

清络通痹精简方中雷公藤“异类相制”减毒机制的化学基础

孙龙^{1,2}, 张本永¹, 朱华旭^{1*}, 刘蒙竹¹, 张新龙¹,
郭立玮¹, 张启春¹, 李博¹, 周学平^{3*}

1. 南京中医药大学 中药复方分离工程重点实验室, 南京 210029;
2. 南京市中医院 南京中医药大学 第三附属医院, 南京 210001;
3. 南京中医药大学 第一临床医学院, 南京 210029)

[摘要] **目的:**通过测定清络通痹精简方、单味雷公藤、雷公藤配伍三七、雷公藤配伍地黄组合中雷公藤3种毒性成分雷公藤甲素、雷公藤红素、雷公藤内酯甲的溶出含量,从化学成分角度探索“异类相制”减毒的规律,为雷公藤的临床配伍减毒应用提供实验依据。**方法:**利用高度选择性和灵敏度的三重四级杆质谱(LC-MS/MS)同时对3种有效成分——雷公藤甲素、雷公藤红素和雷公藤内酯甲进行检测,比较单味雷公藤组、雷公藤配伍三七组、雷公藤配伍地黄组、清络通痹精简方组中3种有效成分的溶出变化。**结果:**雷公藤药材水提液中雷公藤甲素的含量最高,雷公藤内酯甲次之,雷公藤红素的含量最低。而当雷公藤药材用量相同的情况下,雷公藤中3种有效成分在不同配伍环境下的溶出趋势一致,溶出顺序为单味雷公藤组>雷公藤配伍地黄组>雷公藤配伍三七组>清络通痹精简方组。**结论:**在配伍组合中三七对雷公藤3种有效成分的溶出有显著地抑制作用,地黄的抑制作用较弱,而清络通痹精简方中雷公藤3种有效成分的溶出明显降低。该研究结果为雷公藤的临床“异类相制”配伍减毒理论提供了实验依据。

[关键词] 清络通痹精简方; 雷公藤; 雷公藤配伍三七; 雷公藤配伍地黄; 异类相制; 减毒机制; 化学基础

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2017)11-0050-05

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.2017110050

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20170309.1012.024.html>

[网络出版时间] 2017-03-09 10:12

Chemical Basis of *Tripterygium wilfordii* Compatibility for Detoxicity in Qingluo Tongbi Decoction Based on ‘Diversity Restriction’

SUN Long^{1,2}, ZHANG Ben-yong¹, ZHU Hua-xu^{1*}, LIU Meng-zhu¹,
ZHANG Xin-long¹, GUO Li-wei¹, ZHANG Qi-chun¹, LI Bo¹, ZHOU Xue-ping^{3*}

1. Key Laboratory of Separation Engineering for Chinese Medicine Compound, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China;
2. Nanjing Hospital of Chinese Medicine, The Third Affiliated Hospital of Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210001, China;
3. The First Affiliated Hospital, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** By measuring dissolution contents of three kinds of toxic components (triptolide, tripterine, and wilforlide) in simplified Qingluo Tongbi decoction, *Tripterygium wilfordii* (TW), TW + Notoginseng Radix et Rhizoma, as well as TW + Rehmanniae Radix, explore ‘Diversity Restriction’ mechanism of

[收稿日期] 20160831(001)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81072749);江苏省六大人才高峰项目(2014-YY-014);南京中医药大学校级创新团队项目

[第一作者] 孙龙,在读硕士,从事中药学研究,Tel:13505154780,E-mail:13505154780@163.com

[通讯作者] *朱华旭,博士,研究员,从事基于化学结构的中药制药分离过程研究,Tel:025-85811070,E-mail:huaxu72@126.com;

*周学平,博士,教授,从事中医临床研究,Tel:025-85811060,E-mail:zxp@njutcm.edu.cn

detoxicity from the perspective of the chemical basis composition, and provide experimental basis for clinical compatibility application of TW for detoxicity effect. **Method:** Highly selective and sensitive triple quadrupole mass spectrometry (LC-MS/MS) were used at the same time to detect three active ingredients-triptolide, tripterine and wilforlide, and then their dissolution changes were compared between TW, TW + Notoginseng Radix et Rhizoma, TW + Rehmanniae Radix, as well as Simplified Qingluo Tongbi decoction. **Result:** In TW medicinal water extract, triptolide had the highest content, followed by wilforlide, and the content of tripterine was lowest. When the amount of medicine TW was same, the dissolution trend of the above three active ingredients was consistent under different compatibility environments, and the dissolution order was as follows: TW > TW + Rehmanniae Radix > TW + Notoginseng Radix et Rhizoma > Simplified Qingluo Tongbi decoction. **Conclusion:** In the compatibility, Notoginseng Radix et Rhizoma had a significant inhibitory effect on dissolution of three active ingredients of TW, while Rehmanniae Radix had a weak inhibitory effect. In addition, the dissolution of three active ingredients was significantly reduced in Simplified Qingluo Tongbi decoction. The results provided an experimental basis for clinical ‘Diversity Restriction’ detoxicity mechanism of TW.

[**Key words**] Simplified Qingluo Tongbi decoction; *Tripterygium wilfordii*; *Tripterygium wilfordii* + Notoginseng Radix et Rhizoma; *Tripterygium wilfordii* + Rehmanniae; Yi-Lei-Xiang-Zhi; detoxicity mechanism

清络通痹精简方是国医大师周仲瑛教授多年来治疗类风湿关节炎(RA)的经验方,由雷公藤、地黄、三七组成。雷公藤是清络通痹精简方的重要组成部分,具有祛风除湿、消肿止痛、通经活络的功效。其在临床上治疗风湿免疫病方面的药效作用是人们不可否认的,但其治疗剂量和毒性剂量相近,对多器官有着急性中毒损害,限制了其在临床上的应用。近些年,雷公藤的毒副作用越来越受到人们的关注,为了增大雷公藤在临床上使用范围,减毒增效研究至关重要。目前主要是通过原药材炮制加工、复方配伍、改变剂型、结构修饰和现代生物技术手段等来降低雷公藤毒性。多年的临床观察发现其在该复方配伍使用之中并不表现毒性作用。国医大师周仲瑛教授认为,在清络通痹精简方中,雷公藤与滋阴清热的地黄、凉血化瘀的三七配伍,雷公藤通过与具有不同功效的药物配伍,可制约其毒烈偏颇之性,提出中药复方配伍“异类相制”配伍减毒的理论^[1-2],并提出“异类相制”配伍减毒的主要方式有性味相制、异效相制和扶正制毒 3 个方面。

已有的研究表明,雷公藤的主要毒性/活性成分为雷公藤甲素、雷公藤红素、雷公藤内酯甲等^[3-7]。本实验基于“异类相制”理论,以雷公藤为研究对象,通过测定清络通痹精简方、单味雷公藤、雷公藤配伍三七、雷公藤配伍地黄组合中^[8-11],雷公藤 3 种毒性/活性成分雷公藤甲素、雷公藤红素、雷公藤内酯甲的溶出含量^[12-15],以化学基础分析来验证“异类相制”配伍减毒理论,为有毒中药雷公藤的临床安全合理应用和新药研究提供可靠的实验依据,有

着极为重要的理论意义和应用价值。

1 材料

Triple Quad[®] 4500 型液相色谱-串联质谱仪(美国 AB Sciex 公司, Simplicity 型含三重四级杆线性离子阱质量分析仪, ESI 离子源和 Analyst Software 1.5.2 色谱工作站), LC-30A 型超高效液相色谱仪(日本 Shimadzu 公司, 含 SIL-30AC 恒温自动进样器, CTO-30A 柱温箱, LC-30AD 双元泵系统, DGU-20A5 在线脱气机), MS105 Semi-Micro 型电子天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司), RE2000 型旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂), KH-500V 型台式超声清洗器(昆山禾创超声仪器有限公司), Simplicity 型超纯水机(美国 Millipore 公司), Multifuge X1R 型冷冻离心机(美国 Thermo 公司)。

中性氧化铝(100~200 目, 批号 20120305, 上海陆都化学试剂厂), 乙酸乙酯(分析纯, 南京化学试剂公司), 甲醇(色谱纯, 江苏汉邦科技), 乙腈(色谱纯, 德国 Merck); 对照品非诺贝特(纯度 98%, 批号 100733-200401, 中国食品药品检定研究院), 雷公藤甲素(纯度 98%, 批号 111567-201404, 中国食品药品检定研究院), 雷公藤内酯甲(纯度 98%, 批号 111597-200505, 中国食品药品检定研究院), 雷公藤红素(纯度 98%, 批号 ZL150520, 南京泽朗医药科技有限公司)。

雷公藤药材, 产地四川西昌, 批号 121220; 三七、地黄药材均购自安徽亳州中药饮片厂, 批号 121208, 130801, 经南京中医药大学吴启南教授鉴定, 均符合 2015 年版《中国药典》一部中相关规定。

清络通痹精简方组、单味雷公藤组、雷公藤配伍三七组、雷公藤配伍地黄组的提取按照已有文献提取工艺及本课题组前期优化制备工艺进行^[16-17]：取雷公藤药材 100 g 粉碎，过二号筛，加适量水浸泡 3 h，105 ℃ 水回流提取，第 1 次加 11 倍量(1 100 mL)水，煎煮 1.5 h，第 2 次加 7 倍量水(700 mL)，煎煮 1.0 h，纱布过滤后，合并滤液，减压浓缩至 500 mL，即得供试品储备液，放 4 ℃ 冰箱保存，备用。其他各配伍组方中，雷公藤生药量相同，均为 100 g，其余药味按处方比例投料。

2 方法与结果

2.1 雷公藤及配伍组方提取物中雷公藤甲素、雷公藤红素、雷公藤内酯甲的含量测定

2.1.1 色谱条件 Agilent ZORBAX C₁₈ 色谱柱(2.1 mm × 150 mm, 3.5 μm)，流动相 A 为乙腈，B 为 0.1% 甲酸水，梯度洗脱(0 ~ 1 min, 50% A; 1 ~ 5 min, 50% ~ 80% A; 5 ~ 7 min, 80% A; 7 ~ 15 min, 80% ~ 98% A; 15 ~ 15.5 min, 98% A; 15.5 ~ 16 min, 98% ~ 50% A; 20.5 min, 50% A)，柱温 30 ℃，样品室温度 4 ℃，流速 0.2 mL·min⁻¹，进样量 2 μL。

2.1.2 质谱条件 采用喷雾离子源(ESI)，正离子方式检测，离子源温度(TEM)500 ℃，离子喷射电压(IS)为 5 000 V，源内气体 1(GS1, N₂)，压力 275 kPa，源内气体 2(GS2, N₂)压力 379 kPa，气帘气体(N₂)，压力 103 kPa。扫描方式为多重反应监测(MRM)，检测成分的离子对(*m/z*)：雷公藤甲素(361.1/145.1)，雷公藤红素(451.2/201.1)，雷公藤内酯甲(455.3/409.2)，解簇电压(DP)分别为 120, 80, 48 V；碰撞能量(CE)分别为 37, 34, 25 eV；碰撞气(CAD, N₂)压力为 27 kPa；Q1 和 Q3 分辨率均为 Unit。

2.1.3 对照品溶液制备 分别精密称取雷公藤甲素、雷公藤红素和雷公藤内酯甲对照品 6.0, 1.2, 3.0 mg，置于 50 mL 量瓶中，加甲醇超声溶解，以甲醇稀释至刻度，即得混合对照品溶液。依次稀释配制，得雷公藤甲素质量浓度为 15 000, 6 000, 3 000, 1 500, 750, 375, 187.5, 93.75 μg·L⁻¹，雷公藤红素质量浓度为 3 000, 1 200, 600, 300, 150, 75, 37.5, 18.75 μg·L⁻¹，雷公藤内酯甲质量浓度为 7 500, 3 000, 1 500, 750, 375, 187.5, 93.75, 46.86 μg·L⁻¹ 的混合对照品溶液。

2.1.4 供试品溶液制备 精密量取雷公藤组供试品储备液 10.0 mL 于分液漏斗中，加入 6 倍体积的乙酸乙酯萃取 2 次，每次缓慢振摇 30 min，合并上层

萃取液并在旋转蒸发仪上减压浓缩至少量，加适量中性氧化铝拌样蒸干后，上样至预先装有 10.0 g 中性氧化铝的玻璃色谱柱中，以乙酸乙酯 100.0 mL 进行洗脱，收集全部的洗脱液，减压回收溶剂，样品残渣用乙腈 1.0 mL 溶解定容，用 0.22 μm 的微孔滤膜滤过，续滤液作为供试样品，根据上述色谱条件，测定。

清络通痹精简方组、雷公藤配伍三七组、雷公藤配伍地黄组按照雷公藤单味药提取物的制备处理方法制得相应的供试品溶液，按照相同的色谱条件进行测定。

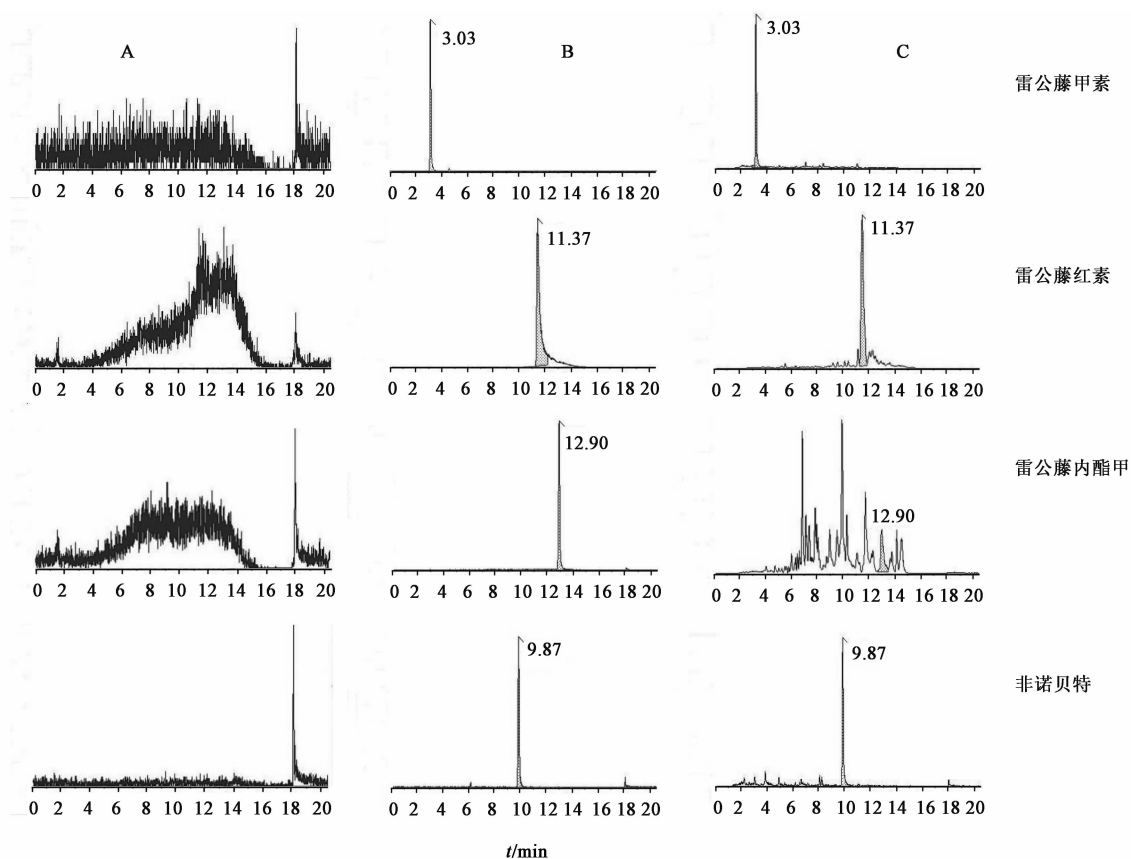
2.2 方法学考察

2.2.1 专属性考察 按本实验采用的样品处理方法和色谱条件操作，清络通痹精简方组、单味雷公藤组、雷公藤配伍三七组、雷公藤配伍地黄组中其他成分对雷公藤甲素、雷公藤红素、雷公藤内酯甲、非诺贝特的检测没有干扰，达到基线分离，峰形良好，保留时间分别为 3.03, 11.37, 12.90, 9.87 min。各组方提取物样品的色谱图见图 1。

2.2.2 标准曲线的制备 精密吸取混合对照品溶液，进样 2 μL。按 2.1.1 项下色谱条件和 2.1.2 项下质谱条件测定峰面积，并以质量浓度(μg·L⁻¹)为横坐标，以峰面积积分为纵坐标进行回归，得线性回归方程，雷公藤甲素 $Y = 623.38X + 10\,459$ ($r = 0.999\,4$)，线性范围 100 ~ 3 000 μg·L⁻¹，雷公藤红素 $Y = 8\,291.8X + 110\,018$ ($r = 0.999\,1$)，线性范围 20 ~ 600 μg·L⁻¹，雷公藤内酯甲 $Y = 319.46X + 9\,043.4$ ($r = 0.999\,6$)，线性范围 50 ~ 1 000 μg·L⁻¹。结果表明，雷公藤 3 种有效成分在相应的浓度范围内线性关系良好。

2.2.3 精密度试验 用甲醇将对照品溶液稀释成高、中、低浓度的混合对照品溶液，分别于 1 d 内重复进样 6 次，按 2.1.1 和 2.1.2 项下色谱、质谱条件进行分析测定。结果表明，雷公藤甲素高、中、低浓度 RSD 分别为 3.3%、3.8%、3.0%，雷公藤红素高、中、低浓度 RSD 分别为 2.0%、3.6%、5.4%，雷公藤内酯甲高、中、低浓度 RSD 分别为 3.8%、4.4%、3.7%，表明该方法精密度良好。

2.2.4 稳定性试验 将同一雷公藤单味药供试品溶液在室温下放置，分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 进样测定，记录雷公藤甲素、雷公藤红素、雷公藤内酯甲的峰面积，以峰面积计算，结果 RSD 1.2%、3.2%、2.0%，表明供试品溶液中雷公藤甲素、雷公藤红素、雷公藤内酯甲 3 种有效成分在 24 h 内稳定



A. 空白溶剂峰; B. 混合对照品; C. 雷公藤水提取溶液

图 1 雷公藤中 3 种成分与非诺贝特 LC-MS/MS

Fig. 1 Representative LC-MS/MS chromatograms for tripterygium and fenofibrate

性良好。

2.2.5 重复性试验 取单味雷公藤水提液,按照 2.1.4 项下方法制备 6 份供试品溶液,按 2.1.1 和 2.1.2 项下条件测定,通过峰面积计算各有效成分的含量,结果显示样品中雷公藤甲素、雷公藤红素、雷公藤内酯甲质量分数的分别为 19.08, 262.94, 163.08 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。RSD 分别为 2.3%, 1.7%, 1.8%, 表明该方法的重复性良好。

2.2.6 加样回收率试验 精密量取已知含量的雷公藤组供试品储备液 5.0 mL 共 6 份,分别准确加入与样品中 3 种有效成分质量相当的对照品,混匀,按照 2.1.4 项下方法处理,按 2.1.1 和 2.1.2 项下条件测定 3 种有效成分的含量,根据标准曲线得到雷公藤甲素、雷公藤红素、雷公藤内酯甲的加样回收率,结果见表 1。

2.3 样品测定 各组方按照 2.1.4 项下方法制备供试品溶液,按照 2.2 项下的色谱条件进样测定,带入线性回归方程分别计算各配伍组中雷公藤甲素、雷公藤红素、雷公藤内酯甲的浓度并计算出相应的含量,结果见表 2。

3 讨论

目前对于雷公藤药材的含量测定多见高效液相色谱法^[18-20],而雷公藤药材中主要药效成分的含量均较低,高效液相色谱检测方法难以同时对多种成分进行定量分析。本文采用具有高度选择性和灵敏度的三重四级杆质谱(LC-MS/MS)同时对 3 种有效成分——雷公藤甲素、雷公藤红素和雷公藤内酯甲进行检测。通过优化待测分析物的碰撞电压使其能够达到最好的响应,并且质谱采用特定离子对的扫描模式,样品中其他成分不会对待测成分产生干扰,克服了高效液相色谱分离度差的问题,并且可实现短时间内快速分离检测。

实验结果表明,雷公藤药材水提液中雷公藤甲素的含量最高,雷公藤内酯甲次之,雷公藤红素的含量最低。而当雷公藤药材用量相同的情况下,雷公藤中 3 种有效成分在不同配伍环境下的溶出趋势一致,溶出顺序为单味雷公藤组 > 雷公藤配伍地黄组 > 雷公藤配伍三七组 > 清络通痹精简方组。此变化趋势说明在配伍组合中三七对雷公藤 3 种有效成分的溶出有显著地抑制作用,地黄的抑制作用较弱,

表 1 雷公藤中 3 种指标性成分的加样回收率试验

Table 1 Recovery test of three metrics component

成分	样品中量 /μg	加入量 /μg	测得量 /μg	回收率 /%	平均值 /%	RSD /%
雷公藤甲素	19.08	19.07	38.43	101.47	98.40	3.4
	19.08	19.09	38.12	99.74		
	19.08	19.02	38.51	102.16		
	19.08	18.99	36.84	93.52		
	19.08	19.08	37.48	96.44		
	19.08	19.05	37.57	97.06		
雷公藤红素	262.94	262.34	517.64	97.09	98.29	3.9
	262.94	262.45	534.26	103.38		
	262.94	262.85	532.04	102.38		
	262.94	262.98	508.77	93.48		
	262.94	262.37	520.01	97.98		
	262.94	262.62	513.64	95.46		
雷公藤内酯甲	163.08	163.02	320.15	96.35	97.21	4.1
	163.08	163.26	329.96	102.22		
	163.08	163.23	322.85	97.88		
	163.08	163.14	314.98	93.11		
	163.08	162.78	313.92	92.66		
	163.08	162.56	327.32	101.03		

表 2 各组方中雷公藤甲素、雷公藤内酯甲、雷公藤红素 3 种成分的含量

Table 2 Determination of triptolide, wilforlide and tripterine in different combinations

组方	雷公藤甲素	雷公藤红素	雷公藤内酯甲
雷公藤	82.10	25.40	66.50
雷公藤配伍三七	62.00	5.50	48.10
雷公藤配伍地黄	80.10	2.70	47.00
清络通痹精简方	64.40	1.60	38.70

注:雷公藤质量均为 100 g。

而清络通痹精简方中雷公藤 3 种有效成分的溶出明显降低。初步推测三七减少雷公藤 3 种有效成分溶出的原因可能是,因其水提液偏酸性而不利于雷公藤 3 种有效成分的溶出。地黄减少雷公藤 3 种有效成分的溶出较三七稍弱,可能是其提取液酸性较三七提取液稍小。具体的抑制作用机制本课题组后续会做进一步试验研究。

综合上述结果,笔者从化学成分的角度上确定了三七、地黄在清络通痹精简方中起到降低雷公藤毒性的作用,从而也说明临床上“异类相制”配伍减毒应用的合理性。

【参考文献】

[1] 郭梦如,何东仪. 雷公藤治疗类风湿关节炎的研究进展[J]. 风湿病与关节炎,2013,2(2):58-62.
[2] 谢彤,周学平,林丽丽,等. 基于“异类相制”的雷公

藤复方配伍减毒代谢组学研究[J]. 中国中药杂志,2016,41(6):1124-1129.

[3] 马哲,梁茂新,张颖. 中药雷公藤化学成分及药理作用研究进展[J]. 亚太传统医药,2011,7(3):157-159.
[4] 郭艳红,谭昱. 雷公藤的毒性及其研究概况[J]. 中药材,2007,30(1):112-117.
[5] 黄之镨,陈普,马伟光. 雷公藤的毒性作用及减毒研究进展[J]. 中国民间民族医药,2013,22(12):20-21.
[6] 马伟光,张滔,张超,等. 有毒药物雷公藤的研究及展望[J]. 中华中医药杂志,2006,21(2):117-120.
[7] 吴立军. 天然药物化学[M]. 5 版. 北京:人民卫生出版社,2009:239-243.
[8] 施栋磊,朱华旭,潘林梅,等. 中药配伍雷公藤减毒作用的研究进展[J]. 中国药事,2009,23(11):1136-1140.
[9] 高丽,聂中标,周然. 雷公藤配伍中药减毒的实验研究进展[J]. 世界中西医结合杂志,2010,5(6):537-539.
[10] 李春庆,孙伟,邵家德,等. 雷公藤减毒研究评述[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(10):263-264.
[11] 饶毅,魏惠珍,陈银芳,等. 中药配伍应用于雷公藤减毒增效的研究进展[J]. 中国中药杂志,2008,33(14):1658-1661.
[12] 杜倩,汤道权,陈永刚,等. 配伍对生化汤中阿魏酸溶出的影响[J]. 时珍国医国药,2010,21(3):617-619.
[13] 闰广利,王喜军,吕海涛. 茵陈蒿汤不同配伍情况下主要有效成分的溶出率研究[J]. 中医药信息,2008,25(3):29-31.
[14] 彭金咏,栾连军,程翼宇. 精制血府逐瘀方不同配伍情况下芍药苷的溶出量[J]. 中国中药杂志,2003,28(6):516-518.
[15] 陈建真,吕圭源,罗小敏,等. 黄芩汤不同配伍对芍药苷溶出率的影响[J]. 中医药学报,2008,36(2):26-28.
[16] 施栋磊. 清络通痹复方配伍对有毒中药雷公藤的减毒作用机制研究[D]. 南京:南京中医药大学,2010.
[17] 刘陶世,郭立玮,周学平,等. 陶瓷膜微滤与树脂吸附等 6 种技术精制清络通痹水提液的对比研究[J]. 中成药,2004,6(4):266-269.
[18] 刘蒙竹,张新龙,朱华旭,等. 清络通痹方中雷公藤配伍减毒的化学基础研究[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,20(7):107-112.
[19] 马鑫斌,巴文强,王珂,等. 雷公藤药材中雷公藤甲素及总二萜内酯的含量测定[J]. 中国中医药现代远程教育,2014,12(6):153-155.
[20] 张贺,江莹,孟楣,等. HPLC 法测定不同产地雷公藤药材中雷公藤内酯甲的含量[J]. 中国药房,2014,25(31):2916-2918.

【责任编辑 顾雪竹】