

一测多评法同时测定雷公藤药材及制剂雷公藤多苷片中 7 个质控成分

姬翔宇^{1,2}, 张子雯², 陈姿伊², 周斌铨², 叶春颖², 计燕萍^{2*}, 詹淑玉^{2*}

1. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 311403

2. 嘉兴学院医学院, 浙江 嘉兴 314001

摘要: 目的 为提高雷公藤质量控制水平, 建立同时测定雷公藤药材及制剂雷公藤多苷片中 7 个成分的一测多评 (quantitative analysis of multi-components with a single-marker, QAMS) 方法。方法 采用 HPLC 法, 以雷酚内酯为参照物, 计算其它 6 种成分雷公藤甲素、雷公藤内酯酮、雷公藤晋碱、雷公藤次碱、雷公藤红素和雷公藤内酯甲的相对校正因子 ($f_{k/s}$), 并对 $f_{k/s}$ 进行耐用性考察。搜集不同产地、厂家及不同批号的 9 批雷公藤药材和 10 批雷公藤多苷片, 分别采用外标法和 QAMS 法测定 7 个成分含量, 比较两者的差异。结果 各个成分的 $f_{k/s}$ 重复性良好, 对 19 批样品运用 QAMS 法和外标法得到的各成分含量无显著性差异 (相对平均偏差 < 3%); 不同厂家、不同批号及不同产地来源的雷公藤多苷片及雷公藤药材中 7 个成分含量均存在较大差异, 说明应提高雷公藤中药的质量控制标准。结论 所建立的 QAMS 法准确性高, 可用于雷公藤药材及其相关制剂的多成分同时定量分析, 为雷公藤中药的全面质量控制提供方法参考。

关键词: 一测多评法; 雷公藤; 雷公藤多苷片; 质量控制; 雷酚内酯; 雷公藤甲素; 雷公藤内酯酮; 雷公藤晋碱; 雷公藤次碱; 雷公藤红素; 雷公藤内酯甲; 相对校正因子

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)17-5338-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.17.010

Simultaneous quantitative determination of seven components in *Tripterygium wilfordii* herbs and preparations of *Tripterygium wilfordii* polyglycosides Tablets by QAMS method

Ji Xiang-yu^{1, 2}, ZHANG Zi-wen², CHEN Zi-yi², ZHOU Bin-cheng², YE Chun-ying², JI Yan-ping², ZHAN Shu-yu²

1. School of Pharmaceutical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311403, China

2. Medical College of Jiaxing University, Jiaxing 314001, China

Abstract: Objective To improve quality control level of Leigongteng (*Tripterygium wilfordii*), a traditional Chinese medicine, the method of quantitative analysis of multi-components with a single-marker (QAMS) was established to simultaneously determine seven components in *T. wilfordii* herbs (TWH) and preparations of *Tripterygium wilfordii* polyglycosides Tablets (TWPT). **Methods** Using triptophenolide as the reference, the relative correction factors ($f_{k/s}$) of other components of triptolide, triptonide, wilforgine, wilforine, tripterine and wilforlide were calculated by HPLC, and then the durability of $f_{k/s}$ was investigated. Nine samples of TWH and 10 samples of TWPT from different origins, manufacturers and batch numbers were collected and their components were determined using the external standard method (ESM) and QAMS method, respectively. The determination results of seven components in 19 samples using ESM and QAMS method were compared. **Results** The repeatability of $f_{k/s}$ for each component was good. There was no significant difference (RAD < 3%) between the measured values of QAMS method and ESM. The components contents in TWH from different origins and TWPT from different manufacturers and batch numbers were both greatly different. The results demonstrated quality control standard of *T. wilfordii* should be improved. **Conclusion** The established QAMS method has

收稿日期: 2022-02-17

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81503338); 浙江省基础公益研究计划项目 (LGF22H280004); 嘉兴市科技计划项目 (2020AY10022); 嘉兴学院重点 SRT 资助项目

作者简介: 姬翔宇, 硕士研究生, 研究方向为中药质量控制。E-mail: jxy912912@163.com

*通信作者: 詹淑玉, 博士, 教授, 研究方向为中药药理学与中药药理学。E-mail: zhansy2000@163.com

计燕萍, 硕士, 实验师, 研究方向为中药药剂学和中药药理学。E-mail: 623220865@qq.com

high accuracy and it can be used for the simultaneous quantitative determination of multiple components in TWH and preparations of *T. wilfordii*. This method will provide a method reference for the comprehensive quality control of *T. wilfordii*.

Key words: QAMS; *Tripterygium wilfordii* Hook. f.; *Tripterygium wilfordii* polyglycosides Tablets; quality control; triptophenolide; triptonide; triptonide; wilforgine; wilforine; tripterine; wilforlide; relative correction factors

雷公藤来源于卫矛科雷公藤属植物雷公藤 *Tripterygium wilfordii* Hook. f. 的干燥根, 产于浙江、安徽、福建、云南、广西等地, 具有清热解毒、消肿止痛、祛风通络、舒筋活血、杀虫止血等功效^[1], 主要含有二萜类、三萜类、生物碱和倍半萜类等多种活性成分^[2]。雷公藤多苷 (*Tripterygium wilfordii* polyglycoside) 是从雷公藤药材中提取的总苷混合物, 为我国首先研究利用的抗炎免疫调节中药提取物, 对类风湿性关节炎、糖尿病肾病、紫癜性肾炎、系统性红斑狼疮等难治性或顽固性疾病疗效显著, 有“中草药激素”之称^[3-7]。雷公藤多苷中的主要成分如雷公藤红素、雷公藤晋碱和雷公藤次碱等既是有效成分也是毒性成分, 由其导致的不良反应多发^[8-10], 在一定程度上限制了中药雷公藤的临床应用。

目前, 市场上雷公藤药材及雷公藤多苷片 (*Tripterygium wilfordii* polyglycosides Tablets, TWPT) 鱼目混杂, 不同来源的药材及制剂中主要成分含量往往差异较大, 而多数仅以雷公藤甲素或雷公藤红素为单一评价指标^[11-14], 质量控制水平不足是雷公藤药材及其制剂产生不良反应的主要原因之一。雷公藤药材及 TWPT 定性分析研究^[15-18]已经广泛开展, 而对其多成分的定量研究还很有限, 现有方法主要基于 HPLC, 采用常规的外标法测定了雷公藤药材或 TWPT 中几种含量较高、且对照品易得的成分^[19-20], 还无法全面控制雷公藤药材及其制剂的质量, 特别是对于一些对照品难以获取、价格昂贵的成分, 对其进行定量分析还存在较多限制。

一测多评 (quantitative analysis of multi-components with a single-marker, QAMS) 法是近年来在中药研究领域内普遍认可、应用较广泛的中药质量控制模式, 它是利用中药各有效成分内在函数关系 (相对校正因子, $f_{k/s}$), 通过只测定某一典型组分的含量, 来实现多指标成分的同步测定^[21]。目前, 在中药质量控制中 QAMS 的研究方法体系日益完善, 其应用范围不断扩大^[22-25]。虽然已有关于雷公藤提取物 QAMS 法的研究报道^[26], 但还存在着测定时间较长、方法普适性不高及分析样本量不足等问题, 另外还未见有关雷公藤制剂的 QAMS 法含量测定。因此, 本研究基于优化的 HPLC 色谱条件,

采用 QAMS 法对不同产地、来源的 9 批雷公藤药材以及不同厂家、批号的 10 批 TWPT 样品中的 7 个质控成分进行定量分析。以雷酚内酯为参照物, 计算雷公藤药材及多苷片中其他 6 种成分雷公藤甲素、雷公藤内酯酮、雷公藤晋碱、雷公藤次碱、雷公藤红素和雷公藤内酯甲的 $f_{k/s}$, 并对 $f_{k/s}$ 进行耐用性考察, 在此基础上对 19 批样品采用 QAMS 法进行了多成分含量测定, 并与外标法的结果进行比较, 证明了 QAMS 法的可行性。本研究基于 QAMS 法开展雷公藤药材及制剂 TWPT 的多指标含量分析, 以期雷公藤药材及制剂的全面质量控制提供技术手段和科学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

Agilent 1260 高效液相色谱仪、Agilent 1200 高效液相色谱仪, 美国安捷伦科技有限公司; Thermo Fisher UltiMate 3000 高效液相色谱仪, 美国赛默飞世尔科技公司; XS105DualRange 型十万分之一分析天平, 瑞士 Mettler Toledo 公司; QE-500 型粉碎机, 江阴市中恒元机械制造有限公司; HC-1014 型高速离心机, 安徽中科中佳科学仪器有限公司; KQ-300DE 型数控超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; RE-2000B 型旋转蒸发器, 上海亚荣生化仪器厂; Merck Millipore Milli-Q Reference 超纯水系统, 美国默克密理博公司。

1.2 试药

对照品雷公藤甲素 (批号 7675)、雷公藤红素 (批号 5664)、雷公藤内酯酮 (批号 4648), 质量分数均为 98.0%, 购自上海诗丹德标准技术服务有限公司; 对照品雷酚内酯 (批号 C16O8G45829, 质量分数 99.0%)、雷公藤内酯甲 (批号 KA0809CB14, 质量分数 98.0%) 购自上海源叶生物科技有限公司; 对照品雷公藤次碱 (批号 DST200819-078, 质量分数 98.0%)、雷公藤晋碱 (批号 DST201101-080, 质量分数 99.0%) 购自成都德思特生物技术有限公司。甲醇、乙腈 (色谱纯, 美国 TEDIA 公司), 磷酸 (色谱纯, 上海阿拉丁生化科技股份有限公司), 三氯甲烷 (分析纯, 国药集团化学试剂有限公司), 水为超纯水。

1.3 药材及制剂

收集不同厂家共 10 批 TWPT 及不同产地和来源共 9 批雷公藤药材进行含量测定, 9 批药材经嘉兴学院詹淑玉教授鉴定, 均为卫矛科雷公藤属植物雷公藤 *T. wilfordii* Hook. f. 的干燥根。样品信息见表 1、2。

表 1 TWPT 样品信息

Table 1 Sources of TWPT

编号	批号	生产厂家
S1	20200502	远大医药黄石飞云制药有限公司
S2	20200402	远大医药黄石飞云制药有限公司
S3	20201101	远大医药黄石飞云制药有限公司
S4	20200903	湖南千金协力药业有限公司
S5	2012112B	浙江得恩德制药股份有限公司
S6	20200902	湖南千金协力药业有限公司
S7	20201101	湖南千金协力药业有限公司
S8	20200503	湖南千金协力药业有限公司
S9	2012115B	浙江得恩德制药股份有限公司
S10	201003	上海复旦复华药业有限公司

表 2 雷公藤药材样品信息

Table 2 Sources of *T. wilfordii*

编号	产地	来源
Y1	浙江	浙江中医药中药饮片有限公司
Y2	湖北十堰	亳州市丽春堂药业有限公司
Y3	云南临沧	江苏诚信药业有限公司
Y4	浙江	农副产品 1
Y5	安徽	亳州市丽春堂药业有限公司
Y6	浙江	农副产品 2
Y7	浙江	绍兴震元中药饮片有限公司
Y8	浙江	杭州华东中药饮片有限公司
Y9	安徽	嘉兴东方国药饮片有限公司

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Waters SunFire® C₁₈ 柱 (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相为 0.02% 磷酸水溶液-乙腈, 梯度洗脱: 0~10 min, 15%~25% 乙腈; 10~20 min, 25%~35% 乙腈; 20~40 min, 35%~40% 乙腈; 40~60 min, 40%~55% 乙腈; 60~75 min, 55%~80% 乙腈; 75~90 min, 80%~88% 乙腈; 90~100 min, 88%~98% 乙腈; 100~101 min, 98%~15% 乙腈; 101~116 min, 15% 乙腈; 体积流量 1.0 mL/min; 检测波长: 0~65 min, 230 nm; 65~116 min, 210 nm; 柱温 30 °C; 进样量 20 μL。色谱图如图 1。

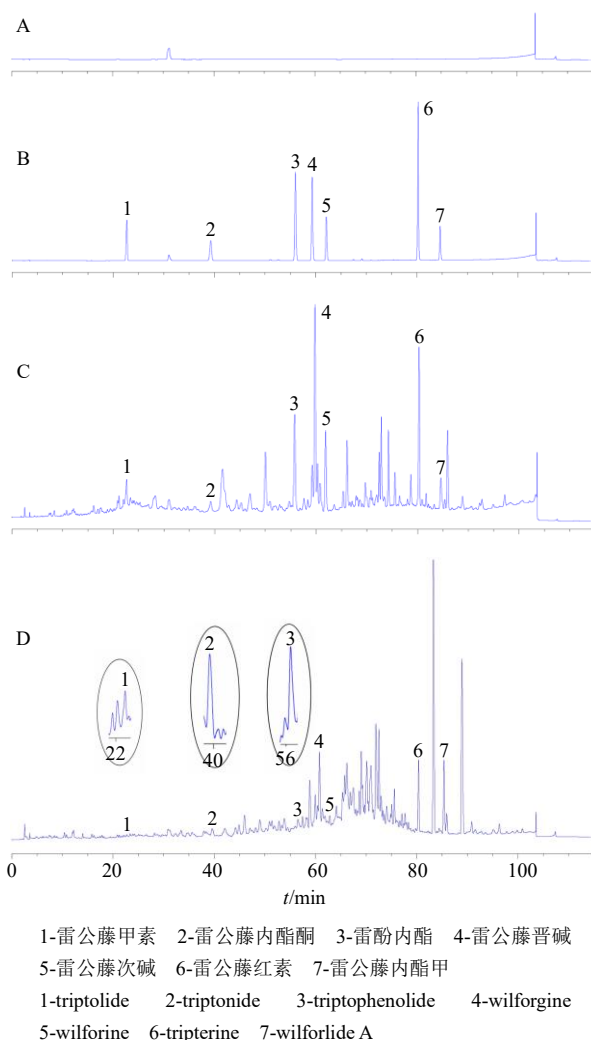


图 1 空白溶剂 (氯仿-甲醇 1:9, A)、混合对照品 (B)、TWPT 样品 (C) 和雷公藤药材样品 (D) 的 HPLC 图
Fig. 1 HPLC of blank solvent (chloroform-methanol 1:9) (A), mixed reference substances (B), TWPT sample (C) and *T. wilfordii* sample (D)

2.2 对照品储备液的制备

精密称取雷公藤甲素、雷公藤内酯酮、雷酚内酯、雷公藤晋碱、雷公藤红素对照品适量, 加甲醇溶解并定容, 制成质量浓度分别为 2.19、1.49、1.19、4.45、1.87 mg/mL 的对照品储备液; 精密称取雷公藤次碱、雷公藤内酯甲对照品适量, 加氯仿溶解并定容, 制成质量浓度分别为 6.00、15.20 mg/mL 的对照品储备液。储备液于 4 °C 冰箱保存备用, 保存时间不超过 15 d。

2.3 供试品溶液的制备

2.3.1 TWPT 供试品溶液 精密称取 TWPT 粉末 0.36 g (约含 50 mg 雷公藤多苷), 置 50 mL 具塞锥形瓶中, 加入 12 mL 甲醇, 超声提取 30 min, 滤过,

滤渣用 2 mL 甲醇洗涤,洗涤液并入滤液后于 50 °C 水浴减压旋转蒸发至干,残渣加 1 mL 氯仿-甲醇(1:9)混合溶剂超声溶解,所得溶液于 10 000 r/min 离心(离心半径 5.9 cm)5 min,取上清液适量,0.22 μm 微孔滤膜过滤,即得 TWPT 供试品溶液。

2.3.2 雷公藤药材供试品溶液 取雷公藤药材粉末(过 20 目筛)约 5.00 g,精密称定,置 500 mL 圆底烧瓶中,加入 100 mL 氯仿,浸泡过夜后加热回流提取 2 h,放冷后滤过,采用 15 mL 氯仿分次洗涤残渣,洗涤液并入滤液后于 50 °C 水浴减压旋转蒸发至干,残渣加 2 mL 氯仿-甲醇(1:9)混合溶剂超声溶解,所得溶液于 10 000 r/min 离心(离心半径 5.9 cm)5 min,取上清液适量,0.22 μm 微孔滤膜滤过,即得雷公藤药材供试品溶液。

2.4 方法学考察

2.4.1 线性关系考察 精密吸取“2.2”项下各对照品储备液适量混合,加甲醇制成雷公藤甲素、雷公藤内酯酮、雷酚内酯、雷公藤晋碱、雷公藤次碱、雷公藤红素和雷公藤内酯甲质量浓度分别为 172.0、94.5、219.5、5 078.9、537.3、839.8、1 887.3 μg/mL 的混合对照品溶液 I。精密吸取混合对照品溶液 I 适量,依次用甲醇稀释 2、3、6、15、30、45 倍,分别作为混合对照品溶液 II、III、IV、V、VI、VII。精密吸取 I~VII 混合对照品溶液各 20 μL,以“2.1”项下色谱条件进样分析,以对照品质量浓度为横坐标(X),色谱峰面积为纵坐标(Y)绘制标准曲线,求算线性回归方程及相关系数(R^2)分别为雷公藤甲素 $Y=24.689 X-9.563 5$, $R^2=0.999 6$, 3.82~172.00 μg/mL;雷公藤内酯酮 $Y=22.729 X-4.052 4$, $R^2=0.999 6$, 2.10~94.50 μg/mL;雷酚内酯 $Y=58.866 X-25.106$, $R^2=0.999 5$, 4.88~219.50 μg/mL;雷公藤晋碱 $Y=8.125 7 X+526.7$, $R^2=0.997 4$, 112.86~5 078.90 μg/mL;雷公藤次碱 $Y=33.515 X-37.597$, $R^2=0.999 5$, 11.94~537.30 μg/mL;雷公藤红素 $Y=40.583 X-106.55$, $R^2=0.999 6$, 18.66~839.80 μg/mL;雷公藤内酯甲 $Y=4.5726 X+14.157$, $R^2=0.999 7$, 41.94~1 887.30 μg/mL。结果显示,7 种成分在相应的质量浓度范围内线性关系良好。

2.4.2 精密度试验 精密吸取混合对照品溶液 II 适量,以“2.1”项下色谱条件连续进样 6 次,记录峰面积,计算其 RSD 值。结果雷公藤甲素、雷公藤内酯酮、雷酚内酯、雷公藤晋碱、雷公藤次碱、雷公藤红素和雷公藤内酯甲峰面积的 RSD 分别为

3.45%、3.59%、3.68%、3.50%、3.56%、3.75%、3.40%,表明仪器的精密度良好。

2.4.3 重复性试验 分别精密称取 TWPT 样品(S8)和雷公藤药材样品(Y7)各 6 份,按“2.3”项下方法分别制备供试品溶液。以“2.1”项下色谱条件进样分析,记录峰面积,计算 7 种质控成分平均质量分数及 RSD 值。结果 TWPT 样品中雷公藤甲素、雷公藤内酯酮、雷酚内酯、雷公藤晋碱、雷公藤次碱、雷公藤红素和雷公藤内酯甲的平均质量分数分别为 173.12、106.06、660.82、11 259.99、1 030.63、884.53、2 591.14 μg/g, RSD 分别为 1.99%、2.25%、2.82%、2.41%、3.60%、2.53%、2.81%;雷公藤药材样品中雷公藤甲素、雷公藤内酯酮、雷酚内酯、雷公藤晋碱、雷公藤次碱、雷公藤红素和雷公藤内酯甲的平均质量分数分别为 7.63、1.07、2.19、625.15、4.60、171.67、184.40 μg/g, RSD 分别为 1.85%、3.02%、3.62%、2.78%、2.56%、3.38%、3.22%,表明该方法的重复性良好。

2.4.4 稳定性试验 分别精密吸取 TWPT(S8)和雷公藤药材(Y7)供试品溶液各适量,于室温下放置 0、2、4、8、12、24 h 后以“2.1”项下色谱条件进样分析,记录各个测定时间点的峰面积,计算其 RSD 值。结果 TWPT 中雷公藤甲素、雷公藤内酯酮、雷酚内酯、雷公藤晋碱、雷公藤次碱、雷公藤红素和雷公藤内酯甲峰面积的 RSD 分别为 2.34%、2.00%、1.09%、1.01%、2.12%、1.89%、1.69%;雷公藤药材中雷公藤甲素、雷公藤内酯酮、雷酚内酯、雷公藤晋碱、雷公藤次碱、雷公藤红素和雷公藤内酯甲峰面积的 RSD 分别为 4.01%、3.06%、1.19%、3.63%、3.20%、3.17%、4.95%,表明供试品溶液在室温下 24 h 内稳定。

2.4.5 加样回收率试验 精密称取 0.18 g TWPT 样品(S8)6 份,精密称定,分别精密加入另行配制的混合对照品溶液 1 mL(雷公藤甲素 57.32 μg/mL、雷公藤内酯酮 31.50 μg/mL、雷酚内酯 73.16 μg/mL、雷公藤晋碱 3 385.90 μg/mL、雷公藤次碱 179.09 μg/mL、雷公藤红素 279.92 μg/mL、雷公藤内酯甲 629.10 μg/mL),另精密称取 2.50 g 雷公藤药材样品(Y7)6 份,精密称定,分别精密加入另行配制的混合对照品溶液 2 mL(雷公藤甲素 11.46 μg/mL、雷公藤内酯酮 2.10 μg/mL、雷酚内酯 4.88 μg/mL、雷公藤晋碱 677.20 μg/mL、雷公藤次碱 11.94 μg/mL、雷公藤红素 279.92 μg/mL、雷公藤内酯甲 629.10

μg/mL), 按“2.3”项下方法制备供试品溶液, 以“2.1”项下色谱条件进样分析, 测定各成分质量浓度, 并计算加样回收率和 RSD 值。结果 TWPT 样品中雷公藤甲素、雷公藤内酯酮、雷酚内酯、雷公藤晋碱、雷公藤次碱、雷公藤红素和雷公藤内酯甲的平均加样回收率分别为 105.2%、103.8%、103.4%、102.1%、108.9%、110.3%、100.6%, RSD 值分别为 2.29%、2.54%、2.88%、3.26%、2.61%、3.42%、3.23%; 雷公藤药材样品中雷公藤甲素、雷公藤内酯酮、雷酚内酯、雷公藤晋碱、雷公藤次碱、雷公藤红素和雷公藤内酯甲的平均加样回收率分别为 98.6%、87.7%、91.2%、101.1%、99.1%、101.3%、104.4%, RSD 值分别为 3.13%、2.75%、3.60%、2.23%、2.90%、

2.98%、2.17%。

2.5 $f_{k/s}$ 测定

精密吸取“2.4.1”项下各混合对照品溶液适量, 以“2.1”项下色谱条件进样分析, 记录各成分峰面积, 以雷酚内酯为参照物, 按下列公式分别计算雷公藤甲素、雷公藤内酯酮、雷公藤晋碱、雷公藤次碱、雷公藤红素和雷公藤内酯甲的 $f_{k/s}$, 结果见表 3。

$$f_{k/s} = f_k/f_s = C_k A_s / (C_s A_k)$$

C_k 为待测成分质量浓度, A_k 为待测成分峰面积, C_s 为参照物质量浓度, A_s 为参照物峰面积

2.6 $f_{k/s}$ 的耐用性考察

2.6.1 不同仪器和不同色谱柱对 $f_{k/s}$ 的影响 精密吸取混合对照品溶液适量, 以“2.1”项下色谱条件

表 3 雷酚内酯对各成分的 $f_{k/s}$
Table 3 $f_{k/s}$ of triptophenolide to various constituents

混合对照 品溶液	$f_{k/s}$					
	雷公藤甲素	雷公藤内酯酮	雷公藤晋碱	雷公藤次碱	雷公藤红素	雷公藤内酯甲
I	1.635 0	2.385 7	3.877 7	1.229 3	1.236 6	4.745 5
II	1.591 9	2.363 8	3.865 4	1.277 8	1.245 9	4.664 2
III	1.619 1	2.430 5	3.831 8	1.188 0	1.288 8	4.710 1
IV	1.610 1	2.416 1	3.737 3	1.198 1	1.281 9	4.486 0
V	1.661 0	2.313 7	3.697 2	1.183 1	1.343 8	4.425 0
VI	1.655 0	2.421 4	3.625 2	1.176 7	1.281 6	4.634 5
VII	1.705 4	2.396 1	3.783 8	1.219 1	1.304 3	4.461 0
平均值	1.639 7	2.389 6	3.774 1	1.210 3	1.283 3	4.589 5
RSD/%	2.31	1.70	2.47	2.92	2.79	2.82

进样分析, 参照“2.5”项下方法求算各成分 $f_{k/s}$, 分别考察不同仪器包括 Agilent 1260、Agilent 1200、ThermoFisher UltiMate 3000 高效液相色谱仪及不同色谱柱包括 Agilent Zorbax Extend-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Welch Ultimate XB-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Waters SunFire® C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm)、Kromasil 100-5-C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 对 $f_{k/s}$ 的影响, 结果如表 4 所示, 各成分 $f_{k/s}$ 的 RSD 值均小于 3%, 表明更换仪器或色谱柱对各成分的 $f_{k/s}$ 无显著影响, 适用性良好。

2.6.2 不同体积流量对 $f_{k/s}$ 的影响 精密吸取混合对照品溶液适量, 以“2.1”项下色谱条件进样分析, 参照“2.5”项下方法求算各成分 $f_{k/s}$, 考察 3 个体积流量 (0.8、1.0、1.2 mL/min) 对 $f_{k/s}$ 的影响, 结果如表 5 所示, 各成分 $f_{k/s}$ 的 RSD 均小于 3%, 表明不同体积流量对各成分 $f_{k/s}$ 无显著影响。

2.6.3 不同柱温对 $f_{k/s}$ 的影响 精密吸取混合对照品溶液适量, 以“2.1”项下色谱条件进样分析, 参照“2.5”项下方法求算各成分 $f_{k/s}$, 考察 3 个柱温 (25、30、35 °C) 对 $f_{k/s}$ 的影响, 结果如表 6 所示, 各成分的 RSD 均小于 3%, 表明不同柱温对各成分 $f_{k/s}$ 无显著影响。

2.7 待测成分色谱峰定位

精密吸取混合对照品溶液适量, 以“2.1”项下色谱条件进样分析, 分别计算雷公藤甲素、雷公藤内酯酮、雷公藤晋碱、雷公藤次碱、雷公藤红素和雷公藤内酯甲对参照物雷酚内酯的相对保留时间 (t_R), 对各成分进行色谱峰定位。结果如表 7 所示, 各成分 t_R 的 RSD 均小于 5%, 表明可利用 t_R 对各成分进行定位。

2.8 QAMS 法与外标法测定结果比较

对表 1、2 来自不同厂家、批号 and 不同产地和来

表 4 不同仪器、不同色谱柱对 $f_{k/s}$ 的影响

Table 4 Effects of different instruments and chromatographic columns on $f_{k/s}$

仪器	色谱柱	$f_{k/s}$					
		雷公藤甲素	雷公藤内酯酮	雷公藤晋碱	雷公藤次碱	雷公藤红素	雷公藤内酯甲
Agilent 1200	Waters C ₁₈	1.619 7	2.399 7	3.909 2	1.278 4	1.239 9	4.692 8
	Agilent C ₁₈	1.586 6	2.365 9	3.867 4	1.273 5	1.222 5	4.653 3
	Welch C ₁₈	1.623 5	2.403 2	3.936 1	1.280 3	1.249 2	4.767 5
	Kromasil C ₁₈	1.611 1	2.383 7	3.911 8	1.273 0	1.225 9	4.702 5
Agilent 1260	Waters C ₁₈	1.591 7	2.350 3	3.830 8	1.282 4	1.220 1	4.441 5
	Agilent C ₁₈	1.563 7	2.329 2	3.794 8	1.285 3	1.222 1	4.428 5
	Welch C ₁₈	1.602 1	2.366 1	3.854 7	1.287 5	1.215 7	4.475 8
	Kromasil C ₁₈	1.585 7	2.342 7	3.829 1	1.285 3	1.216 3	4.422 1
UltiMate 3000	Waters C ₁₈	1.602 6	2.345 9	3.872 2	1.301 1	1.212 5	4.700 0
	Agilent C ₁₈	1.564 9	2.315 6	3.810 2	1.289 8	1.205 1	4.603 9
	Welch C ₁₈	1.641 8	2.357 3	3.873 8	1.292 0	1.216 8	4.654 8
	Kromasil C ₁₈	1.584 5	2.346 7	3.864 6	1.298 4	1.226 9	4.626 0
平均值		1.598 2	2.358 9	3.862 9	1.285 6	1.222 7	4.597 4
RSD/%		1.46	1.13	1.10	0.69	0.98	2.67

表 5 不同体积流量对 $f_{k/s}$ 的影响

Table 5 Effects of different volume flow rates on $f_{k/s}$

体积流量/ (mL·min ⁻¹)	$f_{k/s}$					
	雷公藤甲素	雷公藤内酯酮	雷公藤晋碱	雷公藤次碱	雷公藤红素	雷公藤内酯甲
0.8	1.603 1	2.383 8	3.905 6	1.278 0	1.249 0	4.696 3
1.0	1.586 6	2.365 9	3.867 4	1.273 5	1.222 5	4.653 3
1.2	1.573 8	2.351 9	3.843 2	1.275 3	1.228 5	4.665 5
平均值	1.587 9	2.367 2	3.872 1	1.275 6	1.233 3	4.671 7
RSD/%	0.93	0.68	0.81	0.18	1.13	0.48

表 6 不同柱温对 $f_{k/s}$ 的影响

Table 6 Effects of different column temperatures on $f_{k/s}$

柱温/℃	$f_{k/s}$					
	雷公藤甲素	雷公藤内酯酮	雷公藤晋碱	雷公藤次碱	雷公藤红素	雷公藤内酯甲
25	1.585 1	2.361 6	3.872 7	1.276 6	1.239 0	4.666 6
30	1.586 6	2.365 9	3.867 4	1.273 5	1.222 5	4.876 3
35	1.579 9	2.350 4	3.862 4	1.276 8	1.232 2	4.662 1
平均值	1.583 9	2.359 3	3.867 5	1.275 6	1.231 2	4.735 0
RSD/%	0.22	0.34	0.13	0.15	0.67	2.58

源的 TWPT 和雷公藤药材,分别以“2.3.1”和“2.3.2”项下方法制备供试品溶液,以“2.1”项下色谱条件进样测定,分别采用标准曲线外标法和 QAMS 法计算含量。结果如表 8 所示,2 种方法测定的各成分含量无明显差异,相对平均偏差(RAD, RAD=平均偏差/平均值,其中平均偏差即 2 组测量值与其平

均值的差值取绝对值后求和,再除以 2)均小于 3.0%。

3 讨论

3.1 供试品溶液制备

为筛选最优的 TWPT 及雷公藤药材供试品溶液制备方法,本研究分别对样品预处理、提取溶剂和

表 7 不同仪器、不同色谱柱对 t_R 的影响Table 7 Effects of different instruments and chromatographic columns on t_R values

仪器	色谱柱	t_R					
		雷公藤甲素	雷公藤内酯酮	雷公藤晋碱	雷公藤次碱	雷公藤红素	雷公藤内酯甲
Agilent 1200	Waters C ₁₈	0.409 0	0.707 8	1.060 7	1.108 8	1.433 6	1.512 7
	Agilent C ₁₈	0.382 4	0.653 5	1.050 2	1.122 6	1.511 5	1.597 0
	Welch C ₁₈	0.412 2	0.707 8	1.063 5	1.107 3	1.444 3	1.522 4
	Kromasil C ₁₈	0.405 0	0.697 9	1.063 2	1.110 0	1.457 1	1.537 7
Agilent 1260	Waters C ₁₈	0.407 0	0.705 3	1.061 5	1.109 3	1.432 4	1.511 2
	Agilent C ₁₈	0.380 8	0.650 0	1.050 8	1.124 2	1.513 3	1.598 7
	Welch C ₁₈	0.412 1	0.707 9	1.062 9	1.107 0	1.441 0	1.517 7
	Kromasil C ₁₈	0.404 9	0.696 2	1.061 6	1.109 7	1.452 4	1.531 4
UltiMate 3000	Waters C ₁₈	0.403 7	0.706 3	1.054 9	1.106 0	1.416 7	1.493 7
	Agilent C ₁₈	0.378 3	0.650 5	1.048 0	1.122 1	1.497 6	1.581 8
	Welch C ₁₈	0.408 9	0.709 2	1.058 9	1.104 6	1.427 6	1.503 6
	Kromasil C ₁₈	0.402 4	0.698 5	1.057 8	1.106 8	1.437 9	1.516 3
平均值		0.400 6	0.690 9	1.057 8	1.111 5	1.455 4	1.535 4
RSD/%		3.12	3.51	0.52	0.64	2.29	2.38

表 8 各成分测定结果

Table 8 Results of content determination of various constituents

样品	雷酚内酯/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	雷公藤甲素/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)			雷公藤内酯酮/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)			雷公藤晋碱/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)		
	外标法	外标法	QAMS	RAD/%	外标法	QAMS	RAD/%	外标法	QAMS	RAD/%
S1	252.93	17.25	16.90	1.01	6.15	5.93	1.85	3 833.14	3 793.38	0.52
S2	288.24	12.12	11.62	2.10	15.25	15.20	0.16	3 460.31	3 424.87	0.51
S3	253.92	31.13	31.16	0.05	29.49	30.11	1.05	4 119.28	4 073.92	0.55
S4	402.99	164.66	164.13	0.16	64.83	64.51	0.24	8 523.74	8 344.83	1.06
S5	37.46	87.23	88.19	0.54	16.39	16.37	0.05	1 658.61	1 664.16	0.17
S6	463.97	234.59	234.50	0.02	88.01	89.13	0.63	9 112.14	8 913.91	1.10
S7	365.37	199.91	199.91	0.00	104.49	106.07	0.75	12 729.41	12 444.38	1.13
S8	636.44	170.44	169.63	0.24	100.40	101.56	0.58	11 121.37	10 843.30	1.27
S9	29.36	326.13	331.26	0.78	210.53	220.16	2.24	1 427.35	1 444.39	0.59
S10	33.19	145.87	145.88	0.00	36.38	36.58	0.27	3 418.25	3 375.49	0.63
Y1	12.70	2.41	2.31	1.98	24.34	24.87	1.07	132.04	130.28	0.67
Y2	5.45	1.91	1.84	1.89	5.23	5.28	0.50	137.19	137.55	0.13
Y3	6.67	1.72	1.64	2.50	8.25	8.32	0.45	123.76	123.46	0.12
Y4	2.62	1.58	1.55	1.04	1.36	1.37	0.65	124.23	128.53	1.70
Y5	2.36	1.94	1.94	0.05	1.28	1.31	0.86	87.86	91.56	2.06
Y6	10.24	2.18	2.09	2.12	13.91	13.59	1.15	119.10	117.88	0.52
Y7	2.25	7.98	8.15	1.04	1.11	1.13	0.70	648.50	667.15	1.42
Y8	5.39	2.52	2.46	1.06	11.47	11.66	0.82	177.38	177.80	0.12
Y9	7.14	2.42	2.34	1.52	11.65	11.76	0.48	173.93	173.16	0.22

续表 8

样品	雷公藤次碱/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)			雷公藤红素/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)			雷公藤内酯甲/($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)		
	外标法	QAMS	RAD/%	外标法	QAMS	RAD/%	外标法	QAMS	RAD/%
S1	280.78	277.04	0.67	79.95	76.47	2.22	1 791.97	1 781.12	0.30
S2	340.94	337.49	0.51	78.04	74.41	2.38	1 766.81	1 753.99	0.36
S3	364.55	361.67	0.40	103.03	100.81	1.09	2 347.85	2 326.22	0.46
S4	555.69	552.33	0.30	1 707.59	1 709.06	0.04	2 357.21	2 329.36	0.59
S5	59.09	58.09	0.86	323.12	333.18	1.53	2 906.49	2 878.29	0.49
S6	566.20	562.62	0.32	2 052.93	2 051.90	0.03	2 189.84	2 165.53	0.56
S7	487.88	484.64	0.33	1 760.03	1 762.91	0.08	2 396.87	2 370.10	0.56
S8	978.06	975.98	0.11	854.85	858.57	0.22	2 476.31	2 439.24	0.75
S9	36.11	35.68	0.61	230.98	238.14	1.53	2 994.06	2 989.10	0.08
S10	166.40	162.07	1.32	153.80	155.63	0.59	2 652.88	2 616.15	0.70
Y1	9.69	9.37	1.69	71.62	71.72	0.07	44.57	44.04	0.60
Y2	6.52	6.39	1.00	38.95	40.28	1.68	126.15	127.60	0.57
Y3	6.80	6.63	1.24	39.56	40.67	1.39	45.75	45.71	0.05
Y4	3.75	3.77	0.32	12.96	12.90	0.26	33.11	34.16	1.56
Y5	3.19	3.23	0.54	11.64	11.53	0.48	46.69	48.70	2.11
Y6	6.69	6.47	1.65	57.34	57.87	0.46	76.36	76.03	0.22
Y7	4.78	4.87	0.92	170.85	179.07	2.35	191.97	199.84	2.01
Y8	3.69	3.60	1.24	39.12	40.45	1.68	84.00	84.81	0.48
Y9	4.01	3.89	1.54	45.91	46.91	1.09	131.56	132.21	0.25

提取方法等进行了考察。

对于 TWPT, 采用简单的超声提取方法^[27]对比了不同提取溶剂甲醇、乙醇、氯仿及醋酸乙酯对提取效果的影响, 结果发现用甲醇超声提取 30 min, 各待测成分溶出度较高, 且各成分色谱峰之间分离度和峰形良好, 故选择甲醇超声提取作为 TWPT 供试品溶液制备方法。

对于雷公藤药材, 分别对比了样品是否浸泡预处理、不同提取溶剂(甲醇、乙醇及氯仿)、不同提取方法(超声提取和加热回流提取)以及提取物是否经固相萃取等对制备效果的影响, 结果发现将药材浸泡过夜、氯仿为提取溶剂、加热回流提取 2h 可以使各成分获得较优的提取效率, 同时各成分色谱峰之间分离度和峰形均较好; 而采用固相萃取处理与未采用相比, 各成分分离度和色谱峰峰形未有明显改善, 且固相萃取后目标成分有一定量的损失, 故对药材提取物不采用固相萃取处理。

3.2 色谱条件的优化

雷公藤药材及 TWPT 成分复杂, 多数成分含量较低, 为了使多成分达到较好的分离效果, 对流动相的组成和比例进行了考察, 首先比较了水相分别

添加甲酸、醋酸、磷酸和磷酸-三乙胺对梯度洗脱分离效果的影响, 结果显示水相中加入少量磷酸可显著改善各成分色谱峰峰形。进一步考察了不同体积分数(0.02%、0.05%、0.10%)磷酸水对色谱行为的影响, 结果显示水相中添加 0.02%磷酸时, 各成分色谱峰的分离度和峰形最优, 故以 0.02%磷酸水溶液-乙腈作为流动相。

雷公藤各成分具有不同的最大紫外吸收波长, 为了使各成分获得较高的检测灵敏度, 需要采用不同波长分段检测。参照文献报道^[1,3,28-29]对 7 个成分分别在 210、218、230、267、425 nm 波长下的响应进行了考察, 筛选最优检测波长。综合考虑各成分的含量、紫外响应值、出峰时间及检测波长的简单性, 最后选择雷公藤甲素、雷公藤内酯酮、雷酚内酯、雷公藤晋碱和雷公藤次碱的检测波长为 230 nm, 检测时间段为 0~65 min; 雷公藤红素和雷公藤内酯甲的检测波长为 210 nm, 检测时间段为 65~116 min。

3.3 指标成分和参照物的选择

雷公藤中主要含有二萜类、三萜类和生物碱等生物活性成分, 这些成分共同构成雷公藤的物质基

础^[2]。为有助于雷公藤药材及其制剂的全面质量控制,我们分别选择了活性明确、含量较高的各类代表性成分作为 QAMS 法含量测定的指标成分,主要包括二萜类成分雷公藤甲素、雷公藤内酯酮和雷酚内酯,三萜类成分雷公藤红素和雷公藤内酯甲以及生物碱类成分雷公藤晋碱和雷公藤次碱。从各成分含量测定结果和各成分色谱分离情况看,雷酚内酯含量适中,与其它成分分开明显,在谱图中较易识别,其保留时间约为 56 min,处于色谱图的中位,利于其它成分色谱峰的相对保留时间计算和色谱峰的识别,且雷酚内酯性质稳定、价廉易得,因此,本研究选择雷酚内酯作为 QAMS 法含量测定的参照物。

3.4 含量测定结果及 QAMS 法的准确性

本研究搜集了 10 批不同厂家和批号的 TWPT 制剂以及 9 批不同来源或产地的雷公藤药材进行了 7 个指标性成分的含量测定,结果显示,10 批制剂中雷公藤甲素、雷公藤内酯酮、雷酚内酯、雷公藤晋碱、雷公藤次碱、雷公藤红素和雷公藤内酯甲的质量分数分别为 11.62~331.26、5.93~220.16、29.36~636.44、1 427.35~12 729.41、35.68~978.06、74.41~2 052.93、1 753.99~2 994.06 $\mu\text{g/g}$; 9 批药材中雷公藤甲素、雷公藤内酯酮、雷酚内酯、雷公藤晋碱、雷公藤次碱、雷公藤红素和雷公藤内酯甲的质量分数分别为 1.55~8.15、1.11~24.87、2.25~12.70、87.86~667.15、3.19~9.69、11.53~179.07、33.11~199.84 $\mu\text{g/g}$ 。不同厂家、不同批号及不同产地来源的 TWPT 及雷公藤药材中 7 种成分含量均存在较大差异,这种差异可能与药材来源和质量、生产过程和工艺控制水平等诸多因素有关,因此,还应提高雷公藤中药的质量控制标准。

本研究建立 QAMS 法用于同时测定雷公藤药材及制剂中 7 种成分含量,以雷酚内酯为参照物,对其它 6 种成分的 $f_{k/s}$ 进行了包括仪器、色谱柱、柱温、体积流量以及色谱峰定位的耐用性考察,说明 QAMS 法具有良好的重现性。对 19 批样品分别采用外标法和 QAMS 法求算 7 种成分含量,结果表明 2 种方法测定的含量无显著性差异,证明了 QAMS 法的准确性。

本研究所建立方法可用于雷公藤及其相关制剂的多成分定量分析,为雷公藤中药的全面质量控制提供新的方法参考。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 王亚丹,汪祺,张建宝,等. 雷公藤制剂的化学成分及质量研究现状 [J]. 中国中药杂志, 2019, 44(16): 3368-3373.
- [2] 肖治均,刘传鑫,杨欣欣,等. 雷公藤研究进展及其质量标志物的预测分析 [J]. 中草药, 2019, 50(19): 4752-4768.
- [3] 何昱,石森林,张茹萍,等. 雷公藤多苷主要有效成分的含量研究 [J]. 药物分析杂志, 2013, 33(2): 197-200.
- [4] 刘冰,袁红亮,汪洪波,等. 雷公藤多苷片联合依那西普治疗类风湿性关节炎的疗效及其对血清 14-3-3 η 蛋白、抗环瓜氨酸肽抗体水平的影响 [J]. 药物评价研究, 2021, 44(3): 561-565.
- [5] 白雪,付瑞嘉,乐世俊,等. 雷公藤治疗类风湿性关节炎研究进展 [J]. 中草药, 2020, 51(1): 265-275.
- [6] 汪靓雯,邹新蓉,王长江,等. 雷公藤多苷治疗过敏性紫癜性肾炎随机对照试验的系统评价 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(13): 2806-2816.
- [7] 秦万章. 雷公藤治疗系统性红斑狼疮研究现状的展望 [J]. 中国中西医结合杂志, 2000, 20(12): 884-885.
- [8] Li Y H, Zhu W, He H L, et al. Efficacy and safety of *Tripterygium wilfordii* Hook. F for connective tissue disease-associated interstitial lung disease: A systematic review and meta-analysis [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 691031.
- [9] 李志霞,马冬梅,杨兴华,等. 雷公藤用药者血液系统不良事件发生率的 Meta 分析 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(2): 339-345.
- [10] 李唯,陈阿虹,阙慧卿,等. 雷公藤内酯醇结构修饰和构效关系研究进展 [J]. 药物评价研究, 2019, 42(8): 1651-1662.
- [11] 吴霞,黄文华,郭宝林,等. 雷公藤制剂中雷公藤红素的含量研究 [J]. 中国中药杂志, 2009, 34(7): 836-838.
- [12] 夏焱,王文燕,张彦文,等. HPLC 法测定雷公藤及其片剂中雷公藤红素 [J]. 中草药, 2005, 36(8): 1154-1156.
- [13] 濮存海,何明芳,张晓莺,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.
- [14] 鲍立曾,刘法千,熊仕强. HPLC 法测定雷公藤多苷中雷公藤内酯醇的含量 [J]. 药物分析杂志, 2007, 27(6): 896-898.
- [15] Li K, Wang S D. Fingerprint chromatogram analysis of extracts from the leaves of *Tripterygium wilfordii* Hook. F. by high performance liquid chromatography [J]. *J Sep Sci*, 2005, 28(7): 653-657.
- [16] 高旋,宋敏,庄莹,等. 雷公藤药材及制剂的 HPLC 特

- 征图谱研究 [J]. 药物分析杂志, 2009, 29(5): 702-709.
- [17] Su P, Cheng Q Q, Wang X J, *et al.* Characterization of eight terpenoids from tissue cultures of the Chinese herbal plant, *Tripterygium wilfordii*, by high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Biomed Chromatogr*, 2014, 28(9): 1183-1192.
- [18] Duan Y P, Luo J Y, Liu C M, *et al.* Rapid identification of triptolide in *Tripterygium wilfordii* products by gold immunochromatographic assay [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2019, 168: 102-112.
- [19] 张聪聪, 黄建明, 俞媚华, 等. HPLC 法测定雷公藤提取物中雷公藤甲素及两种生物碱的含量 [J]. 复旦学报: 医学版, 2009, 36(3): 333-336.
- [20] 庄莹, 宋敏, 杭太俊, 等. 雷公藤多苷片中雷公藤总内酯及雷公藤内酯醇的测定 [J]. 药物分析杂志, 2008, 28(1): 36-40.
- [21] 王智民, 钱忠直, 张启伟, 等. 一测多评法建立的技术指南 [J]. 中国中药杂志, 2011, 36(6): 657-658.
- [22] 李佳寅, 张小平, 方梦婷, 等. 一测多评法同时测定生脉注射液 12 个成分 [J]. 中草药, 2021, 52(24): 7484-7492.
- [23] 许啸, 张淹, 刘晓云, 等. 复方阿胶浆质量标准提升研究 [J]. 中草药, 2021, 52(20): 6226-6233.
- [24] Su C N, Li C H, Sun K, *et al.* Quantitative analysis of bioactive components in walnut leaves by UHPLC-Q-Orbitrap HRMS combined with QAMS [J]. *Food Chem*, 2020, 331: 127180.
- [25] Stavrianidi A, Stekolshchikova E, Porotova A, *et al.* Combination of HPLC-MS and QAMS as a new analytical approach for determination of saponins in ginseng containing products [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2017, 132: 87-92.
- [26] 吴珏, 刘志宏, 林兵, 等. 一测多评法同时测定雷公藤提取物中 6 种成分含量 [J]. 福建中医药, 2019, 50(1): 32-35.
- [27] 梁健, 沈熊, 朱孝国, 等. 雷公藤多苷片的 HPLC 指纹图谱 [J]. 中国临床药理学杂志, 2013, 22(1): 9-13.
- [28] 张玉蕊, 吴明侠, 杨晶凡. 雷公藤饮片标准汤剂的研究 [J]. 时珍国医国药, 2020, 31(1): 87-89.
- [29] 刘为萍, 刘素香, 唐慧珠, 等. 雷公藤研究新进展 [J]. 中草药, 2010, 41(7): 1215-1218.

[责任编辑 郑礼胜]