

表 3 白术 4 种炮制品的相似度结果

Table 3 Similarity of four kinds of processed Rhizoma Atractylodis Macrocephalae

样品	白术饮片相似度	清炒白术相似度	麸炒白术相似度	土炒白术相似度
S1	0.963	0.971	0.994	0.989
S2	0.993	0.999	0.998	0.994
S3	0.998	0.991	0.991	0.98
S4	0.987	0.988	0.999	0.979
S5	0.996	0.994	0.994	0.998
S6	0.993	0.993	0.992	0.995
S7	0.983	0.934	0.997	0.971
S8	0.949	0.985	0.996	0.961
S9	0.993	0.992	0.978	0.966
S10	0.991	0.956	0.947	0.988

水-乙腈、甲醇-水、乙腈-水系统进行了考察,结果表明乙腈-水系统分离良好,峰形符合要求,故选择乙腈-水系统进行梯度洗脱。考察了甲醇、乙醇、乙酸乙酯、丙酮等不同提取溶剂,超声、回流等不同提取方式,并进行了提取时间为 30 min、1 h、2 h,提取次数为 1 次、2 次的考察,结果表明,以甲醇超声 30 min,1 次即可提取完全,与长时间的提取结果相差很小,因此,确定该提取方法。比较了 203、220、242、276、300 nm 共 5 个波长下的色谱图,发现 203 和 300 nm 峰信号少,220 和 276 nm 处有几个出峰信号大,但其他峰信号太少,而 242 nm

处出峰多且信号整体较为明显,因此,选择 242 nm 为检测波长。对分析时间也进行了考察,吸取供试品 S5 溶液 10 μL,注入高效液相色谱仪,运行 120 min,记录色谱图,发现 55 min 后已无明显色谱峰,因此,分析时间定为 55 min。

白术饮片在加热炮制过程中,不同加热温度和时间,白术内酯 I、II、III 的含量变化明显^[6],说明炒制后,饮片内在成分发生了较大变化,但哪些成分发生了变化,变化规律如何有待进一步的研究。但本实验制定的 4 种白术炮制品指纹图谱,为科学评价白术炮制品质量标准提供了科学依据。

参考文献:

[1] 杨娥,钟艳梅,冯亦凡. 白术化学成分和药理作用的研究进展[J]. 广东药学院学报, 2012, 28(2): 218-221.

[2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(一部)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 96.

[3] 广东省食品药品监督管理局. 广东省中药饮片炮制规范[S]. 第一册. 广州: 广东科技出版社, 2011: 83.

[4] 中华人民共和国卫生部药政管理局. 全国中药炮制规范[S]. 北京: 人民卫生出版社, 1988: 33.

[5] 周爱珍,程斌,王和平. 炮制对白术的化学成分及药理作用的影响[J]. 中医药导报, 2010, 16(2): 79-80.

[6] 段启,许冬瑾,谢晨. HPLC 法测定白术不同炮制品中白术内酯 I、II、III [J]. 中草药, 2008, 39(9): 1343-1345.

(编辑: 宋威)

雷公藤色谱指纹图谱方法学研究及质量评价

邵 莉¹, 谢培山² (1. 澳门科技大学中医药学院, 澳门; 2. 澳门科技大学澳门药物与健康应用研究所, 澳门)

摘要: **目的** 建立雷公藤的高效液相指纹图谱, 考察雷公藤药材及商品饮片的质量。 **方法** 高效液相色谱条件: 色谱柱: Symmetry C₁₈ 柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 乙腈-0.1 %磷酸溶液梯度洗脱; 柱温: 20 ℃; 流速: 1.0 mL·min⁻¹; 波长: 210 nm。对雷公藤种植药材、商品饮片的图谱与 HPLC 指纹图谱共有模式比较, 并进行相似度计算和主成分分析。 **结果** 种植药材的成分分布较为稳定, 福建 GAP 基地药材质量相似度高, 商品饮片所含成分与共有模式相比有较大差异, 且不同来源饮片之间相互差别明显。 **结论** 根据雷公藤的 HPLC 指纹图谱可有效地分析和评估药材之间的质量情况, 商品饮片质量亟待提高。

关键词: 雷公藤; 高效液相色谱法; 色谱指纹图谱; 质量分析

中图分类号: R284.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2013)03-0289-05

doi: 10.3969/j.issn.1003-9783.2013.03.022

收稿日期: 2013-04-10
作者简介: 邵莉, 女, 博士研究生, 从事中药质量控制研究。Email: Shaoli82@yahoo.cn。通讯作者: 谢培山, 教授, 博士生导师。Email: xiepsnew@163.com。
基金项目: 澳门科技基金项目(040/2009/A2)。

Chromatography Fingerprint Analysis and Quality Evaluation of Root of *Tripterygium wilfordii*

SHAO Li¹, XIE Peishan² (1. Chinese Medicine College, Macao University of Science and Technology, Macao; 2. Macao Institute for Application of Medicine and Health, Macao)

Abstract: Objective To evaluate the quality of commercial and cultivated samples of the root of *Tripterygium wilfordii* (*Leigongteng*, LGT) by chromatographic fingerprinting. **Methods** HPLC conditions were as follow: Agilent 1200 high performance liquid chromatography, Symmetry C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column mobile phase consisting of acetonitrile-0.1 % phosphoric acid by gradient elution, column temperature at 20 °C, flow rate being 1.0 mL/min, wavelength at 210 nm. The similarity and PCA analysis were carried out based on the HPLC fingerprint common pattern of LGT. **Results** The raw material of LGT cultivated in GAP base had stable components distribution, but the ingredients of slices for the decoction varied greatly as compared with the common pattern, some of the slices were inferior. **Conclusion** The HPLC fingerprint of LGT be used to effectively assess the quality of commercial raw materials, and the fingerprint showed that the quality of slices for decoction needs to be improved.

Keywords: *Tripterygium wilfordii*; HPLC; Chromatography fingerprint; Quality analysis

卫矛科植物雷公藤(*Tripterygium wilfordii* Hook. f.)主产于浙江、安徽、江西、湖南、广西、福建、云南等地。雷公藤的根为药用部位,因其具有明显的抗炎^[1]及免疫抑制活性^[2],多年来被应用于类风湿性关节炎^[3]、慢性肾脏疾病^[4]和各种自身免疫疾病^[5]的治疗。由于本品所含主要化学成分既是免疫抑制活性成分,又是毒性成分,因此对其质量的分析和控制备受关。较早期是测定雷公藤甲素的含量^[6],随着分析技术的提高,扩大到雷公藤所含的具有生理活性的二萜类、三萜类和倍半萜类生物碱成分的含量测定^[7],近年来逐渐从整体有效成分的观点出发,开始尝试用色谱指纹图谱的分析技术^[8-11],希望能够较为全面地将可检测到的活性成分的整体情况作为特征加以分析。雷公藤作为一种天然药物,化学成分受产地、采收季节^[8-11]等多因素的影响。质量的不稳定势必会影响到雷公藤的临床效果,而作为一味有强烈毒性^[12]而又有治疗自身免疫疾病功效的中药,安全性更值得给予充分的关注。为了评价市售商品饮片的质量,我们以福建泰宁 GAP 基地种植药材的根木为参照,与购买的商品饮片进行高效液相指纹图谱分析。

1 仪器与试药

1.1 仪器 安捷伦 1200 型高效液相色谱仪,包括二极管阵列检测器(DAD)、Agilent chemstation 工作站(美国安捷伦公司)。

1.2 试药 试验所用雷公藤药材样品 18 批,其中原药材根木共 9 批(福建 GAP 基地 6 批、浙江商品 2

批、江西商品 1 批);商品饮片共 9 批(广州 6 批、珠海 1 批、湖北通城 1 批、湖南怀化 1 批)。

2 实验方法

2.1 供试品溶液的制备 取雷公藤粉末(过 4 号筛) 0.5 g,精密称定,加入乙酸乙酯 40 mL,置 45 °C 超声水浴中超声提取 1 h,取出,过滤,将残渣再加入甲醇 40 mL,置 45 °C 超声水浴中超声提取 1 h,取出,过滤,将乙酸乙酯滤液和甲醇滤液合并,置于旋转薄膜蒸发器中浓缩至近干,残渣加入约 10 mL 水,离心(4000 r·min⁻¹, 10 min),取出,弃去上清液。皮部样品残渣再加入约 10 mL 水,离心(4000 r·min⁻¹, 10 min),取出,弃去上清液。残渣用甲醇定容至 5 mL,通过孔径为 0.45 μm 的微孔滤膜,续滤液为供试品溶液。

2.2 色谱条件 色谱柱: Symmetry C₁₈ 柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm);流动相: 乙腈-0.1 %磷酸溶液梯度洗脱;柱温: 20 °C;流速: 1.0 mL·min⁻¹;波长: 210 nm。

2.3 共有模式的建立 取各样品按已建立的条件提取和前处理,依法测定,所得色谱图导入指纹图谱计算软件 chempattern 2.0 专业版,以 GAP 基地种植的雷公藤根木部 HPLC 图谱为参照生成共有模式,见图 1。

2.4 方法学验证

2.4.1 药材提取及前处理方法考察

(1)样品提取溶剂选择 根据文献报道^[13],雷公藤中化学成分主要为二萜、三萜和生物碱类化合物

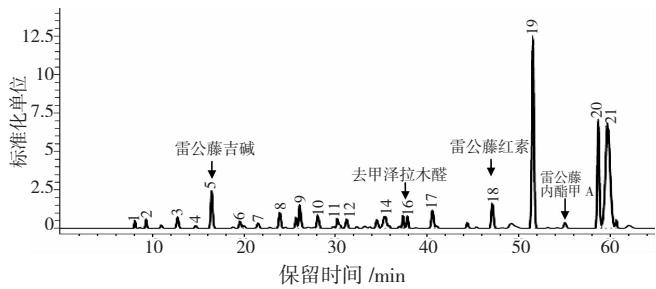


图 1 雷公藤药材根木部 HPLC 指纹图谱共有模式

Figure 1 The common pattern of the HPLC fingerprint of *Tripterygium wilfordii* Hook. f. root woods

等中等极性成分，故选择乙酸乙酯及甲醇提取，并与甲醇的提取物比较其异同，结果如图 2 所示。①甲醇提取：中等极性部位(C)提取不完全，水溶性部位(A)成分较多(不是本品有效成分的主要贡献部位)；②乙酸乙酯提取：乙酸乙酯可将中等极性的部位(B)及(C)较好地提取，但 B 区化学成分提取不够完全；③以乙酸乙酯与甲醇不同比例的混合溶剂提取，共考察了 5 个不同比例，即乙酸乙酯与甲醇 8：2，1：1，7：3，5：5 和 3：7。结果当乙酸乙酯与甲醇 1：1 混合溶剂提取，各成分含量都相对较高，且可辨认 20 个色谱峰，见表 1。④乙酸乙酯与甲醇等量溶剂，分次提取比混合提取效果更佳，有 30 个色谱峰可以辨别，积分面积最高，见表 2。

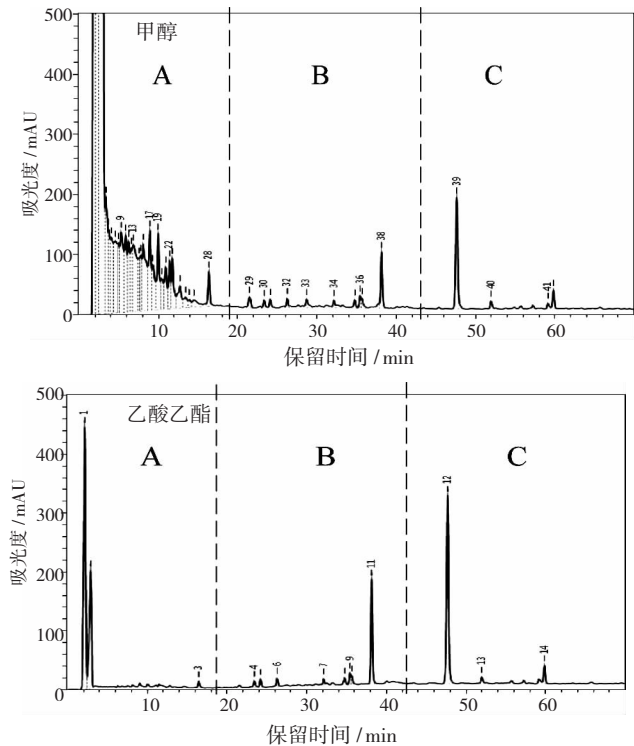


图 2 甲醇和乙酸乙酯提取样品色谱图

Figure 2 The HPLC chromatogram of samples extracted with methanol and ethyl acetate

表 1 乙酸乙酯与甲醇不同比例提取结果

Table 1 The extraction results by different proportions of ethyl acetate and methanol

乙酸乙酯：甲醇	积分总面积/mAU	峰数目
8：2	12038.30	18
7：3	10153.62	17
5：5	10352.67	20
3：7	9633.11	17

表 2 乙酸乙酯与甲醇等比例分次提取和混合提取结果

Table 2 The extraction results by equal proportions of ethyl acetate and methanol separately and mixed

提取方法	积分总面积/mAU	峰数目	主要峰面积 (Rt=38.135)	主要峰面积 (Rt=47.646)
分次提取	19733.31	30	3573.9	5973.8
混合提取	10352.67	20	2280.9	3254.3

(2)样品预处理条件优化 预试验时发现，在色谱图中样品的大极性成分集中在 10 min 之前流出。从文献^[12]可知，雷公藤的活性成分以中等极性的萜类内酯倍半萜类生物碱为主，所以将水溶性成分作为杂质处理。样品预处理的实验方案如下：

①吸附-洗脱净化法：分别选择聚酰胺、氧化铝及硅胶吸附剂，将乙酸乙酯提取液分别通过吸附小柱，用不同浓度的甲醇洗脱，结果显示聚酰胺可将大部分大极性杂质除去，但是中等极性的活性成分有损失；氧化铝的吸附力过强，将样品中大部分化合物被死吸附，难以将活性成分洗脱；硅胶柱也吸附相当量的中等极性的活性成分，而大极性杂质未能除尽，故而不宜使用，见图 3。

②水萃取净化法：雷公藤样品 0.5 g，加入乙酸乙酯 40 mL，置 45 ℃ 超声水浴中超声提取 1 h，取出，过滤，将残渣再加入甲醇 40 mL，置 45 ℃ 超声水浴中超声提取 1 h，取出，过滤，将乙酸乙酯滤液和甲醇滤液合并，置于旋转薄膜蒸发器中浓缩至近干，加 10 mL 水混悬，放入离心管中，用冷冻离心机离心(4000 r·min⁻¹)10 min 后，将上层水溶液弃去，再加入水 10 mL 混悬，放入离心管中，用冷冻离心机离心(4000 r·min⁻¹)10 min 后，将上层水溶液弃去，底部沉淀用甲醇溶解，定量到 5 mL。过 0.45 μm 的微孔滤膜过滤，取续滤液为供试品溶液，见图 4。

2.5 色谱方法学考察

2.5.1 稳定性试验 取同一样品溶液，分别在 0，1.5，3，4.5，6，24，48，72 h 不同时间点进样，所得色谱图导入相似度计算软件，计算夹角余弦相似度，

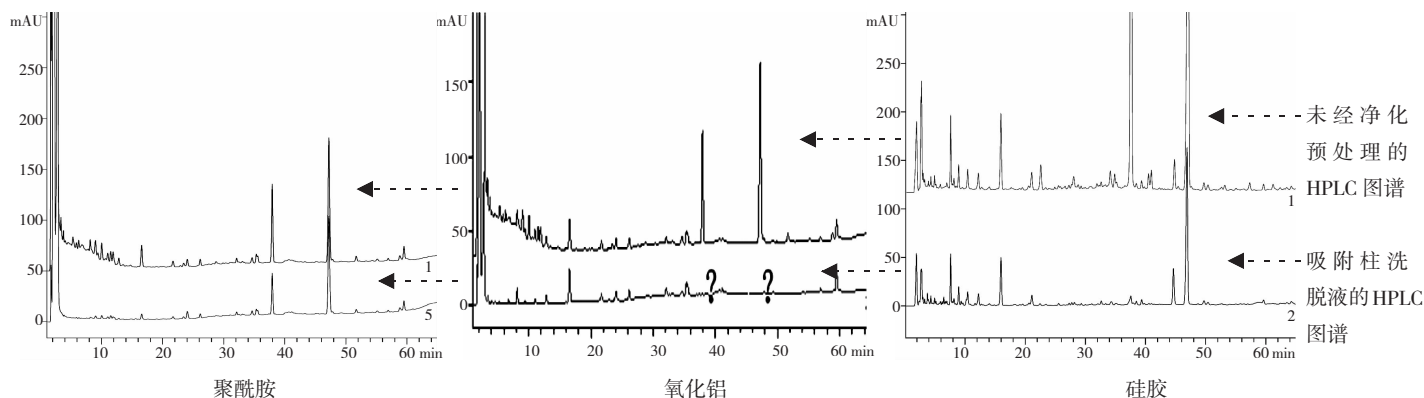


图3 吸附柱净化处理实验结果

Figure 3 The purification experiment results by adsorption column

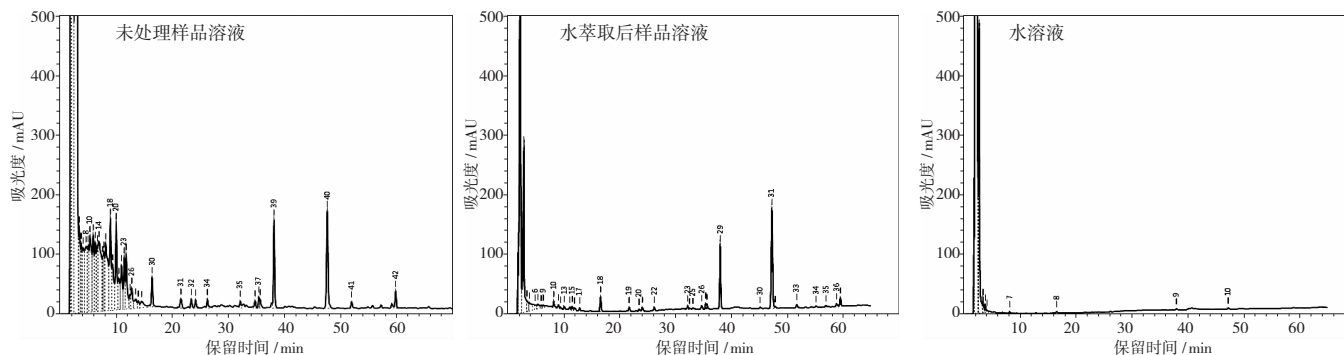


图4 水萃取净化法的 HPLC 色谱图

Figure 4 HPLC chromatograms of water extraction method

各时间点的相似度均在 0.99 以上, 谱图一致, 表明稳定性良好。

2.5.2 重复性试验 取同一样品 6 份, 依法测定, 所得色谱图导入相似度计算软件, 计算夹角余弦相似度, 结果均在 0.99 以上, 表明重复性良好。

2.5.3 精密度试验 取同一样品溶液, 依法测定, 连续进样 6 次, 所得色谱图导入相似度计算软件, 计算夹角余弦相似度, 结果均在 0.99 以上, 表明仪器精密度良好。

2.6 色谱中主要成分的确证 精密称量雷公藤甲素、雷公藤内酯甲、雷公藤红素、去甲泽拉木醛, 用甲醇溶解, 配置成终浓度分别为 0.38, 0.18, 0.14, 0.20 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的溶液, 精密吸取 20 μL 溶液进样检测, 通过保留时间来确定峰的化学属性。

3 结果

3.1 HPLC 指纹图谱的共有模式与种植药材和饮片的图谱对比分析

3.1.1 相似度分析 将各样品图谱导入指纹图谱分析软件 chempattern 2.0 专业版, 以夹角余弦计算相似度, 浙江丽水(2 批)及江西的药材样品(3 批)相似度

约小于 0.7, 说明产地对雷公藤化学成分是有影响的。福建 GAP 基地不同年限(2~7 年)种植样品相似度为 0.8 左右, 说明生长年限的影响不大, 可见, 按照 GAP 规范种植, 能有效稳定雷公藤原药材的质量。此外, 商品饮片的 HPLC 图谱与指纹图谱共有模式相比大多数相似度都低于 0.65, 最差的是 12 号样品, 相似度仅 0.4188; 而 11 号样品商品饮片(湖南怀化市场)相似度比其他饮片要高(0.70), 说明商品饮片质量与药材来源、产地不同、药材部位、甚至品种基源不同等因素有关, 图 5, 6。

3.2 主成分分析 以阈值化后的数据, 进行主成分分析。由主成分分析投影图可以看出, 原药材聚为一类, 商品饮片散在分布。说明商品饮片样品之间质量很不均衡。值得注意的是, 样品样品 11(购自湖南怀化)分布在种植药材区域, 与相似度分析结果一致。

4 讨论

本实验以乙酸乙酯、甲醇分次提取, 水萃取除杂质的简便的制备雷公藤药材样品供试品溶液的方法, 用 HPLC-DAD 检测, 建立了 GAP 基地雷公藤药

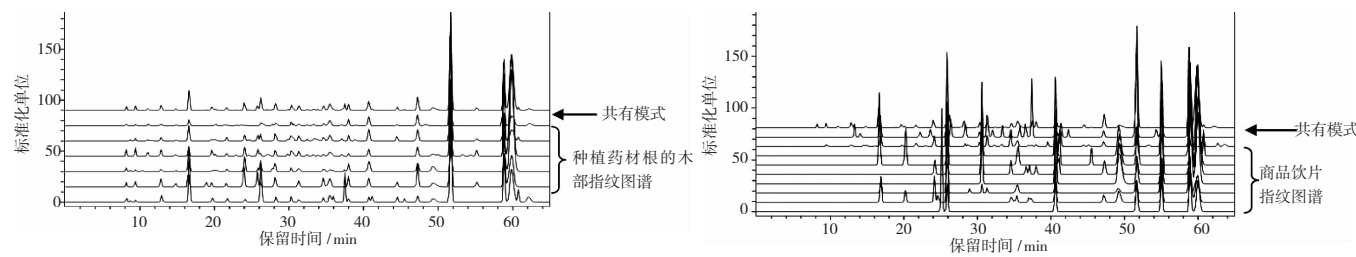


图 5 雷公藤原药材根木部(左)与饮片(右)的 HPLC 色谱与 HPLC 指纹图谱共有模式的比较
Figure 5 The comparisons of HPLC fingerprint for LGT raw herbs(left) and decoction slices(right)

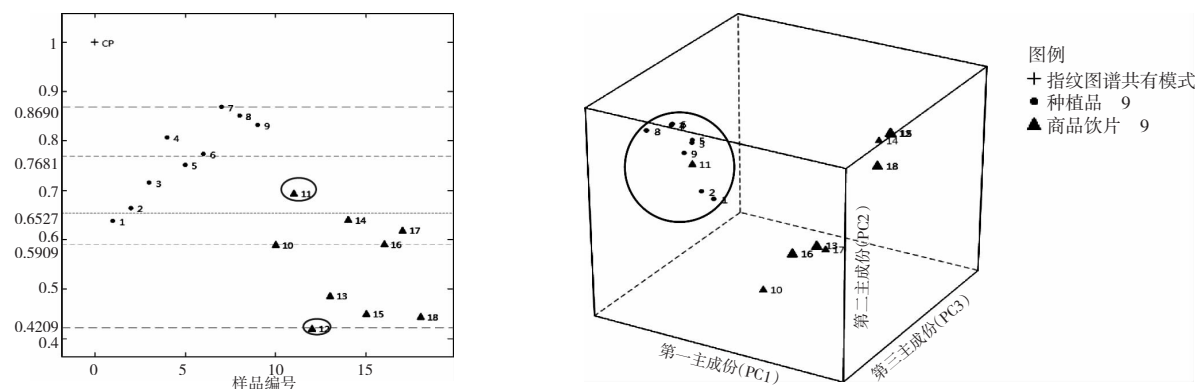


图 6 雷公藤样品 HPLC 指纹图谱的相似度(左)及主成分分析投影图(右)
Figure 6 Similarity of LGT samples(left) and Principal component analysis projection map(right)

材色谱指纹图的共有模式, 确认了色谱中主要的生物活性成分。对 9 批药材样品前处理方法进行了优化。用指纹图谱比较了雷公藤原药材根木与收集到的商品饮片的成分异同。结果表明福建泰宁 GAP 基地药材质量稳定, 不随生长年限发生太大变化。但不同产地药材互有差异; 而商品饮片 (均为根木) 绝大部分与原药材根木成分差异明显, 活性成分少、含量低, 不同收集来源的商品饮片质量也相互不同。说明当前商品雷公藤的饮片质量极不稳定, 对于一个毒性较大的药材来说, 其安全是一个值得关注的问题。

致谢 本文为感谢澳门科技基金项目(项目编号 040/2009/A2)的部分内容, 对澳门科技基金的支持表示感谢。相似度及主成分分析软件 chempattern 2.0 专业版由田润涛提供, 特此致谢。

参考文献:

[1] 周晓慧, 李桂洁. 雷公藤抗炎作用的研究进展[J]. 医学综述, 1995, 1(5): 201-203.
[2] 向明, 张程亮. 雷公藤免疫抑制作用研究进展[J]. 中草药, 2005, 36(3): 458-461.
[3] 李鹏, 方剑乔. 雷公藤制剂治疗类风湿性关节炎的临床概况[J]. 内蒙古中医药, 2008, (6): 70-71.

[4] 张丽春. 雷公藤多苷对慢性肾炎的作用机制研究[J]. 南京中医药大学学报, 2012, 28(6): 594-596.
[5] 王爽, 张如松. 雷公藤多苷治疗自身免疫疾病作用机制的研究进展[J]. 中成药, 2011, 33(3): 498-501.
[6] 申琳, 邹爱英. HPLC 法测定雷公藤粗制品中雷公藤甲素的含量[J]. 天津药学, 2005, 17(4): 28-29.
[7] 张茹萍, 何昱, 石森林, 等. 雷公藤药材中 6 种有效成分以及总二萜内酯、总生物碱、总三萜的含量测定[J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(1): 224-229.
[8] 董林毅, 张庆伟, 段宏泉. 雷公藤药材 HPLC 指纹图谱的研究[J]. 中国药理学杂志, 2009, 44(6): 422-426.
[9] 库尔班江, 赛得合买提, 张焱. 雷公藤药材高效液相色谱指纹图谱研究[J]. 喀什师范学院学报, 2009, 30(3): 48-52.
[10] 黄文华, 郭宝林, 斯金平, 等. 雷公藤药材 HPLC 指纹图谱研究[C]// 第五届全国雷公藤学术会议论文汇编. 泰宁, 2008.
[11] 高旋, 庄莹, 宋敏, 等. 雷公藤药材及制剂的 HPLC 指纹图谱研究[C]// 2008 年《药物分析杂志》第 3 届普析通用杯论文集. 北京: 中国药学会, 2008: 1342-1357.
[12] 夏焱, 段宏泉, 张铁军, 等. 雷公藤属药用植物的研究进展[J]. 中草药, 2005, 36(7): 38-141.
[12] 孙新, 张素敏, 田春华, 等. 雷公藤及其安全性[J]. 中国新药杂志, 2001, 10(7): 539-543.
[13] 薛璟, 贾晓斌, 谭晓斌, 等. 雷公藤化学成分及其毒性研究进展[J]. 中华医药杂志, 2010, 25 (5): 726-733.

(编辑: 梁进权)