

· 中药现代化论坛 ·

基于成分敲除/敲入的中药药效组分辨识与质量控制模式的商建

肖小河, 鄢丹, 袁海龙, 王伽伯, 金城*
(解放军中药研究所 解放军302医院, 北京 100039)

摘要: 中药药效物质辨识与中药质量控制一直是中药现代化研究的难点和热点问题。为了探寻中药药效物质与质量控制标准研究的重大突破, 在回顾性研究和前瞻性分析的基础上, 首次提出“基于成分敲除/敲入的中药药效物质辨识与质量控制模式”的研究设想, 以期为又快又准地辨识中药药效关键组分, 实现中药质量标准“关联药效, 量而又准, 可控可评”的愿景, 提供具有原创性和实用性的研究思路和方法体系。

关键词: 中药药效组分辨识; 成分敲除/敲入; 质量控制

中图分类号: R28; R284

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2009)09-1345-04

Novel patterns of efficient components recognition and quality control for Chinese materia medica based on constituent knock-out / knock-in

XIAO Xiao-he, YAN Dan, YUAN Hai-long, WANG Jia-bo, JIN Cheng

(Military Institute of Chinese Materia Medica, 302 Military Hospital of China, Beijing 100039, China)

Abstract: The patterns of efficient components recognition and quality control for Chinese materia medica (CMM) have been the difficult and hot topics for CMM modernization. To get a radical and significant breakthrough in the investigation on the efficient component recognition and quality control standard for CMM, a tentative idea about efficient component recognition and quality control pattern for CMM based on constituent knock-out/ knock-in is initially proposed in this article on the foundation of retrospective and prospective analyses. And its main aim is to provide some creative and practical ideas and methods to recognize the key efficient components of CMM precisely and quickly, and to meet with the requirements that the quality control standards for CMM will be effectiveness-related, quantitative and accurate, controllable and assessable.

Key words: efficient component recognition of Chinese materia medica; constituent knock-out/ knock-in; quality control

中药质量控制是攸关中药现代化发展的重大课题,而中药药效物质辨识则是支撑中药质量控制的重要基石。由于包括研究思路和方法在内的多种因素的局限,绝大部分中药的药效物质基础均未阐明,致使现行中药质控水平未能走出“难关药效,量而不准,难控难评”的窘境^[1]。

为了探寻中药药效物质筛选与质量控制标准研究的新突破,本文在回顾性分析既有研究思路和方法的利弊的基础上,首次提出“基于目标成分敲除/敲入(constituents knock-out/ knock-in)的中药药效

物质辨识与质量控制模式”的研究设想,以期为又快又准地锁定中药药效关键组分、实现中药质量标准“关联药效,量而又准,可控可评”的愿景,提供具有前瞻性、创新性和实用性的研究思路和方法体系。

1 现行中药药效组分辨识模式的利与弊

现行中药药效物质辨识模式主要有4大类,各有利弊,略述如下:

1.1 经典的植化分离分析模式:这是一条以发现新化合物为主要目的的研究模式,由于缺少活性示踪,获得高性天然产物的成功几率较低。

* 收稿日期:2009-05-07

基金项目:国家“重大新药创制”科技重大专项课题(2009ZX09502022, 2009ZX09502-003);国家杰出青年科学基金项目(30625042);国家“十一五”科技支撑计划课题(2006BA108B03)

作者简介:肖小河,全军中药研究所所长,研究员、博士生导师,主要研究方向为中药品质药性评价与新药开发研究。

Tel: (010) 66933322 Fax: (010) 63850781 E-mail: pharmacy302@126.com

1.2 基于药理活性示踪的中药药效组分辨识模式:与经典的植化分离分析模式比较,该模式有利于获取有效成分或部位。目前普遍倡导从 3 个化学层次(中药整体、有效部位、有效成分)和 4 个药理水平(整体、组织、细胞、分子)筛选中药药效组分,并取得一定成效。该模式“工于分离解析,疏于还原整合”,而中医药的本原是整体,应注意体现中医药的整体观和整合作用,否则会出现方药整体有效,但组分分离越纯越细,活性越弱甚至无效^[2,3]。

1.3 基于生物色谱膜分析的中药有效组分辨识模式:这是近年来国内外新兴的中药药效物质辨识模式^[4]。由于分离介质多是生物源材料(如脂质体、细胞膜、受体、目标蛋白等),该模式实质上是一种融化学分离和体外活性筛选于一体的仿生式中药有效组分分离模式,具有较好的应用前景。但是,该模式还应注意与中医药理论的进一步结合,同时注意排除假阳性和假阴性结果的干扰。

1.4 基于计算机虚拟筛选的中药药效组分辨识模式:该模式借鉴了现代药物化学的计算机虚拟筛选(computerized virtual screening)的理念和方式,也是一种前瞻性的中药有效组分辨识模式^[5]。由于计算机虚拟筛选本身处于探索阶段,且中药本身是一个异常复杂的体系,其成分复杂,活性多样,靶点多重,组合繁多,因此中药药效组分的计算机虚拟筛选是一项既有前景同时充满挑战的研究课题。

2 现行中药质量控制模式的利与弊

2.1 中药质量的化学评价与控制

2.1.1 基于个别指标性成分检测与定量的中药质量控制:现行中药质控模式主要是参照化学合成药,即中药质量标准主要是依据指标性成分定性检测与定量。由于大多数中药的“指标性”成分不一定是其专属性成分,也不一定是有效成分;即使是专属性成分也是有效成分,其谱效关系、量效关系、毒效关系目前尚远不清楚。目前的中药质控方法和标准已经陷入了“难关药效,量而不准,难控难评”的尴尬局面。

此外,现行中药质控标准成分的限量范围也主要是根据数批样品量的大小分布而人为地设定,缺少药效毒理试验或临床试验支持。如 10 批中药中,有 8 批成分量超过 1.0%,有 2 批低于 1.0%,则往往会制定其量不得少于 1.0%的规定。由于缺少药效毒理试验或临床试验支持,成分限量范围与中药安全性和有效性实际上没有多大关联,成分量高不一定是好事情,量低也不一定是坏事情,反之亦然。

2.1.2 基于化学指纹图谱和多指标成分定量的中

药质量控制:近年来,随着指纹图谱技术的研究发展,基于化学指纹图谱和多指标成分定量测定的中药质量控制模式已逐步得到应用,特别是在现代中药注射剂质量控制中得到了广泛应用。该模式仍属于化学评价模式,仍难以直接反映中药的安全性和有效性。

2.2 中药质量的生物评价与控制

2.2.1 中药质量的生物评价与控制的现实意义:鉴于现行中药质控模式的现状和局限,综览世界药物(含化学药、生物药和中药)质量控制模式和标准的发展历程(图 1),可以看出在中药质量控制体系中,生物评价是不可或缺的。

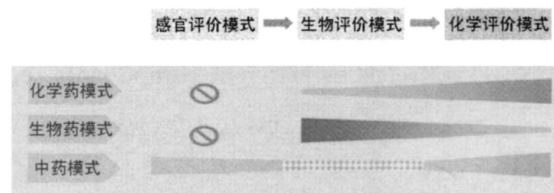


图 1 世界药物质量控制模式发展历程

Fig 1 Development history of quality control pattern for drugs in whole world

对比分析中药、化学药与生物药的生产质量控制管理模式的差异性和合理性(表 1),结果提示:中药近于生物药,而不同于化学药;中药质控模式应“接轨”生物药模式而非化学药模式;生物测定可反映与安全有效直接相关的信息。

表 1 中药与生物药、化学药的质量控制模式

Table 1 Quality control pattern between CMM and biological and chemical medicines

药物类型	药物组分	工艺对组分的影响	内在质量控制模式和效果	《中国药典》生产质量管理模式
化学药	单一成分	不影响	含量测定,可保证安全性、有效性	(1) 原料、半成品和成品非一体化管理 (2) 只载标准,不收工艺
生物药	一类化合物	影响大	生物效价 + 化学含测,可保证安全性、有效性	(1) 原料、半成品和成品一体化管理 (2) 质量标准与制备工艺链合
中药	一类至多类化合物	影响大	定性鉴别 + 定量测定,难以保证安全有效	(1) 原料、半成品和成品非一体化管理 (2) 质量标准与工艺链合

建立以生物评价为手段和指标之一的中药质量标准体系,以补充和完善目前主要基于化学药质控模式的不足,这将是中药质量控制的新的重要发展方向。笔者从 1999 年来一直致力于中药品质的生物评价与控制,初步建立了基于地道药材和生物效价检测的中药质量评价模式和方法^[6,7],并在板蓝

根^[8]、动物角类药材^[9]、黄连、大黄、清开灵注射剂、双黄连注射剂等示范应用研究,取得了较满意的结果。

为了进一步提高中药质控水平,进一步保证中药安全性和有效性,《中国药典》2010 年版一部特别注重中药质控模式的多元化和生物评价手段的应用,并在编写大纲中明确指出,中药的质量标准要逐步由单一指标成分定性定量测定,向活性有效成分及生物测定的综合检测过渡。这体现了今后我国中药质量标准制定的发展方向。

2.2.2 中药质量生物评价与控制的主要技术关键:中药质量生物评价与控制的关键技术问题很多,主要有两大方面:

(1) 适合中药质量控制的生物评价方法的筛选和确定:生物评价方法既要具有定量药理学的基本属性,又要满足药检分析的基本要求,概括起来其方法选择应满足 8 个原则:选择性、准确性、灵敏性、精密度、快捷性、普适性、经济性、安全性^[10,11]。令人遗憾的是,目前同时满足上述要求且适合中药特点的生物评价方法还非常少。

(2) 中药质量控制用对照物质的选择和标化:用于生物评价的对照物质选择必须满足 5 个属性:同质性、均一性、代表性、稳定性、可溯源性^[12,13]。为了既有利于中药质量控制标准制定,同时又有利于临床制定合理用药剂量,可考虑采取双重参照物制,即采用类效化学药和对照药材(道地优质药材)进行双重标化和评价,先以类效化学药的活性或效价标定对照药材(道地优质药材)的活性或效价,再以对照药材(道地优质药材)的活性或效价评价不同中药的活性或效价,即生物品质。类似于时间校对,通常个人时间是以北京时间为基准进行校对,而北京时间又以格林威治时间为基准进行校核。

3 基于成分敲除/敲入的中药药效物质辨识与质量控制模式

随着中药指纹图谱的兴起,谱效关系已成为中药指纹图谱研究的新趋势和新热点,也成为中药药效物质辨识的新的的重要途径^[14,15]。但是,在复杂的谱效关系中,中药化学成分与药效作用之间的相关性存在两重性:有的直接相关,有的间接相关;有的表面相关,有的内在相关;有的或然相关,有的必然相关。

3.1 “敲除/敲入”模式的基本思路与技术路线:如何又快又准地辨识中药化学成分与药效作用之间相关关系的客观真实性,又快又准地锁定中药药效物

质基础,本文提出采取“系统分层筛选”的策略,即溶剂系统分离法结合药效试验,初步确定可代表整体方药药效的有效萃提物;在此基础上,借鉴“基因诊断治疗”(gene diagnosis and gene therapy)策略,以中药谱效关系为切入点,建立基于目标成分“敲除/敲入”的中药谱效关系与量效关系研究模式(图 2),为多快好省地确定中药药效关键物质(主要药效组分和/或药效相关组分)、建立“关联药量,量而又准,可控可评”中药质量标准提供技术手段和科学依据。

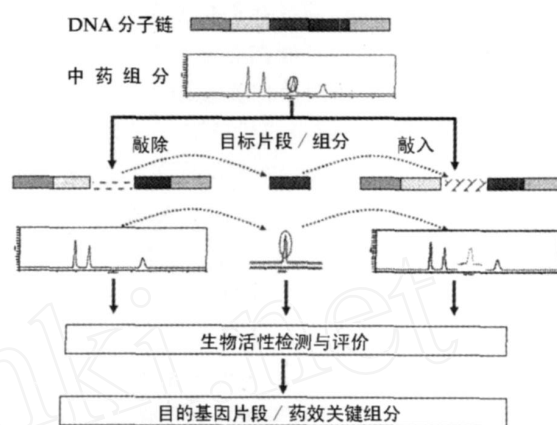


图 2 基于目标成分敲除/敲入的中药药效物质辨识与质量控制模式

Fig 2 Efficient component recognition and quality control for CMM based on constituents knock-out/ knock-in

3.1.1 基于目标成分敲除的中药谱效关系与药效关键组分辨识

(1) 中药谱效关系的一般分析与目标成分的初步确定:在系统分层筛选的基础上,根据有效萃提物化学指纹图谱和药理药效试验指标,定性、定量地分析各个色谱峰与药效的相关性,选取与药效指标相关显著的色谱峰作为目标成分。

(2) 目标成分的敲除与目标成分阴性样品的制备:尽可能地采用无破坏、无残留的快速分离纯化技术,富集目标成分,同时收集敲除该目标成分后的剩余萃提物,即目标成分阴性样品。

(3) 目标成分与目标成分阴性样品的生物等效性试验:采用与方药功效关联性好、观测指标灵敏、操作简便的药理试验模型和方法,对比考察目标成分、目标成分阴性样品与方药总提物的药效作用和毒性及其客观差异。

(4) 药效关键组分(主要药效成分和/或药效相关成分)的确定:根据生物等效性试验结果,可作如下解析和判断:①如果目标成分与方药总提物的药效作用相同或相似,而目标成分阴性样品无效或作

用很弱,则说明该目标成分与药效作用之间存在直接或必然相关,该目标成分为方药的主要药效成分之一。②如果目标成分无效或作用很弱,而目标成分阴性样品与方药总提取的药效作用相同或相似,则提示该目标成分与药效作用之间的没有直接或必然相关,该目标成分不是方药的主要药效成分,尚需进一步在目标成分阴性样品中继续寻找和确定目标成分。③如果目标成分无效或很作用很弱,目标成分阴性样品也无效或作用很弱,但二者合并起来又具有与方药总提物相同或相似的药效作用,说明该目标成分与药效作用之间的存在间接或内在相关,该目标成分为方药的药效相关成分之一。④再重复上述筛查程序,逐次确定或排除各个目标成分是否为方药的主要药效成分和/或药效相关成分。一个方药的主要药效成分和/或药效相关成分统称为药效关键组分,也就是方药的药效物质基础。

3.1.2 基于目标成分敲入的中药量效关系与质量控制标准确定

(1)目标成分的敲入与量效关系表达:中药药效关键物质的确定,同样地采用与方药功效关联性好、观测指标灵敏、操作简便的药理试验模型和方法,对比考察在目标成分阴性样品中,依次加入不同剂量的目标成分后,并以之与方药总提物的药效作用和毒性进行比较,建立量(毒)效关系。

(2)基于目标成分最小有效用量和最大安全用量的方药质量控制标准限量的确定:①为获得与方药总提物相同或相似的药效作用,目标成分阴性样品中所需要加入的目标成分的最低用量即为最小有效用量,这一阈值可作为中药质量标准定量控制的下限。②在获得与方药总提物相同或相似的药效作用的基础上,逐次增加目标成分,当继续增加目标成分而样品的药效几乎没有变化,甚至出现明显不良反应时,此时目标成分的用量就是方药安全有效“治疗窗”的最大用量,这一阈值可作为方药质量标准定量控制的上限。

3.2 “敲除/敲入”模式需要解决的关键技术问题:要实现基于目标成分敲除/敲入的中药药效物质辨识与质量控制模式,必须要有两方面的关键技术作为支撑:①要有高提取率、高回收率、无损、无残留的组分快速分离技术,即一方面要多快好省地获得目标组分,同时对剩余组分要尽可能地保持无损和完整,目前中高压柱色谱系统是一个较好的解决手段之一。②要有与功效关联性好的高效、灵敏、快速的生物评价方法,这种生物评价方法最好既能定量又

能定性,或者说既能从生物效价值又能从生物效应谱方面,系统地评价目标成分与方药整体的相似性和差异性。

3.3 “敲除/敲入”模式的主要适用范围:从理论上讲,基于目标成分敲除/敲入的中药药效物质辨识与质量控制模式可以适应所有方药,但是从实用和操作层面来看,该模式更适用于:①化学本底基本清楚,疗效确切的方药;②基于有效部位中药制剂;③中药注射剂。

3.4 “敲除/敲入”模式的主要特色和优势

3.4.1 中医药特色:该模式始终把方药作为一个整体或系统来考量,目标组分的药效作用始终与方药整体进行等效性(包括生物效应谱和生物效价值)比较,能较好地体现中医药的整体观、系统观以及多成分协同或拮抗作用的特点。

3.4.2 又快又准:该模式可准确、快速地辨识中药谱效关系和量效关系的客观真实性,在此基础上可实现中药(化学)质量标准研究3个转变:从指标性成分测定向关键药效组分测定升华;限量标准从人为主观规定向科学试验推定过渡;质量控制结局从“难关药效,量而不准,难控难评”向“关联药效,量而又准,可控可评”飞跃。

4 结语

综合分析了中药药效物质筛选4种主要模式的优势和劣势,剖析了现行主要指标性成分定性定量检测的中药质量控制模式的问题和不足,强调提出中药质量生物评价与控制是中药标准研究的新的重要方向。

为了探寻中药药效物质筛选与质量控制标准研究的新突破,本文前瞻性地提出基于目标成分“敲除/敲入”的中药药效物质辨识与质量控制模式,以期又快又准地辨识中药药效关键组分、实现中药质量标准“关联药效,量而又准,可控可评”的愿景,提供具有原创性和实用性的研究思路和方法体系。目前该研究模式已示范应用于金银花、黄连、大黄、姜黄、双黄连注射剂、清开灵注射剂等方药,并列入国家重大新药创制专项研究课题。相关研究结果将陆续专文报道。

参考文献:

- [1] 肖小河,肖培根,王永炎. 中药科学研究的几个关键问题[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(02): 119-123.
- [2] 曹俊岭,李寒冰,肖小河. 基于热力学观和还原整合的中药物质基础筛选模式和方法的设想[J]. 中国中药杂志, 2008, 33(7): 863-864.

3 结论与讨论

3.1 岩白菜素易溶甲醇,在乙醇或水中微溶。根据这一特性,在样品溶液制备中以甲醇为提取溶剂。提取方法上,以超声提取和回流提取两种方法作对比,表明用甲醇超声提取较为适宜。通过考察超声提取时间(10、20、30、40、60 min),试验结果表明超声提取 40 min 岩白菜素提取率最高,故确定提取条件为用甲醇超声提取 40 min。实验考察了 4 种不同条件的流动相:(1)甲醇-水(20 :80);(2)甲醇-水(25 :75);(3)甲醇-水(30 :70);(4)甲醇-水(40 :60),进行了系统适用性试验,试验结果表明在实验色谱条件下,以甲醇-水(25 :75)为流动相,体积流量 1.0 mL/min,柱温 25 °C,检测波长 275 nm,供试品中岩白菜素得到较好分离,理论板数达到 2 000,分离度 2.20。

3.2 检测波长的确定,对岩白菜素溶液在 190~400 nm 波长扫描,在波长为 210 和 275 nm 有最大吸收,实验表明在 275 nm 波长处岩白菜素吸收峰灵敏度高,其他色谱峰干扰较小,故选择 275 nm 作为检测波长。

3.3 分别对不同采收期、不同生长年限、不同药用部位红凉伞药材中岩白菜素的量进行了测定。结果表明,不同入药部位红凉伞药材中岩白菜素的量存在较大的差异,其中以根中主要有效成分岩白菜素的量最高,不同部位岩白菜素的量由高到低的顺序为:根、叶、茎、侧枝、果柄、花、果壳、种子,其中,侧枝与茎、果壳与果柄中岩白菜素的量没有明显差异。

一年生长期内岩白菜素在红凉伞中积累动态表明,5 月份红凉伞根、茎、叶中岩白菜素的量最高,以后逐渐下降,建议 5 月份为红凉伞药材采收期。

不同生长年限红凉伞中岩白菜素的量存在较大的差异,思茅地区的三年生红凉伞根、茎、叶中岩白菜素的量高于一年生、二年生栽培的红凉伞,但多年生栽培的根、茎、叶中岩白菜素的量较低(同一采收期)。由于样品数量有限,该问题有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 中国药典[S].一部.2005.
- [2] 赵亚,刘合刚.紫金牛属植物研究近况[J].中草药,1999,30(3):228.
- [3] 张艺,赖先荣,孟宪丽.紫金牛属药用植物中岩白菜素的高效液相色谱法测定及资源利用[J].中国中药杂志,1996,21(8):458.

(上接第 1348 页)

- [3] 曹俊岭,李祖伦,付强,等.中药及复方整合作用的研究[J].中草药,2007,38(1):附2-附4.
- [4] 方艺霖,张艺,肖小河,等.细胞膜色谱技术用于中药活性成分筛选的研究进展[J].中草药,2008,39(7):附3-附5.
- [5] 朱伟,陈可冀,徐筱杰.计算机药物虚拟筛选技术在中医药领域中的应用前景[J].中国中西医结合杂志,2007,29(3):263-266.
- [6] 肖小河,金城,赵中振,等.论中药质量控制与评价模式的创新与发展[J].中国中药杂志,2007,32(14):1377-1381.
- [7] 王伽伯,李会芳,肖小河,等.生物检定方法控制中药质量的思考[J].世界科学技术-中药现代化,2007,9(6):36-39.
- [8] 赵艳玲,王伽伯,肖小河,等.微量热法研究板蓝根的生物热力学特征[J].中草药,2007,38(2):193-196.
- [9] 鄢丹,周丹蕾,唐慧英,等.角类动物药质量控制模式与方法创新和发展[J].中草药,2009,40(5):673-676.
- [10] 李寒冰,鄢丹,金城,等.基于化学荧光测定的板蓝根抗病毒效价检测方法的建立[J].光谱学与光谱分析,2009,29(4):908-910.
- [11] 李寒冰,鄢丹,王伽伯,等.基于神经氨酸酶活性检测的板蓝根品质生物评价的研究[J].药学报,2009,44(2):162-166.
- [12] Yan D, Xiao X H, Jin C, et al. Microcalorimetric investigation of the effect of berberine alkaloids from *Coptis chinensis* Franch on *Staphylococcus aureus* growth[J]. Sci China Ser B-Chem, 2008, 51(7):640-645.
- [13] 李寒冰,鄢丹,曹俊岭,等.中药生物效价检测用对照品的选择与标化[J].中国中药杂志,2009,34(3):363-365.
- [14] Wei J K, Yan L Z, Li M S, et al. Investigation on the spectrum-effect relationships of EtOAc extract from *Radix Isatidis* based on HPLC fingerprints and microcalorimetry[J]. J Chromatogr B, 2008, 871:109-114.
- [15] 孔维军,赵艳玲,山丽梅,等.左金丸及类方 HPLC 指纹图谱与生物热活性的“谱-效”关系研究[J].化学学报,2008,66(22):3533-3538.