量差异显著，部分企业甚至未检出雷公藤甲素。提示，作为已被证明为药效成分的雷公藤甲素除规定上限外，同时应对含量下限进行明确规定。



注：10 个企业随机取 1 批进行测定。

图 2 雷公藤多苷片中雷公藤甲素液相色谱图

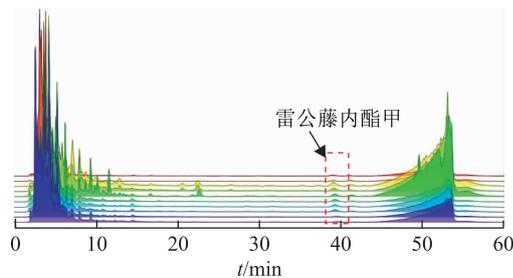
表 2 10 个不同企业来源的雷公藤多苷片中的雷公藤甲素含量( $\bar{x} \pm s$ )

企业代号	检测批数	每片含量区间/ $\mu\text{g}$	每片平均含量/ $\mu\text{g}$
A	12	0~1	0.58 ± 0.51
B	13	1~7	4.92 ± 1.38
C	32	0~8	3.31 ± 1.67
D	6	5~9	6.17 ± 1.47
E	3	4~7	6.00 ± 1.73
F	31	0~9	6.52 ± 2.14
G	16	0~7	0.90 ± 1.69
H	30	0~0.3	0.01 ± 0.05
I	27	0~3	0.96 ± 0.88
J	1	6	6.00

注：含量限度均为每片  $\leq 10 \mu\text{g}$ ，且均合格。

### 3.4 雷公藤内酯甲含量测定结果

10 个企业随机抽取 1 批次样品进行测定, 结果见图 3、表 3。液相色谱图显示, 不同企业间雷公藤多苷片所含成分存在明显差异。通过对 171 批次样品测定发现, 10 个企业雷公藤内酯甲含量均符合标准规定, 每片含雷公藤内酯甲不少于 10  $\mu\text{g}$ , 然而不同企业间, 雷公藤内酯甲含量 11 ~ 62  $\mu\text{g}/\text{片}$ , 同一企业不同批次间含量 19 ~ 62  $\mu\text{g}/\text{片}$ , 可见质控指标雷公藤内酯甲含量波动范围大, 存在产品质量整体不稳定的情况。



注: 10 个企业随机取 1 批进行测定。

图 3 雷公藤多苷片中雷公藤内酯甲液相色谱图

表 3 10 个企业雷公藤多苷片中雷公藤内酯甲

企业代号	检测批数	含量情况 ( $\bar{x} \pm s$ )	
		每片含量区间/ $\mu\text{g}$	每片平均含量/ $\mu\text{g}$
A	12	23 ~ 49	32.33 $\pm$ 9.60
B	13	11 ~ 32	22.77 $\pm$ 5.83
C	32	13 ~ 53	37.53 $\pm$ 12.72
D	6	25 ~ 31	26.33 $\pm$ 2.42
E	3	18 ~ 27	24.00 $\pm$ 5.20
F	31	19 ~ 62	43.77 $\pm$ 12.85
G	16	11 ~ 19	16.06 $\pm$ 5.65
H	30	14 ~ 31	23.80 $\pm$ 4.40
I	27	19 ~ 31	22.67 $\pm$ 3.67
J	1	19	19.00

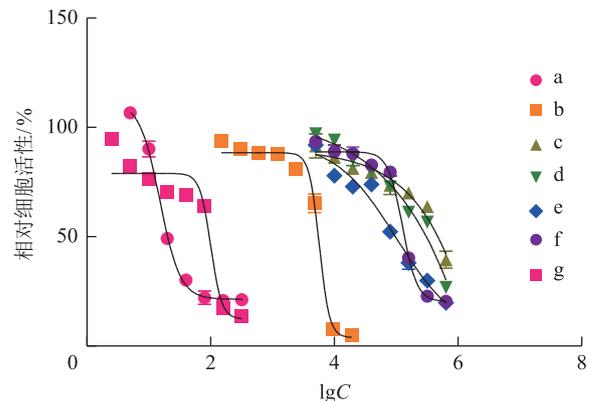
注: 含量限度均为每片  $\geq 10 \mu\text{g}$ , 且均合格。

### 3.5 体外细胞毒性评价

雷公藤多苷片现行标准控制的指标成分主要为雷公藤内酯甲及雷公藤甲素, 10 个企业 171 批次样品中雷公藤内酯甲含量范围分布差异较大, 而已有明确毒性报道的雷公藤甲素在制剂中含量普遍较低, 部分企业甚至不含雷公藤甲素, 因此提示雷公藤多苷片不良反应的原因是否为其其他成分导致。查阅文献发现, 雷公藤多苷片中雷公藤红素也具有药效作用且含量较高, 此外生物碱类成分约占其总提取物的 30%, 而此类成分以往研究较少, 因此针对这一

类含量高或具有药效作用的成分进行体外细胞毒性考察, 可初步推测其潜在毒性风险, 为形成制剂质量标准提供数据支持。实验选取雷公藤甲素、雷公藤内酯甲、雷公藤红素、对珉 B 及具有结构代表性的生物碱雷公藤春碱、雷公藤次碱、雷公藤晋碱进行体外毒性考察。

实验结果以细胞存活率及半数抑制浓度 ( $\text{IC}_{50}$ ) 值为评价指标, 考察待测单体的潜在毒性作用, 结果见图 4、表 4。分析数据发现, 雷公藤甲素 ( $\text{IC}_{50}$  为  $0.015 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 及对珉 B ( $\text{IC}_{50}$  为  $0.10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 毒性强, 雷公藤红素 ( $\text{IC}_{50}$  为  $5.73 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 次之, 4 个生物碱单体成分几乎没有毒性作用, 因此提示, 除雷公藤甲素外, 应增加制剂中对珉 B 及雷公藤红素的含量限度控制。相反, 生物碱类成分含量高, 无明显毒性作用, 因此其是否具有药效作用值得进一步研究。



注: a. 雷公藤甲素; b. 雷公藤红素; c. 雷公藤内酯甲; d. 雷公藤春碱; e. 雷公藤次碱; f. 雷公藤晋碱; g. 对珉 B。

图 4 雷公藤药材不同单体体外细胞毒性实验

表 4 雷公藤药材中不同单体的体外细胞毒性结果

单体名称	$\text{IC}_{50}$ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
雷公藤甲素 (triptolide)	0.015
雷公藤红素 (celastrol)	5.73
雷公藤内酯甲 (wilforlide)	$2.58 \times 10^8$
雷公藤春碱 (wilfortrine)	$2.40 \times 10^8$
雷公藤次碱 (wilforine)	101.33
雷公藤晋碱 (wilforgine)	127.05
对珉 B (confrontation Quinone B)	0.10

## 4 讨论与结论

本研究发现, 雷公藤多苷片制剂不同企业及相同企业不同批次间样品崩解时限差异大, 雷公藤甲素及雷公藤内酯甲含量相差悬殊, 雷公藤内酯甲含

量测定结果显示,该成分含量11~62 μg/片,提示该产品整体质量不稳定。

目前,雷公藤多苷片制剂原料均由制剂厂家自行制备,无统一生产工艺,制备雷公藤总苷涉及柱层析环节,而吸附剂用量、洗脱溶剂、组分收集等方面各企业不尽相同,由此导致制剂崩解时间相差悬殊,化学成分含量相差较大,在临床上则表现为疗效和毒副作用的差异。现代药理研究表明,不同生产企业雷公藤多苷片制剂在抗炎药效方面不同<sup>[16]</sup>。此外,6个不同企业雷公藤多苷片小鼠肝毒性研究发现,不同企业生产的雷公藤多苷片,对于小鼠肝系数、血清生化及肝组织中丙二醛(MDA)值影响作用差异显著,提示质量差异与其临床不良反应也具有明显相关性<sup>[18]</sup>。因此控制制剂质量,使其发挥药效的同时避免不良反应发生成为雷公藤制剂质控亟待解决的问题。提高雷公藤多苷片制剂质量,首先要统一该制剂生产工艺,其次建立合理的质量标准。本研究发现,雷公藤多苷片现行标准存在如下问题:薄层鉴别与含量测定项重复设定,且薄层鉴别对照品溶液浓度与制剂中雷公藤内酯甲含量差异大,不利于实验结果判定;雷公藤甲素含量检查仅设置上限,而部分企业样品未检出该成分,因此建议增加下限检查。其次,针对其不良反应的发生,本研究体外毒性实验发现,对毘B及雷公藤红素为潜在毒性成分,含量较高的生物碱可能为一类毒性低同时具有药效的活性成分,因此建议进一步考察其药效并增设控制指标。

### 参考文献

- [1] 中国科学院《中国植物志》编委会. 中国植物志[M]. 北京:科学出版社,1999:102.
- [2] WAN Y G, CHE X Y, SUN W, et al. Low-dose of multi-glycoside of *Tripterygium wilfordii* Hook. f., a natural regulator of TGF-beta1/Smad signaling activity improves adriamycin-induced glomerulosclerosis *in vivo* [J]. J Ethnopharmacol, 2014, 151(3): 1079-1089.
- [3] BAO J, DAI S M. A Chinese herb *Tripterygium wilfordii* Hook. f. in the treatment of rheumatoid arthritis: Mechanism, efficacy, and safety [J]. Rheumatol Int, 2011, 31(9): 1123-1129.
- [4] 胡德俊, 彭泽燕, 何东初. 雷公藤的药理作用研究进展[J]. 医药导报, 2018, 37(5): 586-592.
- [5] 吴闽枫, 马瑜宏, 李军, 等. 雷公藤及其衍生物在皮肤疾病中的应用研究[J]. 辽宁中医杂志, 2016, 43(1): 191-194.
- [6] YANG J H, LUO S D, WANG Y S, et al. Triterpenes from *Tripterygium wilfordii* Hook [J]. J Asian Nat Prod Res, 2006, 8(5): 425-429.
- [7] GAO C, WANG D, ZHANG Y, et al. Kaurane and abietane diterpenoids from the roots of *Tripterygium wilfordii* and their cytotoxic evaluation [J]. Bioorg Med Chem Lett, 2016, 26(12): 2942-2946.
- [8] BRINKER A M, MA J, LIPSKY P E, et al. Medicinal chemistry and pharmacology of genus *Tripterygium* (Celastraceae) [J]. Phytochemistry, 2007, 68(6): 732-766.
- [9] CAI T, LUO Y G, ZHOU M, et al. Untargeted analysis of sesquiterpene pyridine alkaloids from the dried roots of *Tripterygium wilfordii* using high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. RCM, 2015, 29(10): 965-972.
- [10] ZHAO G, VASZAR L T, QIU D, et al. Anti-inflammatory effects of triptolide in human bronchial epithelial cells [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000, 279(5): 958-966.
- [11] ZHU W, HU H, QIU P, et al. Triptolide induces apoptosis in human anaplastic thyroid carcinoma cells by a p53-independent but NF-kappaB related mechanism [J]. Oncol Rep, 2009, 22(6): 1397-1401.
- [12] KIM D Y, PARK J W, JEOUNG D, et al. Celastrol suppresses allergen induced airway inflammation in a mouse allergic asthma mode 1 [J]. Eur J Pharmacol, 2009, 612(1/3): 98-105.
- [13] RAJA S M, CLUBB R J, ORTEGA-CAVA C, et al. Anticancer activity of celastrol in combination with ErbB2-targeted therapeutics for treatment of ErbB2-over expressing breast cancers [J]. Cancer Bio Ther, 2011, 11(2): 263-276.
- [14] FU Q, HUANG X, SHU B, et al. Inhibition of mitochondrial respiratory chain is involved in triptolide-induced liver injury [J]. Fitoterapia, 2011, 82(8): 1241-1248.
- [15] LI J, JIN J, LI M, et al. Role of Nrf2 in protection against triptolide-induced toxicity in rat kidney cells [J]. Toxicol Lett, 2012, 213(2): 194-202.
- [16] 林兵, 杨海跃, 刘志宏, 等. 不同厂家雷公藤多苷片指纹图谱及体内抗炎药效、毒性比较研究 [J]. 中国药师, 2019, 22(2): 206-210.
- [17] 国家药品监督管理局. 国家药品监督管理局标准: WS3-B-3350-98-2011 [S]. 北京: 国家药品监督管理局, 2011.
- [18] 刘春芳, 张晶璇, 李逸群, 等. 6个不同厂家雷公藤多苷片致小鼠急性肝损伤的比较研究及机制探索 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(16): 3494-3501.

(收稿日期: 2019-08-13 编辑: 王笑辉)