

不高,但仍表明:采用浸苗法将野生天麻总DNA导入马铃薯中的方法是可行的。

GAFP其相对分子质量为14 kd,它能强烈抑制腐生性真菌生长,从而阻止密环菌侵染顶生球茎,使其得以正常生长。马铃薯中不存在此蛋白,通过SDS—PAGE发现在转化的植株中有GAFP,说明GAFP基因已整合到马铃薯基因组中,并且通过基因表达调控而翻译GAFP^[1]。

野生天麻的有效成分为天麻素即对羟基苯- β -D-葡萄糖吡喃糖苷,它是一种小分子有机物质,其甲醇液在220 nm有最大吸收峰。本实验通过紫外扫描法从200株转化的马铃薯中检测到21株的扫描图谱与正常对照组有明显差异,说明天麻的基因在马铃薯中已经表达并且导致马铃薯发生变异。变异的发生可能通过受、供体基因同源重组这一整合途径或通过供体DNA片断插入到受体基因组中^[10]。

笔者通过薄层色谱法在3株转化的植株中检测到天麻素,而天麻素不属于蛋白质,说明天麻的基因在马铃薯中已经表达并且通过一系列复杂的体内代谢产生了天麻的有效药用成分天麻素。但转基因马铃薯中含天麻素很少(样品浓缩200倍),如何提高转基因马铃薯中野生天麻的有效药用成分——天麻素的量有待于进一步研究。

References:

- [1] Zhu S W, Xu Z, Zhu X C, et al. A preliminary study on using the seedling soaking method to induce the genetic characters in flue-cured tobacco [J]. *J Northeast Agric Univ* (东北农业大学学报), 1999, 30(2): 190-194.
- [2] Huang J, Ge X, Sun M. Modified CTAB protocol using a silica matrix for isolation of plant genomic DNA [J]. *Biotechniques*, 2000, 28(3): 432-434.
- [3] Li X B, Feng B, Zhang Z H, et al. Isolation of total DNA from plant Chinese medicinal materials [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(7): 652-654.
- [4] Ding L, Huang Y. Detecting gastrodin by TLC—UV in *Gastrodia elata* patch [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 1996, 18(1): 48-49.
- [5] Zhou J, Jia E, Liu T F. The methods of gastrodin's determination in *Gastrodia elata* [J]. *Prac J Med Pharm* (实用医药杂志), 2002, 19(9): 713-714.
- [6] Hu Z, Huang Q, Liu X, et al. Primary structure and cDNA cloning of the antifungal protein GAFP-1 from *Gastrodia elata* [J]. *Acta Bot Yunnan* (云南植物研究), 1999, 21(2): 131-138.
- [7] Wang X C, Willson A D, Guy D. Molecular cloning of GAFP-1 an antifungal protein from *Gastrodia elata* [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1999, 41(10): 1041-1045.
- [8] Wang Y Q, Li W B, Lan H M, et al. N-terminal sequence and cDNA cloning of *Gastrodia* antifungal protein (GAFP) from *Gastrodia* (*G. elata* Bl. f. *elata*) [J]. *High Technol Lett* (高技术通讯), 2000, 10(1): 10-14.
- [9] Ding G H, Chi C Y, Xu Q J, et al. Electrophoretic analysis of proteins in D₁ generation after exogenous DNA introduced of tobacco [J]. *Plant Physiol* (植物生理学通讯), 2003, 39(2): 153-155.
- [10] Potrykus I, Paszkowski J, Saul M W, et al. Molecular and general genetics of a hybrid foreign gene introduced into tobacco by direct gene transfer [J]. *Mol Gen Genet*, 1985, 199(2): 169-177.

雷公藤属3种植物不同群体和个体中雷公藤甲素的研究

黄文华¹, 郭宝林^{1*}, 斯金平², 阮秀春², 余竞光¹, 孙 兰¹

(1. 中国医学科学院 中国协和医科大学药用植物研究所, 北京 100094;

2. 浙江省丽水市林业科学研究所, 浙江 丽水 323000)

摘要:目的 测定雷公藤属3种植物(雷公藤、昆明山海棠和黑蔓)不同群体和个体中雷公藤甲素(triptolide),为评价雷公藤药材质量和寻找雷公藤的优质种质奠定基础。方法 建立雷公藤甲素HPLC测定方法,并测定了全国主要分布区25个群体91个个体的木质部和韧皮部中的雷公藤甲素。结果 黑蔓的雷公藤甲素质量分数很低;雷公藤和昆明山海棠种间的雷公藤甲素差异不明显,个体质量分数木质部为 $1.0 \times 10^{-6} \sim 5.83 \times 10^{-5}$;韧皮部为 $2.3 \times 10^{-6} \sim 1.030 \times 10^{-4}$ 。结论 雷公藤和昆明山海棠不同个体雷公藤甲素质量分数最高值与最低值相差约50倍,不同居群雷公藤甲素质量分数最高值与最低值相差10多倍,不同来源的药材质量差异极大,严重影响用药的安全性;雷公藤甲素质量分数高的居群位于浙江西南部和中部、湖南新宁、贵州雷山和安徽黄山;湖南新宁、贵州雷山和浙江江山居群中有雷公藤甲素质量分数极高的个体,值得进一步研究,以寻找质量分数高的优良单株。

关键词:雷公藤属;雷公藤;昆明山海棠;黑蔓;雷公藤甲素;高效液相色谱法

中图分类号:R282.6

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2005)07-1065-04

收稿日期:2004-11-23

基金项目:浙江省林业重大科研项目“木本药材高效栽培技术及有效成分提取工艺的研究”资助项目(2002 A 01)

作者简介:黄文华(1969—),女,新疆石河子市人,助理研究员,硕士,中国医学科学院中国协和医科大学药用植物研究所工作,从事天然药物和药用植物资源的科研工作。 Tel:(010)62899728 Fax:(010)62899717 E-mail:hwhzh69@sohu.com

* 通讯作者 郭宝林 Tel:(010)62899732 E-mail:guobaolin010@yahoo.com.cn

Triptolide in different populations and individuals of three species of *Tripterygium* Hook. f.HUANG Wen-hua¹, GUO Bao-lin¹, SI Jin-ping², RUAN Xiu-chun², YU Jing-guang¹, SUN Lan¹

(1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100094, China; 2. Institute of Forestry Sciences of Lishui, Lishui 323000, China)

Abstract: Objective To determine the triptolide in different populations and individuals of three species of *Tripterygium* Hook. f. (*Tripterygium wilfordii*, *T. hypoglaucum*, and *T. regellii*), establish a foundation for evaluating the quality of species in *Tripterygium* Hook. f., and find good germplasm of *Tripterygium* Hook. f. **Methods** HPLC method for determining triptolide was established. The triptolide in xylem and phloem of 25 populations and 91 individuals from main distribution areas in China was determined. **Results** The triptolide in *T. regellii* was very low. The interspecies difference between *T. wilfordii* and *T. hypoglaucum* was not conspicuous. The range of triptolide of the individual was 1.0×10^{-6} — 5.83×10^{-5} in xylem and 2.3×10^{-6} — 1.030×10^{-4} in phloem. **Conclusion** The quality of species in *Tripterygium* Hook. f. from different resources varies significantly. It will affect seriously the security of administering drugs. The highest value of triptolide is about 50 times as the lowest value in different individuals and more than 10 times in different populations. The populations with higher triptolide are in the southwest and middle parts of Zhejiang Province, Xinning, Hunan Province, Leishan, Guizhou Province, and Huangshan, Anhui Province. The individuals with very high contents of triptolide exists in Xinning, Hunan Province, Leishan, Guizhou Province, and Jiangshan, Zhejiang Province populations. So further study on the three populations should be carried out to find good individuals.

Key words: *Tripterygium* Hook. f.; *T. wilfordii* Hook. f.; *T. hypoglaucum* (Levl.) Hutch; *T. regellii* Sprague et Takeda; triptolide; HPLC

雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 系卫矛科雷公藤属植物,具有抗炎、抗菌、免疫调节、抗肿瘤及抗生育等多种药理作用,其原生药及其各类制剂的临床应用极为广泛,用于治疗类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、肾脏病和多种皮肤病,均取得良好的疗效,尤其是治疗各种免疫亢进性疾病的首选药物。但雷公藤又具有一定的毒性,其主要有效成分同时又是毒性成分,治疗安全范围比较窄,临床使用的不良反应时有报道,因此,严格控制雷公藤制剂的质量是当前雷公藤应用最关键的问题,而药材质量控制是首要环节,但迄今为止,该方面的研究极为薄弱。

雷公藤同属植物昆明山海棠 *T. hypoglaucum* (Levl.) Hutch. 和黑蔓 *T. regellii* Sprague et Takeda 含有与雷公藤相同和类似的成分,具有相近的功效,也有相应的临床使用制剂。本课题组通过对雷公藤属 3 种植物在全国主要分布地区资源的调查和药材及活植物的采集、引种,研究其中的主要有效成分质量分数以及其影响的主要因素,系统评价雷公藤药材的质量,并从中筛选出优良的种质,为今后的种植推广,最终实现雷公藤药材质量的稳定可控奠定基础。本实验首先对雷公藤属 3 种植物 25 个群体及其中的个体中雷公藤甲素质量分数进行研究。

笔者采集的雷公藤活植物经种植后发现,采集于浙江和福建泰宁海拔高于 500 m 的样品,依据其形态特征无法将其归于雷公藤或昆明山海棠,暂定为拟雷公藤和拟昆明山海棠,即依据《中国植物志》:雷公藤叶小,叶背无白粉;昆明山海棠叶片大,叶背白粉明显;而拟雷公藤叶片较小,白粉较少或无,接近雷公藤;拟昆明山海棠,叶片较大,叶背有白粉,接近昆明山海棠。另外又发现嫩叶颜色特别的两种类型:C:紫红,D:嫩绿。本实验先据此分类,形态学以及形态与质量的关系待以后进一步研究。

1 仪器、试剂与药材

1.1 仪器: Waters-高效液相色谱仪: Waters 600 型泵, 2487 型检测器, Millennium³² 色谱工作站。

1.2 试剂: 甲醇为色谱纯, 重蒸水, 其他提取用有机溶剂为分析纯。雷公藤甲素对照品由笔者从雷公藤植物根中分离得到, 其光谱和熔点测定结果与文献报道一致, HPLC 色谱归一法测定质量分数大于 99%。

1.3 药材: 试验所用雷公藤属 3 种植物的根采自浙江、福建、湖南、湖北、贵州、云南、江西、安徽、吉林 9 个省的 22 个市县的 25 个居群, 每个居群取 3~5 个个体, 共计 91 个样本(表 1), 采集时间为 2002 年和 2003 年 10~12 月。由于雷公藤根的韧皮部和木质

部所含的成分种类和质量分数以及所具有的毒性有较大差别,本实验均将每一个个体样本分为两个部位测定,取粗细基本一致的根进行分析。

2 方法与结果

2.1 色谱条件:色谱柱:Merck公司的Lichrospher 100 RP-18e柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m),流动相:甲醇-水(45:55),体积流量:0.75 mL/min,检测波长:218 nm,柱温:22℃,进样量:10 μ L。雷公藤甲素保留时间:12.33 min,对照品和样品色谱图见图1。

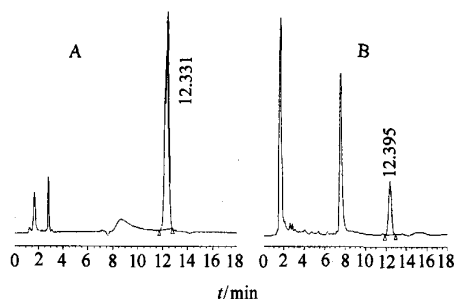


图1 雷公藤甲素对照品(A)和雷公藤药材样品(B)的HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC chromatograms of triptolide (A) and sample of *T. wilfordii* (B)

2.2 对照品溶液的制备:用微量分析天平精密称取雷公藤甲素对照品适量,用甲醇-水(6:4)溶解并定容得9.156 μ g/mL溶液,作为对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备:将每一个样本先刮去植物根的栓皮,然后将其韧皮部与木质部分开,分别粉碎过40目筛,备用。参照文献[1]方法精密称取样品粉末0.27 g,置磨口三角瓶中,加醋酸乙酯25 mL,浸泡过夜(16 h),超声提取45 min,静置,过中性氧化铝柱(含2.5 g中性氧化铝,玻璃柱d=1.0 cm),然后用15 mL醋酸乙酯冲洗柱子,合并流出液和洗脱液,减压回收醋酸乙酯至干,放置过夜后,用甲醇-水(6:4)溶液溶解并定容至2 mL容量瓶中,摇匀,过0.45 μ m微孔滤膜,取续滤液为进样液。

2.4 标准曲线及线性范围:精密吸取雷公藤甲素对照品溶液,依次进样2、4、8、10、12、16、18 μ L,分别进样3次,以峰面积平均值(A)为纵坐标,对照品进样量(C)为横坐标,得线性回归方程: $A = 3.64 \times 10^6 C - 2.01 \times 10^4$, $r = 0.9999$,线性范围:0.018~0.165 μ g。

2.5 精密度试验:精密吸取雷公藤甲素对照品溶液10 μ L,连续进样6次,测定峰面积,平均峰面积为330 141.7, RSD=0.86% ($n=6$)。

2.6 稳定性试验:精密吸取样品391-2溶液10 μ L,每2 h进样1次,共测定5次,雷公藤甲素的平均峰

面积为385 270, RSD=1.20% ($n=5$),表明供试样品溶液在8 h内稳定。

2.7 重复性试验:按2.3项方法分别制备5份样品(42-1)溶液,按上述色谱条件测定,雷公藤甲素的平均峰面积为65 860, RSD=1.41% ($n=5$)。

2.8 加样回收率试验:精密称取已知质量分数的样品5份,加入适量对照品溶液,混匀,按2.3项方法处理,在上述色谱条件下测定雷公藤甲素(μ g),计算平均回收率为98.06%, RSD=0.77% ($n=5$)。

2.9 样品测定:分别精密吸取样品溶液各10 μ L,注入高效液相色谱仪,按上述色谱条件各测定3次,计算样品中雷公藤甲素,结果见表1。

3 讨论

3.1 本实验的测定方法经过了重复性、精密度、稳定性和回收率试验,并且获得的药材质量分数范围值与文献报道的使用薄层扫描、HPLC以及气相色谱方法测定的结果基本一致^[1~4]。

3.2 在分析样品的结果中,雷公藤和昆明山海棠中个体韧皮部质量分数(μ g/g)最高值103.0与最低值2.3相差约50倍,木质部质量分数(μ g/g)最高值58.3与最低值1.0也相差约50倍,居群韧皮部最高值64.1与最低值5.4相差10多倍,木质部最高值23.3与最低值1.9也相差10多倍,表明不同来源的药材质量差异极大,对于雷公藤甲素这一安全范围很小的成分,药材的质量至关重要。本研究未发现文献报道^[6]的类似福建永安产药材木质部质量分数(μ g/g)达102.5和浙江新昌产药材全根质量分数75.0的情况,有待于以后研究的进一步验证。

3.3 按位于总样本数量前20%为限,木质部大于17.0 μ g/g,或韧皮部大于50.0 μ g/g个体确定为优良单株,木质部平均质量分数(μ g/g)大于15.0,或韧皮部平均大于40.0居群确定为优良居群。可看出韧皮部高于40.0的8个优良居群按顺序为:浙江遂昌64.1>浙江江山49.1>浙江景宁47.3>安徽黄山46.9>贵州雷山46.2>湖南新宁44.2>浙江义乌44.1>浙江开化40.8;木质部高于15.0的7个优良居群按顺序为:湖南新宁24.8>浙江松阳(拟雷公藤)21.5>浙江松阳(雷公藤)17.6>浙江遂昌16.4>福建泰宁15.9>浙江江山15.7>浙江庆元15.2。据此找到值得关注的韧皮部和木质部质量分数均比较高的优良居群分布于浙江以义乌为界,以西以南的地区,其中遂昌和江山居群质量分数最高,其他地区的韧皮部一般不低于30.0,木质部不低于10.0(缙云、武义的拟昆明山海棠除外),而位于浙江

表 1 雷公藤属植物不同个体和群体雷公藤甲素的测定结果

Table 1 Determination of triptolide in different individuals and populations of species in *Tripterygium* Hook. f.

样品类型	产 地	样本个数	雷公藤甲素均值(范围)/(μg · g ⁻¹)	
			木质部	韧皮部
雷公藤	浙江丽水	5	10.5 (5.0~27.0)	31.7 (8.3~50.0)
拟雷公藤	浙江开化	5	11.2 (6.0~15.6)	40.8 (17.2~58.8)
拟雷公藤	浙江江山	5	15.7 (7.4~24.8)	49.1 (12.4~78.3)
雷公藤	浙江苍南	3	5.3 (4.7~ 6.1)	22.0 (17.5~29.8)
雷公藤	浙江乐清	3	3.7 (2.4~ 5.1)	22.5 (16.3~29.5)
雷公藤	浙江义乌	4	12.1 (4.7~22.6)	44.1 (36.3~48.9)
雷公藤	浙江云和	3	10.9 (3.1~24.5)	37.3 (29.7~47.0)
雷公藤	浙江松阳	2	21.5 (18.1~24.9)	38.2 (24.5~51.8)
拟雷公藤	浙江松阳	3	17.6 (6.7~23.6)	24.6 (11.8~50.2)
雷公藤	浙江缙云	5	9.7 (3.5~17.9)	38.7 (10.7~67.3)
拟昆明山海棠	浙江缙云	2	1.9 (1.0~ 2.8)	5.4 (2.3~ 8.4)
拟雷公藤	浙江景宁	5	11.2 (7.0~17.4)	47.3 (15.7~64.1)
拟雷公藤	浙江遂昌	3	16.4 (10.9~19.2)	64.1 (54.2~78.1)
拟雷公藤	浙江庆元	3	15.2 (7.9~22.2)	39.6 (26.5~53.2)
拟昆明山海棠	浙江武义	5	3.4 (2.6~ 4.9)	23.2 (16.8~29.4)
雷公藤	湖北通城	3	5.0 (4.2~ 6.4)	34.3 (15.7~43.9)
雷公藤	江西萍乡	3	12.5 (8.3~16.3)	21.6 (14.0~28.9)
雷公藤	安徽黄山	3	14.8 (12.7~16.6)	46.9 (38.9~55.6)
拟昆明山海棠 C	福建泰宁	5	11.9 (5.5~21.2)	22.1 (16.1~37.1)
拟昆明山海棠 D	福建泰宁	3	15.9 (11.2~19.6)	20.0 (12.3~27.1)
昆明山海棠	云南昆明	5	5.8 (2.0~13.1)	14.4 (6.1~26.3)
昆明山海棠	湖南新宁	4	24.8 (5.2~58.3)	44.2 (5.4~103.0)
昆明山海棠	贵州雷山	3	12.6 (6.3~17.6)	46.2 (28.9~80.0)
昆明山海棠	江西遂川	3	9.0 (1.6~16.6)	13.5 (9.0~21.0)
黑蔓	吉林通化	3	0.7 (0.5~ 0.9)	2.8 (0.3~ 5.3)

样本编号为统一编号,便于不同研究结果的相互比较;加“_”标注的为雷公藤甲素居于前 20% 的数值。

Sample code is uniform for intercomparison of different research results; “_” means that triptolide lies before 20%

沿海的苍南和乐清居群质量分数低。湖南新宁、贵州雷山和安徽黄山的居群为质量分数高的居群,历来认为福建泰宁产雷公藤质量较好,但笔者发现仅木质部质量分数相对较高,因此,从雷公藤甲素质量分数的角度看,不及浙江产。而江西、云南产雷公藤或昆明山海棠的质量分数低,将不被考虑作为提高雷公藤甲素质量分数良种选育的种质资源。

3.4 在分析的个体样本中,湖南新宁的 132 号韧皮部质量分数(μg/g)高达 103.0、木质部达 58.3,在所有分析样品中质量分数最高;其次为贵州雷山的 159 号,分别为韧皮部 80.0,木质部 17.6;以及浙江江山的 41 号(韧皮部 78.3,木质部 24.8);同时发现这 3 个居群个体间差异极大,将值得扩大样本研究,从中选择出优良的单株。

3.5 黑蔓(东北雷公藤)植物在所有样本中雷公藤甲素质量分数最低,在木质部中仅为 0.7 μg/g,韧皮部为 2.8 μg/g,符合目前用药的实际情况,也不应作为雷公藤入药。笔者没有发现雷公藤和昆明山海棠种间存在雷公藤甲素的质量分数的明显差异。在形态和质量分数的相关性方面,仅发现在同一地区分

布于高海拔的形态接近昆明山海棠的样本,其雷公藤甲素质量分数低于分布于低海拔形态为典型雷公藤的样本(如浙江缙云的样本,武义的拟昆明山海棠),是形态的或地理为主要影响因素有待进一步研究,可以考虑在遂昌、景宁和武义采集低海拔样本,以及测定移栽于相同环境下的样本。

3.6 木质部和韧皮部的雷公藤甲素质量分数的一致或不一致,规律不明显。

References:

[1] Chi Y M, Wen H M, Xu J G, et al. Determination of content of triptolide in *Tripterygium wilfordii* herbal pieces with HPLC method [J]. *J Nanjing Univ Tradit Chin Med; Nat Sci* (南京中医药大学学报:自然科学版), 2001, 17(1): 32-33.

[2] Zhang L, Zhang Z X, Sheng L S, et al. The determination of triptolide in *Tripterygium wilfordii* by capillary gas chromatography [J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 1992, 23(3): 158-160.

[3] Cheng Z Z, Fang H. Determination of content of triptolide in *Tripterygium wilfordii*'s root of the different parts and seasons [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1986, 17(2): 12-13.

[4] Yang C X, Zhou T C, Qin W Z. The content variation of triptolide in *Tripterygium wilfordii* in the different parts and seasons [J]. *Chin Hosp Pharm J* (中国医院药学杂志), 2001, 21(1): 25-26.

[5] Yu L R, Li J L. The thin scanning determination of triptolide in *Tripterygium wilfordii* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1988, 19(2): 18-20.