

HPLC 测定不同套种模式下雷公藤不同部位甲素含量

李云鹤¹, 乔一娜², 张力¹, 陈礼光², 何天友¹, 倪乐², 郑郁善^{1,2*}

(1. 福建农林大学园林学院, 福建福州 350002; 2. 福建农林大学林学院, 福建福州 350002)

摘要 [目的]以厚朴/雷公藤(处理①)、杉木/雷公藤(处理②)、马尾松/雷公藤(处理③)为3种套种模式,雷公藤纯林为CK对照组,建立不同套种模式下雷公藤甲素的HPLC测定方法,并对不同套种模式下雷公藤不同部位甲素的含量进行比较。[方法]采用高效液相色谱法(HPLC),色谱柱为SinoChrom ODS-BP(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相为甲醇-水(体积比45:55);流速1.0 mL/min;检测波长218 nm;柱温40℃;进样量20 μL。[结果]该方法能在8 min左右实现雷公藤甲素的快速分离,雷公藤甲素浓度在1.55~248.00 μg/mL与峰面积线性关系良好($R^2=0.9997$),平均加样回收率为99.6%,RSD为1.85%($n=6$)。[结论]该方法易操作、分析速度快、重现性好、准确率高,可作为雷公藤甲素含量的测定方法。不同套种模式下雷公藤甲素总含量从高到低依次为处理①、CK、处理②、处理③,雷公藤不同部位的雷公藤甲素含量从高到低依次为根、叶、茎,说明厚朴林下套种雷公藤的模式可提高雷公藤甲素的含量,因此可作为优质林药间作模式广泛推广。

关键词 套种;雷公藤甲素;含量测定;高效液相色谱法

中图分类号 R284 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2019)23-0219-03

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2019.23.063

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Determination of Triptolide in Different Parts of *Tripterygium wilfordii* in Different Interplanting Patterns by HPLCLI Yun-ge¹, QIAO Yi-na², ZHANG Li¹ et al (1. College of Landscape Architecture, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002; 2. College of Forestry, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002)

Abstract [Objective] There were three interplanting patterns of *Magnolia officinalis*/ *Tripterygium wilfordii* (Treatment 1), *Cunninghamia lanceolata*/ *Tripterygium wilfordii* (Treatment 2), *Pinus massoniana*/ *Tripterygium wilfordii* (Treatment 3), and the pure forest of *Tripterygium wilfordii* was CK control group. HPLC method for the determination of triptolide in different interplanting patterns was established, and compared triptolide content in different parts of *Tripterygium wilfordii*. [Method] High performance liquid chromatography method was used, a SinoChrom ODS-BP 5 μm column (4.6 mm×250 mm) was used at 40℃; mobile phase was methanol-water (volume ratio 45:55); the flow rate was 1.0 mL/min; the detection wavelength was 218 nm; the injection volume was 20 μL. [Result] The method could achieve rapid separation of triptolide in about 8 minutes. A good linear was obtained within the range of 1.55-248.00 μg/mL ($R^2=0.9997$), the average recovery was 99.6% (RSD=1.85%, $n=6$). [Conclusion] The method is easy to operate, has fast analysis speed, good reproducibility and high accuracy, and can be used as a method for determining the content of triptolide. The order of total content of triptolide in different interplanting patterns is treatment 1>CK>treatment 2>treatment 3, and the order of triptolide in different parts of *Tripterygium wilfordii* is root>leaf>stem. It shows that the model of *Tripterygium wilfordii* under *Magnolia officinalis* can increase the content of triptolide, so it can be widely promoted as a high quality forest medicine interplanting pattern.

Key words Intercropping; Triptolide; Content determination; High performance liquid chromatography

雷公藤(*Tripterygium wilfordii*),是卫矛科常见的有毒蜜源植物,是我国传统医学中常用的中草药之一。雷公藤甲素,又名雷公藤内酯醇(triptolide, T10),外观呈白色针状结晶体,是雷公藤中含量最高、活性和毒性最强的二萜类原生化合物^[1],常作为需求量大的雷公藤片、雷公藤多苷片的主要成分^[2]。临床研究发现,雷公藤甲素及其衍生物可通过多靶点多途径改善多种疾病,具有抗炎、免疫抑制、抗肿瘤、抗生育、抗病毒、神经组织保护作用^[3-4]。因其在科研的广泛应用和长期无序采挖致使野生资源急剧减少,供不应求^[5],即使雷公藤甲素可生物合成,但其存在合成路线长、获得率低、反应条件不易创造等局限性,所以从植物中提取雷公藤甲素依然是首要途径^[6]。

林药间作套种模式是复合农林业生态系统的重要组成部分,既能提高林地利用率又可保证药用植物资源的合理化种植,可调整林分结构,增加林分内生物多样性,改善土壤条

件,提高单位面积的生物总产量^[7-10],其在实现土地经济效益最大化的同时兼顾生态效益^[11]。目前,有关雷公藤的研究多集中于其活性成分在临床医学研究中的应用,如Yang等^[12]研究了甘草酸与雷公藤甲素联合使用以减轻脏器毒性,王烁阳等^[13]利用雷公藤甲素改善内毒血症大鼠心血管功能损伤,仅张亮等^[14]、李汉保等^[15]研究了雷公藤不同部位的雷公藤甲素含量差异较大。但针对雷公藤生态栽培模式影响雷公藤甲素含量的研究较少,因此笔者以套种在厚朴、杉木、马尾松林下的雷公藤及雷公藤纯林作为试验对象,建立雷公藤甲素含量的测定方法,并对不同套种模式下的雷公藤不同部位甲素含量进行对比分析,以期雷公藤甲素的提取与分离及雷公藤优质套种经营模式提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料与地点 试验中均以6年生雷公藤作为试材,马尾松、厚朴、杉木均是同年栽植,长势良好。设置4个处理:雷公藤纯林(CK)为对照组,厚朴和雷公藤套种(处理①)、杉木和雷公藤套种(处理②)、马尾松和雷公藤套种(处理③),样地规模均为20 m×20 m,3次重复。

试验地点为福建省三明市泰宁县杉城镇邱洪村(玉溪工业园区)雷公藤种植基地,位于26°56'N、117°09'E,亚热带季风气候

基金项目 “十二五”国家科技支撑计划项目(2011BAI01B06);福建农林大学科技发展基金项目(CXZZ2016066)。**作者简介** 李云鹤(1993—),女,陕西武功人,硕士研究生,研究方向:园林植物与应用。*通信作者,教授,博士生导师,从事森林培育和园林植物研究。**收稿日期** 2019-07-10; **修回日期** 2019-07-29

候,年均气温 15.5~17.2℃,最高气温 38.9℃,最低气温 -10.6℃,年平均相对湿度 84%,年平均降水量 1 725~1 913 mm,壤土肥力中等,年平均无霜期 214~252 d。

1.2 雷公藤甲素测定方法

1.2.1 色谱条件。色谱柱为 SinoChrom ODS-BP (4.6 mm×250 mm, 5 μm); 流动相为甲醇-水 (体积比 45:55); 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 218 nm; 柱温: 40℃; 进样量: 20 μL。

1.2.2 对照品溶液的制备。精密称取 24.80 mg 雷公藤甲素标准品,置于 50.00 mL 容量瓶,用甲醇溶解并定容于刻度线,充分摇匀,配成每 1 mL 含 0.496 mg 的标准品储备液。

1.2.3 供试品溶液的制备。分别将采自 5、7、9 月的雷公藤根、茎、叶烘干、研磨、过筛 (60 目),各取 2.00 g 于三角瓶中,72 mL 甲醇浸提 12 h,过滤,蒸馏,加 25 mL 三氯甲烷萃取 3 次,旋转蒸发仪蒸干,加少量洗脱液 (甲醇:乙酸乙酯:乙醚=1:2:1) 洗脱,超声,溶解残渣。加入中性氧化铝于层析柱,待溶液经过层析柱,等量洗脱液洗脱 2 次,层析完毕,蒸干溶液,甲醇定容至 10 mL,滤膜过滤,滤液作为供试品溶液备用。

1.2.4 阴性对照品溶液的制备。取按处方量除去雷公藤甲素制备样品,并按“1.2.3”供试品溶液的制备方法制备阴性对照溶液。

2 方法学考察

2.1 专属性考察 在检测波长 218 nm、柱温 40℃、进样量 20 μL、流动相为甲醇-水 (45:55) 的高效液相色谱条件下,分别精密吸取对照品溶液、阴性对照品溶液、供试品溶液各 20 μL,按“1.2.1”色谱条件进行 HPLC 分析,结果表明 (图 1~

3),阴性对照溶液在雷公藤甲素标准品色谱峰保留时间段未出现色谱峰,表明阴性对照无干扰;且分离度达到 10.17,理论塔板数不低于 1 800,符合要求,表明此方法的专属性较强。

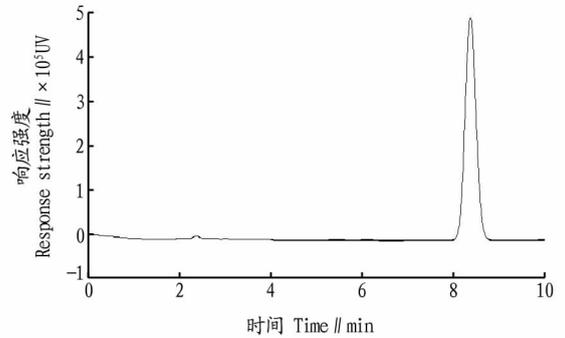


图 1 雷公藤甲素标准品溶液 HPLC 图谱

Fig. 1 HPLC chromatogram of triptolide standard solution

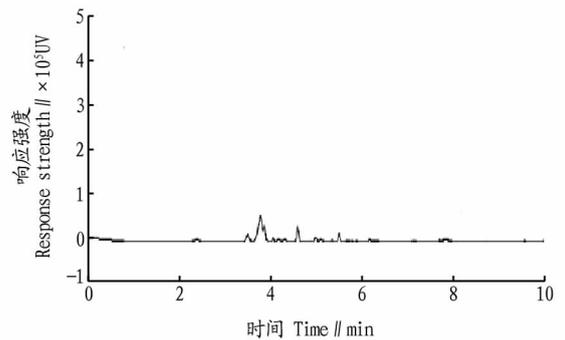
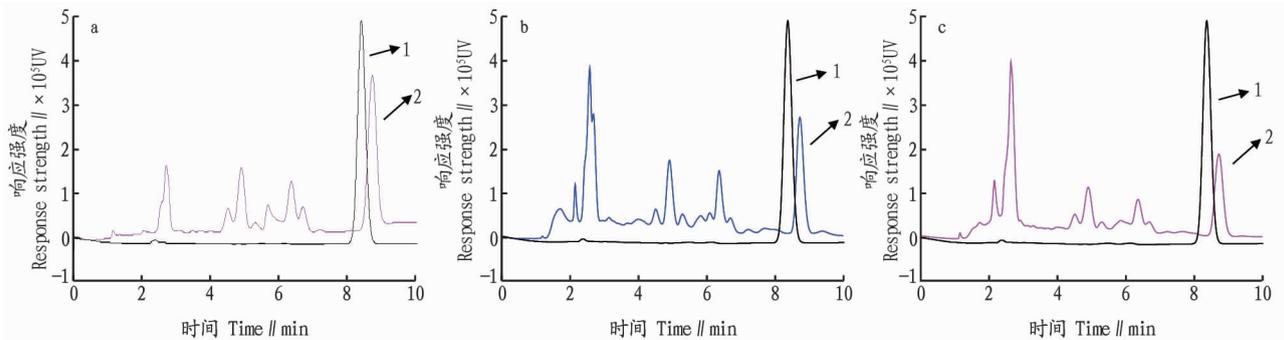


图 2 雷公藤甲素阴性对照溶液 HPLC 图谱

Fig. 2 HPLC chromatogram of triptolide negative control solution



注:1. 雷公藤甲素标样;2. 雷公藤样品溶液

Note: 1. *Tripterygium wilfordii* standard sample; 2. *Tripterygium wilfordii* sample solution

图 3 雷公藤根 (a)、叶 (b) 和茎 (c) 样品与标样色谱曲线

Fig. 3 Chromatographic curves of samples and standards of roots (a), leaves (b) and stems (c) of *Tripterygium wilfordii*

2.2 线性关系考察 分别精密吸取标准品溶液 0.031 25、0.062 50、0.125 00、1.250 00、2.500 00、5.000 00 mL 于 10 mL 容量瓶中,用甲醇稀释定容至刻度,摇匀。在“1.2.1”的色谱条件下,吸取各浓度的标准品溶液,分别进样 20 μL,测得峰面积,以溶液浓度 (x) 对峰面积 (y) 做线性回归,得出线性回归方程 $y=0.011 6 x+1.359 6 (R^2=0.999 7)$,说明雷公藤甲素浓度在 1.55~248.00 μg/mL 线性关系良好。

2.3 精密度试验 吸取 496 μg/mL 雷公藤甲素对照品溶液 20 μL,连续进样 5 次,测定峰面积,计算雷公藤甲素峰面积

的相对标准偏差 RSD 为 1.04%,表明仪器精密度良好。

2.4 稳定性试验 吸取“1.2.3”配制的雷公藤甲素供试品溶液,在室温下放置 0、2、4、8、12、14、18、24 h 分别测定一次,计算雷公藤甲素峰面积的 RSD 为 0.96%,表明供试品溶液 24 h 内稳定性良好。

2.5 重复性试验 取同时期制备的供试品溶液,重复进样 5 次,测定峰面积,计算雷公藤甲素峰面积的 RSD 为 0.96%,表明该方法重现性良好。

2.6 加样回收率试验 分别精确称量雷公藤供试样品

2.00 g, 平行 6 份, 按相同质量浓度精确加入 0.496 mg/mL 雷公藤甲素对照品溶液, 相同的方法测定峰面积, 计算回收率, 结果发现平均加样回收率为 99.6%, RSD 为 1.85%。

2.7 样品测定 按“1.2.3”方法制得雷公藤不同部位的供试样品溶液, 再依“1.2.1”色谱条件进样 20 μL , 计算含量, 结果详见表 1。从表 1 可以看出, 5、7、9 月不同套种模式下雷公藤不同部位甲素含量从高到低依次为根、叶、茎。处理①、处理②、处理③、CK 对照组 3 个月的甲素总含量分别为 9.754 6、6.754 5、5.196 1、7.526 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 处理①的甲素含量最高, 相比 CK 对照组高出 29.61%, 处理②和处理③的甲素含量较 CK 对照组分别降低 10.26%、30.97%。同时还可看出, 9 月份 4 种处理的甲素含量均升高到最高, 其中处理①的甲素含量极高 (4.492 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 几乎为处理②和处理③的 2 倍。雷公藤在 5—9 月进入生长期尤其是快速生长期, 次生代谢较快, 代谢产物甲素逐渐积累, 于 9 月份甲素含量达到最高。

表 1 不同套种模式下雷公藤不同部位甲素含量

Table 1 Triptolide content in different parts of *Tripterygium wilfordii* in different interplanting model $\mu\text{g}/\text{mL}$

时间 Time	处理 Treatment	根 Root	叶 Leaf	茎 Stem	总计 Total
5 月 May	①	1.866 4	0.647 0	0.064 8	2.578 2
	②	1.588 9	0.569 9	0.085 3	2.244 1
	③	0.783 1	0.196 2	0.067 5	1.046 8
	CK	1.761 2	0.368 7	0.121 2	2.251 1
7 月 July	①	1.653 2	0.890 5	0.140 0	2.683 7
	②	1.001 2	0.815 8	0.285 8	2.102 8
	③	1.067 1	0.700 9	0.083 6	1.851 6
	CK	1.477 3	0.310 9	0.303 3	2.091 5
9 月 September	①	2.367 0	1.772 0	0.353 7	4.492 7
	②	0.932 7	1.205 3	0.269 6	2.407 6
	③	1.583 3	0.594 3	0.120 1	2.297 7
	CK	1.867 2	1.008 7	0.308 2	3.184 1

3 讨论与结论

在 200~450 nm 处对雷公藤甲素进行测定, 发现在 218 nm 处有最大吸收, 因此选定 218 nm 为测定波长。选用甲醇-水 (体积比 45:55) 为流动相, 能使雷公藤甲素与其他活性成分保持稳定的游离状态, 峰形对称。通过对多次均衡进样后的峰面积进行分析, 发现进样量为 20 μL 时, 峰面积没有明显的变大或变小, 较为稳定。

样品溶液的出峰时间较对照品出峰时间推迟了约 0.4 min, 且出现了不同程度的杂质峰, 原因可能是样品溶液的制备过程中混有少量杂质, 污染了色谱柱, 使柱效降低, 但对雷公藤甲素含量及出峰面积没有影响。

试验结果表明, 不同套种模式下雷公藤甲素含量差异较大, 相比雷公藤纯林, 厚朴林下套种的雷公藤甲素含量提高了 29.61%, 而杉木、马尾松林下套种的雷公藤甲素含量则分别降低了 10.26%、30.97%; 根据样品溶液的出峰现象, 发现同种处理下, 雷公藤根对应的峰最高、面积最大, 叶次之, 茎出峰面积最小, 因此雷公藤不同部位甲素含量从高到低依次为根、叶、茎。孙乙铭等^[16]测定了不同采收年限雷公藤不同部位的甲素含量发现根皮甲素含量最高、叶片次之, 这与该研究的结果基本一致。涂育和等^[17]测定了林下套种雷公藤的厚朴林的胸径和树高, 发现其比厚朴纯林分别高出了 14.55% 和 7.43%。厚朴林下套种雷公藤, 雷公藤的生长表现出了较高的优越性, 然而厚朴也具有较高的药用价值, 多作为中药制剂应用于临床医学, 但现阶段仅对套种模式中厚朴的形态特征有少量研究, 雷公藤对厚朴的药用成分是否有影响需进一步研究。

参考文献

- [1] 崔艳秋, 陆莉, 王晓民. 雷公藤内酯醇及其衍生物的神经保护作用及机制[J]. 首都医科大学学报, 2011, 32(6): 859-864.
- [2] 王楠楠, 赵雪梅, 迟延青, 等. 雷公藤类制剂药理作用及有效成分含量测定研究[J]. 食品与药品, 2012, 14(11): 450-452.
- [3] 许可嘉, 赵雨坤, 顾颀, 等. 基于网络药理学方法的雷公藤药理、毒理机制研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2018, 38(8): 1006-1010.
- [4] 何蒙荟媛. 苗药雷公藤资源调查及雷公藤红素提取工艺研究[D]. 贵阳: 贵州民族大学, 2016.
- [5] 刘超. 雷公藤人工林林下植被群落生态及凋落物持水性研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2014.
- [6] 汪文强, 邓奇, 肖安菊. 湖北黄石野生驯化扦插雷公藤芽、叶中雷公藤甲素的含量分析[J]. 广州中医药大学学报, 2016, 33(6): 868-871.
- [7] 李国良, 林赵淼, 许泳清, 等. 不同类型甘薯光合光响应曲线拟合及比较分析[J]. 福建农业学报, 2018, 33(7): 687-690.
- [8] 张沁龙, 林开敏, 郑郁善. 杉木套种三年桐模式土壤肥力研究[J]. 福建林学院学报, 1995, 15(2): 170-174.
- [9] 刘开汉. 杉木林下套种红锥效果研究[J]. 绿色科技, 2013(1): 193-194.
- [10] 苏亨荣. 林下种植草珊瑚对林下植物多样性的影响[J]. 福建林业科技, 2014, 41(2): 84-89.
- [11] 杨文火. 闽南山地火力楠林下套种草珊瑚试验研究[J]. 安徽农学通报, 2012, 18(11): 142-144.
- [12] YANG G H, WANG L, YU X T, et al. Protective effect of 18 β -glycyrrhetic acid against triptolide-induced hepatotoxicity in rats [J]. Evid-Based Complement Alternat Med, 2017, 2017: 1-12.
- [13] 王烁阳, 宗佳琪, 苏萍, 等. TLR4/NF- κ B p65 信号通路介导雷公藤甲素对内毒素血症大鼠内皮保护作用[J/OL]. 中国中药杂志, 2019-07-04 [2019-07-05]. http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.2272.r.20190702.1733.001.html.
- [14] 张亮, 张正行, 盛龙生, 等. 毛细管气相色谱法测定不同产地雷公藤中雷公藤甲素的含量[J]. 中国药科大学学报, 1992, 23(3): 158-160.
- [15] 李汉保, 王玉玺, 王曙东, 等. 雷公藤地上部分资源利用初探[J]. 中药材, 1990, 13(4): 16-17.
- [16] 孙乙铭, 徐建中, 王志安, 等. HPLC 测定不同采收年限雷公藤根及不同部位雷公藤甲素含量[J]. 中国现代应用药学杂志, 2009, 26(11): 904-906.
- [17] 涂育和, 许可明, 姜建国, 等. 雷公藤栽培与利用[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005.