

## • 药理与临床 •

## 从茜草素的超分子印迹作用探讨中药归经体外研究方法

廖琼<sup>1</sup>, 杨岩涛<sup>1</sup>, 刘志刚<sup>1</sup>, 胡超<sup>1</sup>, 唐宇<sup>1</sup>, 刘文龙<sup>1</sup>, 邓凯文<sup>5\*</sup>, 贺福元<sup>1,2,3,4\*</sup>

1. 湖南中医药大学药学院, 湖南 长沙 410208
2. 中药药性与药效国家中医药管理局重点实验室, 湖南 长沙 410208
3. 湖南中医药大学 现代中药制剂制备技术与评价实验室, 湖南 长沙 410208
4. 湖南中医药大学 中医药超分子机理与数理特征化实验室, 湖南 长沙 410208
5. 湖南中医药大学第一附属医院, 湖南 长沙 410007

**摘要:** **目的** 基于超分子印迹模板自主识别理论, 以茜草素为印迹模板功能单体进行猪不同组织的体外亲和色谱实验, 验证茜草素归肝经机制, 为创立中药归经体外研究方法奠定基础。 **方法** 将猪的肝、肺、舌、腹部肌肉、腿部肌肉等组织作固定相制成色谱柱, 以 PBS 为流动相, 进行归肝经的茜草素与归脾经的白砂糖 (阴性对照) 体外亲和色谱实验, 采用 HPLC 测定各洗脱液中茜草素的量, UV 法测定阴性对照组各洗脱液中葡萄糖的量, 采用总量统计矩分析法获得各亲和色谱参数, 获得色谱方程。 **结果** 茜草素在肝、肺、舌、腹部肌肉、腿部肌肉的色谱参数为  $C_0$ : 0.250 9~4.813 mg/mL; AUC: 2.509~48.13 mg;  $V_R$ : 20.42~30.77 mL;  $\sigma^2$ : 282.6~532.7 mL<sup>2</sup>;  $H$ : 14.13~26.63 mL;  $n$ : 1.212~1.777;  $S$ : 0.759 0~1.000。肝脏对茜草素的吸附性最强, 腹部肌肉、腿部肌肉、肺、舌对茜草素的吸附作用依次减弱。阴性对照组中, 肝脏对葡萄糖的吸附性并非最强。 **结论** 猪的肝器官对茜草素的吸附最大, 两者存在超分子印迹模板亲合作用, 这与茜草素归肝经理论相吻合, 由此可建立中药归经的体外初步研究方法。

**关键词:** 超分子; 印迹模板; 肝经; 亲和色谱; 茜草素; 中药归经

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2015)22-3364-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2015.22.013

## Exploration of *in vitro* channel tropism research methods of Chinese materia medica by supramolecular imprinting function of alizarin

LIAO Qiong<sup>1</sup>, YANG Yan-tao<sup>1</sup>, LIU Zhi-gang<sup>1</sup>, HU Chao<sup>1</sup>, TANG Yu<sup>1</sup>, LIU Wen-long<sup>1</sup>, DENG Kai-wen<sup>5</sup>, HE Fu-yuan<sup>1,2,3,4</sup>

1. Department of Pharmaceutics, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China
2. Key Laboratory of Property and Pharmacodynamics, State Administration of Chinese Medicine, Changsha 410208, China
3. Pharmaceutical Preparation Technology and Evaluation Laboratory of Chinese Materia Medica, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China
4. Supramolecular Mechanism and Mathematics-Physics Characterization Laboratory for Chinese Materia Medica, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China
5. The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China

**Abstract: Objective** Based on supramolecular imprinting template self-recognition theory, to lay the foundation for the *in vitro* channel tropism research methods of Chinese materia medica (CMM). Using alizarin as imprinting template feature monomer, *in vitro* affinity chromatography of different pig organs was performed to test the mechanism of alizarin belonging to the liver meridian. **Methods** The liver, lungs, tongue, abdominal muscle, leg muscle groups, and other tissues of pigs, as stationary phases, were made into

收稿日期: 2015-03-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81173558, 81270055); 国家博士点基金项目 (20124323110002); 教育厅重点项目 (14A108); 湖南省中医药管理局项目 (201494)

作者简介: 廖琼 (1989—), 女, 硕士在读, 研究方向为中药制剂及其质量控制的研究。E-mail: 18613963567@163.com

\*通信作者 邓凯文, 副主任医师, 主要从事中医针灸内科、中药归经、中药和针灸联合应用研究。

贺福元 (1965—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事中药药理学、中成药分析、遗传中药药理学、生物药剂学及中医药信息研究。Tel: (0731)5381372 E-mail: pharmsharking@tom.com

column chromatography. Using PBS as the mobile phase, *in vitro* affinity chromatography experiments with alizarin belonging to the liver meridian and white sugar belonging to the spleen meridian were conducted, the content of eluent alizarin was measured by HPLC and the content of sugar was measured by UV. By using the analysis of total statistical moment, the various chromatographic parameters and chromatography equations were obtained. **Results** The chromatographic parameters for the alizarin in liver, lungs, tongue, abdominal muscles, leg muscles were as following:  $C_0$ : 0.250 9—4.813 mg/mL; AUC: 2.509—48.13 mg;  $V_R$ : 20.42—30.77 mL;  $\sigma^2$ : 282.6—532.7 mL<sup>2</sup>;  $H$ : 14.13—26.63 mL;  $n$ : 1.212—1.777;  $S$ : 0.759 0—1.000. In the positive control group, the adsorption capacity of liver for alizarin was the strongest, and abdominal, leg, lungs, and tongue were weakened in turn. While in the negative control group, the adsorption capacity of liver for glucose (white sugar) was not the strongest. **Conclusion** The adsorption capacity of liver for alizarin is the strongest, and liver has an affinity for alizarin by the super molecular imprinting templates, and it matches the theory of meridian belonging to the liver, which would establish the *in vitro* channel tropism preliminary research methods of CMM.

**Key words:** supramolecular; imprinting template; liver meridian; affinity chromatography; alizarin; channel tropism

中药归经理论历史悠久, 长期指导中医临床用药。“归”有走向、归属的涵义, 是定向、定位的概念。“经”宜用“经脉”表达为好, 既包括经络, 也包括脏腑及脏腑病变证候群<sup>[1]</sup>。经络学说是中医学基础理论的核心内容, 在中医临床诊断、治疗、保健等方面起着重要的指导作用, 其本质目前尚未完全阐明<sup>[2-8]</sup>, 针对目前研究成果而言, 经络是人体结构的一部分, 由已知的神经、血管、淋巴管、体液等, 以及目前尚未知的诸多因素共同构成的复合功能系统<sup>[9]</sup>, 是附着于筋膜组织, 借助神经、血管、淋巴管, 调整人体机能的网状结构<sup>[10]</sup>。本课题组前期已将超分子化学引入中医药理论研究, 从理论上初步阐明了经络产生的本质规律并提出中药归经的超分子印迹模板自主识别的假说<sup>[11]</sup>。作为生物体的人体与中药可以看成是一个由单分子、超分子、聚合超分子及巨复超分子构成的复杂体系。在由小分子构成整个人体有序超分子过程中, 其超分子主体保留了客体小分子的印迹模板, 形成孔穴通道结构与外界发生化学反应, 进行物质能量联系, 否则生命现象难以继。当人体的各类小分子在心脏搏血功能的推动下, 人体各组织器官的主体分子对客体小分子表现出机体结构的各向异性作用, 亦“气析”现象。水为洗脱剂, 溶于水的各类客体分子与组织器官主体分子的孔穴通道产生印迹作用, 包括分子筛、离子交换、吸附、分配与亲合色谱等各种形式, 体现出共印迹模板特征的“气析”现象, 亦经络脏腑现象。其结果是与组织器官印迹模板相吻合的分子产生作用, 而不吻合的分子就难以产生作用。因此, 具有与之相同或相似的印迹模板中药分子便构成了中药有效成分; 中药有效成分与经络脏腑的印迹作用便形成了中药药性理论和功效; 中药归经的物质基础是与经络脏腑共印迹模板功能单

体的成分群。猪与人的同源性达到 84%, 猪的许多器官已被作为临床医学操作的前期训练对象, 且成本合理<sup>[12]</sup>。鉴于此, 本研究先从体外实验着手, 选择仅归肝经的茜草中的代表性成分茜草素为模型药物, 进行猪不同器官体外印迹模板亲合色谱实验, 旨在探讨各脏器印迹模板孔穴对茜草素的选择性自主识别规律, 验证假说, 创立中药归经研究体外新方法, 也为后续的经络脏腑的微观物质基础研究奠定基础。本实验中药归经理论中的脏腑经络与机体的组织脏器虽不完全相同, 但具有一定相似性, 例如期门穴为足厥阴肝经穴, 是肝之募穴, 而隶属于肝脏, 故本实验从研究组织器官入手, 以期寻找中医经络脏腑理论的微观物质基础探索一条可行之路。

## 1 材料

### 1.1 药物与试剂

0.01 mol/L PBS 缓冲液 (自制, 每升蒸馏水加入 NaCl 8.00 g、KCl 0.20 g、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.44 g、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.24 g, 充分溶解); 台氏液 (自制, 每升蒸馏水加入 NaCl 8.0 g、KCl 0.2 g、CaCl<sub>2</sub> 0.2 g、NaHCO<sub>3</sub> 1.0 g、NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.05 g、MgCl<sub>2</sub> 0.1 g、葡萄糖 1.0 g, 充分溶解)。茜草素 (批号 AJ0725LC14, 上海源叶生物科技有限公司); 白砂糖 (一级)、葡萄糖对照品 (国药集团化学试剂有限公司); 甲醇、乙腈为色谱纯; 超纯水; 其他试剂均为分析纯。

### 1.2 主要仪器

Waters 高效液相色谱仪, Waters1500 泵, Waters 2487 双波长检测器, Breeze 工作站 (美国 Waters 公司); Adventure 分析天平 (美国 Ohaus 公司); TU-1990 型紫外分光光度仪 (北京普析通用仪器有限公司); DZF-6050 型真空干燥箱 (上海精宏实验设备有限公司)。

### 1.3 动物材料

新鲜的猪肝、肺、舌、腿部肌肉、腹部肌肉等。实验动物许可证编号 43006700003434。

## 2 方法

### 2.1 组织器官的处理

分别取适量的新鲜猪肝、肺、舌、腹部肌肉、腿部肌肉于烧杯中，绞碎，加适量的台氏液浸泡，每隔 6 h 换 1 次台氏液，浸泡到肉呈白色，整个浸泡过程烧杯置于 3 °C 冰箱中。

### 2.2 茜草素 PBS 液与白砂糖 PBS 液的配制

取 1.25 g 茜草素与白砂糖分别于烧杯中，加入适量 PBS 缓冲液溶解，分别转移至 50 mL 量瓶中，用 PBS 液定容，配成 25 mg/mL 的茜草素 PBS 液与 25 mg/mL 的白砂糖 PBS 液。

### 2.3 装柱（湿法装柱）

取 15 根洁净的玻璃柱（规格 200 mm × 10 mm），分别加入适量的 PBS 缓冲液，再分别加入 10 g 浸泡过且已绞碎了的猪肝、肺、舌、腹部肌肉、腿部肌肉组织，装柱（每种组织各装 3 根玻璃柱）。

### 2.4 色谱柱洗脱

阳性对照：用移液枪吸取 2 mL 茜草素 PBS 液，加入到装好的 5 根色谱柱（柱温 10 °C，分别装有猪肝、肺、舌、腹部肌肉、腿部肌肉），用 PBS 液洗脱调节色谱柱的体积流量（约 2 h 收集 10 mL 的洗脱液）。用 25 mL 的锥形瓶收集洗脱液，每个锥形瓶收集 10 mL，依次编号。收集的第 1 瓶肝洗脱液为肝 1，第 2 瓶肝洗脱液为肝 2，依次类推，肝得到 8 个样品；同样收集的第 1 瓶肺洗脱液为肺 1，依次类推，每组均共收集 80 mL 的洗脱液，即每组均有 8 个样品；阴性对照：用移液枪吸取 2 mL 白砂糖 PBS 液，其他步骤同阳性对照；空白对照：用移液枪吸取 2 mL 的 PBS 液，其他步骤同阳性对照。

### 2.5 洗脱液的处理

阳性对照：将洗脱液用乙醚萃取，每个锥形瓶中含洗脱液 10 mL，分别用 10 mL 乙醚萃取 3 次，合并 3 次萃取的有机相（乙醚层）于锥形瓶中，弃去水相，挥净乙醚，加入 400 μL 的甲醇溶解。再用有机针式滤器滤过，将滤液收集于 0.5 mL 的 EP 管中作为供试品溶液备用。阴性对照与空白对照：各组取 2 mL 洗脱液用有机针式滤器滤过，将滤液收集于 2 mL 的 EP 管中作为供试品溶液备用。

### 2.6 对照品溶液的制备

精密称取对照品茜草素 10 mg，加甲醇，定容

至 100 mL，滤过，得质量浓度为 100 μg/mL 茜草素对照品溶液；精密称取 105 °C 干燥至恒定质量的葡萄糖 100.4 mg，置 100 mL 量瓶中，加蒸馏水溶解，定容得 1.004 mg/mL 葡萄糖对照品溶液。

### 2.7 茜草素的 HPLC 法测定<sup>[13]</sup>

色谱条件：Ultimat XB-C<sub>18</sub> 色谱柱（250 mm × 4.6 mm，5 μm）；流动相为甲醇-乙腈-0.2% 磷酸水溶液（25：50：25），检测波长为 270 nm，体积流量 1.0 mL/min。经方法学考察，重复性、精密度、稳定性、回收率均符合定量要求，茜草素对照品的标准曲线为  $Y=2.015 \times 10^3 X+1.284 \times 10^4$  ( $r=0.9996$ )，线性范围为 28.70~2 870.00 μg/mL。

精密吸取茜草素对照品（茜草素 PBS 液）及阳性对照各供试品溶液，进样 20 μL，测得 HPLC 图谱，见图 1，茜草素的保留时间为 4.80 min。

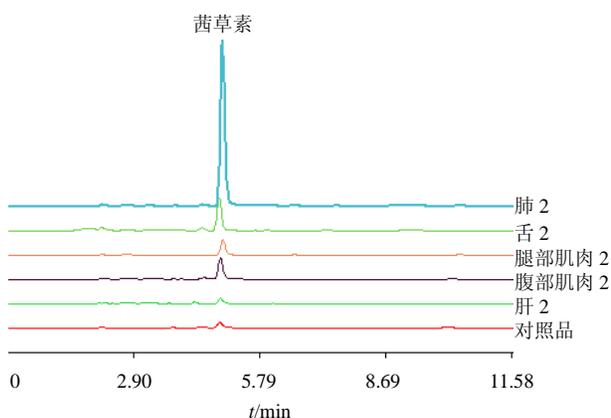


图 1 茜草素对照品及阳性供试品 HPLC 图

Fig. 1 HPLC of flavopurpurin substance and positive samples

### 2.8 改良差示酚磺法测定葡萄糖的量<sup>[14]</sup>

2.8.1 标准曲线的制备 精密吸取葡萄糖对照品溶液 0.05、0.1、0.5、1、5 mL 于 5.0 mL 量瓶中，加蒸馏水至刻度，摇匀得系列对照品溶液。分别取对照品溶液 1 mL，加 1 mL 5% 苯酚水溶液，摇匀即刻加入 5 mL 浓硫酸，振荡摇匀，于沸水浴中加热 20 min，取出冷却至室温补加 1 mL 蒸馏水，混匀后加热 10 min，冷却至室温后，用双光束紫外可见分光光度计进行全波长扫描，在 488.5 nm 处吸光度 (A) 值最大，并于 488.5 nm 处测定得 A<sub>1</sub>。以 1 mL 蒸馏水代替对照品溶液，后续操作同上，作为空白对照。

另取不同质量浓度葡萄糖对照品溶液 1 mL，加 1 mL 蒸馏水，混匀，加 5 mL 浓硫酸，振荡混匀，于沸水浴中加热 20 min，取出冷却至室温，加入 5% 苯酚水溶液 1 mL，混匀后加热 10 min，冷却至室

温, 用双光束紫外可见分光光度计进行全波长扫描, 在 488.5 nm 处 A 值最大, 并于 488.5 nm 处测定得 A<sub>2</sub> 值 (空白同上), 以 ΔA (A<sub>1</sub> 与 A<sub>2</sub> 的差值) 为纵坐标 (Y), 以对照品质量浓度为横坐标 (X), 绘制标准曲线, 得回归方程为 Y=4.395 7 X+0.054 4 (r=0.997 4), 葡萄糖质量浓度在 10.04~1 004.00 μg/mL 线性关系良好。

**2.8.2 精密度试验** 精密吸取 1.004 mg/mL 葡萄糖对照品 1 mL 于具塞试管中, 按照“2.8.1”项依法连续测定 5 次, 得到 A 值的 RSD 为 0.339 3%。

**2.8.3 重复性试验** 取同一批供试品 6 份, 按照“2.8.1”项方法测定 A 值, 得 RSD 为 1.61%。

**2.8.4 稳定性试验** 取同一样品, 分别在 0、2、4、6、8 h 按照“2.8.1”项方法测定, 4 h 内 RSD 值为 2.21%, 说明样品在 4 h 内稳定性好。

**2.8.5 加样回收率试验** 分别精密移取供试品 0.5 mL 于 3 支具塞试管中, 分别加入 1.004 mg/mL 葡萄糖对照品溶液 100、150、200 μL, 再分别加入 400、350、300 μL 蒸馏水, 平行实验 3 次。按“2.8.1”项下操作, 在 488.5 nm 的波长下测定其 A 值, 并计算回收率, 结果葡萄糖的平均回收率为 103.2%, RSD 为 2.16%。

**2.8.6 供试品溶液的测定** 取供试品溶液 1.0 mL, 按照“2.8.1”项下的处理方法, 测定各样品的 A 值, 计算阴性样品中葡萄糖的量。

### 2.9 亲和色谱动力学参数计算

运用总量统计矩计算色谱学参数。由色谱学理论可知成分在色谱柱的迁移动力学方程为:

$$C = \frac{C_0}{\sigma\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{(V-V_R)^2}{2\sigma^2}} \quad (1)$$

根据统计矩原理<sup>[15]</sup>可计算色谱动力学参数。

①阶距: 洗脱液中茜草素浓度曲线下面积, 可用式 (2) 计算。

$$AUC = \int_0^\infty C dV = \sum_{i=1}^n C_i (V_i - V_{i-1}) \quad (2)$$

C<sub>i</sub> 表示第 i 体积段的洗脱液中茜草素质量浓度, V<sub>i</sub> 表示第 i 段体积

②一阶距: 为平均滞留体积, 即式 (1) 中的 V<sub>R</sub>, 可用式 (3) 计算。

$$V_R = \frac{\sum_{i=1}^n C_i V_i (V_i - V_{i-1})}{AUC} \quad (3)$$

③二阶距: 为平均滞留体积的方差, 即式 (1) 的 σ<sup>2</sup>。可用式 (4) 计算。

$$\sigma^2 = \frac{\sum_{i=1}^n V_i^2 C_i (V_i - V_{i-1})}{AUC} - V_R^2 \quad (4)$$

④塔板高度 (H) 与理论塔板数 (n): 根据色谱法理论<sup>[16]</sup>可用式 (5)、(6) 计算。

$$H = \frac{\sigma^2}{L} \quad (5)$$

L 为柱长, 均为 20 cm

$$n = \left( \frac{V_R}{\sigma} \right)^2 \quad (6)$$

总量统计矩相似度 (S) 按文献公式计算<sup>[17]</sup>。

## 3 结果

### 3.1 阳性对照各组织洗脱液中茜草素的质量浓度

结果见表 1。可知, 茜草素在肝、肺、舌、腹部肌肉、腿部肌肉组织中吸附达饱和后, 才随洗脱液洗脱出来, 故洗脱液中茜草素的质量浓度在洗脱早期最高, 随着洗脱时间的推移, 越来越低。对于舌组织先降低后升高的特殊情况, 可能由于舌对茜草素瞬间解吸造成的, 也有可能是由温度条件以及实验时间过长导致舌组织细胞功能减退造成的。

### 3.2 阴性对照组与空白对照组各组织洗脱液中葡萄糖的质量浓度

阴性对照组与空白对照组各组织前 4 号洗脱液中均能检测到葡萄糖, 从第 5 号洗脱液 (40~50 mL) 开始已经检测不到葡萄糖, 具体前 4 号洗脱液中葡萄糖质量浓度见表 2。

表 1 阳性对照各组织洗脱液中茜草素的质量浓度

Table 1 Concentration of alizarin in different eluate volumes for each organ of positive control group

组织	不同洗脱液中茜草素质量浓度/(mg·mL <sup>-1</sup> )							
	0~10 mL	10~20 mL	20~30 mL	30~40 mL	40~50 mL	50~60 mL	60~70 mL	70~80 mL
肝	0.066 7	0.038 7	0.033 9	0.026 8	0.021 0	0.023 8	0.023 4	0.016 6
肺	1.074 0	0.912 7	0.614 5	0.214 6	0.187 9	0.122 6	0.098 3	0.042 7
舌	2.447 0	0.185 6	0.140 9	0.440 4	0.559 1	0.768 8	0.193 9	0.076 6
腹部肌肉	0.170 3	0.143 1	0.095 5	0.076 2	0.040 7	0.035 0	0.026 9	0.023 2
腿部肌肉	0.286 0	0.177 3	0.094 6	0.081 3	0.057 7	0.036 1	0.025 1	0.024 2

表 2 阴性对照组与空白对照组各组织洗脱液中葡萄糖的质量浓度

Table 2 Concentration of glucose in eluate volume for each organ of negative control and blank control groups

组别	组织	不同洗脱液中葡萄糖的质量浓度/(mg·mL <sup>-1</sup> )			
		0~10 mL	10~20 mL	20~30 mL	30~40 mL
阴性对照	肝	0.849 60	0.164 20	0.171 90	0.132 77
	肺	0.840 30	0.099 30	0.033 35	0.082 94
	舌	0.837 10	0.104 80	0.011 06	0
	腹部肌肉	0.829 10	0.081 81	0.019 02	0
	腿部肌肉	0.842 60	0.069 50	0.014 47	0
空白对照	肝	0.182 40	0.130 50	0.120 70	0.073 62
	肺	0.105 90	0.052 23	0	0
	舌	0.121 80	0.076 80	0.005 38	0
	腹部肌肉	0.057 01	0.047 23	0	0
	腿部肌肉	0.136 40	0.027 89	0.007 43	0

### 3.3 亲和色谱动力学参数

根据式(1)~(6)计算可得各组织对茜草素和葡萄糖的亲合色谱参数,结果见表3。将C<sub>0</sub>、V<sub>R</sub>、σ带入式(1),可得肝、肺、舌、腹部肌肉、腿部肌肉的亲合色谱方程,见表4。

由表3可知,阳性组中茜草素在肝的C<sub>0</sub>、AUC最小,而V<sub>R</sub>、σ<sup>2</sup>、H与n均最大。肝、肺、舌、腹部肌肉、腿部肌肉的C<sub>0</sub>、AUC有显著性差异,其RSD值为93.4%。结果表明肝脏对茜草素的亲合能力最大,共印迹模板的可能性最大,而肺的C<sub>0</sub>最大,其他参数最小,说明肺与茜草素的亲合能力最差;其他的组织介于两者之间。由总量统计矩的整体相似度分析可知:舌与肝的洗脱过程最相似,其次为腹部肌肉、腿部肌肉、肺。阴性对照组中舌的C<sub>0</sub>、AUC最小;肺的V<sub>R</sub>、σ<sup>2</sup>、H与n最大;肝、肺、舌、腹部肌肉、腿部肌肉的C<sub>0</sub>、AUC差异不大,

表 3 茜草素和葡萄糖在不同组织体外亲和色谱参数

Table 3 Affinity chromatographic parameters of alizarin and glucose *in vitro* for each organ

组别	组织	体外亲合色谱参数						
		C <sub>0</sub> /(mg·mL <sup>-1</sup> )	AUC/mg	V <sub>R</sub> /mL	σ <sup>2</sup> /mL <sup>2</sup>	H/mL	n	S*
阳性对照	肝	0.250 9	2.509	30.770	532.700	26.63 0	1.777 0	1.000 0
	肺	3.267 0	32.67	20.420	282.600	14.13 0	1.476 0	0.759 0
	舌	4.813 0	48.13	24.880	510.900	25.54 0	1.212 0	0.897 1
	腹部肌肉	0.610 9	6.109	25.040	391.000	19.55 0	1.604 0	0.876 4
	腿部肌肉	7.823 0	7.823	22.150	370.900	18.54 0	1.323 0	0.824 0
阴性对照(扣除空白)	肝	0.811 2	8.112	8.865	80.080	4.004 0	0.981 4	1.000 0
	肺	0.897 8	8.978	9.039	86.940	4.347 0	0.939 8	0.996 3
	舌	0.749 0	7.490	5.526	6.496	0.324 8	4.700 0	0.254 0
	腹部肌肉	0.825 7	8.257	5.880	12.630	0.631 4	2.737 0	0.332 0
	腿部肌肉	0.754 9	7.549	5.738	8.701	0.435 0	3.784 0	0.286 2

\*由总量统计矩相似度计算得到

\*obtained by the similarity calculating of the total statistical moment

表 4 猪的肝、肺、舌、腹部肌肉、腿部肌肉组织亲和色谱曲线方程

Table 4 Affinity chromatographic curve equations for liver, lung, tongue, abdominal and leg muscle of pigs

组织	亲合色谱方程	
	阳性对照	阴性对照(扣除空白)
肝	$C=0.043 4 e^{-0.000 938 6 (V-30.77)^2}$	$C=0.361 7 e^{-0.006 244 (V-8.865)^2}$
肺	$C=0.775 5 e^{-0.001 769 (V-20.42)^2}$	$C=0.384 2 e^{-0.005 751 (V-0.005 751)^2}$
舌	$C=0.849 7 e^{-0.000 978 7 (V-24.88)^2}$	$C=1.1730 e^{-0.076 97 (V-5.526)^2}$
腹部肌肉	$C=0.123 3 e^{-0.001 279 (V-25.04)^2}$	$C=0.927 1 e^{-0.039 59 (V-5.880)^2}$
腿部肌肉	$C=0.162 1 e^{-0.001 348 (V-22.15)^2}$	$C=1.0210 e^{-0.057 46 (V-5.738)^2}$

其 RSD 值为 7.50%；结果表明肝脏与葡萄糖的亲能力和能力比舌强，但弱于肺；5 种组织与葡萄糖的亲能力和能力无显著性差异。由总量统计矩的整体相似度分析可知：肝与肺的洗脱过程非常相似，舌、腹部肌肉、腿部肌肉非常相似，但与肝、肺有一定差异。综合上述分析可知，肝器官对茜草素存在超分子印迹模板亲合作用。

#### 4 讨论

亲和色谱是以与被分离物质结构相吻合的大分子物质作固定相进行色谱分离，包括抗体抗原<sup>[18]</sup>、细胞膜、生物膜等亲和色谱，本实验是根据超分子化学的印迹模板的吻合性而设计的亲和色谱，当两者在分子孔穴空间上能产生有利的互补锁钥关系时，被分离物质的流出量最小，保留时间扩大，色谱峰扩散，因此采用体外亲和色谱实验，运用总量统计矩法处理色谱参数，分析各组织对成分的色谱图相似程度，从体外可以建立中药成分的归经分析方法。

近年来，超分子的印迹理论已用于中药成分提取分离、分析与活性成分的筛选，但没有用于解释与研究中医药基础理论，其所具有的独特优势还远没有引起人们的重视。本项目组成员前期用超分子化学诠释了中医药理论的微观物质基础运行规律，其中重要的内容是怎样创立体内外中药归经研究方法。对于体外可采用印迹模板亲合色谱法进行研究；对于体内可采用“穴药”法进行研究。体外实验的原理是利用器官组织细胞间的印迹模板空穴结构与药物分子进行锁钥关联性研究；体内可利用相似印迹模板的脏腑（为细胞间一定分子空间结构的水通道）与相似的印迹模板中药成分产生体内印迹，宏观上表现“气析”，这种作用能被针刺特异性的腧穴改变，易采用针药并用的“穴药”法进行研究，两者结合就能创立较完整的中药归经研究方法。

本实验受脏器固定相制备方法、药物成分的亲水性、温度、实验环境等众多因素的影响，在进行实验时应严格控制实验环境与实验条件，同时要确保各组织器官的新鲜。由于本实验是离体性体外实验，与体内实验还存在一定差异，为此本实验室将进行体内、体外实验相关性研究，以验证体外实验结果的准确性。综上所述，通过体外超分子印迹模板自主识别规律的研究，将有望揭示中医经络脏腑理论的微观物质基础。

#### 参考文献

- [1] 黄璐明, 唐仕欢. 中药归经理论的概念渊源和内涵探析 [J]. 中医杂志, 2009, 50(8): 680-682.
- [2] 胡祥龙, 包景珍, 马廷芳. 中医经络现代研究 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1990.
- [3] 张涛, 杭群. 针灸现代研究与临床 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1998.
- [4] 赵宴, 史文春, 王会生, 等. 神经肽 A 与经络信息的传递 [J]. 西安医科大学学报, 1997, 18(2): 149-151.
- [5] 承焕生, 何文权, 陈尔瑜, 等. 用 PIXE 研究经络穴位元素浓度的异常分布 [J]. 核技术, 1999, 22(8): 494-499.
- [6] 朱兵. 经络磁特性的实验证明 (续五) [J]. 国外医学: 中医中药分册, 1994, 16(5): 20-23.
- [7] 汪培清, 胡翔龙, 许金森. 人体体表督脉与任脉的红外辐射轨迹显示的探讨 [J]. 中国临床康复, 2003, 7(9): 1379-1380.
- [8] 李定忠. 经络可能是植物神经末梢结构上的一种特殊联系 [J]. 中医药研究参考, 1975, 15(7): 12-13.
- [9] 范郁山, 曾绍球. 经络与血管关系纵横谈 [J]. 中医学刊, 2004, 22(8): 1541-1542.
- [10] 郑利岩. 经脉似附着于一定组织上的功能带 [J]. 中国针灸, 2001, 21(1): 35-36.
- [11] 贺福元, 周逸群, 邓凯文, 等. 超分子化学对中医药理论的特殊影响 [J]. 中国中药杂志, 2014, 39(8): 1534-1543.
- [12] 张维波, 王广军, 田宇瑛, 等. 论针灸经络研究的模式生物——“疾病动物模型学术及战略研讨会”参会 [J]. 针刺研究, 2014 (6): 512-514.
- [13] 林文华, 朱喜梅, 严萍, 等. 茜草中大叶茜草素、羟基茜草素含量测定方法优化的实验研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2014, 25(3): 345-348.
- [14] 魏舒畅, 王继龙, 李昶, 等. 改良差示酚磺法测定红芪粗多糖的方法研究 [J]. 中成药, 2013, 35(3): 634-636.
- [15] 贺福元, 周宏灏, 邓凯文, 等. 指纹图谱的一种定性定量研究新方法: 总量统计矩分析法 [J]. 药学报, 2008, 4(2): 195-201.
- [16] 李发美. 医药高效液相色谱技术 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1999.
- [17] 贺福元, 邓凯文, 黄胜, 等. 总量统计矩标准相似度数学模型的建立及应用研究 [J]. 药学报, 2013, 48(9): 1453-1458.
- [18] 屈会化, 赵琰, 王庆国. 中药小分子单克隆抗体技术平台的构建 [J]. 中草药, 2014, 45(7): 895-899.