

· 药物代谢 ·

## 甘草对雷公藤甲素与雷公藤内酯酮体内代谢成分的影响

刘建群\*, 刘一文, 王雪梅, 舒积成, 张锐

(江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004)

**[摘要]** **目的:**研究甘草对雷公藤甲素与雷公藤内酯酮体内代谢成分的影响。**方法:**采用 LC-MS/MS 研究雷公藤甲素和雷公藤内酯酮单独给药及与甘草联合给药后在大鼠血浆中相应代谢成分, 比较单独给药及联合给药后代谢产物种类和生成量的差异。**结果:**在雷公藤甲素单独给药组及其与甘草联合给药组的大鼠血浆中, 均发现 4 个代谢产物:  $m/z$  ( $[M+H]^+$ ) 359, 359, 375, 377, 其中羟基氧化代谢产物 ( $m/z$  359) 生成量较大。在雷公藤内酯酮单独给药组及其与甘草联合给药组的大鼠血浆中, 均发现代谢产物 3 个:  $m/z$  ( $[M+H]^+$ ) 375, 397, 413, 其中羟基化代谢产物 ( $m/z$  375) 生成量较大, 在联合给药组的大鼠血浆中还发现 1 个单独给药组中没有的代谢产物  $m/z$  ( $[M+H]^+$ ) 413。联合给药组比单独给药组的各代谢产物生成量大。**结论:**雷公藤甲素和雷公藤内酯酮单独给药及其与甘草联合给药后, 大部分代谢产物相同, 其中氧化代谢产物为主要代谢产物。甘草可加速雷公藤甲素和雷公藤内酯酮的体内代谢, 为阐明甘草对雷公藤的减毒增效作用机制提供参考。

**[关键词]** 甘草; 雷公藤甲素; 雷公藤内酯酮; 代谢产物; LC-MS/MS

**[中图分类号]** R283.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)13-0169-05

**[doi]** 10.11653/syfy2013130169

## Effect of *Glycyrrhiza uralensis* on *in vivo* Metabolites of Triptolide and Triptonide

LIU Jian-qun\*, LIU Yi-wen, WANG Xue-mei, SHU Ji-cheng, ZHANG Rui

(Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine (TCM), Ministry of Education, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate effect of *Glycyrrhiza uralensis* on *in vivo* metabolites of triptolide and triptonide, disclose attenuation mechanism of *G. uralensis* on *Tripterygium wilfordii*. **Method:** SD rats were divided into single and combined administration groups. Combined groups were injected with triptolide or triptonide after orally treated with extracts of *G. uralensis*, while these single groups was injected only with triptolide or triptonide. Metabolites of triptolide or triptonide in rat plasma were identified and determined by LC-MS/MS, and compared difference of metabolites under two administration models. **Result:** Four metabolites ( $[M+H]^+$ ,  $m/z$  359, 359, 375, 377) of triptolide and three metabolites ( $[M+H]^+$ ,  $m/z$  375, 397, 413) of triptonide in rat plasma were found under two administration models, respectively; Oxydation metabolites ( $m/z$  359 of triptolide,  $m/z$  375 of triptonide) were the major metabolites. Another metabolite ( $[M+H]^+$ ,  $m/z$  413) of triptonide in rat plasma were found only in these combined administration groups. Difference of the amount of metabolites under two administration models was significant, combined administration model was the larger. **Conclusion:** Under two administration models, most of metabolites of triptolide and triptonide in rat plasma were the same, while major metabolites was oxidative metabolites. *G. uralensis* could accelerate *in vivo* metabolism of triptolide and triptonide, it

**[收稿日期]** 20130121(010)

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81160541);江西省卫生厅中医药科研项目(2011A143)

**[通讯作者]** \*刘建群,教授,博士,中药活性成分及质量评价研究, Tel:0791-87118674, E-mail:liu5308@sina.com

could provide a reference for clarifying attenuation synergistic mechanism of *T. wilfordii*.

[Key words] *Glycyrrhiza uralensis*; triptolide; triptonide; metabolites; LC-MS/MS

雷公藤甲素和雷公藤内酯酮为环氧二萜内酯化合物,是雷公藤的主要活性成分,具有显著的免疫抑制、抗炎、抗肿瘤和抗生育等活性;但同时也是其毒性成分,具有肝脏、肾、心脏和生殖系统等多脏器毒性<sup>[1]</sup>。文献报道甘草与雷公藤配伍能显著降低雷公藤的毒性<sup>[2-6]</sup>,但其减毒机制尚不明确。甘草具有肝药酶诱导作用,与其他药物联用后,可能改变药物的代谢行为,从而影响药物毒性<sup>[7]</sup>。目前关于雷公藤甲素和雷公藤内酯酮代谢产物的鉴定研究报道较少<sup>[8]</sup>。前期研究发现,甘草能影响雷公藤甲素和雷公藤内酯酮的代谢行为<sup>[9-10]</sup>。本实验旨在考察甘草对雷公藤甲素与雷公藤内酯酮在血浆中代谢产物的影响,从体内代谢层面探讨甘草对雷公藤的减毒作用机制。

## 1 材料

Agilent 6410 型质谱联用仪(美国 Agilent 公司),XW80A 型漩涡混合器(上海医科大学仪器厂),TL-5.0W 型台式离心机(上海市离心机机械研究所),HGC-24A 型氮气吹干仪(天津市恒奥科技发展有限公司)。雷公藤甲素、雷公藤内酯酮对照品(南京泽朗医药科技有限公司,批号分别为 ZL110619, ZL111119),甘草(江西药都樟树中药饮片有限公司,产地内蒙,经本校刘建群教授鉴定为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fish. 的干燥根及根茎),聚氧乙烯氯化蓖麻油 40(RH40,上海协泰化工有限公司),乙腈、甲酸铵为色谱纯,其余试剂均为分析纯。

SD 大鼠,体重 200 ~ 220 g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,许可证号 SCXK(湘)2009-0004。

## 2 方法与结果

### 2.1 溶液配制

**2.1.1 甘草溶液的制备** 精密称取甘草药材 800 g,切片,加 4 倍量水煎煮 2 次,每次 1 h,过滤,合并滤液,减压蒸干,得甘草浸膏约 80 g,用适量水配成甘草溶液。

**2.1.2 雷公藤甲素注射液的制备** 精密称取雷公藤甲素对照品 2.0 mg,置 10 mL 量瓶中,用 20% 丙二醇生理盐水溶液溶解并稀释至刻度,即得。

**2.1.3 雷公藤内酯酮注射液的制备** 精密称取雷公藤内酯酮对照品 3.0 mg,置 10 mL 量瓶中,加无水乙醇 1 mL,超声溶解,加 RH40 1 mL,混匀,用生

理盐水定容至刻度,即得。

**2.1.4 雷公藤甲素组空白溶剂** 20% 丙二醇生理盐水溶液。

**2.1.5 雷公藤内酯酮组空白溶剂** 10% 乙醇 + 10% RH40 生理盐水溶液。

### 2.2 动物分组与给药

**2.2.1 雷公藤甲素** 取健康 SD 大鼠 24 只,随机等分成 4 组(空白组、甘草空白组、雷公藤甲素单独给药组、雷公藤甲素与甘草联合给药组)。空白组注射空白溶剂,甘草空白组灌胃给予甘草溶液(剂量按生药量 30 g·kg<sup>-1</sup>计算)并注射空白溶剂,单独给药组尾静脉注射雷公藤甲素溶液(给药量 0.7 mg·kg<sup>-1</sup>),联合给药组于尾静脉注射雷公藤甲素 24 h 前和 2 h 前分别灌胃给予甘草溶液,然后尾静脉注射雷公藤甲素溶液(给药量 0.7 mg·kg<sup>-1</sup>)。给药后按时间点(1,2,3 h)取血。

**2.2.2 雷公藤内酯酮** 分组及给药方法同 2.2.1 项,雷公藤内酯酮给药剂量 1.4 mg·kg<sup>-1</sup>。

**2.3 血浆样品的处理** 准确吸取大鼠血浆样品 200 μL 置 1.5 mL 离心管中,加入乙酸乙酯 1.2 mL 于涡旋液体混合器上震荡 2 min,离心 10 min(3 500 r·min<sup>-1</sup>),吸取上清液 1 mL 置离心管中,于 40 °C 氮气吹干。用 200 μL 流动相定容,超声溶解,于 16 000 r·min<sup>-1</sup> 高速离心 10 min,吸取上清液 10 μL 进样,进行 HPLC-MS/MS 分析。

### 2.4 HPLC-MS/MS 测定代谢产物

#### 2.4.1 色谱条件

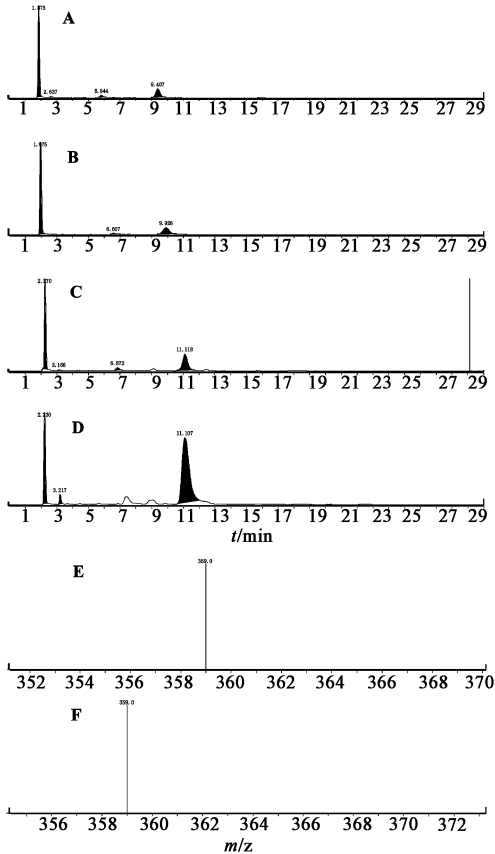
**2.4.1.1 雷公藤甲素** Phenomenex Luna C<sub>18</sub> 色谱柱(2.00 mm × 150 mm, 3 μm),流动相乙腈-10 mmol·L<sup>-1</sup> 甲酸铵溶液(20:80),流速 0.3 mL·min<sup>-1</sup>,柱温 30 °C。

**2.4.1.2 雷公藤内酯酮** 流动相乙腈-10 mmol·L<sup>-1</sup> 甲酸铵溶液(45:55),其他条件同 2.4.1.1 项下。

**2.4.2 质谱条件** 采用电喷雾离子源(ESI),正离子模式,喷射电压 3 500 V,离子源温度 350 °C,干燥气(N<sub>2</sub>)的流速 10 L·min<sup>-1</sup>,扫描方式为选择离子监测(SIM)。雷公藤甲素组检测离子为 *m/z* 359,375,377;雷公藤内酯酮组检测离子为 *m/z* 375,397,413。

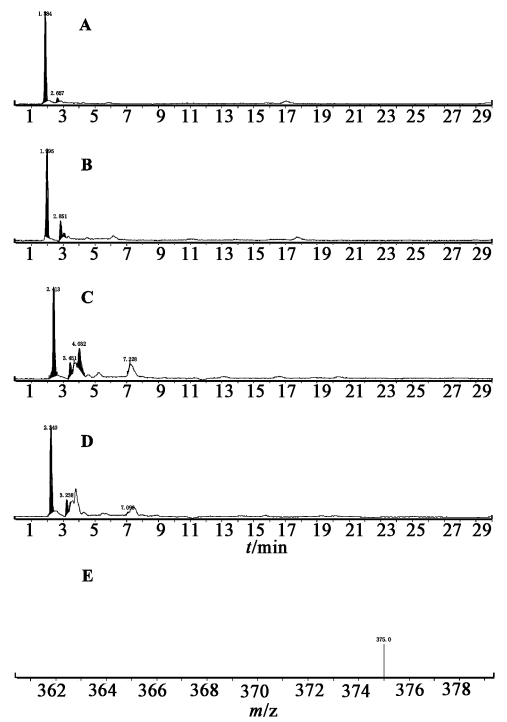
**2.5 雷公藤甲素代谢产物的测定** 从雷公藤甲素单独给药组及其与甘草联合给药组血浆中检出了 4

个代谢产物( $m/z$  359, 359, 375, 377),结果见图 1~4。由图 1 可知,单独给药组及其与甘草联合给药组血浆中均出现保留时间约 3.2, 11.1 min 共 2 个色谱峰( $m/z$  359),而空白血浆和甘草空白血浆中均未出现,根据可能代谢途径及相对分子质量,推测这 2 个代谢产物可能为雷公藤甲素羟基氧化产物。由图 2 可知,雷公藤甲素单独给药组及其与甘草联合给药组血浆中均出现保留时间约 7.2 min 色谱峰( $m/z$  375),而空白血浆和甘草空白血浆中均未出现,根据可能代谢途径及相对分子质量,推测该代谢产物可能为雷公藤甲素的甲基化产物。由图 3 可知,雷公藤甲素单独给药组及其与甘草联合给药组血浆中均出现保留时间约 10.8 min 色谱峰( $m/z$  377),而空白血浆和甘草空白血浆中均未出现,根据可能代谢途径及相对分子质量,推测该代谢产物可能为雷公藤甲素的羟基化产物。由图 4 可知,注射给药 1,2,3 h 后,联合给药组血浆中上述 4 个代谢产物生成量(以色谱峰面积表示)均比单独给药



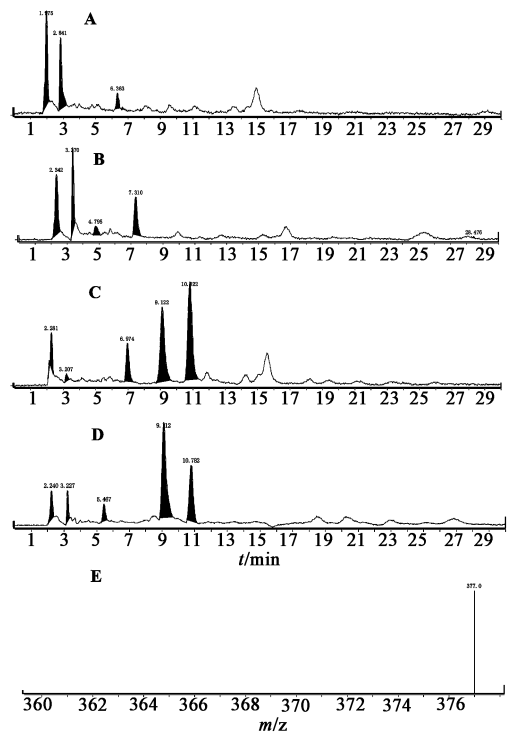
A. 空白血浆; B. 甘草空白血浆; C. 单独给药组血浆;  
D. 联合给药组血浆; E.  $m/z$  359 ( $t_R = 3.2$  min) 选择离子监测;  
F.  $m/z$  359 ( $t_R = 11.1$  min) 选择离子监测

图 1 SIM 模式下雷公藤甲素代谢产物 ( $m/z$  359) 的 HPLC 和 MS



A. 空白血浆; B. 甘草空白血浆; C. 单独给药组血浆;  
D. 联合给药组血浆; E.  $m/z$  375 选择离子监测

图 2 SIM 模式下雷公藤甲素代谢产物 ( $m/z$  375) 的 HPLC 和 MS

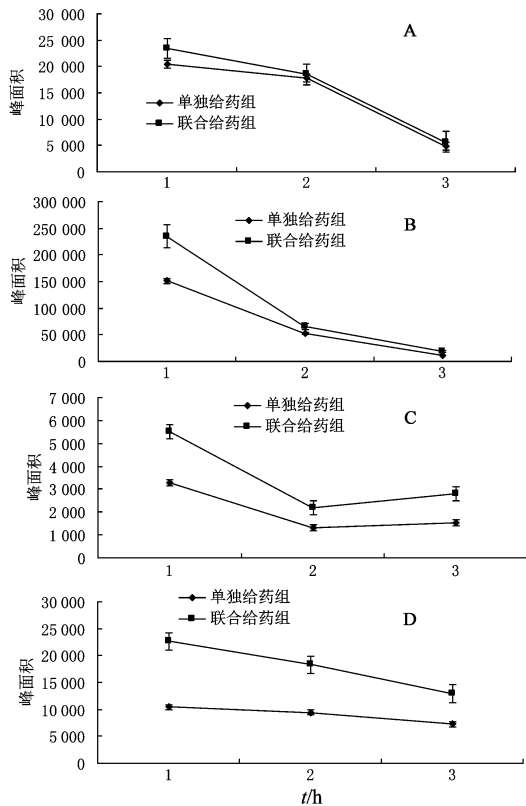


A. 空白血浆; B. 甘草空白血浆; C. 单独给药组血浆;  
D. 联合给药组血浆; E.  $m/z$  377 选择离子监测

图 3 SIM 模式下雷公藤甲素代谢产物 ( $m/z$  377) 的 HPLC 和 MS

组大;其中羟基氧化代谢产物( $m/z$  359,保留时间约 11.1 min)生成量较大,为主要代谢产物。

## 2.6 雷公藤内酯酮代谢产物测定 从雷公藤内酯

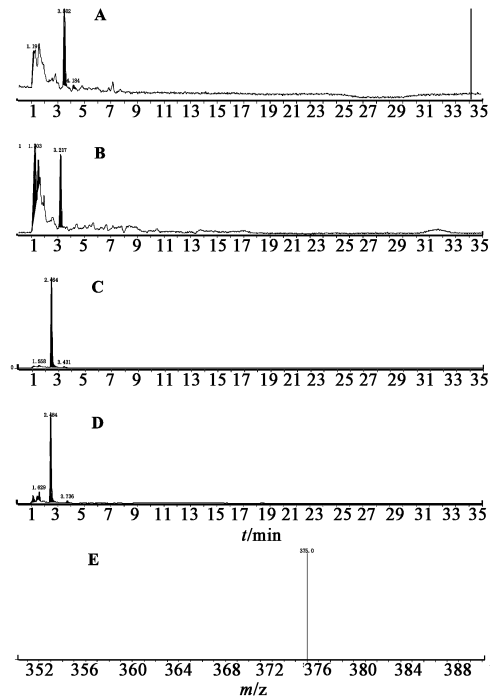


A.  $m/z$  359 ( $t_R = 3.2$  min); B.  $m/z$  359 ( $t_R = 11.1$  min);  
C.  $m/z$  375; D.  $m/z$  377

图 4 单独和联合给药组雷公藤甲素代谢产物生成量对比

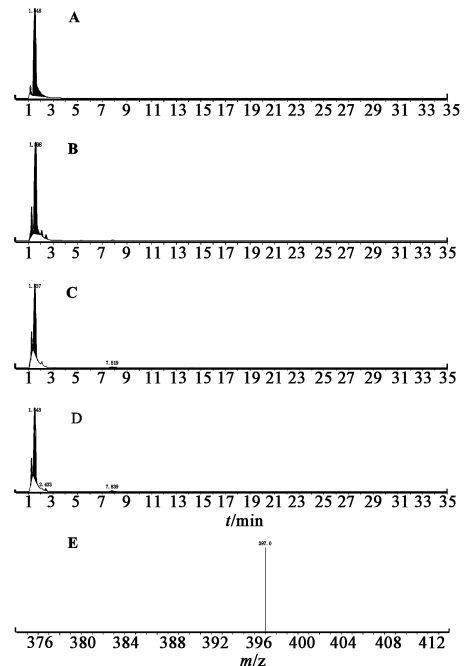
酮单独给药及其与联合给药组血浆中均检出了 3 个代谢产物 ( $m/z$  375, 397, 413,  $t_R = 8.4$  min), 联合给药组血浆中还发现了 1 个单独给药组中未出现的代谢产物 ( $m/z$  413,  $t_R = 10$  min)。由图 5 可知, 单独给药组和联合给药组血浆中均出现保留时间约 2.4 min 色谱峰 ( $m/z$  375), 而空白血浆和甘草空白血浆中均未出现, 根据可能代谢途径及相对分子质量, 推测该代谢产物可能为雷公藤内酯酮羟基化产物。由图 6 可知, 单独给药组和联合给药组血浆中均出现保留时间 7.8 min 色谱峰 ( $m/z$  397), 而空白血浆和甘草空白血浆中均未出现, 根据可能代谢途径及相对分子质量, 推测该代谢产物可能为雷公藤内酯酮两个环氧开环成二醇、酮羰基还原成醇的产物。由图 7 可知, 单独给药组和联合给药组血浆中均出现保留时间约 8.4 min 色谱峰 ( $m/z$  413), 而空白血浆和甘草空白血浆中均未出现, 根据可能代谢途径及相对分子质量, 推测该代谢产物可能为雷公藤内酯酮三个环氧开环成二醇的产物。由图 8 可知, 注射给药 1, 2, 3 h 后, 联合给药组血浆中上述 3 个代谢产物生成量 (以色谱峰面积表示) 均比单独给药组大; 其中羟基化代谢产物 ( $m/z$  375) 生成量较大, 为

雷公藤内酯酮的主要代谢产物。



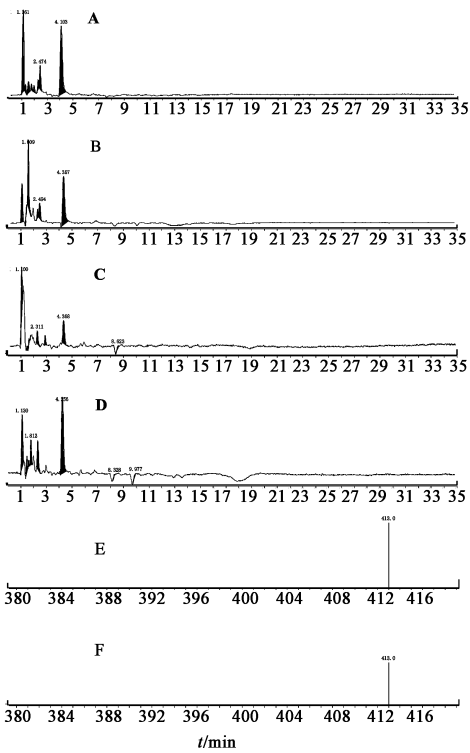
A. 空白血浆; B. 甘草空白血浆; C. 单独给药组血浆;  
D. 联合给药组血浆; E.  $m/z$  375 选择离子监测

图 5 SIM 模式下雷公藤内酯酮代谢产物 ( $m/z$  375) 的 HPLC 和 MS



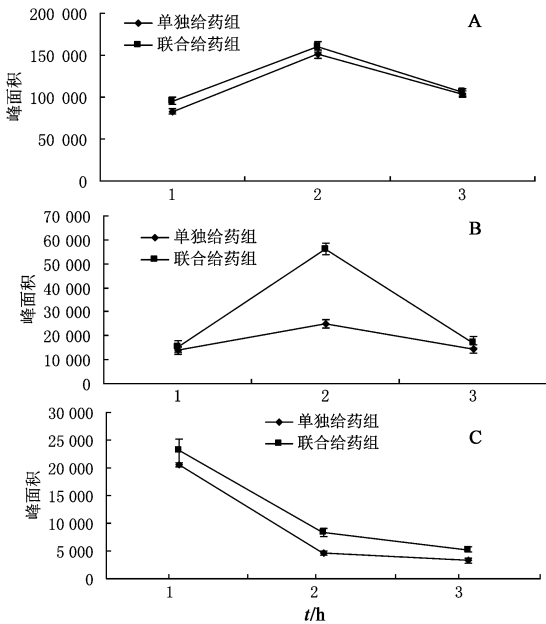
A. 空白血浆; B. 甘草空白血浆; C. 单独给药组血浆;  
D. 联合给药组血浆; E.  $m/z$  397 选择离子监测

图 6 SIM 模式下雷公藤内酯酮代谢产物 ( $m/z$  397) 的 HPLC 和 MS



A. 空白血浆; B. 甘草空白血浆; C. 单独给药组血浆;  
D. 联合给药组血浆; E.  $m/z$  413 ( $t_R = 8.4$  min) 选择离子监测;  
F.  $m/z$  413 ( $t_R = 10$  min) 选择离子监测

图7 SIM模式下雷公藤内酯酮代谢产物 ( $m/z$  413)的HPLC和MS



A.  $m/z$  375; B.  $m/z$  397; C.  $m/z$  413 ( $t_R = 8.4$  min)

图8 单独和联合给药组雷公藤内酯酮代谢产物生成量对比

### 3 讨论

采用LC-MS/MS研究在甘草干预下雷公藤甲素和雷公藤内酯酮的部分代谢产物,并对血浆中代谢

产物生成量的变化进行比较。在雷公藤甲素单独给药组与与甘草联合给药组的大鼠血浆中,均发现代谢产物4个,其中羟基氧化代谢产物( $m/z$  359)生成量较大。在雷公藤内酯酮单独给药组及与甘草联合给药组的大鼠血浆中,均发现代谢产物3个,其中羟基化代谢产物( $m/z$  375)生成量较大,在联合给药组的大鼠血浆中还发现1个单独给药组中没有的代谢产物( $m/z$  413)。根据相对分子质量初步判断雷公藤甲素代谢产物( $m/z$  375)和雷公藤内酯酮代谢产物( $m/z$  413)与已报道的代谢物不同,有待于进一步研究。因MS提供的结构信息有限,各代谢产物的具体结构还有待确定。雷公藤甲素和内酯酮单独给药和与甘草联合给药后其大部分代谢产物相同,其中氧化代谢产物为主要代谢产物,说明氧化为其主要代谢过程。联合给药组比单独给药组的各代谢产物生成量要大,说明甘草可加速雷公藤甲素和雷公藤内酯酮的体内代谢,这可能是甘草对雷公藤的减毒作用机制之一。

### [参考文献]

[1] 虞海燕,秦万章.雷公藤活性单体的筛选及毒性研究[J].浙江中医药大学学报,2000,24(2):70.  
[2] 梅之南,杨祥良,徐辉碧.雷公藤内酯醇的药理研究[J].中国医院药学杂志,2003,23(9):557.  
[3] 黄玲.雷公藤药理作用研究进展[J].江西中医药,2000,31(2):45.  
[4] 李玉洁,王强状,郑晓俊.雷公藤治疗类风湿性关节炎的机制研究现状[J].中国药师,2004,7(8):639.  
[5] 李涯松,童培建,马红珍.甘草对雷公藤治疗类风湿性关节炎的减毒增效作用[J].中国中西医结合杂志,2006,26(12):1117.  
[6] 杜佳林,崔明昊,苏忠伟,等.雷公藤与甘草配伍对大鼠生化指标的影响[J].实用中医内科杂志,2008,22(5):71.  
[7] 朱建华.中西药物相互作用[M].2版.北京:人民卫生出版社,2006:11.  
[8] 张锐,李青,刘芳,等.甘草对雷公藤二萜内酯体内代谢产物的影响研究[J].江西中医学院学报,2010,22(4):37.  
[9] 刘建群,李青,张锐,等.LC-MS-MS法研究甘草对雷公藤甲素药代动力学及组织分布与排泄的影响[J].药物分析杂志,2010,30(9):1664.  
[10] 张锐,李青,刘芳,等.LC-MS/MS法研究甘草对雷公藤内酯酮药代动力学及组织分布与排泄的影响[J].中国实验方剂学杂志,2010,16(7):151.

[责任编辑 仝燕]