

· 综述 ·

中药血清药物化学在中药药效物质基础研究中的应用

魏元锋¹, 张 宁^{1*}, 冯 怡², 林 晓^{2*}

(1. 上海中医药大学科学技术实验中心, 上海 201203; 2. 中国现代制剂技术教育部工程研究中心, 上海 201203)

摘 要:运用中药血清药物化学方法对中药药效物质基础进行探究是近年来中药现代化研究的一个热点。回顾了中药血清药物化学的概念、理论依据及研究模式, 综述近 10 年来其在中药药效物质基础研究中的应用概况, 并对实际应用过程中存在的问题与对策进行了探讨。

关键词:中药血清药物化学; 药效物质基础; 对策

中图分类号: R284

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)09-1489-04

Application of Chinese materia medica serum pharmacochemistry in studies on therapeutic material basis of Chinese materia medica

WEI Yuan-feng¹, ZHANG Ning¹, FENG Yi², LIN Xiao²

(1. Experimental Center for Science and Technology of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. Engineering Research Center of Modern Preparation Technology of Traditional Chinese Medicine of Ministry of Education, Shanghai 201203, China)

Key words: Chinese materia medica serum pharmacochemistry; therapeutic material basis; countermeasures

中药药效物质基础研究是中药现代化研究的核心,但由于中药化学成分的复杂性,以及有效成分对机体作用的协同性,中药药效物质基础研究十分困难,目前还没有一种理想的研究方法,已成为制约中医药现代化发展公认的瓶颈问题。近年来,针对中药物质基础的研究出现了很多新理论和新方法^[1],其中特别值得注意的是中药血清药物化学的发展与应用。我国自 20 世纪 90 年代开始这方面的研究,经过十余年的发展,积累了宝贵的经验并取得了可喜的进展,但作为一种新的研究方法,还有其不足之处,尚需不断地进行探讨、规范和完善。本文对中药血清药物化学近 10 年来在中药药效物质基础研究中的应用概况进行综述,对该方法目前存在的问题以及对策进行了探讨。

1 中药血清药物化学概念的提出、理论依据及研究模式

1.1 概念的提出:日本学者田代真一最早提出了“血清药化学”(serum pharmacochemistry, SPC)的概念^[2]。1997 年,国内学者王喜军^[3]进一步完善了这一概念:以中药口服给药后血清为样品,按传统药物化学相同的研究方法,多种现代技术综合应用从血清中分离、鉴定移行成分,研究血清中移行成分与传统疗效的相关性,阐明体内直接作用物质代谢及体内动态的领域称之为中药血清药物化学 (serum pharmacochemistry of CMM)。

1.2 理论依据:中药成分复杂,经过适当途径给药后,在体内经过吸收、代谢等过程,最后吸收入血的往往是多个单体成分形成的有效成分群,其结构既可以是中药的原型成分,也可以是代谢产物或中药中各成分间相互反应形成的新成分,还可以是机体在药物作用下生成的新的内源性生理活性物质。这些物质均须以血液为介质输送到靶点才能产生作用,因而给药后的血清才是真正起作用的“制剂”。这些入血成分真实地反映了中药成分在体内的变化过程,能体现各成分对机体的协同作用,可代表中药及复方的整体药效物质基础。因此,分析研究血清移行成分,探明体内直接作用物质,将成为快速、准确的研究中药药效物质基础的有效方式。

1.3 研究模式:主要有两种模式,一种是首先进行血清药理学研究,证明含药血清的药理作用,阐明中药的作用机制,然后综合运用现代分析技术分离、鉴定血清中有效成分,阐明中药的药效物质基础;另一种是首先通过前期血清药物化学研究确定移行成分来源、种类、数量等,然后综合运用各种提取分离方法,对相应的单味药材进行分离,对分离得到的活性成分进行药理学研究,这种以中药血清药物化学为指导的生药学研究具有极强的针对性,使中药药效与中药成分的研究更能协调一致,由此确定的有效成分或有效成分群,极有可能是中药真正的药效物质基础,并能更好地反映中药

* 收稿日期:2009-03-27

基金项目:上海市教育委员会重点学科资助项目 (J50302);上海市教育委员会科研创新项目 (09 YZ117)

作者简介:魏元锋 (1981—),男,上海中医药大学 2007 级博士,研究方向为中药复方新型给药系统。

Tel:(021)51322388 E-mail:wiyuanfengyuer@yeah.net

* 通讯作者 张 宁 Tel:(021)51322384 E-mail:ningzh@126.com

药效的整体协同作用^[4]。

2 中药血清药物化学在中药物质基础研究中应用概况

近10年来我国中药血清药物化学的研究取得了较大进展,综合运用各种色谱和光谱手段,通过药效学实验,对中药口服给药后移血成分及代谢产物进行分析,揭示了多味中药的药效学物质基础。王喜军等^[3~6]在中药血清药物化学研究方面做了大量工作,涉及的中药及复方有茵陈蒿、远志、桑日皮、生姜、白术、吴茱萸、枳术丸复方安替威胶囊、六味地黄丸等。通过血清药物化学及药效学实验研究,发现口服茵陈蒿、茵陈蒿汤及茵陈蒿五苓散后移血成分均只检测到了6,7-dimethylesculetin,且该物质具有利胆、抗炎、利尿、调血脂等一系列茵陈蒿具有的药效,因而推测该物质可能是茵陈蒿、茵陈蒿汤及茵陈蒿五苓散共同的药效学物质基础;口服远志后清中分离得到了3,4,5-trimethoxycinnamic acid (TMCA)及体内代谢产物 methyl-3,4,5-trimethoxycinnamic acid (M-TMCA),两种物质具有明显的镇静安神作用,为远志体内直接作用物质。而远志中主要成分为 tenuifolioside,无镇静化痰等疗效,tenuifolioside A与C可在胃肠道中被代谢为TMCA, TMCA在肝脏中被代谢为M-TMCA,因而 tenuifolioside A与C为TMCA与M-TMCA的前体药物。六味地黄丸是滋阴补肾的经典名方,但其补肾的药效物质基础尚不明确,通过对大鼠口服六味地黄丸后血中移行成分研究,共发现了11个入血成分,4个为新产生的代谢产物,7个为六味地黄丸所含的原型成分,其中有一成分虽为地黄中所含的原型成分,但其他两种药材也能代谢产生,对其体内的量变有共同的贡献。六味地黄丸血中移行成分对氢化可的松致大鼠肾虚动物模型的保护作用的药效学实验进一步证明了血中移行成分是六味地黄丸补肾的药效物质基础,其中以莫诺苷、獐牙菜苷和马钱子苷的作用最为明显,是补肾作用的核心成分。

除此之外,国内其他学者应用中药血清药物化学方法对中药药效物质基础的研究也有较多报道。程星辉等^[7]利用LC-MS/MS技术,对口服延胡索活性部位后大鼠血浆中的移行成分进行分析鉴定,发现9个入血成分均为原型成分,同时也发现部分生物碱是以葡萄糖醛酸结合物的形式存在,为延胡索抗心肌缺血作用的物质基础研究奠定了基础。陈旭等^[8]通过比较,龙血竭提取物、含药血清和空白血清的HPLC指纹图谱,结合LC-MS/MS技术研究龙血竭给药后的血中移行成分,发现6个入血成分,是龙血竭在体内主要直接作用物质,其中5个都为原型成分,1个可能为原型成分或代谢产物,为阐明龙血竭的药效物质基础提供了依据。贾丹兵等^[9]对越桔中能以原型吸收入血的两个成分熊果苷和秦皮苷进行了抗炎、祛痰和镇咳的药效学实验,阐明了该两种物质是越桔的药效物质基础。宋金春等^[10]对口服生化汤后大鼠血清进行了初步的探索,在血中发现了9个移行成分,其中6个为原型成分,3个为代谢产物,这些血中移行成分为生化汤的体内作用基础,对其深入研究将有助于阐明生化汤的有效部位及作用机制。张梁等^[11]通过HPLC指

纹图谱在口服芍药甘草复方后的大鼠血清中检测出18个移行成分,其中13个为复方直接入血物质,3个为复方代谢产物,移行成分的确认及归属将进一步阐明复方的效应物质基础。阳长明等^[12]通过建立醒脑滴丸及其大鼠体内血清HPLC指纹图谱,发现醒脑滴丸给药后,5个成分未被吸收或被代谢,血中出现了18个移行成分,其中10个为原型成分,8个为代谢成分,为进一步阐明醒脑滴丸的物质基础及其作用机制奠定了基础。窦志华等^[13,14]从大鼠口服复方五仁醇胶囊后血清中分离出13个入血成分,全部来自君药五味子,其中8个为制剂原型成分,包括五味子醇甲、五味子甲素、五味子乙素,其余5个为代谢产物,证明复方五仁醇胶囊含药血清中的药源性成分主要是木脂素及其代谢产物。另外,还有对葛根、降脂宁、葛根芩连汤、归芩片等中药及复方的血清药物化学研究报告^[15~18],为这些药物药效物质基础的研究提供了依据。

3 中药血清药物化学研究方法的问题与对策

3.1 给药途径问题:无论是日本学者还是中国学者,所提出的中药血清药物化学的概念给药途径均为口服给药,这无疑会限制中药血清药物化学的应用范围。实际上,非口服给药的中药及复方制剂的中药血清药物化学研究已经展开,如吴秀君等^[19]应用中药血清药物化学的研究方法对脑血宁注射液的药效物质基础进行了研究,从iv该注射液后的人血清中检测到了3种化合物,其中2种为脑血宁注射液所含原型成分,分别为丹皮酚和梔子苷,1种为代谢产物,初步揭示了该注射液药理作用的物质基础。因此,在制备含药血清时,应根据不同中药的具体要求选择合适的给药途径,如口服制剂可采用灌胃给药,注射剂应采用注射给药,皮肤给药剂型应采用皮肤给药制备含药血清等。

3.2 血中成分与药效的相关性问题:中药口服给药后能发挥药效的成分一定是能被吸收入血的成分,但不能保证所有吸收入血的成分都是有效成分。因此,中药血清药物化学研究必须与药理学研究相结合,重视血中移行成分与中药传统疗效的相关性研究,即选择与方药适应症相对应的动物模型、细胞模型,以及基因组或蛋白组,进行药效相关性研究,确定药效物质基础。

3.3 实验动物的选择问题:目前,中药血清药物化学研究所选用的实验动物以大鼠居多,其次有豚鼠、家兔、狗等。药物在不同实验动物体内的吸收、代谢等情况与人体有差异,因此,药物血清移行成分也可能不一样。实验动物的选择应遵循以下原则:(1)相似性原则,即选择结构、功能、代谢及疾病特点等与人相似的实验动物;(2)重复性和均一性原则,要保证实验结果的可靠、稳定,需选择标准化的实验动物;(3)经济、实用、易获取原则。

3.4 给药方案的确定问题:中药血清药物化学给药方案包括给药剂量、给药次数及采血时间等,理想的给药方案应使血清中的药物成分更客观地代表中药药效物质基础。

3.4.1 给药剂量:合适的给药剂量应为原方药的临床用药量或整体模型动物的有效剂量(提高给药剂量为原方药的

3~30倍)。建议应取少量实验动物通过预试验确定合适的给药剂量。

3.4.2 给药次数与采血时间:原则上应以药动学理论为指导,在给药后各成分达到稳态血药浓度后采血,不过由于中药成分复杂,各成分理化性质及体内过程不完全一样,药动学参数各异,很难采用统一的标准设计给药次数与采血时间。目前有几种经验给药方案:(1)7~10 d 给药法(每天 ig 1 次,连续给药 7~10 d);(2)3 次给药法(连续 ig 3 次,第 1、2 次间隔 20 h,第 2、3 次间隔 4 h);(3)2 次给药法(第 1 次给药后 2 h,再以相同剂量重复给药 1 次)等。采血时间一般在末次给药后 0.5~3 h,一般不超过 6 h,采血时间过早,部分药物组分未被吸收入血;采血时间过长,部分药物组分在体内发生转化或被排泄掉。李仪奎^[20]针对给药次数与采血时间提出了两个方案:(1)标准法,即先用少量动物进行预试验,通过不同采血时间进行比较后确定,这种方法得到的结果较为确切,但个体性强,结果不能通用;(2)通法,每天给药 2 次,连续给药 3 d,末次给药后 1 h 采血。在实际操作中可以先按通法给药、采血,如不能得到预期结果,疑为采血时间不当时,再采用标准法确定最佳采血时间。

3.5 给药前的禁食问题:不同的中药对饮食有不同的要求,如有的强调饭前服用,有的强调需饭后服用等,这说明饮食会对中药的疗效产生一定影响,即饮食可能会影响药物的吸收、代谢等体内过程,因而在制备含药血清时应根据中药的服用特点决定给药前禁食与否。

3.6 实验动物模型选择问题:药物在正常生理状态下与病理状态下的体内过程可能不一样,因此,在同一采血点血清所含药物成分与浓度可能不同,为使实验结果尽可能体现药物临床病理状态下药效物质基础,中药血清药物化学的研究应在病理状态模型下进行。另外,同一疾病的不同动物模型(如偏头痛有硬脑膜神经炎症模型、硝酸甘油型实验性偏头痛模型、利血平化低 5-HT 伴局部脑血管痛痉挛小鼠偏头痛模型)亦可能对实验结果造成影响,所选动物模型应遵循以下原则^[21]:(1)相似性,所复制的动物模型应尽可能近似于人类疾病的情况;(2)重复性,理想的动物模型应该能够准确的重复再现;(3)可靠性,复制的动物模型应可特异性地反映某种疾病或某种功能、代谢、结构变化,即具该种疾病的主要症状和体征;(4)适用性和可控性,复制动物模型时还应考虑到实际应用和便于控制其疾病发展,以利于进行研究;(5)易行性和经济性。

3.7 血清与血浆的选择问题:血浆是血液在抗凝条件下去除血细胞的液体,吸收入血的中药成分就在其中,血清是指血浆中除去纤维蛋白后得到的淡黄色液体,在血液凝固后才能分离出来。中药脑泰方是补阳还五汤的加减方,贺石林等^[22]采用 HPLC-MS 指纹图谱分析方法,观察到含药血清丧失了大部分中药极性成分,但含药血浆却保留了大部分中药成分。中药成分十分复杂,有些用血清与血浆可能并无差别,但究竟哪些中药以何种方法为宜,需要通过系列比较研究加以阐明。

3.8 含药血清、血浆的制备与预处理

3.8.1 含药血清的制备:采血后不加入抗凝剂,静置一定时间,待血液凝固后 3 000 r/min 离心 5~10 min,吸取上清液,即得。含药血浆的制备:采血后加入抗凝剂,3 000 r/min 离心 5~10 min,吸取上清液,或不加抗凝剂,采血后立即 3 000 r/min 离心 5~10 min,吸取上清液,即得。

3.8.2 预处理:制得的含药血清或血浆在进行分析研究前一般需经过预处理,以除去其中的杂质成分,富集有效成分。常用的预处理方法有沉淀蛋白法,包括乙腈法、丙酮法、甲醇法、乙醇法、三氯乙酸法、70%高氯酸法、磷酸二氢钠酸化法、重金属盐法以及水浴法等。袁莹等^[23]考察了三氯乙酸法、70%高氯酸法、甲醇法、丙酮法等不同血样处理方法对大川芎方血浆移行成分的影响,发现采用 70%高氯酸法处理的血浆样品川芎、天麻效应组分各色谱峰分离度较好,响应值较高。水浴法是由黄熙等^[24]发明的一种血样预处理的新方法:在 1 ml 含药血清中加入内标,涡旋混匀 15 s,100 °C 水浴 10 min,用超微型搅拌器搅拌 1 min 制成匀浆,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液直接上机进样。该法具有方法简单、不使用有机溶剂、可单独大规模制备样品且精确、灵敏、重复性好等特点。此外,还有液液萃取法、固相萃取法、快速流动馏分技术以及超滤法等处理方法^[25]。

3.9 血清、血浆分析方法:综合运用各种光谱、色谱技术(HPLC、GC、CE、UV、DAD、NMR、MS、原子吸收光谱法等)对血中移行成分进行分离、鉴定。HPLC 指纹图谱是目前常用的含药血清、血浆分析方法。另外,各种光、色谱联用技术(如 LC-MSⁿ、GC-MSⁿ 等)的使用大大提高了分析检测灵敏度,不仅能分析血中移行成分的数量,而且还能对这些成分进行准确的定性。

4 结语

中医药具有几千年的临床经验和独特的理论体系,为中国乃至世界人民的健康做出了不可磨灭的贡献。然而,中药特别是中药复方的药效物质基础不明确,直接造成中药不能建立与国际接轨的质量标准,缺乏可靠的药理学、毒理学研究数据,导致我国中药市场竞争力薄弱,已成为严重制约中医药发展的“瓶颈”。中药血清药物化学的提出是中药现代化研究不断创新的结果,虽然目前还处在成长与完善阶段,但已经显示出了强大的生命力与应用价值,随着研究的不断深入,方法的不断完善,最终将为中药物质基础研究提供强有力的工具,并极大地推动中药现代化的发展。

参考文献:

- [1] 郭立民,王长云,顾谦群,等. 中药复方效应物质基础研究方法及发展趋势[J]. 中成药, 2007, 29(1): 118-121.
- [2] 贺玉琢. 日本汉方药“血清药理学”、“血清化学”的研究概况[J]. 国外医学:中医中药分册, 1998, 20(5): 3-7.
- [3] 王喜军. 中药及中药复方的血清药物化学研究[J]. 世界科学技术—中药现代化, 2002, 4(2): 1-5.
- [4] 王喜军. 中药血清药物化学的研究现状及未来发展[J]. 亚太传统医药, 2005(1): 59-63.
- [5] 王喜军,陈曦,杨炯,等. 枳术丸口服给药后血中移行成分分析及定量研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2007, 9(2): 54-57.

- [6] 王喜军, 张宁, 孙晖, 等. 六味地黄丸血中移行成分对氯化可的松致大鼠肾虚动物模型的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2008, 14(2): 33-37.
- [7] 程星辉, 石钺, 孙虹, 等. 延胡索活性部位入血成分的LC-MS/MS研究[J]. 药学学报, 2009, 44(2): 167-174.
- [8] 陈旭, 雍克岚, 吕敬慈, 等. 龙血竭小鼠灌胃给药后血中移行成分的分析[J]. 中草药, 2009, 40(3): 352-355.
- [9] 贾丹兵, 王立强, 范玉玲. 越桔口服后血中移行成分的生物活性研究[J]. 中医药研究, 2000, 16(5): 48-49.
- [10] 宋金春, 曾俊芬, 胡传芹, 等. 生化汤的血清药物化学研究[J]. 中国药理学杂志, 2005, 40(13): 997-999.
- [11] 张梁, 徐德生, 冯怡. 芍药甘草复方大鼠血中移行组分归属分析研究[J]. 中国中药杂志, 2007, 32(17): 1789-1791.
- [12] 阳长明, 陈玉平, 石任兵, 等. 醒脑滴丸血清药物化学研究(I)[J]. 北京中医药大学学报, 2006, 29(9): 621-623.
- [13] 窦志华, 丁安伟, 王陆军, 等. 复方五仁醇胶囊血清药物化学研究[J]. 中草药, 2006, 37(8): 1137-1140.
- [14] 丁安伟, 窦志华, 罗琳, 等. 复方五仁醇胶囊血清药化学研究(II)[J]. 中草药, 2008, 39(9): 1285-1288.
- [15] 张梅, 邱丰, 谢学军, 等. 葛根血中移行成分高效液相色谱分析[J]. 中华中医药杂志, 2008, 23(3): 215-217.
- [16] 王福刚, 刘斌, 王伟, 等. 降脂宁血中移行成分归属研究[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(8): 912-914.
- [17] 金慧, 王彦, 阎超. 葛根芩连汤入血成分的归属[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(22): 2687-2691.
- [18] 曹艺, 朱丹妮, 林志宏, 等. 归芍片血清药物化学研究(I)[J]. 中国药科大学学报, 2007, 38(6): 519-522.
- [19] 吴秀君, 肇丽梅. 脑血宁注射液血清药物化学及药理学研究[J]. 中药新药与临床药理, 2008, 19(5): 376-379.
- [20] 李仪奎. 中药血清药理学实验方法的若干问题[J]. 中药新药与临床药理, 1999, 10(2): 95-98.
- [21] 吴端生, 张健. 现代实验动物学技术[M]. 北京: 化学工业出版社, 2007.
- [22] 贺石林, 葛金文, 贺蓉, 等. 质疑血清药理学, 加强多层次半体内实验研究[J]. 中国药理学通报, 2005, 21(3): 277-279.
- [23] 袁莹, 冯怡, 徐德生. 大川芎方效应组分物质基础研究[D]. 上海: 上海中医药大学, 2008.
- [24] 黄熙, 任平, 张莉, 等. HPLC直接测定血清阿魏酸—方剂血样预处理新方法(I)[J]. 中草药, 1999, 30(3): 175-179.
- [25] 张莉, 黄熙, 王骊丽. 中药药动学血样预处理方法回顾与展望[J]. 中草药, 2000, 31(10): 792-794.

黄黄连寒热药性研究概况及其研究思路与方法

蒋俊^{1,2}, 高成林^{1,2}, 贾晓斌^{1,2*}, 陈彦¹, 蔡宝昌³, 吴皓^{3*}

- (1. 江苏省中医药研究院 中药新型给药系统重点实验室, 国家中医药管理局 中药释药系统重点研究室, 江苏 南京 210028;
2. 江苏大学药学院, 江苏 镇江 212013; 3. 南京中医药大学 江苏省中药炮制重点实验室, 江苏 南京 210029)

摘要: 黄黄连是“以热制寒”的经典药物, 充分体现了中药炮制对中药药性的影响。从寒热药性的本质入手, 总结了寒热药性研究的方法和成果; 在整理了中药药性研究的现有技术方法和研究思路的基础上, 根据黄黄连寒热药性的研究现状, 提出了黄黄连寒热药性研究的新思路、新方法。

关键词: 黄黄连; 寒热药性; 思路和方法

中图分类号: R285.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2670(2009)09-1492-04

Overview of cold-heat nature study on Fructus Evodiae-Rhizoma Coptidis and its thoughts and methods

JIANG Jun^{1,2}, GAO Cheng-lin^{1,2}, JIA Xiao-bin^{1,2}, CHEN Yan¹, CAI Bao-chang³, WU Hao³

- (1. Key Laboratory of New Drug Delivery System of Chinese Materia Medica, Jiangsu Provincial Academy of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210028, China; 2. School of Pharmacy, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; 3. Key Laboratory of Processing of Chinese Materia Medica, Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing, 210029, China)

Key words: Fructus Evodiae-Rhizoma Coptidis; cold-heat nature; thoughts and methods

黄黄连是取吴茱萸汁炮制黄连, 去萸不用, 去药存性。炮制目的是用药性辛热的吴茱萸来抑制黄连的苦寒之性, 使黄连寒而不滞的同时又增强黄连清气分湿热、散肝胆郁火的功效, 主要用于积滞内阻、胸膈痞闷、胁肋胀满、下痢脓血等症^[1]。黄黄连是“以热制寒”的“反制”炮制经典, 充分体现了中药炮制对

药药性的影响, 但迄今黄黄连炮制前后药性差异的研究较少, 且与其药性相关的物质基础仍不明确, 亟待解决。

1 寒热药性本质研究

药性有广义和狭义之分, 通常所说的药性主要是指中药的四种性气, 即寒、热、温、凉, 这是中药最基本的属性^[1]。徐

* 收稿日期: 2009-04-10

基金项目: 江苏省中药炮制重点实验室开放课题(ZYP2002); 江苏省中医药领军人才专项(2006)

作者简介: 蒋俊(1986—), 男, 江苏镇江人, 主要从事中药新剂型、新技术和中药炮制、制剂分析等方面研究。曾参与“神阙穴给药可塑性胶贴膏的研制和国家2010版药典“炎淫羊藿的质量标准研究”。E-mail: xuyan9323@126.com

* 通讯作者 贾晓斌 Tel: (025) 85637809 E-mail: jxiaobin2005@hotmail.com