

雷公藤药材及制剂的 HPLC 特征图谱研究

高旋¹, 宋敏¹, 庄莹¹, 翟清波¹, 杭太俊^{1*}, 马鹏程²

(1. 中国药科大学药物分析教研室, 南京 210009; 2. 中国医学科学院皮肤病研究所, 南京 210042)

摘要 目的: 建立雷公藤药材及制剂的 HPLC 特征图谱对照测定法, 为雷公藤质量控制提供参考。方法: 采用 C₁₈ 色谱柱, 甲醇-水为流动相梯度洗脱, 测定雷公藤药材及制剂的 HPLC 特征图谱, 统计分析确定共有模式; 以最接近共有模式的雷公藤药材和制剂为特征图谱对照, 采用夹角余弦法和相对欧氏距离法, 分别从化学成分定性和定量 2 个方面对不同产地雷公藤药材和主要市售雷公藤片剂的 HPLC 特征图谱进行定性定量相似性评价。结果: 建立的雷公藤药材及制剂的 HPLC 特征图谱测定条件分离良好、专属性强, 可用于雷公藤质量的比较与控制。结论: 以特征对照品为参照进行雷公藤药材或制剂特征图谱相似性评价, 重复性和耐用性良好。测得雷公藤药材或制剂的特征图谱差异显著。因此, 雷公藤药物的质量和安全性亟待提高。

关键词: 雷公藤药材; 雷公藤片剂; 雷公藤内酯醇; 特征图谱; 高效液相色谱法

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0254-1793(2009)05-0702-08

Study of *Tripterygium wilfordii* Hook f and *Tripterygium wilfordii* preparations by HPLC specific chromatograms

GAO Xuan¹, SONG Min¹, ZHUANG Ying¹, ZHAI Qing-bo¹, HANG Tai-jun^{1*}, MA Peng-cheng²

(1. China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China; 2. Institute of Dermatology, Chinese Academy of Medical Sciences Nanjing 210042, China)

Abstract Objective To establish stable and repeatable HPLC specific reference chromatogram standards for the quality analysis and control of *Tripterygium wilfordii* Hook f and its preparations. **Method** HPLC separation was performed on a C₁₈ column with methanol-water as mobile phase in gradient elution. The specific reference chromatograms were determined as the most typical chromatograms representing most of the properties of *Tripterygium wilfordii* Hook f and *Tripterygium wilfordii* tablets respectively from both constituents and quantity view of points established by statistical and similarity analyses. **Result** The results indicate that the quality assessments of *Tripterygium wilfordii* Hook f and its tablets with reference to the concomitantly measured HPLC specific reference chromatograms have good ruggedness, specificity and reproducibility. **Conclusion** The specific chromatograms of *Tripterygium wilfordii* Hook f and its preparations can be quantitatively and qualitatively evaluated by comparison with the established specific reference standards by using both Cosine θ and relative Euclid distance methods respectively. The specific chromatograms of both *Tripterygium wilfordii* Hook f and its preparations were found to be in great diverse. Therefore, the clinical safety and quality of the drug need to be improved significantly.

Key words *Tripterygium wilfordii* Hook f; *Tripterygium wilfordii* tablets; tripolide; specific chromatogram; HPLC

雷公藤 (*Tripterygium wilfordii* Hook. f) 系卫矛科雷公藤属植物, 产于浙江、安徽、江西、湖南、广东、广西、福建、云南等地, 同属植物还包括昆明山海棠 (*Tripterygium hypoglaucom* Hutch.)、东北雷公藤 (*Tripterygium regelii* Sprague et Takeda)。雷公藤是一味传统中药, 具有抗炎、免疫抑制、抗肿瘤、抗生育

等活性^[1], 这些作用是由其所含的二萜和三萜内酯、生物碱等多种成分的协同作用所产生^[2]。雷公藤总内酯是从卫矛科植物雷公藤根中提取出来的一些次代谢物的混合物, 具有抗炎和免疫抑制作用, 在临床上雷公藤片广泛用于治疗类风湿性关节炎^[3], 并在抗肿瘤方面具有良好的应用前景^[4], 其抗生育

* 通讯作者 Tel: (025) 83271090 E-mail: hangtj@cpu.edu.cn

活性也曾受到关注^[5]。但是,雷公藤药材和制剂都有明显的毒副作用,临床安全使用的治疗剂量较小、治疗窗较窄,药材、分离制备工艺、服用剂量不合理等多种因素都会导致服药后的毒性反应^[6]。

尽管已有大量的雷公藤化学成分的分鉴定研究和雷公藤内酯(雷公藤多苷)的药理研究报告^[2 6-9],但是临床上广泛使用的“雷公藤多苷”产品大都仅对所含的雷公藤内酯醇(雷公藤甲素)或雷公藤酯甲进行测定控制^[10-12],中药成方制剂标准^[13 14]中分别以雷公藤酯甲与雷公藤内酯醇作为指标,使用薄层扫描法进行测定,控制指标准确性较差。其化学成分的整体系统分析控制研究和实际应用较少,仅见有对雷公藤叶提取物特征图谱的研究报道^[15]。

本文以“特征对照品”^[16]为参照,分别采用夹角余弦法和相对欧氏距离法^[17],从化学成分定性和定量2个方面,对雷公藤药材及其制剂的整体质量进行多指标化学成分的分析控制,为雷公藤制剂质量的整体控制提供参考,以保障临床用药的安全。

1 仪器与试药

LC 2010高效液相色谱仪和 LC Solution 色谱数据工作站(日本岛津公司);Satorious 电子分析天平(德国赛多利斯股份公司);KQ3200E 医用超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

无水甲醇、无水乙醇、乙酸乙酯、乙醚、二氯甲烷和石油醚(60~90℃)均为分析纯(南京化学试剂厂);中性氧化铝(上海陆都化学试剂厂,100~200目);水为重蒸水。

对照品雷公藤内酯醇(批号 111567-200502)、雷公藤酯甲(批号 111597-200402)均购自中国药品生物制品检定所。

雷公藤药材为 *Tripterygium wilfordii* Hook f 的干燥根及根茎,分别于 2007~2008 年购自广西、福建、四川、浙江、湖南等地,由南京师范大学生命科学院龚祝南教授鉴定(见表 1)。雷公藤片剂:市售(见表 2)。

表 1 雷公藤药材来源

Tab 1 Origin of <i>Tripterygium wilfordii</i> Hook f	
样品号 (sample No.)	产地 (origin)
1	福建泰宁 (Taiping, Fujian)
2	广西桂林 (Guilin, Guangxi)
3	云南大理 (Dali, Yunnan)
4	四川西昌 (Xichang, Sichuan)
5	广西玉林 (Yulin, Guangxi)
6	重庆 (Chongqing)
7	四川成都 (Chengdu, Sichuan)
8	浙江丽水 (Lishui, Zhejiang)

表 2 雷公藤制剂来源

Tab 2 Origin of *Tripterygium wilfordii* tablets

样品号 (sample No.)	厂家 (manufacturer)	批号 (Lot No.)	规格 (labeled amount)
1	上海复旦复华药业有限公司 (Shanghai Fudan FuhuaPharm. Co., Ltd.)	070302	浸膏 (liquid extracts) 10 mg per tablet
2	江苏美通制药有限公司 (Jiangsu Meitong Pharm. Co., Ltd.)	070321	浸膏 (liquid extracts) 10 mg per tablet
3	湖南协力药业有限公司 (Hunan Xielixi Pharm. Co., Ltd.)	20070501	浸膏 (liquid extracts) 10 mg per tablet
4	黄石飞云制药有限公司 (Huangshi Feiyun Pharmaceutical Co., Ltd.)	20070301	浸膏 (liquid extracts) 10 mg per tablet
5	三九黄石制药厂 (Sanjiu Huangshi Pharmaceutical Factory)	060207	浸膏 (liquid extracts) 33 μg triptolide per tablet
6	福建汇天生物药业有限公司 (Fujian Huitian Biological Pharmacy Co., Ltd.)	060701	浸膏 (liquid extracts) 10 mg per tablet
7	浙江得恩德制药有限公司 (Zhejiang De'ende Pharmaceutical Co., Ltd.)	0701103	浸膏 (liquid extracts) 10 mg per tablet
8	浙江普洛康裕天然药物有限公司 (Zhejiang Plocon Natural Medicine Co., Ltd.)	070401	浸膏 (liquid extracts) 10 mg per tablet
9	南京军区南京总医院 (Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command)	060520	总内酯 (total lactones) 80 μg per tablet

2 溶液的制备

2.1 药材供试品溶液 取雷公藤药材粉末(过 40 目筛)约 5.0 g 精密称定,加无水乙醇 100 mL,浸泡过夜后水浴加热回流 2 h 慢速滤纸抽滤,用 20 mL 无水乙醇分次洗涤残渣,合并滤液,将滤液于 50℃ 水浴减压旋转蒸发至干,精密加入无水乙醇 20 mL 复溶,定量移取 15 mL,置中性氧化铝柱[中性氧化铝 5.0 g 柱内径 0.8~1.0 cm,用石油醚(60~90℃)-乙酸乙酯(1:4) 5 mL 预洗]上,用石油醚(60~90℃)-乙酸乙酯(1:4) 50 mL 洗脱,收集洗脱液,于 45℃ 水浴减压旋转蒸发至干,残留物精密加入甲醇-水(80:20) 1 mL 溶解,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取续滤液作为供试品溶液。

2.2 制剂供试品溶液 取雷公藤片剂 10 片,除去薄膜衣,精密称定,研细,取细粉适量(约相当于浸膏 70 mg 或雷公藤内酯醇 70 μg),精密称定,置 25 mL 量瓶中,加无水乙醇约 20 mL,密塞,超声处理(120 W, 40 kHz) 60 min,冷至室温,加无水乙醇至刻度。

~90℃)-乙酸乙酯(1:4) 50 mL 洗脱,收集洗脱液,于 45℃ 水浴减压旋转蒸发至干,残留物精密加入甲醇-水(80:20) 1 mL 溶解,用微孔滤膜(0.45 μm)滤过,取续滤液作为供试品溶液。

度, 摇匀, 滤过, 精密量取续滤液 15 mL, 置中性氧化铝柱[中性氧化铝 1.0 g 柱内径 0.8~1.0 cm, 用石油醚(60~90℃)-乙酸乙酯(1:4)5 mL 预洗]上, 用石油醚-乙酸乙酯(1:4)30 mL 洗脱, 收集洗脱液, 于 45℃水浴减压旋转蒸发至干, 残留物精密加入甲醇-水(80:20)1 mL 溶解, 用微孔滤膜(0.45 μm)滤过, 取续滤液作为供试品溶液。

3 特征图谱的建立

3.1 色谱条件与系统适用性 采用 Phenomenex Luna C₁₈(4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱, 甲醇(A)-水(B)为流动相, 梯度洗脱(0 min, 40% A → 120 min, 70% A); 流速 1.0 mL·min⁻¹; 检测波长 218 nm; 柱温为 35℃。在上述色谱条件下, 雷公藤内酯醇色谱峰与相邻色谱峰分离度大于 1.5。

3.2 测定方法 精密量取供试品溶液 20 μL, 注入色谱仪, 记录色谱图。以雷公藤内酯醇的保留时间和峰面积为参比计算各特征峰的相对保留时间(α)和相对峰面积(A_R)。按夹角余弦和相对欧氏距离法分别计算各特征图谱相对于对照图谱的定性和定量相似度。

3.3 特征峰的确定 分别测定各批雷公藤药材和制剂的 HPLC 特征图谱, 经比较分析后确定药材特征图谱中 32 个共有峰, 制剂 30 个共有峰。图 1 为雷公藤药材和制剂的典型 HPLC 特征图谱。选择主要特征有效成分雷公藤内酯醇峰为参照峰(s 峰)。

3.4 方法验证 取福建泰宁药材样品按“2.1”项下方法制备供试品溶液, 取上海复旦复华药业有限公司生产的雷公藤片剂(批号 070302)按“2.2”项下方法制备供试品溶液。对同一供试品溶液, 连续测定 6 次, 考察精密性; 对同一供试品溶液分别放置 0, 2, 4, 6, 12, 24 h 分别测定, 考察稳定性; 取同一批样品, 制备 6 份供试品溶液, 分别测定, 考察重复性。结果表明: 以雷公藤内酯醇为参比, 药材和制剂各特征色谱峰的相对保留时间和相对峰面积重复性良好, RSD 均小于 5.0%。

4 特征成分含量测定

4.1 线性关系 精密称取雷公藤内酯醇对照品适量, 加少量甲醇溶解后用甲醇-水(80:20)定量逐级稀释配制成浓度分别为 160, 80, 40, 16, 8 μg·mL⁻¹ 的系列对照品溶液, 在“3.1”项色谱条件下测定, 以质量浓度(C, μg·mL⁻¹)为横坐标, 以峰面积(A)为纵坐标进行线性回归。结果表明, 雷公藤内酯醇进样浓度在 8~160 μg·mL⁻¹ 范围内有良好

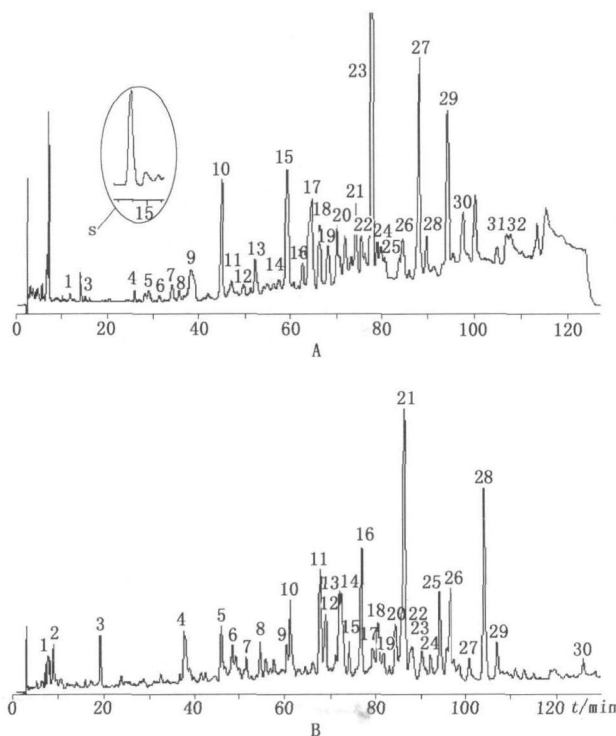


图 1 福建泰宁雷公藤药材(A)及上海复旦复华药业有限公司雷公藤片(B)的 HPLC 典型图谱

Fig 1 HPLC typical chromatograms of *Tripterygium wilfordii* Hook f from Taiping, Fujian(A) and *Tripterygium wilfordii* tablets from Shanghai Fudan Fuhua Pharm. Co., Ltd (B)
s 雷公藤内酯醇 (triptolide)

的线性关系, 回归方程为:

$$A = 2.091 \times 10^4 + 4.304 \times 10^4 C \quad r = 0.9999$$

4.2 回收率 精密称取已测知雷公藤内酯醇含量的福建泰宁产药材约 2.5 g 和南京军区南京总医院产片剂(批号 060520)样品各 9 份, 分别加入相当于样品中已知含量的 80%, 100% 和 120% 的对照品溶液后分别照“2.1”项和“2.2”项下方法制备药材及制剂低、中、高浓度回收率测定用供试溶液各 3 份, 在“3.1”项色谱条件下测定, 计算回收率。结果雷公藤药材的平均回收率分别为 97.2% (RSD = 1.6%), 96.6% (RSD = 0.8%), 103.7% (RSD = 0.1%); 制剂的平均回收率分别为 99.0% (RSD = 0.8%), 98.7% (RSD = 1.5%), 98.6% (RSD = 0.8%)。

4.3 样品测定 分别按“2.1”项和“2.2”项下方法制备雷公藤药材和雷公藤片剂的供试品溶液, 在“3.1”项色谱条件下测定, 以外标标准曲线法计算各产地、各厂家的样品中雷公藤内酯醇含量, 结果见表 3 各产地、各厂家样品的 HPLC 特征图谱分别见图 2 及图 3。

表 3 含量测定结果 (平均值 $\pm$ SD, $n = 3$;
样品编号与表 1 和表 2 相同)

Tab 3 Assay results (mean $\pm$ SD, $n = 3$;
sample No. same as Tab 1 and Tab 2)

样品号 (sample No.)	药材 (<i>Tripterygium wilfordii</i> Hook. f.)		制剂 (<i>Tripterygium wilfordii</i> tablets)	
	雷公藤内酯醇 (triptolide) /	雷公藤酯甲 (wilforlide) /	雷公藤内酯醇 (triptolide) / μ g	雷公藤酯甲 (wilforlide) / μ g
	(μ g $\cdot$ g $^{-1}$)	(μ g $\cdot$ g $^{-1}$)	per tablet	per tablet
1	6.2 $\pm$ 0.12	13.5 $\pm$ 0.05	14.3 $\pm$ 0.69	67.2 $\pm$ 0.85
2	7.6 $\pm$ 0.03	13.4 $\pm$ 0.12	13.4 $\pm$ 0.62	64.5 $\pm$ 1.5
3	7.4 $\pm$ 0.22	5.6 $\pm$ 0.03	6.6 $\pm$ 1.7	499 $\pm$ 0.70
4	16.0 $\pm$ 0.30	5.3 $\pm$ 0.05	1.0 $\pm$ 0.28	314 $\pm$ 1.6
5	9.2 $\pm$ 0.15	检测限以下 (not detected)	20.9 $\pm$ 0.40	2184 $\pm$ 1.0
6	15.9 $\pm$ 0.26	9.5 $\pm$ 0.10	10.9 $\pm$ 0.42	41.0 $\pm$ 1.0
7	14.8 $\pm$ 0.02	6.1 $\pm$ 0.08	3.5 $\pm$ 0.04	127 $\pm$ 3.2
8	5.9 $\pm$ 0.05	34.1 $\pm$ 0.20	2.9 $\pm$ 0.03	210 $\pm$ 11
9			66.1 $\pm$ 3.0	检测限以下 (not detected)

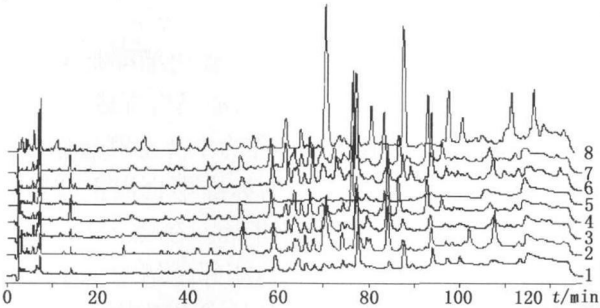


图 2 不同产地雷公藤药材 HPLC 特征图谱
Fig 2 Specific chromatograms of *Tripterygium wilfordii* Hook. f. from different origins
1 ~ 8. 样品编号, 同表 1 (sample No., same as Tab 1)

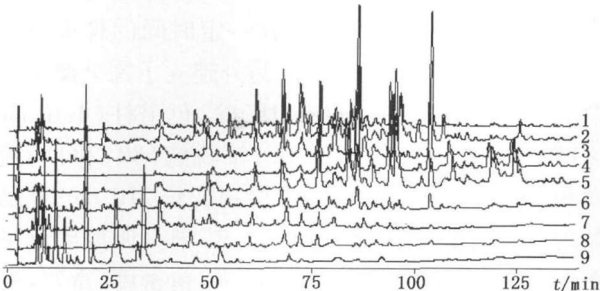


图 3 不同厂家生产的雷公藤片剂 HPLC 特征图谱
Fig 3 Specific chromatograms of *Tripterygium wilfordii* tablets from different manufactory
1 ~ 9. 样品编号, 同表 2 (sample No., same as Tab 2)

5 特征图谱相似度评价

以夹角余弦为定性相似度指标, 对“4.3”项下所测得 8 批雷公藤药材和 8 批雷公藤片剂样本 (9

号制剂与其他制剂有显著性差异, 不用于共有模式分析) 的特征图谱分别以平均值法建立共有模式, 以夹角余弦法和相对欧氏距离法分别进行定性和定量相似度计算, 分析确定最接近共有模式的药材和制剂为相应的特征对照品。结果, 桂林产药材和黄石飞云制药有限公司生产的雷公藤片剂分别被确定为药材和制剂的特征对照品。以特征对照品图谱为参照, 分别计算各样本与参照之间的定性相似度 (Cos θ) 和定量相似度 (Red)。结果见表 4。结果表明, 无论是不同产地的药材还是不同厂家生产的制剂, 在定性和定量相似度上都有较大差异。

表 4 雷公藤药材和制剂的相似度计算结果
(样品编号与表 1 和表 2 相同)

Tab 4 The result of similarity of *Tripterygium wilfordii* Hook. f. and *Tripterygium wilfordii* tablets
(sample No. same as Tab 1 and Tab 2)

样品类型 (sample type)	样品号 (sample No.)	共有模式为参照 (reference with common mode)		特征对照品为参照 (reference with specific reference substance)	
		Cos θ	Red	Cos θ	Red
药材 (<i>Tripterygium wilfordii</i> Hook. f.)	1	0.8244	0.6974	0.7142	1.1203
	2	0.9219	0.1750	1.0000	0.0000
	3	0.8638	0.8007	0.8278	0.8892
	4	0.6522	0.8176	0.4413	1.4419
	5	0.5101	0.9037	0.5213	1.4836
	6	0.8635	0.7565	0.8316	0.8956
	7	0.3639	0.9077	0.2996	1.5077
	8	0.8160	1.6164	0.7280	1.6019
制剂 (<i>Tripterygium wilfordii</i> tablets)	1	0.7134	0.5370	0.6472	1.0645
	2	0.7432	1.3387	0.6733	1.6907
	3	0.5831	0.7614	0.4907	1.2716
	4*	0.9762	0.6376	1.0000	0.0000
	5	0.9627	1.4002	0.9740	0.9975
	6	0.6239	0.6357	0.5262	0.9883
	7	0.3803	0.8574	0.2209	1.1494
	8	0.3600	0.8845	0.2084	1.1402

* 特征对照品 (specific reference substance)

6 LC-MS/MS 法分析雷公藤化学成分

6.1 供试品溶液制备 分别按上述“2.1”项和“2.2”项下方法制备福建产药材和上海复旦复华药业有限公司样品 (批号 070302) 的供试品溶液。

6.2 液相色谱条件 色谱柱: Agilent HC- C_{18} (4.6 mm $\times$ 250 mm, 5 μ m); 柱温 35 $^{\circ}$ C; 流动相: 甲醇 (A) - 水 (B); 梯度洗脱 (0 ~ 60 min 时 35% $\rightarrow$ 52% A, 60 ~ 140 min 时 52% $\rightarrow$ 70% A, 140 ~ 143 min 时 70% $\rightarrow$ 90% A, 143 ~ 145 min 时 90% $\rightarrow$ 35% A, 145 ~ 150

min时 35% A), 流速: $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

6.3 质谱检测条件 大气压化学离子化 (APCI) 正离子检测, 电流 $80 \mu\text{A}$, 雾化温度 450°C , 雾化气压 207 kPa , 辅助气压力 69 kPa , 毛细管温度 350°C , 采用一级离子全扫描和子离子扫描 [0.16 Pa 氩气碰撞诱导解离 (CID), 碰撞能量 30 eV] 2 种方法进行测定。

6.4 主要特征峰的 LC-MS 鉴别 对供试品溶液进行 LC-MS 测定, 一级质谱全扫描方式获得加合

离子峰的信息, 再进行二级质谱子离子扫描测定, 结果如图 4。通过对照品比对确认 1 号、2 号、14 号和 17 号峰分别为雷公藤内酯三醇、雷公藤内酯醇、雷公藤吉碱和雷公藤次碱。并将 LC-MS/MS 测定的结果与已有文献^[18-22]报道的化合物相对照, 对主要特征色谱峰进行初步鉴别。表 5 列出了相应色谱峰的质荷比及其可能的化合物名称、特征碎片离子、分子式和相对分子质量信息。

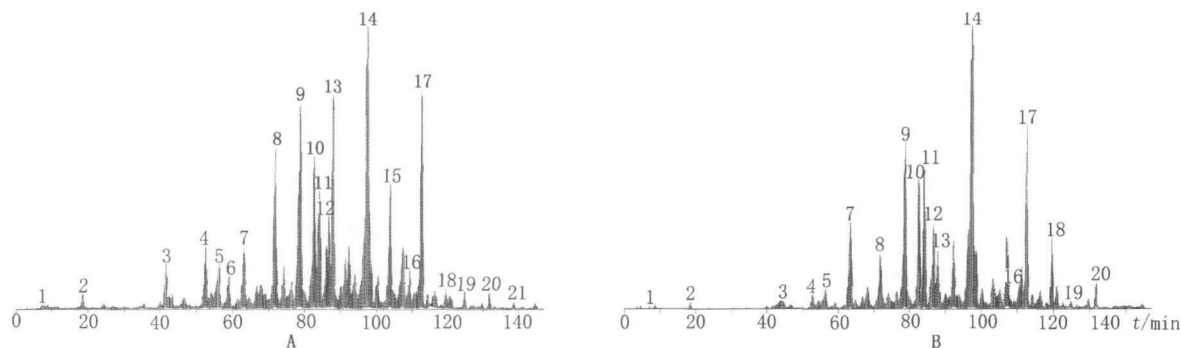


图 4 雷公藤片剂 (A)、雷公藤药材 (B) 一级质谱全扫描的总离子流色谱图

Fig 4 Fullscan chromatograms of *Tripterygium wilfordii* tablets (A) and *Tripterygium wilfordii* Hook. f (B)

7 讨论与小结

7.1 提取条件的选择 提取雷公藤药材时, 由提取溶剂种类、液料比、回流时间三因素设计正交试验, 并结合工业生产的实际情况对试验结果进一步优化。结果表明使用无水乙醇为溶剂, 与药材比例 20:1, 回流提取 2 h 为较佳条件, 药材中各主要成分提取较完全。另外, 在此基础上结合文献^[23]考察了制剂的不同提取方法和提取时间, 由于制剂中主要成分含量较高且较易提取, 最终选择了较为简便的无水乙醇超声提取方法。

7.2 脱色与洗脱条件选择 试验采用中性氧化铝脱色, 目的是除去样品中的色素与极性杂质。研究比较了无水乙醇、乙酸乙酯、乙醚、二氯甲烷、不同比例的乙酸乙酯-石油醚等多种洗脱剂。结果表明乙酸乙酯-石油醚 (4:1) 可较好地将药材和制剂中包括雷公藤内酯醇在内的内酯类成分洗脱出来。在选定的中性氧化铝柱条件下, 洗脱剂用量考察发现, 洗脱剂体积分别为 50 mL 和 30 mL 可分别将药材制剂样品中内酯类成分洗脱完全, 并有效消除色素干扰。

7.3 色谱条件的选择 由于雷公藤含有的成分较多, 极性差别大, HPLC 等度洗脱法难以实现良好分离。故采用 HPLC 梯度洗脱法测定, 分离度高, 重现性好, 结果准确可靠。雷公藤内酯醇仅有 UV 末端吸收, 故选择 218 nm 作为检测波长。

7.4 特征参照峰的选择 雷公藤内酯醇是雷公藤药材中已知主要有效成分之一, 亦是 toxic 成分之一, 生药中也多以雷公藤内酯醇作为主要检测指标评价药材质量^[24]。中药成方制剂标准中也以雷公藤内酯醇与雷公藤酯甲作为检测指标。在建立的色谱条件下, 雷公藤内酯醇色谱峰与相邻色谱峰分离度良好, 且与雷公藤内酯醇相比其他成分单体对照品较难得到, 故选择雷公藤内酯醇为特征参照。

7.5 雷公藤酯甲含量测定 雷公藤酯甲是雷公藤三萜类的强活性代表物质, 为此类制剂质量控制的另一个重要检测指标, 但由于雷公藤酯甲与雷公藤内酯醇极性差异较大, 很难在一定时间的梯度洗脱程序内同时检测。故本实验另外建立了雷公藤酯甲的 HPLC 测定方法: Agilent HC C_{18} 色谱柱 ($4.6 \text{ mm} \times 150 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$); 甲醇-0.1% 磷酸 (80:20) 为流动相; 流速 $1.0 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$; 检测波长 210 nm ; 样品处理方法同上述“2.1”项和“2.2”项。典型图谱见图 5。方法学考察项目同“3.4”项: 精密度、重复性、稳定性良好, RSD 均小于 3.0%。进样浓度在 $6.8 \sim 136 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 范围内有良好的线性关系, 低、中、高回收率均在 96.0% ~ 105.0%。各产地药材及各厂家制剂含量测定结果见表 3。结果显示无论药材还是制剂中雷公藤酯甲含量差异也较大。

表 5 特征峰的初步鉴别

Tab 5 Most probable peak identity of the characteristic chromatogram

峰号 (peak No)	名称 (name)	母离子 (adduct ions) [M + H] ⁺	碎片离子 (fragment ions)	分子式 (molecular formula)	M _r
1	雷公藤内酯三醇 (triptolide)	379	361, 343, 301, 269, 241, 213, 185, 157, 131, 91, 79, 43	C ₂₀ H ₂₆ O ₇	378
2	雷公藤内酯醇 (triptolide)	361	333, 297, 267, 239, 195, 169, 145, 119, 91, 79, 43	C ₂₀ H ₂₄ O ₆	360
3	雷公藤植碱 (wilfordine) / 雷公藤榕碱 (wilfordine)	780	752, 674, 572, 277, 259, 194, 176, 134, 106	C ₃₆ H ₄₅ NO ₁₈	779
4	2- O - 去乙酰基雷公藤新碱 (2- O - deacetyl euonine) / 7- O - 去乙酰基雷公藤新碱 (7- O - deacetyl euonine)	764	206, 178, 160	C ₃₆ H ₄₅ NO ₁₇	763
5	alatusinine /	822	804, 720, 558, 462, 222, 176	C ₃₈ H ₄₇ NO ₁₉	821
6	未见报道 (unreported)		762, 632, 222, 204, 176, 134, 106		
7	未见报道 (unreported)	818	681, 638, 556, 443, 361, 320, 279, 203, 191, 178		817
8	Pertassinines A /	806	788, 728, 686, 206, 178, 160	C ₃₈ H ₄₇ NO ₁₈	805
9	雷公藤新碱 (euonine) /		206, 188, 178		
10	卫矛碱 (euonymine)		788, 746, 718, 206, 186, 176		
11	雷公藤康碱 (wilfordine) / 雷公藤春碱 (wilfortrine) / 异雷公藤春碱 (isowilfortrine)	874	856, 832, 176, 134	C ₄₁ H ₄₇ NO ₂₀	873
12	山海棠二萜内酯 (hypodiolide)	319	301, 258, 213, 199, 186, 173, 165, 157, 145, 133, 121, 115, 105, 95, 91, 82	C ₂₅ H ₃₀ O ₃	318
13	雷公藤康碱 (wilfordine) / 雷公藤春碱 (wilfortrine) / 异雷公藤春碱 (isowilfortrine)	874	837, 778, 672, 614, 205, 194, 176	C ₄₁ H ₄₇ NO ₂₀	873
14	雷公藤吉碱 (wilforgine)	858	206, 178, 106	C ₄₁ H ₄₇ NO ₁₉	857
15	雷公藤定碱 (wilfordine) / 雷公藤明碱 (wilfordine)	884	814, 797, 674, 592, 540, 423, 326, 221	C ₄₅ H ₄₉ NO ₁₉	883
16	雷公藤碱庚 (wilforine)	826	790, 748, 206	C ₄₁ H ₄₇ NO ₁₇	825
17	雷公藤次碱 (wilforine)	868	808, 790, 686, 206, 178, 160	C ₄₃ H ₄₉ NO ₁₈	867
18	山海棠素 E (hyponines E)	921	903, 206, 188	C ₄₅ H ₄₈ N ₂ O ₁₈	920
19	大理雷公藤碱 (forestine) / 山海棠素 C (hyponines C)	868	686, 206	C ₄₃ H ₄₉ NO ₁₈	867
20	山海棠素 D (hyponines D)	931	913, 206	C ₄₇ H ₅₀ N ₂ O ₁₈	930
21	chen iloline E - II	930	912, 894	C ₄₈ H ₅₁ NO ₁₈	929

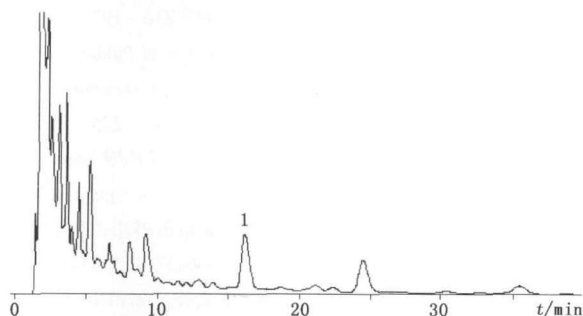


图 5 雷公藤酯甲 (1) HPLC 典型图谱

Fig 5 HPLC chromatogram of wilfordine (1)

7. 6 雷公藤药材与制剂特征图谱比较与探讨

从特征图谱和相似度计算结果均可看出, 无论是不同产地的药材还是不同厂家生产的制剂, 在定性和定量相似度上都有较大差异。药材的差异主要是由于不同部位、不同产地、不同采收期的化学成分分布与含量的不同。而制剂的差异除了采用的药材具有以上差异之外, 不同的生产工艺是另一个主要因素。

本实验比较了药材不同部位的差别: 取浙江丽水产地雷公藤全株药材的干燥根、茎、叶分别处理测定。结果表明: 雷公藤叶中雷公藤内酯醇含量显著

高于根和茎,其他成分的含量相对较少;根中生物碱成分占绝大部分,萜类成分含量较少;茎较根而言生物碱成分含量相对较少而萜类成分含量相对较多。因此,选取的药材部位不同或者不同部位的比例不同可能为不同厂家生产的雷公藤片剂质量差异较大的原因之一。例如,南京军区南京总医院生产的雷公藤制剂是采用雷公藤叶提取而成,得到的特征图谱与以雷公藤的根茎为原料生产的雷公藤制剂的特征图谱有很大的差异,且雷公藤内酯醇含量较大,与文献报道结果^[15]相一致。

即便是同一产地、相同部位的药材也会有较大差异。采收期不同,所含化学成分及含量不同可能为主要因素。同一产地于夏季和冬季采收的雷公藤叶提取物中主要成分,尤其是雷公藤内酯醇含量相差较大^[15]。另有文献报道^[25]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。

6~8号制剂样品特征图谱表明其生物碱成分峰数量相对较少且含量小,可能与采用雷公藤茎为原料,并在生产工艺中分离去除了生物碱成分相应。不同厂家生产的制剂样品4号和5号,7号和8号不论定性还是定量相似度都很高,这可能与它们药材来源、部位相同,并使用相似的生产工艺相关。

由于药材部位、来源、采收期和生产工艺的不同和不稳定性,导致目前市售的雷公藤片剂质量差异较大,从而影响临床使用的有效性与安全性。因此,建立雷公藤特征图谱标准,可以平行地整体监控和比较产品内在质量,从而保障临床应用的安全与有效。

参考文献

- HE Jiang-ping(贺江萍), WANG Wen-yan(王文燕), GAO Wen-yuan(高文远), et al. Determination of triptolide in *Tripterygium wilfordii* and its tablet by HPLC (HPLC法测定雷公藤药材及其片剂中雷公藤内酯醇). *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(6): 837
- WEI Hu-li(魏慧林), CHEN Yun(陈云), ZHANG Jia-nun(郑家润). Advances in pharmacological research of *Tripterygium wilfordii* Hook f on immune system and inflammatory reaction (雷公藤对免疫系统和炎症反应的药理作用及其机制的研究进展). *Chin J New Drugs* (中国新药杂志), 2004, 13(9): 780
- WU Jin-quan(吴锦权), PAN Wei-hong(潘伟红). Comparative anti-inflammation test of the rootwood extracts of *Tripterygium wilfordii* Hook f from two habitats (不同产地雷公藤原药材提取的雷公藤多苷抗炎作用的对比试验). *Chin J Med Appl Pharm* (中国现代应用药学), 2006, 23(7): 623
- REN Rong(任荣), LI Zheng-xiang(李正翔), LI Bin(李彬), et al. Research and development of effective components in *Tripterygium wilfordii* and its preparations (雷公藤有效成分及其制剂的研究进展). *Chin Hosp Pharm J* (中国医院药学杂志), 2005, 25(11): 1068

- Q IANG Chun-qian(强春倩), LU Shi-ren(刘世任), DU Ben-min(都本敏). Research progress in pharmacological activities of *Tripterygium wilfordii* (雷公藤药理研究进展). *J Emerg Syndromes Tradit Chin Med* (中国中医急症), 2006, 15(2): 198
- ZHAO Run-shuan(赵润栓), ZHANG Min(张敏). Advances in studies on toxic and adverse reactions of *Tripterygium wilfordii* Hook f and their prevention (雷公藤毒副作用及其防治研究进展). *Forum Tradit Chin Med* (国医论坛), 2006, 21(3): 52
- XIA Yan(夏焱), DUAN Hong-quan(段宏泉), ZHANG Tie-jun(张铁军), et al. Advances in studies on medicinal plants of *Tripterygium Hook f* (雷公藤属药用植物的研究进展). *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(7): 1093
- REN Rong(任荣), LI Zheng-xiang(李正翔), LI Bin(李彬), et al. Advances in studies on active components and pharmaceutics of *Tripterygium wilfordii* Hook f (雷公藤有效成分及其制剂的研究进展). *Chin Hosp Pharm J* (中国医院药学杂志), 2005, 25(11): 1068
- MA Wei-guang(马伟光), ZHANG Tao(张滔), ZHANG Chao(张超), et al. Advances and prospects in studies of toxic herbal *Tripterygium wilfordii* Hook f (有毒药物雷公藤的研究及展望). *Chin J Tradit Chin Med Pharm* (中华中医药杂志), 2006, 25(11): 1068
- YANG Xiao-hong(杨小红), ZHANG Wei-cheng(张伟程). Applications and adverse reactions of *Tripterygium wilfordii* Hook f preparations (雷公藤制剂的应用及其副作用). *Chin J Tradit Chin Med* (中医临床杂志), 2004, 16(5): 511
- LI Ke(李克), YUAN Yi-sheng(袁倚盛), DAI Xiao-li(戴晓莉), et al. Determination of triptolide in extract from *Tripterygium wilfordii* Hook f by RP-HPLC (反相高效液相色谱法测定雷公藤提取物中雷公藤甲素含量). *Chin J Chromatogr* (色谱), 1998, 16(4): 356
- HUANG Wen-hua(黄文华), GUO Bao-lin(郭宝林), SI Jin-ping(斯金平), et al. Triptolide in different populations and individuals of three species of *Tripterygium Hook f* (雷公藤属3种植物不同群体和个体中雷公藤甲素的研究). *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(7): 1065
- Drug Specifications Promulgated by the Ministry of Public Health, P R China (中华人民共和国卫生部药品标准). Preparation of Chinese Patent Medicine (中药成方制剂). 1997, Z16-197
- Drug Specifications Promulgated by the Ministry of Public Health, P R China (中华人民共和国卫生部药品标准). Preparation of Chinese Patent Medicine (中药成方制剂). 1998, Z17-275
- LI Ke(李克), WANG Shu-dong(王曙东), CHEN Shuang(陈爽). Study on HPLC fingerprint of extract of *Tripterygium wilfordii* Hook f leaves (雷公藤叶提取物高效液相色谱指纹图谱的研究). *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2006, 37(11): 1671
- SONG Min(宋敏), HANG Tai-jun(杭太俊), ZHANG Zheng-xing(张正行). Studies on the fingerprints of the liposoluble components of *Salvia miltiorrhiza* Bge by HPLC using fingerprint reference material (丹参脂溶性成分指纹图谱标准的对照品对照法研究).

- Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2007, 27(1): 8
- 17 CHEN Jun(陈珺), SONG Min(宋敏), ZHANG Yu(张钰), *et al* Determination of Pueraria isoflavones in *Pueraria thomsonii* and *Pueraria lobata* by HPLC reference fingerprint chromatogram and Folin-phenol reagent colorimetry(粉葛与野葛中异黄酮的 HPLC 指纹对照和比色测定). *Chin J New Drugs*(中国新药杂志), 2008, 17(14): 1240
 - 18 ZHANG Chong-pu(张崇璞), LÜ Xie-yu(吕燮余), MA Peng-cheng(马鹏程), *et al* Study on diterpenoids from leaves of *Tripterygium wilfordii*(雷公藤叶中二萜化合物的研究). *Acta Pharm Sin*(药学报), 1993, 28(2): 110
 - 19 de Sousa JR, Silva GDE, Miyakoshi T, *et al* Constituents of the root wood of *Austroplendia piquetii* var *ovata*. *J Nat Prod*, 2006, 69(8): 1225
 - 20 N^ozumi M, Guad^o A, Jimenez IA, *et al* Insecticidal sesquiterpene pyridine alkaloids from *Maytenus chilensis*. *J Nat Prod*, 2004, 67(1): 14
 - 21 Ishiwata H, Shizuri Y, Yanada K. Three sesquiterpene alkaloids from *Euonymus alatus* form *striatus*. *Phytochemistry*, 1983, 22(12): 2839
 - 22 OU YANG Xiao-kun, JIN Mi-cong, HE Chao-hong. Preparative separation of four major alkaloids from medicinal plant of *Tripterygium wilfordii* Hook f using high-speed counter-current chromatography. *Sep Purif Technol*, 2007, (56): 319
 - 23 ZHUANG Ying(庄莹), SONG Min(宋敏), HANG Tai-jun(杭太俊), *et al* Assay of *Tripterygium* total lactones and triptolide in *Tripterygium* tablets(雷公藤多苷片中雷公藤总内酯及雷公藤内酯醇的测定). *Chin J Pharm Anal*(药物分析杂志), 2008, 28(1): 36
 - 24 LI Ke(李克), WANG Shu-dong(王曙东), CHEN Shuang(陈爽). Fingerprint of Chinese material medica and its effects on development of Chinese material medica(中药指纹图谱及其对中药发展的影响). *Chin Tradit Herb Drugs*(中草药), 2002, 33(11): 961
 - 25 SUN Xin(孙新), ZHANG Su-min(张素敏), TIAN Chun-hua(田春华), *et al* Safety of *Tripterygium wilfordii*(雷公藤及其安全性). *Chin J New Drugs*(中国新药杂志), 2001, 10(7): 539

(本文于 2008 年 8 月 14 日收到)

欢迎订阅 2009 年《药物分析杂志》

《药物分析杂志》是由中国科学技术协会主管, 中国药学会主办, 中国药品生物制品检定所药物分析杂志编辑部编辑出版的学术性期刊。主要栏目有研究论文、交流、综述等。报道化学药物、中药与天然药物、抗生素、蛋白质、多肽类药物、生物技术药物等的分析、质量标准研究、临床药物分析、药物分析基础理论与实践以及新方法、新技术的应用, 并及时报道国家重大研究课题的最新成果。

本刊获 2006 年、2007 年、2008 年中国科协精品科技期刊工程项目 C 类资助。

本刊为我国自然科学核心期刊、中文核心期刊、全国统计源期刊, 被国内外主要检索系统收录。

本刊坚持质量第一、面向广大读者, 以其独具的深度与广度展示我国药物分析的现状与发展。

本刊 2005 年开始由双月刊改为月刊, 大 16 开本, 每期 160 页, 国内外公开发行。每期定价 20 元, 全年定价 240 元, 国内邮发代号: 2-237, 国外读者请同中国国际图书贸易总公司(中国国际书店, 北京 399 信箱)联系。欢迎广大读者到当地邮局订阅, 并欢迎有关专业人员集体订购, 价格从优。

本刊已将创刊以来的文章制成光盘, 需要者请与本刊联系。

希望为本刊推广发行者, 价格另议。

地址: 北京市天坛西里 2 号(100050) 联系人: 刘小帅

电话: (010) 67058427 传真: (010) 67012819

编辑部网址: www.ywfxzz.cn 浏览网址: www.nicbpb.org.cn E-mail: ywfx@nicbpb.org.cn

《药物分析杂志》编辑部