

中药复方药效物质基础的研究方法与技术*

□ 徐 青 肖红斌 梁鑫淼

(中国科学院大连化学物理研究所 大连 116011)

摘 要：中药复方化学物质基础的研究和药效模型的建立是中药现代化的关键问题。本文利用现代高效色谱方法及其联用技术对中药全成分范畴进行系统分离和分析,并结合药理实验,以阐明起作用的主要组成或成分,进一步利用制备色谱重组,对这些组分或成分进行药效验证和配伍优化。

关键词：中药复方 物质基础 色谱 联用技术 高效液相制备色谱 药理实验

一、引 言

中医药学从整体着眼,针对功能,采取多途径的整合调节性治疗,即“调整阴阳,以平为期”。这种治疗思想对防治不良生活方式引起的疾病和养生保健都具有明显优势。但是中医缺乏对药效物质的微观分析和作用规律的科学阐释,影响了进一步发展和在世界范围内的应用。但中药治病必有其根本的化学物质基础,深入研究方剂的药效物

质提取、分离、鉴定的先进技术和方法,以及它对人体多途径、多靶点的整合调节作用规律和机理,是中药现代化的关键问题,并从分子水平来认识和阐明复方证候的微观机理。这一方面结合中医证候理论和中药复方配伍规律,另一方面还要利用最先进的仪器分析手段以及分子生物学的最新成果,进行深入研究,探明其作用的化学物质基础(多组分)及其作用的靶点(多靶点)和作用机理。随着以色谱、质谱为代

表的各种仪器分析、分离手段和计算机技术的迅速发展,采用以液相色谱为主的各种高效色谱方法及其联用技术并结合可定量化的分子生物学手段,阐明中药复方药效物质基础已成为可能和必然。我们对中药整体和其切割部位进行比较研究,切去无效部位,将能代表全成分的有效部位继续进行切割研究至不能切割为止,去粗存精,逐步优化重组,形成精简的方剂,并依此弄清其主要成分及其相应的每一成分的含

* 本文部分内容为国家“973”资助项目——“方剂关键科学问题的基础研究”。

量比例,为符合国际标准的新型优化重组药物的创制提供科学依据。

二、研究中药复方药效物质基础的基本思路

1. 寻找中药活性组成群是药效物质基础的核心内容

中药活性成分的研究已有大量的积累,如青蒿素、紫杉醇、 β -榄香烯等等,有的已开发成新药用于临床,然而这是远远不够的。这仅仅是将中药中极小的一部分作为可利用资源用西医的模式来开发,这类活性天然化合物和以它为先导化合物进行结构修饰后的产品对于一些疾病有特殊的疗效,也能达到创制新药的目的,但“头痛医头,脚痛医脚”的模式仍未改变,治标不治本,可能复发,而且有毒副作用,没有体现中药多组分的协同作用。我们试图从总提取物、部位、组分到成分多层次逐级寻找活性分子群的最佳组合,有效分子群的发现、分离、分析鉴定,是我们的目标,并建立该方法学,研究按极性切割、不同类别的成分群切割,或两者相结合的方法,为符合国际标准的新型优化重组药物的创制提供科学依据。

2. 化学-药理-中医理论相结合是阐明药效物质基础的必要途径

中药复方的研究不仅要继承它的多成分协同作用的特色,发展新配伍方剂,更要注意采用现代药理和化学手段阐明中医药机理,进行二次的深层次研究开发。首先需

要从整体出发,采用黑箱分析方法综合分析其化学组成,给出其定性定量信息,根据中医辨证论治的特点复制适宜的动物“证”的模型。最后结合化学成分、药理研究的结果,利用计算机模式识别的方法进行化学组成与药理的相关分析,弄清与药效相关的成分,阐明复方药效化学物质基础^[1]。

3. 分子生物学技术的介入是深层次揭示中药作用机理的一个突破口

随着分子生物学迅速发展,生命活动的许多微观生理生化机制被不断揭示,介导药物作用的许多受体、离子通道、酶、细胞跨膜信号转导及细胞凋亡途径中的生物活性分子及基因被分离、纯化、克隆或阐明,并被应用于筛选活性成分分子靶标,为中药复方活性部位或组分的导向分离及评筛以及作用靶点的研究提供有力的技术支撑条件。中药治病最终是要通过体内实现的,因此还需从动物整体、器官上体现中药的活性组分。生物学上的每一个重要突破都将导致中药复方作用机理的逐步阐明,在基因组、基因表达调控、结构分子生物学、信号转导等四大前沿领域中开展深入持久的工作,为中医药学的发展与创新提供强大的驱动力^[2]。

4. 计算机多维分析处理是解决复杂系统多元化数据的重要辅助手段

21世纪飞速发展的信息系统,也将作为中药现代化的重要支撑条件。中医药优于西药的主要特点在于将人体视为一个有机整体。中药

所以采用复方的形式,是针对人体病理状态所呈现的证候群,采用多成分、多靶点、多途径的整体综合调节治疗作用。因此无论对中药的化学成分研究还是对复方中药的药理研究均需要进行多维分析。对于化学成分的研究需要以色谱为基础,包括质谱、光谱等多种手段的综合分析,获取其大量组成及定性、定量信息;对于药理研究应同时采用多元药理模型进行跟踪筛选,尽可能全面衡量复方中药的作用效果。最后,化学、药理和临床之间的关联涉及复杂的多维信息的关联和定量组效关系。

三、技术与方法

1. 以液相色谱-质谱为主的多种高效色谱是中药化学组分综合分析的基础

中药复方中含有多糖、蛋白质、有机酸、生物碱、皂甙、黄酮、挥发油等各类极性差别很大的化合物,需要用色谱分析的理论与方法,包括最佳柱系统推荐、操作条件的最优化、重叠峰的解析和定量等来解决复杂体系的分离问题。我们采取以液相色谱-紫外-质谱为主流,辅以气相色谱、毛细管电泳的各种分离模式和联用技术,用气相色谱分析挥发油成分、毛细管电泳分析生物大分子;反相高效液相色谱分析中等极性和非极性成分,对一些极性较强的酸、碱类则需在流动相中加入添加剂,或用离子对色谱,已形成了一整套综合分析的技术和方法,并为部位、组分的分离纯化建立了基础。最新的三级四极杆质谱仪

灵敏度高,实现了大气压下的软电离,产生拟分子离子峰,以及选择离子检测技术,使得对未知化合物的定性定量能力大为增强。

2. 制备液相色谱是从化学到药理的连接点

只有获得一定质和量的分离物质,才能满足结构测定、活性、毒理实验,乃至治疗等大规模应用的要求。制备液相色谱以其高分离度、快速、灵活,并能制备一定数量等特点已广泛地应用于生命科学,因此作为复方研究,在制备其药效物质的组分时,无疑是首选的方法。我们在分析型液相色谱上进行操作条件优化后放大至制备色谱,考察流速、上样量及梯度洗脱条件,按保留时间(即化合物与流动相、固定相的分子间相互作用)切割组分,用冷冻干燥技术得到恒重的固体混合物提供给药理实验筛选用,并用药理实验的反馈信息继续分离活性部位和组分,进行部位和组分的优化。

3. 多途径、多靶点整合调节的生物学机制研究是中药药效作用的技术支撑

实验药理学研究已从以往主要从整体水平进行药效评价逐步发展为整体、细胞及分子水平相结合的研究模式。激素、神经递质、细胞因子等活性分子及受体乃至基因表达等已被作为中药药理研究的靶标,为中药复方药理学的深入研究积累了较为丰富的经验和可供借鉴的资料。我们与生化研究单位合作,用不同的中药复方(包括单味药)分别在动物、器官、细胞和基因

多个途径上进行活性筛选,已取得初步成效。

四、不同层次药理模型的中药活性筛选举例

1. 黄芪用于白血病细胞模型的活性筛选

从红白血病人血液中分离出来的恶性肿瘤细胞株,相似于红系发育阶段中特定时期的红系祖先细胞,它只表达胚胎型 ϵ -珠蛋白基因和胎儿型 γ -珠蛋白基因,而不表达成年型 β -珠蛋白基因,处于不成熟红细胞的分化阶段。任何外在因素作用于人类红白血病细胞后,如能诱导其表达成年型 β -珠蛋白基因,则提示这种因素可促进该细胞趋向终末分化。因此,人类红白血病细胞为研究红系细胞和珠蛋白基因表达提供了一个理想模型。

原有的基础:分别用化疗药羟基脲、白细胞介素-3(IL-3)诱导人类红白血病细胞,表达 β -珠蛋白基因,促进该细胞向终末分化,可以促进人类红白血病细胞 β -珠蛋白 mRNA 翻译成珠蛋白和合成血红蛋白。可通过影响细胞周期、诱导细胞分化和细胞凋亡达到抗肿瘤作用。

临床研究表明,黄芪水提取物对白血病人的治疗有效,必然有其化学物质在起作用,为提示内在规律,以相应的细胞株进行体外活性试验,以羟基脲和 IL-3 为阳性对照,发现:

第一批样品,黄芪的 95% 乙醇提取物,分为水层与油层,水层有明

显活性;

第二批样品,黄芪的 95% 乙醇提取物,经制备色谱分为多个 Fraction,有的部位有明显活性,而有的部位明显无活性。

于是,在化学的研究上,总体策略得到了肯定,有效部位的范围得到了缩小和优化,可进一步跟踪,在药理研究上,得到以下结果:

(1)在细胞水平上,已发现经中药分离样品的诱导后,人红白血细胞的形态发生明显变化,光镜下细胞外形变大;

(2)在基因转录水平上,已发现经中药分离样品的诱导后,人红白血病细胞上 β -珠蛋白基因从不表达达到表达。

2. 复方丹参用于心血管疾病的基因、器官模型的活性筛选

与中科院上海生化所李伯良等合作,发现了能调控胆固醇的合成与代谢功能的一个新的基因片段,用复方丹参的不同提取物在该基因片段上进行活性筛选,并与对照药物的活性结果比较,发现某一组样品的活性明显高于对照药物,影响基因的表达,调节胆固醇的含量。这对于动脉粥样硬化和心血管疾病的治理将有很好的前景,这部分工作正在深入进行。

同时,复方丹参用于动物离体心脏灌注模型的活性筛选也已经开展,用人造血液维持正常离体心脏生理活动,电子仪器动态测量乳酸脱氢酶指标。

3. 血府逐瘀汤用于动脉粥样硬化的动物模型的活性筛选

血府逐瘀汤是 11 味中药复方,

用不同配比的药对,如赤芍-柴胡、赤芍-川芎、柴胡-枳壳的水提取物浓缩成浸膏后,分别在大白鼠、家兔、犬体内进行整体动物模型的活性筛选,分别考察血流变、脂质代谢、血小板功能、血流动力学指标,根据第一批总提取物的活性数据,再优化提取工艺、分离策略。由于动物模型上的用药量相对要大得多,因此,用制备色谱时,制备量是首先要考虑的因素,我们用自行加工填装的制备色谱柱,内径达 100mm,可以满足药理实验的要求。

参考文献

- 1 梁鑫淼、肖红斌、卢佩章. 从复方中药中创制新药的现代方法学研究. 全球华人中药现代化学术研讨会论文集, 1998 年 7 月, 南京, 135-139.
- 2 肖培根、肖小河. 21 世纪与中药现代化. 中国中药杂志, 2000, 25(2): 68-69.

(责任编辑: 许有玲)

“九五”国家中医药重点科技攻关项目通过验收

“九五”国家中医药重点科技攻关计划项目《中药复方药物标准化(范例)研究》和《重大疾病的综合防治研究(中医)》分别于日前在京通过由科技部组织的项目验收,取得了多项科技成果。其中 16 项成果与合作企业签订了转让合同,总成交额达 5100 万元。

据了解,两项目中“高血压中、大量脑出血血肿清除术和中医药汉疗的研究”、“中药材质量标准规范化研究”、“银杏灵申报美国 FDA 和 IND 临床研究”及“风湿平的研制”等 4 项研究已获“九五”国家重点科技攻关计划优秀科技成果。

据介绍,《重大疾病的综合防治研究(中医)》项目是以危害我国人民身体健康的重大疾病为研究对象,将中医药临床治疗具有显著优势的方向作为研究的切入点,运用中医药治疗冠心病、高血压性脑出血、老年痴呆、糖尿病并发症、慢性乙型肝炎及肝纤维化等重大疾病,取得了临床疗效的显著提高。并结合临床研究,初步探讨了中医药治疗部分重大疾病的机理。研制出了一批科技含量较高的现代中药制剂,产生了较好的社会 and 经济效益。共获专利 5 项,发表论

文 303 篇。

《中药复方药物标准化(范例)研究》项目运用现代科技手段,以中医药理论为指导,瞄准发达国家植物药的研究趋势,集中解决了一些关键性的技术问题,取得了重要进展。其中一个药物在美国获准进行 II 期临床研究,另一个药物在德国通过了预审。共获专利 18 项,发表论文 270 篇。提供了 112 个对照品,19 项药材的质量标准载入了 2000 年版《中国药典》。同时还发现一些具有一、二类新药开发前景的有效成分和组分,多方面体现了本研究的示范性和先进性。

作为项目主管部门的国家中医药管理局对项目进行了严格科学的管理,在项目实施初期加强了顶层设计的论证,在项目执行过程中实行了动态、滚动管理机制,充分发挥了专家的指导作用。并根据国内外研究发展的变化及时调整技术路线,使攻关项目的整体研究水平得到了保障和提高。同时还积极策划和组织企业、地方政府与研究单位的合作,使部分研究成果得到及时转化,为今后攻关项目的组织管理提供了值得借鉴的成功经验。

(文 摘)

Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Arbitrarily Primed PCR (AP-PCR), Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) and Capillary PCR etc.; 2) Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) and PCR-RFLP; 3) DNA sequencing; 4) highly specialized PCR; 5) DNA chip or gene chip. This paper can be used for reference for those who are engaged in research of TCM

Key words: molecular biological technology identification of TCM electrophoresis immunity DNA molecular genetic marker

Investigative Methodology and Technology for Pharmacodynamic Material Basis of Compound Prescription of Traditional Chinese Medicine

9: ; *, 0 9*-\$ <\$, 0=*, >*- , 0 9*, ?*-\$

Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences Dalian 116011

The key of the modernization of Traditional Chinese Medicine is to clarify chemical material basis and to found pharmacological model. This article indicates that many complex components extracted from Chinese herbal medicines are systematically separated and analyzed by high performance chromatography and coupling techniques, while their major effective constituents or components are enucleated by pharmacological experiments. Furthermore, their pharmacological data are tested and verified and their compatibleness is optimized by preparative HPLC.

Key words: compound prescription of TCM material basis chromatography coupling technique preparative HPLC pharmacology test

Determination of Soil and Herbal Selenium in the Areas of Endemic Diseases Related to Selenium Background

<: (/ *&*, @+, 0 9: +6+, 0 A-, 0 >*-, B:

C, 85%5: 5+ \$6 7/*, +8+ 3-5+%- 3-'*)-D 7/*, - E)-' +?1 \$6 7/*, +8+ .%- '5*\$, -& 3+'*)*, +D F+*B, 0 GHIIHH

Objective To know the levels of selenium in both soils and herbals from the areas of endemic diseases related to selenium for providing new data to quality control and clinical use of the herbals. **Methods** Hydride Atomic Fluorescence Spectrophotometry. **Results** The levels of selenium in soils and herbals from the places in poor background of selenium of the and the content difference of selenium among the species are also obvious. **Conclusions** The selenium content in herbals mainly depends on geochemical background and some of them may produce better effects, or even a new indication.

Key words: Selenium Geo - herbals Endemic diseases

Present Status of Study on Gecko Used as Traditional Chinese Medicine

7/+ , 3*, 0

J+K-%?+, 5 \$6 L/-%?-)1 , @: B-, 7\$&&+0+ \$6 .%- '5*\$, -& 7/*, +8+ 3+'*)*, + , @: 4/\$: "MHHH"

<: -, 0 N-, /-, 0

3+'*)*, -& 3-5+%-& 7\$%K\$%-5*\$, \$6 @: B-, L%\$0*,)+, @: 4/\$: "MHHH"

In recent years, Gecko used as traditional Chinese medicine has shown definite effects on many difficult and complicated diseases, such as malignant tumors, osteomyelitis tuberculosis and fistula, which has attracted general attention in medical circle and related research achievements of it are often published in various journals. This paper reviews the recent research on textual criticism, resources, chemical constituents, preparation, pharmacological action and related development of clinic research of Gecko and has a discussion on the determination of Gecko strains and its preparation methods.

Key words: Gecko Present status of study Development

Preliminary Discussion on the Sense of Innovation of the Application of New Techniques in Traditional Chinese Medicine

A-, 0 3*, 0 <: 9*-\$?+* >: ; *- , 0

(*)+,)+ -, ' 5+)/, \$&\$01 ' +K-%?+, 5 \$6 7/+ , 0': P, *0+%*51 \$6 . 73

It is the problem of how to turning TCM achievement into industry products and how to choose the reasonable quantity, quality, scale and efficiency of industrialization that has become an important factor which is impeding the shift in the mode of economy increase and the optimization of industry structure. To bring new ideas(also known as innovation) is the

{#%\$% ()+,)+ -, ' .+)/, \$&\$012 3\$'+%, *4-5*\$, \$6 .%- '5*\$, -& 7/*, +8+ 3+'*)*, +J !"