

• 专论 •

化学振荡技术在中药研究中的应用

张孟民

(宝鸡文理学院 陕西省植物化学重点实验室, 陕西 宝鸡 721007)

摘 要: 中药是一个多组分的复杂体系, 质量监控因多方面因素较难实现, 虽已有高效液相色谱等多种分析方法, 但仍不十分理想, 因此, 有不少学者针对中药特性开展了多方面研究, 力求开发一种既简便, 又快捷, 且能反映中药特性的分析方法。探讨采用电化学手段和振荡技术, 获取中药及其制剂的特征振荡指纹图谱, 依据图谱所反映的信息, 确定中药种类及有关成分的量; 通过 15 种草药和六味地黄中成药的振荡图谱, 探讨了建立中药特征振荡图谱的理论, 并进行了反应机制研究; 介绍了中药特征振荡指纹图谱的研究方案及拟解决的关键问题; 讨论了振荡体系对中药振荡图谱的影响, 给出了中药振荡反应振荡系数的研究方法, 基于图谱进行了动力学和反应机制研究。这种方法克服了中药化学成分复杂, 相互干扰严重, 难以确认的弊端, 是一种新的研究手段。

关键词: 化学振荡; 中药; 中药振荡指纹图谱

中图分类号: R282; R282.5

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2006)07-0961-05

Application of chemical oscillation in study on Chinese materia medica

ZHANG Meng-min

(Shaanxi Provincial Key Laboratory of Phytochemistry, Baoji College of Arts and Sciences, Baoji 721007, China)

Key words: chemical oscillation; Chinese materia medica (CMM); CMM's oscillation fingerprint

随着社会进步, 人类对自然认识的加深, 自然宝库中植物药逐渐重新成为对抗疾病的武器。已有资料显示, 从天然药物发现新药是当今国际药学界研究药物的新趋势。最新国际医药市场报告显示, 英、法、美等发达国家的植物药市场自 1987 年以来购买力分别上升了 70%、50% 和 20%。美洲、欧洲、亚洲的中医药市场需求额均为 120 亿美元, 其他地区的市场需求额为 90 亿美元。这表明中医药正在世界范围内得到承认和接受。这为中医药提供了最大的发展机遇。

然而, 中药是一个多组分复杂体系, 作用机制尚未完全清楚。尽管其药效已被人们接受, 但由于它的综合性、复杂性、协同作用等使得中药方剂千变万化, 质量更是难以控制。随着中国加入 WTO, 对中药的研究从提高分离单一有效成分到建立指纹图谱库, 中药正在世界范围内得到重视和认可。但中药质量标准偏低, 成分不清楚, 疗效不稳定等问题一直严重地阻滞着中药标准化与现代化的进程, 确定中药的有效成分及量, 建立中药特征图谱, 进行作用机制研究, 成为中药进入国际市场的关键所在。如何根据

中医药的特点, 建立一整套具有中医药特点又有高科技特征的中药材、中成药现代质量标准是一重大课题。本文探讨采用电化学手段和振荡技术, 获取中药及其制剂的特征振荡图谱, 依据图谱所反映的信息, 确定中药种类及有关成分的量; 通过 15 种草药和六味地黄中成药的振荡图谱, 探讨了建立中药特征振荡图谱的理论, 并进行了反应机制研究; 介绍了中药特征振荡指纹图谱的研究方案及拟解决的关键问题; 讨论了振荡体系对中药振荡图谱的影响, 给出了中药振荡反应振荡系数的研究方法, 基于图谱进行了动力学和反应机制研究。这种方法克服了中药化学成分复杂, 相互干扰严重, 难以确认的弊端, 是一种新的研究手段。

1 中药振荡图谱产生的基础

中药化学信息是由多种化学成分综合构成的。以中药材而言, 经过一个多世纪的植物化学研究和药理药效研究, 人们越来越认识到, 中药的药效不是来自任何一个单个的活性成分, 而是多种活性成分, 甚至是与非活性成分的“协同作用”或“生克作用”的结果, 君臣佐使、协同作用是其主要的特征。因此中

收稿日期: 2005-11-23

基金项目: 陕西省自然科学基金项目(2002B22)

作者简介: 张孟民(1958—), 男, 硕士, 副教授, 主要从事应用化学、植物化学研究。

Tel: (0917)3364294 E-mail: zhangmengmin2004@163.com

药中的化学信息具有一定的模糊性,只有部分化学信息(包括已知的活性成分、已知的非活性成分、一部分未知成分)可表征于指纹图谱中。目前研究较多的是利用高效液相色谱法(HPLC)建立中药的指纹图谱。HPLC 所使用的仪器昂贵,分析样品时柱前处理过程复杂,实验结果及重复性对实验人员要求较高。资料表明,这种指纹图谱难以全面反映中药的信息,甚至不能指明这种成分的来源。如黄连和黄柏都含有小檗碱,如果只用小檗碱来作为鉴别黄连和黄柏的指标就难以将它们区分;再如检测中成药知柏地黄丸时,由于采用黄芩或直接采用提取的小檗碱投料都可检测出小檗碱,但这种方法制得的中成药却不是知柏地黄丸,必须获得黄连、黄柏、黄芩的特征图谱,然后加以对照才能确定其小檗碱来源。显然,HPLC 建立的指纹图谱有其缺陷。因此中药研究需要新思路、新方法。

振荡技术是近年来较为活跃的研究领域,具有选择性高、灵敏度好、设备投资小,对化学组分敏感等特点。它以有机物为振荡底物,在化学振荡器“ BrO_3^- - Mn^{2+} - H^+ -丙酮”体系中,通过调整振荡体系中各种物质的浓度,使其呈现出特征振荡波形。因此,这种振荡波形是振荡体系中所有物质共同作用的结果。如果固定振荡体系中 BrO_3^- 、 Mn^{2+} 、 H^+ 、丙酮的浓度,而只改变有机底物的种类和浓度,所获得的振荡波形无疑就是该物质的特征波形。在对中药和

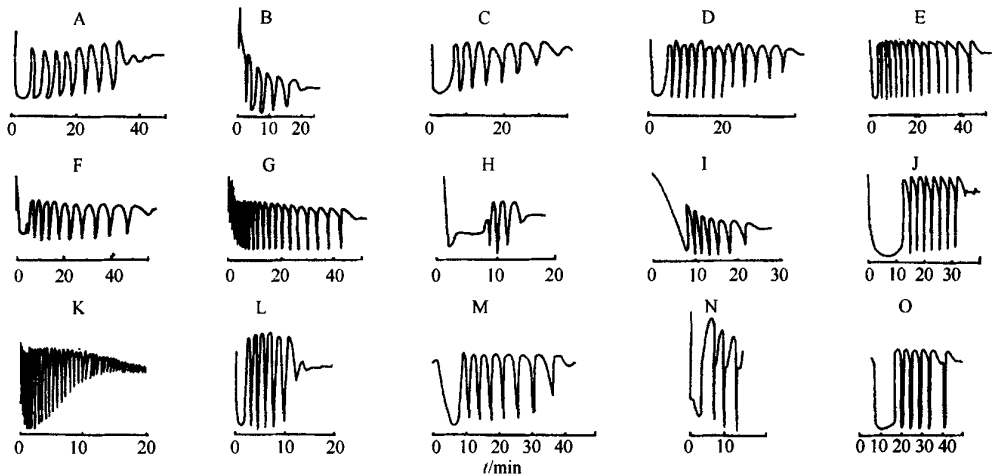
生物体内物质参与的化学振荡反应的长期研究中发现,采用振荡技术可获得中药的化学振荡图谱。利用化学振荡的特点,在不改变 BrO_3^- 、 Mn^{2+} 、 H^+ 、丙酮浓度的前提下,以中药为振荡底物,可获得不同中药的特征振荡波形,称之为该中药的化学振荡特征图谱。目前通过研究已经获得 60 余种中药材和 5 种中成药的化学振荡特征图谱,图 1 给出了 15 种中药材的振荡指纹图谱;图 2 给出了不同厂家生产的六味地黄的振荡指纹图谱。

图 1、2 这些波形千姿百态,表现出不同中药的个性特点,且重现性良好。不同的中药具有形状迥异的振荡特征图谱,品质相同的同种中成药,在同一浓度时的振荡图谱极其相似,这与各单味药的协同作用不谋而合。因此,用此图谱不仅可辨识中药,还可研究中药参与循环的动力学,进而研究其在人体循环中的作用机制以及药效,从而为中药的研究开辟一条新路。

2 中药振荡指纹图谱拟解决的问题及研究方案

在我国中药的应用已有上千年的历史,其在保健、疾病的治疗和预防等方面为人类做出了巨大贡献,但其成分复杂、作用机理不明确、药材生产和中成药生产不规范等问题一直严重地阻碍着中药标准化与现代化进程,成为制约中药走向国际市场的关键所在。

指纹图谱的研究是建立在现代仪器的发明和广



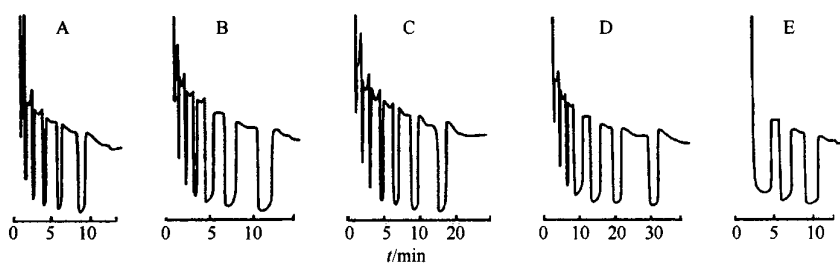
A-党参 B-白术 C-当归 D-黄芪 E-升麻 F-北柴胡 G-甘草 H-沙参 I-太子参 J-女贞

K-陈皮 L-玄参 M-丹参 N-贯叶连翘 O-鹿衔草

A-*Codonopsis pilosula* B-*Atractylodes macrocephala* C-*Angelica sinensis* D-*Astragalus membranaceus* E-*Cimicifuga foetida*
F-*Bupleurum chinense* G-*Glycyrrhiza uralensis* H-*Adenophora stricta* I-*Pseudostellaria heterophylla* J-*Ligustrum lucidum*
K-*Pericarpium Citri Reticulatae* L-*Scrophularia ningpoensis* M-*Salvia miltiorrhiza* N-*Forsythia suspense* O-*Pelvetia siliquosa*

图 1 15 种中草药的振荡指纹图谱

Fig. 1 Oscillating fingerprints of 15 kinds of Chinese herbal medicines



A-兰州 B-湖南 C-河南 D-桂林 E-宝鸡
A-Lanzhou B-Hunan C-Henan D-Guilin E-Baoji

图 2 不同厂家六味地黄丸的振荡指纹图谱

Fig. 2 Oscillating fingerprints of Liuwei Dihuang Pill from various manufacturers

泛应用的基础上的,结合了先进的分析测试手段、数学统计手段以及计算机模拟的方法,进一步揭示了中药体系的内涵,定性和量化,得到相对完备的质量控制数据。

采用振荡技术,获得大量中药的化学振荡特征图谱,根据特征图谱所反映的信息来确定药材种类及有效成分的量,建立中药振荡特征图谱库,从而开展中药的动力学及反应机制研究。目前拟解决的关键问题:①怎样得到各种中药的振荡指纹图谱。②如何将获得的不同种类中药振荡特征图谱上升到机理高度,使图谱得到物理化学表征。为实现以上目标,拟采用振荡技术,在化学振荡器“ BrO_3^- - Mn^{2+} - H^+ -丙酮”中,考察各种中药的振荡行为,获取众多信息来完成研究任务。

2.1 利用外加物质对振荡体系进行干扰,研究迟滞时间等与中药种类间可能的依存性,从而用振荡参数来实现中药的选择性识别:该项工作研究已经取得了较大进展,通过对各种中药振荡反应的波形进行比较发现,所有中药振荡体系的典型振荡波形都呈现准正弦波形,具有衰减式特征,振幅随着时间的延长而衰减。一般而言,可将振荡反应分为 3 个时期:(1)能量的积累期(BC);(2)能量的平衡期(CD);(3)能量的消耗期(DE)。历经以上 3 个时期,振荡反应开始,这是以中药为底物的振荡反应在封闭体系中的共同特征。伴随着 3 个时期的变化,各振荡体系的 $E \sim t$ 图又呈现出明显的个性,主要表现在不同中药对振荡反应的速度、振荡周期和振幅有着不同的影响,因而表征各振荡体系的振荡波形千差万别。尽管如此,它们均显示出阻尼振荡的特点,这种模式符合封闭体系的反应特征。

同时,考虑各地气候环境及生长期的不同,许多中药材单从植物形态、药材形状、性味、色泽等方面较难辨识,甚至发生错误,给中药的开发研究带来诸

多不便。采用化学振荡方法,调整浓度范围,寻找特征波形,绘制出能显示中药特性的振荡特征图谱,是解决中药识别的有效途径。然而,中药化学成分复杂,往往一种中药含有多种化学成分。化学振荡反应是以有机物为振荡底物,在化学振荡器“ BrO_3^- - Mn^{2+} - H^+ -丙酮”体系中,通过调整振荡体系中各种物质的浓度,使其呈现出特征振荡波形。因此,这种振荡波形是中药中所有物质共同作用的结果。如果固定振荡体系中 BrO_3^- 、 Mn^{2+} 、 H^+ 、丙酮的浓度,而只改变有机底物的种类和浓度,所获得的振荡波形无疑就是该物质的特征波形。利用化学振荡的这一特点,在不改变 BrO_3^- 、 Mn^{2+} 、 H^+ 、丙酮浓度的前提下,以中药为振荡底物,可获得不同中药的特征振荡波形。这种特征波即为该中药的振荡特征图谱。利用此振荡图谱不仅可鉴别中药,还可研究其参与循环的动力学,进而研究其在人体循环中的作用机制以及药效,从而为中药的研究开辟一条新路。

2.2 确定中药振荡反应振荡系数,促使其定量化:化学振荡就整个振荡体系而言,是发生在远离平衡的非线性区,但就某一过程而言,还是能找到平衡点。因此,可以利用物理学的基本观点来解释振荡波形和振荡现象。

由于振荡波峰是时间的函数,只要振荡反应发生就有振荡波峰。振荡能量是振幅的函数。若以 E 表示能量, H 代表振幅,则

$$E = f(H)$$

式中能量 E 可理解为动能和势能之和

对阻尼振荡有下式成立

$$E = \frac{1}{2} K H^2 e^{-\beta t} \quad (1)$$

式中 β 为阻尼系数,是与振荡体系有关的常数,取决于底物中药的特性; t 为振荡时间; K 是化学链系数,可理解为反应物浓度 C 与振荡周期 t_p 的比值,即

$$K = k = \frac{C}{t_p} \quad (2)$$

这恰等于振荡反应的速率常数。

现将(1)式变形并取对数得

$$\ln H = \frac{1}{2} \beta t + \frac{1}{2} \ln \frac{2E}{k} \quad (3)$$

以 $\ln H$ 对 t 作图,直线的斜率即为 $\beta/2$,截矩则为 $\frac{1}{2} \ln \frac{2E}{k}$ 。由于 H 是振幅,可从振荡波形获得;常数 β 正好反映了振荡反应的特性;这样,利用公式(3)便可计算振荡反应的能量 E 以及特性常数 β 。

由于振荡反应实质上是氧化还原反应,因此它符合能斯特方程,电势 φ 与浓度的对数呈正比,即

$$\varphi \propto \lg C \quad \text{或} \quad \varphi = \beta \lg C$$

式中的 β 为特性常数, C 为振荡反应 t 时刻的浓度

由于振荡反应的特点,反应某时刻的浓度是不同的,这样便可依据 t 及 β 求得某时刻参与反应的底物浓度(C),为中药的定量提供理论依据。

2.3 利用数学计算方法解析图谱,得振荡周期、波形、峰高、半峰宽等与主要有效成分及疗效的定性、定量关系,可建立中药及其制剂的质量评价系统。

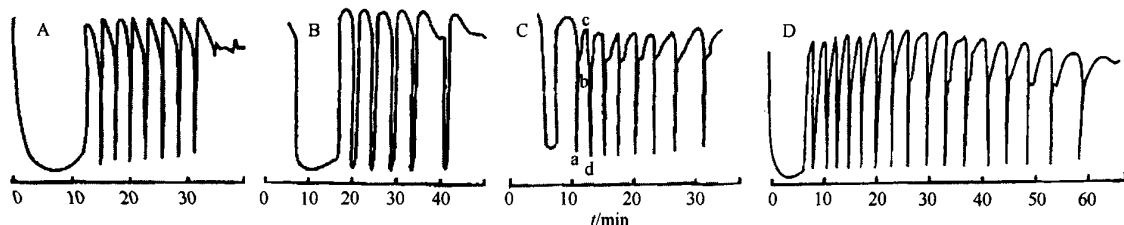
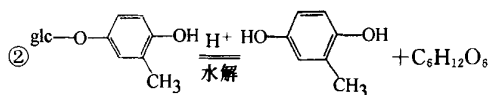
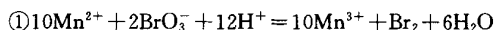
2.4 基于图谱开展动力学及反应机制研究:利用化学振荡技术探讨反应机制,捕捉振荡信息,突破常规手段的禁区,开辟中药研究的新路。

笔者已经成功地考察了鹿衔草、女贞子的振荡行为,探讨了它们的振荡反应机制及参加反应的化学成分,发现振荡特征图谱可用来研究中药的振荡机制。例如,采用振荡技术通过对鹿衔草及女贞子的研究发现,两种振荡体系在各自的浓度范围均呈现出良好的振荡行为,显示了各自的特性。然而比较发现,女贞子振荡曲线光滑规划,鹿衔草的振荡曲线下快上慢,中间出现转折或平台,这一现象至少说明参与图 3-A 和图 3-C 体系的振荡物质不同,且差异较大。这也揭示出鹿衔草的振荡可能由两种物质或中间产物引起。已知鹿衔草中含有酚苷类物质,如高熊果苷等,其可在酸性条件下发生水解作用。由此可以

推断振荡可能是由于酚苷类物质的水解、糖氧化及苷元上的取代作用所引起。又由于糖的醛基易氧化, Br_2 取代速度较慢,因而鹿衔草体系形成了下快上慢的趋势;女贞子中苷类物质质量极少,因此振荡图形未出现转折和平台,整个振荡曲线光滑规则,与鹿衔草体系形成了极大反差。而在鹿衔草体系的低浓度区,由于苷类物质质量低,水解产物相对较少,只发生了糖的醛基氧化,而对苯二酚的量达不到振荡浓度,即未发生 Br_2 的取代反应,如图 3-B,使鹿衔草的高、低浓度区振荡图形不同。

由于苷无还原性,而其水解产物还原糖具有还原性。根据实验事实,体系电势发生了连续变化,从而断定苷类结构中的键首先因水解而发生断裂,形成了具有还原性的葡萄糖及对苯二酚(含有酚羟基的苷元)2种产物。葡萄糖中的醛基易于氧化,它可使 Mn^{3+} 还原成 Mn^{2+} , Br_2 还原成 Br^- ;与此同时,另一产物对苯二酚由于分子中酚羟基的活化作用,苯环上的氢极易接受亲电试剂 Br_2 及 Mn^{3+} ,又会因 BrO_3^- 与 Mn^{2+} 在 H^+ 存在下再次产生,这种周而复始的反应,就形成了振荡。为了验证酚苷类物质是引起如图 3-C 振荡的推论,采用市售生化试剂芦丁在上述同一条件下,得到了如图 3-D 所示的振荡图形。图 3-D 与图 3-C 极为相似,且芦丁水解后易形成具还原性的糖和含酚羟基的苷元。因此,前述酚苷类物质参与了振荡反应的推论是合理的。在此,可推断,在图 3-C 中, $a \rightarrow b$ 段为糖的氧化, $b \rightarrow c$ 段为苯环的溴代, $c \rightarrow d$ 段是 BrO_3^- 、 Mn^{2+} 与 H^+ 生产 Br_2 所形成。

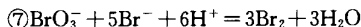
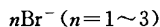
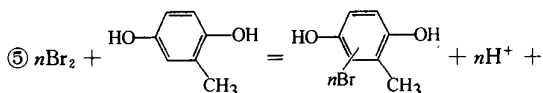
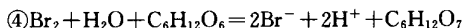
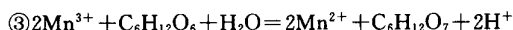
通过以上分析,结合振荡图形,认为酚苷类物质参与的振荡反应可能的机制为:



A-女贞子体系 B-鹿衔草低浓度体系 C-鹿衔草高浓度体系 D-芦丁体系
A-Ligustrum Lucidum system B-Pelvetia siliquosa system with lower concentration
C-Pelvetia siliquosa system with higher concentration D-rutin system

图 3 4 类体系的典型振荡指纹图谱波形

Fig. 3 Typical oscillating fingerprint wave of four kinds of system



3 结语

由以上分析可以看出中药是一个多组分化学混合体系,各种组分的协同作用难以弄清楚,对中药作用机制研究带来许多困难,仅靠简单方法和经验鉴别中药缺乏科学依据。利用灵敏、选择性强的振荡技术获得中药振荡特征图谱,综合考虑混合体系多组分的相互影响,使复杂问题变得简单化,经验问题科学化。同时克服了目前其他方法所得到的指纹图谱不能表明中药成分来源的弊端,使中药特性及协同作用真正体现于振荡特征图谱之中。相信这种方法会给中药的鉴定、作用机制研究、有效成分的确定等带来新的研究思路。

References:

- [1] Li Z X, Yuan C L, Nie F. Kinetic parameters of oscillating reaction of amino acid- BrO_3^- - Mn^{2+} - H_2SO_4 -acetone system [J]. *Chin Sci Bull* (科学通报), 2005, 50 (1): 46-48.
- [2] Wang X L, Li Z X. *Trans*-2, 2', 4, 4'-tetramethyl-6, 6'-dinintrozobenzene from *Aconitum sungpanense* [J]. *Phytochem Commun*, 2004, (75): 789-791.
- [3] Wang X L, Li Z X. Isolation and crystal structure of *trans*-2, 2', 4, 4'-tetramethyl-6, 6'-dinintrozobenzene [J]. *Chin J Struct Chem*, 2004, 23(9): 1001-1008.
- [4] Li Z X, Yuan C L. The effects of traditional Chinese medicine on amino acid oscillation and its bacteriostatics [J]. *Acta Physico-chim Sin* (物理化学学报), 1999, 15(8): 761-763.
- [5] Li Z X, Yuan C L, Nie F. Catch information of herbs by oscillation reaction [J]. *Chem Bull* (化学通报), 2005, 2: 48-50.
- [6] Li Z X, Yuan C L. Study on the oscillating belousov-zhabotinskii type reaction of seven amino acids [J]. *Chin Sci Bull* (科学通报), 1993, 38(2): 191-194.
- [7] Yuan C L, Li Z X. Study on the activation center of amino acids in chemical oscillating reaction [J]. *Acta Physico-chim Sin* (物理化学学报), 1996, 12(11): 1041-1043.
- [8] Yuan C L, Li Z X. Study of the oscillating reaction in amino acid- BrO_3^- - Mn^{2+} - H_2SO_4 -acetone system [J]. *Acta Physico-chim Sin* (物理化学学报), 1994, 10(1): 87-91.
- [9] Li Z X, Yuan C L. Study on the B-Z type oscillating reaction using eight amino acid as organic substrate [J]. *Chem Bull* (化学通报), 1993, 1: 51-53.
- [10] Yuan C L, Li Z X. Oscillating reaction using glutathione and diglycine as organic substrates [J]. *Chem Bull* (化学通报), 1996, 10: 47-51.
- [11] Li Z X, Yuan C L. Distinguishing Chinese medicinal herbs by chemical oscillating fingerprints [J]. *J Chin Med Mater* (中药材), 2004, 27(1): 10-12.
- [12] Yuan C L, Li Z X. The oscillating fingerprints of many kinds of traditional Chinese medicines [J]. *Chin J Nat Med* (中国天然药物), 2004, 2(1): 42-44.
- [13] Li K, Wang S Z, Song B S. Fingerprint of Chinese material medical and its effect on development of Chinese material medical [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2002, 33 (11): 36-42.
- [14] Liu H Q, Guo S H. Modern instrument and fingerprint graph of Chinese herbs [J]. *Acta Chin Med Pharmacol* (中医药学报), 2002, 30(2): 35-37.
- [15] Yao H, Tang Y H. Development of TCM chromatographic fingerprint [J]. *Northwest Pharm J* (西北药学杂志), 2002, 17(6): 282-284.
- [16] Zheng Y, Wu F E. Development of traditional Chinese medicines chromatographic fingerprint [J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2003, 15(1): 55-60.
- [17] Zhuo Z G. The thinking about establishment fingerprint of traditional Chinese medicines [J]. *China Pharm* (中国药业), 2002, 11(8): 62-64.
- [18] Luo G A, Wang Y M. Classification and development of TCM fingerprint [J]. *Chin J New Drugs* (中国新药杂志), 2002, 11(1): 46-60.

• 新书介绍 •

《天然产物核磁共振碳谱分析》

本书是中国科学院成都生物研究所植化室龚运淮研究员(客座)和丁立生研究员组织所内外一些科研人员经多年努力完成的一部天然产物化学方面的大型工具书。也是1986年出版的《天然有机化合物的 ^{13}C 核磁共振化学位移》一书的增扩改编新版。无论在内容和形式上都有很大的改进。收集有碳谱数据的化合物达4 100多个,全书超过1 000页。如有感兴趣或有意购买的单位或读者,可登录下述网站,查看有关本书的详细介绍、联系方式和购买办法等, <http://www.npcnmr.com>;也可以直接通过电邮、电话和信函与本书代理商、编委代表等联系。邮购免挂号邮寄费。购10本以上,优惠价150元,购5~9本,优惠价165元。银行或网上银行汇款详见上述网站介绍。

代理商:昆明蓝星科技有限公司 地址:昆明白龙路238号俊发大厦A401 邮编:650233
电话:(0871)6532345 13888439630 联系人:王科军 E-mail:kmwkj@163.com QQ:14060615
编委代表:龚运淮 E-mail:gongyuh06@163.com 电话:(0871)3862309