

品溶液制备方法制备,测定。每批样品测定 3 份,按外标法计算原薯蓣皂苷质量分数,测定结果见表 1。

表 1 菝葜提取物中原薯蓣皂苷的测定结果 (n=3)

Table 1 Protodioscin in *T. terrestris* extract (n=3)

批号	原薯蓣皂苷/(mg·g ⁻¹)	RSD/%
050612	164.90	0.90
050608	153.21	1.12
050616	161.65	0.85
050528	165.86	0.75
050620	160.62	1.05

3 讨论

3.1 检测波长的选择:将原薯蓣皂苷对照品储备液在紫外分光光度计上于 200~700 nm 进行波长扫描,结果原薯蓣皂苷在 203 nm 处有特征吸收,因此确定 203 nm 为原薯蓣皂苷的检测波长。

3.2 洗脱条件的选择:采用高效液相色谱等度洗脱时,流动相比例为 35% 乙腈水溶液,由于原薯蓣皂苷结构式中只含有一个双键,因此,在 203 nm 处吸

收值很小,色谱峰面积也很小,色谱峰分离效果不好。而采用高效液相色谱梯度洗脱法时,虽然基线有波动,但色谱峰能够达到很好的分离,并且色谱峰面积稳定。因此宜采用梯度洗脱法进行测定。

References:

[1] Ch P (中国药典) [S]. Vol 1. 2005.
 [2] Chu S D, Qu W J, Li M, et al. Research advance on chemical component and pharmacological action of *Tribulus terrestris* [J]. *Chin Wild Plant Resour* (中国野生植物资源), 2003, 22(4): 4-7.
 [3] Adimoelja A. Phytochemicals and the breakthrough of traditional herbs in the management of sexual dysfunctions [J]. *Int J Androl*, 2000, 23(Suppl 12): 82-84.
 [4] Gauthaman K, Adaikan P G, Prasad R N V. Aphrodisiac properties of *Tribulus terrestris* extract (protodioscin) in normal and castrated rats [J]. *Life Sci*, 2002, 71(12): 1385-1396.
 [5] Ganzera M, Bedir E, Khan I A. Determination of steroidal saponins in *Tribulus terrestris* by reversed-phase high performance liquid chromatography and evaporative light scattering detection [J]. *J Pharm Sci*, 2001, 11: 1752-1758.
 [6] Trimbak R, Sasikumar M, Yashwantrao A, et al. Quantitation of protodioscin in *Tribulus terrestris* L. fruit powder by reversed-phase high-performance thin-layer chromatography [J]. *J Planar Chromatogr*, 2004, 17: 379-382.

雷公藤叶提取物高效液相色谱指纹图谱的研究

李克,王曙东,陈爽

(南京军区南京总医院 检验中心,江苏 南京 210002)

雷公藤 *Tripterygium Wilfordii* Hook. f. 系卫矛科雷公藤属植物,主产于浙江、江西、福建、广东、安徽等地。主要含有二萜、三萜、倍半萜、生物碱及苷类、糖类、醇类和微量元素等成分。具有抗肿瘤、抗炎以及免疫抑制等药理活性。雷公藤提取物研制的制剂用于治疗类风湿性关节炎、白血病、肾病综合症、肿瘤等取得了较好的疗效并已被广泛认可^[1~4]。雷公藤含有许多毒性成分,在临床应用上仍会经常发生不良反应^[5,6]。因此,需要对雷公藤药材进行整体质量的综合控制。研究开发新型、低毒剂型显得十分必要。指纹图谱分析是近年发展起来的对中药及其制剂进行综合宏观分析和质量控制的可行手段,现已成为控制中药质量的有效方法^[7,8]。

本实验采用 HPLC 法研究了采收于不同季节的雷公藤叶提取物的色谱指纹图谱,并利用色谱相对峰面积和相对保留时间作为参数,比对了不同季节的雷公藤叶之间的异同,为合理开发利用雷公藤药材提供了参考。

1 材料

Integral 100 高效液相色谱仪系统(美国 Perkin Elmer 公司)。N-2000 色谱数据工作站(浙江大学智能信息工程研究所)。雷公藤甲素对照品(批号:1566-200201)购自中国药品生物制品检定所。雷公藤叶药材购自浙江省永康市,其采收期分别为夏季(7月)和冬季(12月),经南京军区南京总医院王玉玺副主任药师鉴定。D-101 大孔吸附树脂购自天津海光化工有限公司。储备液制备:精确称取雷公藤甲素对照品 5 mg,加少许甲醇溶解后,以流动相确定容至 5 mL,摇匀,置 4℃ 冰箱保存。

流动相采用色谱纯级乙腈配制。其余试剂均为分析纯级试剂,试验用水均使用超纯净水。

2 方法与结果

2.1 色谱条件:色谱柱:Lichrospher C₁₈ 高效液相色谱分离柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)(江苏汉邦科技有限公司);流动相:乙腈-水(39:61);检测波长:210 nm;体积流量:0.80 mL/min;定量管体积:20

μL ; 色谱分离柱温: $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

2.2 样品的提取及供试品溶液的测定: 取雷公藤叶 $1\ 000\ \text{g}$, 95% 乙醇回流 3 次, 每次 2 h。滤液浓缩至适量后, 加 10 倍蒸馏水煮沸, 抽滤。取滤液 $400\ \text{mL}$ 过 $20\ \text{g}\ \text{D-101}$ 大孔吸附树脂吸附, 以水洗除去杂质后, 用 95% 乙醇解吸, 再经 Al_2O_3 柱吸附除杂, 然后用酯酸乙酯-石油醚混合溶剂洗脱。将洗脱液挥干后用少量甲醇溶解, 流动相定容, 即得雷公藤叶提取物供试品溶液备用。

将雷公藤叶药材提取物和雷公藤甲素对照品, 分别用流动相配制成供试品溶液, $0.22\ \mu\text{m}$ 针式过滤器滤过后进样测定。

2.3 HPLC 指纹图谱方法学建立与考察

检测波长选择: 测定了检测波长在 $205\sim 225\ \text{nm}$ 下雷公藤叶提取物的紫外吸收色谱指纹图谱。结果显示, 在 $210\ \text{nm}$ 处出现的色谱峰数目适中, 且各色谱峰相互之间分离度较好, 基线平稳。

流动相选择: 研究了流动相组成对色谱指纹图谱分离情况的影响。结果显示, 雷公藤叶提取物在乙腈-水流动相体系中即可得到满意的分离。当流动相中乙腈比例在 $20\%\sim 50\%$ 时, 随着乙腈比例减少, 指纹图谱中各色谱峰保留时间呈延长趋势。综合考虑, 用于雷公藤叶提取物色谱指纹图谱检测较为适宜的流动相条件为乙腈-水 ($39:61$)。

分离柱温选择: 考察了分离柱温对雷公藤叶提取物指纹图谱的检测影响。结果显示, 柱温变化对各色谱峰的保留时间和峰面积影响不大。但在恒温条件下, 各色谱峰保留时间和峰面积的稳定性和重复性均得到明显改善, 试验选择分离柱温为 $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。

内参物的选择: 雷公藤甲素又称雷公藤内酯醇, 是从雷公藤中分离的二萜类内酯, 是雷公藤中最具代表性的活性成分之一, 生药中也多以雷公藤甲素评价药材质量的好坏^[7]。在本实验条件下, 雷公藤甲素的色谱峰为谱图中 7 号峰, 其色谱峰面积约占总峰面积 20% 以上 (以夏季采收药材为例), 且色谱保留时间和峰面积稳定, 与相邻其他色谱峰分离较好, 故选择雷公藤甲素为指纹图谱的内参物。按雷公藤甲素峰计算, 分离系统理论塔板数约为 6.6×10^4 。

共有峰的选定: 在色谱指纹图谱研究中, 不同样品中相对保留时间值相同的峰, 称为色谱指纹图谱共有峰。按上述方法检测了 5 批雷公藤叶提取物的指纹图谱。见图 1。结果显示, 共出现色谱峰近 30 个, 其中 18 个峰为 5 批雷公藤叶提取物所共有。考虑到溶剂对保留时间小于 $5\ \text{min}$ 的色谱峰的影响,

并以单峰面积大于或等于 2% 为选择标准, 确定了 10 个峰为共有色谱指纹峰 (表 1), 其相对保留时间分别为: 1 ($0.466\ 8\sim 0.471\ 7$), 2 ($0.547\ 5\sim 0.551\ 5$), 3 ($0.575\ 3\sim 0.580\ 6$), 4 ($0.652\ 9\sim 0.656\ 1$), 5 ($0.696\ 7\sim 0.699\ 6$), 6 ($0.898\ 9\sim 0.902\ 1$), 7 ($1.000\ 0$), 8 ($1.125\ 2\sim 1.130\ 8$), 9 ($1.211\ 8\sim 1.224\ 5$), 10 ($2.204\ 1\sim 2.223\ 7$)。其中 6 号峰为 1 个未达基线分离的双峰, 当分离柱效下降时, 其第 2 个峰表现为 1 个小肩峰。谱图处理时将此双峰视为 1 组峰计算峰面积, 保留时间以第 1 个峰的保留时间计。10 个共有指纹峰的总面积约占总峰面积 90% , 且相对保留时间和相对峰面积较为稳定、重复。

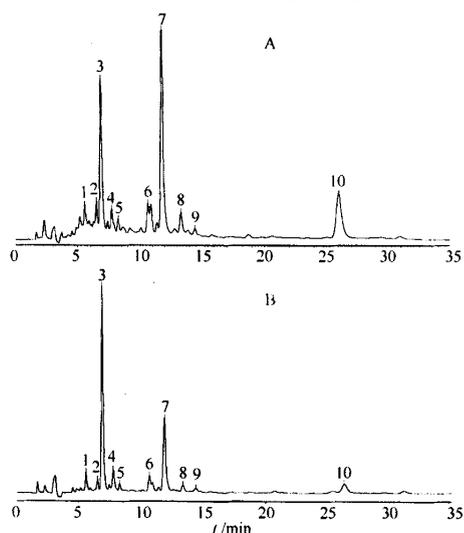


图 1 采收于冬季(A)和夏季(B)的雷公藤叶提取物的 HPLC 指纹图谱

Fig. 1 HPLC Fingerprint of extract in *Wilfordia* leaves collected in winter (A) and in summer (B)

稳定性试验: 取一新配制供试品溶液, 分别在 0、2、4、8、12 h 进样检测指纹图谱。以雷公藤甲素为内参比峰, 计算各共有峰的相对保留时间和相对峰面积。结果显示, 10 个共有峰的色谱相对保留时间的 RSD 小于 0.5% 、相对峰面积的 RSD 小于 2% 。

精密性试验: 取采收于冬季的雷公藤叶提取物, 配制成供试品溶液, 连续进样 5 次。结果共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD 分别为 $0.11\%\sim 0.30\%$ 和 $0.22\%\sim 1.23\%$ 。

重现性试验: 平行取 5 份采收于夏季的雷公藤叶提取物, 配制成供试品溶液, 分别进样检测。结果显示, 共有峰的相对保留时间和相对峰面积的 RSD

分别小于 0.5% 和小于 2.5%。

表 1 雷公藤叶提取物指纹图谱分析结果
(采收季节:7月, n=5)

Table 1 Fingerprint analysis of extract in *I. wilfordii* leaves
(collected in July, n=5)

峰号	相对保留时间		相对峰面积	
	均值	RSD/%	均值	RSD/%
1	0.468 6	0.40	0.149 6	0.88
2	0.548 7	0.29	0.082 7	0.69
3	0.577 3	0.35	1.903 2	0.96
4	0.654 3	0.19	0.204 2	2.44
5	0.698 5	0.16	0.053 2	1.34
6	0.900 6	0.15	0.276 3	0.59
7	1	0	1	0
8	1.128 3	0.21	0.084 4	1.13
9	1.219	0.47	0.040 4	2.39
10	2.216 5	0.33	0.234 4	2.04

3 讨论

传统上,由于雷公藤毒性较大,通常使用去皮的根入药,造成毁灭性采收使用,而雷公藤的叶子基本没有得到很好的利用。如何克服或降低雷公藤叶的药用毒性,开发新剂型,对满足临床用药及科学、环保地开发利用我国中药资源都具有重大的意义。

分别取采收于夏季(7月)和冬季(12月)的雷公藤叶提取物,按本方法制成供试品溶液测定图谱。结果显示,两组样品 HPLC 指纹图谱中主要峰群的面貌基本一致,提示不同采收季节雷公藤叶中的主成分基本相同。但其中某些成分的相对比值却有所不同,尤其是 3 号、7 号峰差异显著。采收于冬季的雷公藤叶样品中 7 号峰(雷公藤甲素)的量高于 3 号峰。而采收于夏季的雷公藤叶样品中 3 号峰的量却

显著高于 7 号峰。文献报道夏季采收的雷公藤药材毒性最大,而冬季采收的雷公藤药材毒性较小^[6]。因此,3 号峰组分是否即为含有较强毒性的组分尚有待进一步研究。

通过高效液相色谱指纹图谱检测分析研究,可以简便、快速地区分采收于不同季节的雷公藤叶药材,从而为雷公藤叶药材的鉴定和内在质量控制提供参考。同时也为科学、环保地开发利用雷公藤药材资源、促进我国中药材资源的可持续发展和开发雷公藤新剂型、降低雷公藤叶的药用毒性提供了有效的参考依据。

References:

- [1] Gao X P, Li B G, Zhou J, et al. Antitumor activities and induction of apoptosis by triptolide [J]. *Nat Prod Res Devel* (天然产物研究与开发), 2000, 12(1), 18-21.
- [2] Yao W C, Cen Y Z. Status in applied study on *Tripterygium wilfordii* glycoside in treatment of rheumatoid arthritis [J]. *Chin Rem Clin* (中国药物与临床), 2002, 2(6): 392-393.
- [3] Zhou X H, Li G J. Advance in study on anti-inflammatory function of *Tripterygium wilfordii* [J]. *Med Recapit* (医学综述), 1995, 1(5): 201-203.
- [4] Lin X, Li M B. Advance in application of *Tripterygium wilfordii* in treatment of nephrosis [J]. *Chin J Integrated Tradit West Nephrol* (中国中西医结合肾病杂志), 2001, 2(9): 557-558.
- [5] Zhu T Z. An approach cause of death due to *Tripterygium wilfordii* poisoning [J]. *Beijing J Tradit Chin Med* (北京中医), 1995(2): 35-37.
- [6] Sun X, Zhang S M, Tian C H, et al. Safety of *Tripterygium wilfordii* [J]. *Chin J New Drugs* (中国新药杂志), 2001, 10(7): 539-543.
- [7] Li K, Wang S D, Song B S. Fingerprint of Chinese material medica and its effects on development of Chinese material medica [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33(11): 961-963.
- [8] Zhang K R, Bi K S. Study on fingerprints of *Radix Paeoniae Rubra* by HPLC [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34(11): 1048-1051.
- [9] Zhang L, Zhang Z X, Shang 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.

敬告读者

《中草药》杂志编辑部尚存部分过刊合订本,包括:1974-1975年、1976年、1979年、1985-1994年(80元/年)、1995-1997年(110元/年)、1998年(120元/年)、1999年(135元/年)、2000年(180元/年)、2001-2003年(200元/年)、2004年(220元/年)。1996年增刊(50元)、1997年增刊(45元)、1998年增刊(55元)、1999年增刊(70元)、2000年增刊(70元)、2001年增刊(70元)、2002年增刊(65元)、2003年增刊(65元)、2004年增刊(65元)、2005年增刊(65元)。欢迎订购。订读者请直接与《中草药》杂志编辑部联系。

电话:(022) 27474913 23006821 传真:(022) 23006821

E-mail: zcyzzbjb@tjipr.com