

用生物筛选法筛选 中药活性成分的研究

□ 丁明玉 李红霞 (清华大学化学系 北京 100084)
刘德麟 (中国中医研究院基础理论研究所 北京 100700)

摘 要: 本文介绍了作者运用生物筛选法筛选出了中药材川芎、麻黄和天麻中的主要活性成分。确定川芎中主要活性成分为香兰素、阿魏酸和洋川芎内酯类化合物;麻黄中主要活性成分为麻黄碱、伪麻黄碱、去甲基麻黄碱和去甲基伪麻黄碱;天麻中主要活性成分为天麻苷元和天麻苷。作者认为生物筛选法所得结果与已有研究报道基本一致,说明生物筛选法是一种快速、准确的中药活性成分筛选方法。

关键词: 生物筛选法 中药 川芎 麻黄 天麻

中药是在千百年实践的基础上了解其药效的,但其产生药效的物质基础却未被阐释清楚。这不仅阻碍了中药新方的开发研究,也使中药在走向国际市场的过程中受阻。我们认为,中药(单味或复方)口服后,通常进入体内的分子不止一种,而是多种(群或系列)^[1]。它们可以构成不同的功能组合,分别产生不同的作用。换言之,中药的某一作用可由其进入体内的分子群

中的某一特定分子组合来表示,我们称之为有效分子组合。如何求得有效分子组合(药效成分)是中药药理学研究的关键。目前,研究中药药效成分主要沿袭传统的方法。即先将方剂中的化学成分按一定的方法和步骤分成若干类物质,然后分别用各类物质进行药理实验,按一定的药理指标确定药效成分。随着现代医学的发展,传统方法已有明显的不足,如:(1)工作量和耗资大。中药成分多且作用广,按传统

方法筛选则需用多种药理指标和模型过筛多种成分,得到有效成分还需用同位素标记,才能查明其通过体液进入组织的分子结构。(2)因为其忽视了各种成分之间的协同作用,所以容易漏掉药效成分。(3)传统研究方法中化学成分的提取条件与实际用药时的煎煮条件相差较远,难以真实反映复方中进入体内的药效成分。为此,我们提出了一个查找中药有效分子组合的研究方法——生物筛选法。

[收稿日期] 2001-8-6

[修回日期] 2001-12-19

一、方法原理

中药材中的化学成分种类多、含量差别大,能被人体吸收且发挥药效的成分只是一小部分。我们认为,可发挥药效作用的药物成分应该能进入人体内,并且能够被现代分析技术所检测。基于这一思想,我们提出了一种中药活性成分筛选的新方法。该方法是将中药总提取物从胃肠道给予实验动物,观察对动物的作用,并取动物组织(血液和器官组织),分析动物组织内中药成分或其代谢物。改变所给制剂成分,动物组织内中药成分的种类和浓度会随之改变,中药的作用也同时变化,由此可以发现对应于特定作用的有效分子组合。我们把这种先利用动物的生化过程将中药活性成分分离到动物体内,然后从体液中分析药物成分的方法称作“生物筛选法”。生物筛选法只是一个进行初步筛选的方法,它还需要进一步的药理药效实验来确证。生物筛选法在某些方面显示出了一定的优越性,用它查找中药活性成分快捷而准确,同时又能充分保持中药原有的特色。我们根据这种新的研究思路,用生物筛选法分析了中药川芎、麻黄和天麻中的活性成分,结果成功地验证了生物筛选法的可行性和有效性。从而为今后运用该方法快速分析其它中药,尤其是复方中药的有效分子组合奠定了一定的基础。

二、实验方法

1. 试剂与材料

川芎、天麻和麻黄原药材购自

四川省成都市,川芎嗪、对羟基苯甲醇(天麻苷元)、对羟基苯甲醛、天麻苷、盐酸麻黄碱等对照品(分析纯)购自中国药品生物制品检定所。其它试剂均为分析纯。

2. 仪器

美国惠普 HP1100 高效液相色谱仪和 HP5973 气质联用仪。液相色谱柱为硅胶柱 Zorbax Rx-Sil (4.6mm i.d. × 250mm) 和反相柱 Nova-Pak[®] C₁₈ (3.9mm i.d. × 150mm)。毛细管气相色谱柱为 HP-5 MS (30m × 0.25mm i.d. × 0.25μm)。

3. 动物实验

将川芎、麻黄及天麻的总提取物分别给大鼠灌胃,测定进入动物体内的主要化学成分的含量及其分布、药代动力学、代谢产物。口服给药前,禁食 12 h,自由饮水,采血期间禁食。给药剂量 2 ml(浸膏浓度 50 mg/ml),口服给药后于 0、10、30 min 以及 1、1.5、2、4、8 h 分别断头处死,收集全血,取出脑、肾、肝脏等器官。口服给药后至处死前,分别于 1、2、4 和 8 h 分段收集尿液(大鼠置于代谢笼中)。

4. 样品处理

血液取 2 ml,加肝素抗凝,离心分离(3000 rev/min),取上清液加 3 倍量甲醇沉淀蛋白,离心过滤后分析。脑组织是在取完血后立即取出大鼠脑组织,称重后加 5ml 生理盐水,用玻璃研钵研磨,2500r/min 离心分离,取上清液作为脑匀浆样品。加 3 倍量甲醇沉淀蛋白,离心过滤,浓缩后分析。其它组织器官的处理同脑组织。

三、结果与讨论

1. 川芎中活性成分的筛选

通过比较大鼠灌胃 2hr 后的血清与空白血清的液相色谱图(图 1),发现主要有 5 种成分进入血浆和大脑中。通过与标准品保留时间及紫外光谱图对照,确定进入血液中的成分有香兰素(4.4min)、阿魏酸(5.4min)。保留时间为 10.5min 和 12.6min 的物质无标准品,通过液质联用分析和文献对比,确定他们分别为洋川芎内酯 H 和洋川芎内酯 I,另有 2 个未知成分(6.2min 和 8.6min)尚不能确认。同样方法测得大脑中含有阿魏酸、洋川芎内酯 H 和洋川芎内酯 I。文献报道川芎中主要有效成分为香兰素、阿魏酸和洋川芎内酯等,与我们的实验结果一致。

2. 麻黄中活性成分的筛选

分析实验动物血液及各组织器官样品中进入的麻黄化学成分。分析血样、脏器及尿液时,仅在血样和肾脏中测到少量盐酸麻黄碱(E)和盐酸伪麻黄碱(PE),在其它脏器(大脑、肝和心脏)中未能检测到来自麻黄的药物成分。尿液中麻黄类生物碱浓度较高(图 2)。我们考虑一方面可能是由于药物经胃肠粘膜逐渐吸收进入血液循环后,药物成分经血液稀释,使血药浓度过低而不能检测到;另一方面可能是由于逐渐被吸收进入血液中的少量麻黄药物成分在血液中的滞留时间很短,进入血液后迅速作用于靶器官,随后到达肾脏,经尿液排出。从给药后 0-1,1-2,2-4,4-8hr 时间

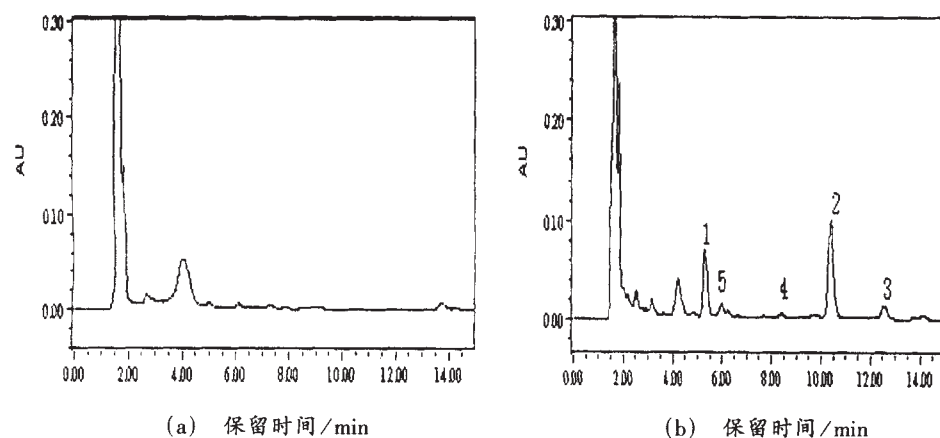


图1 空白血清(a)和服用川芎浸膏 2hr 后大鼠血清(b)的液相色谱图

色谱柱 :Nova-Pak[®] C₁₈(3.9mm i. d. ×150mm) ;

流动相 :甲醇-水-乙酸(35:65:0.5,体积比) ;

流速 0.8ml/min,检测波长 270nm。

色谱峰 :1-阿魏酸, 2-洋川芎内酯 H, 3-洋川芎内酯 I, 4-洋川芎内酯 I 异构体, 5-未知 6-香兰素

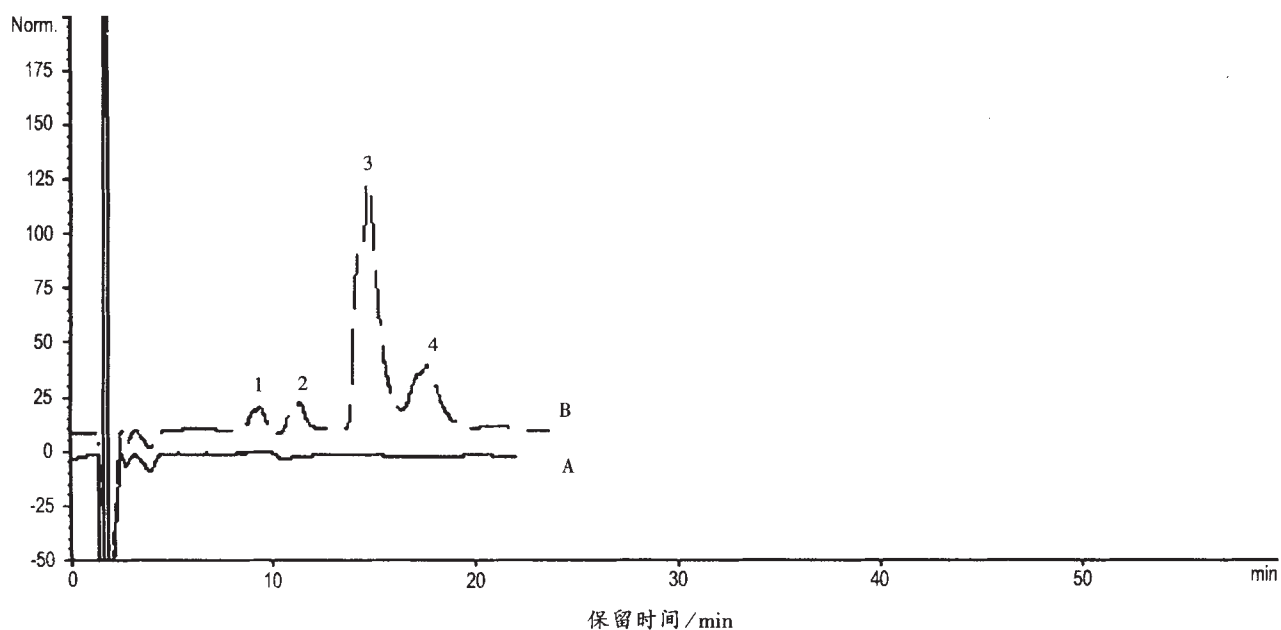


图2 空白尿液(A)及服药 1h 后尿液(B)的色谱图

色谱柱 :Nova-Pak[®] C₁₈(3.9mm i. d. ×150mm) ;

流动相 :甲醇-0.02 mol/L KH₂PO₄-乙酸-三乙胺(96:4:0.2:0.01 体积比) ;

流速 0.8 ml/min,检测波长 210 nm。

色谱峰 :1-去甲基麻黄碱 2-去甲基伪麻黄碱 3-麻黄碱 4-伪麻黄碱。

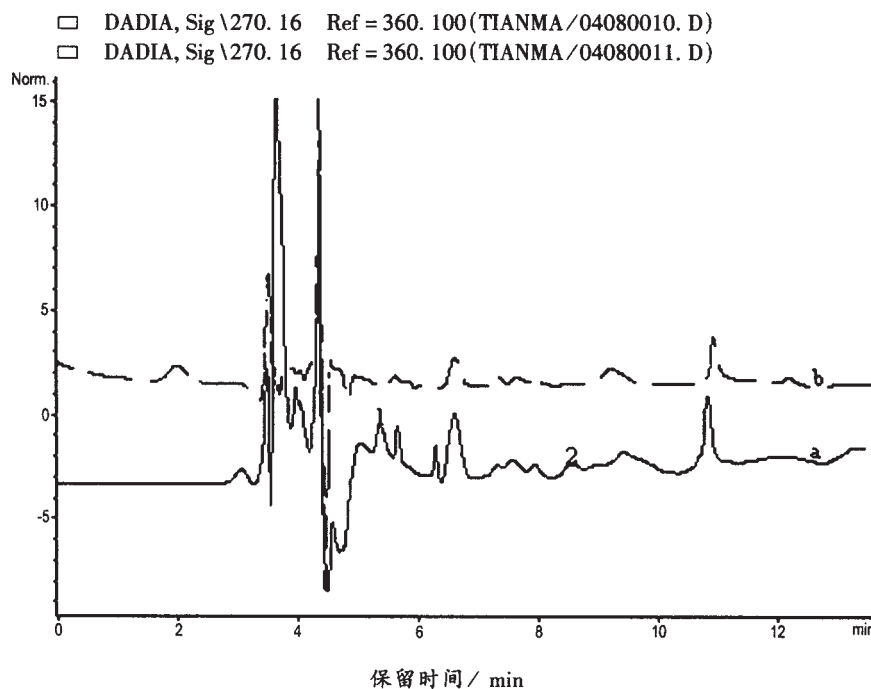


图3 血浆中天麻苷元和苷的测定

色谱柱: Zorbax Rx-Sil(4.6mm i. d. × 250mm); 流动相: 正己烷-乙酸乙酯-甲醇(30: 10: 10, 体积比); 流速: 0.8 ml/min; 检测波长: 270 nm(二极管阵列检测器); 色谱峰: 1-苷元, 2-苷

段大鼠尿液中E和PE浓度变化可看出尿中药物浓度在服药后1 hr内即达到最大,随后逐渐降低。尽管进入血液及其它脏器中的麻黄类药物成分由于浓度过低而难以检测,但仍然可以用进入实验大鼠尿液中药物成分作为评判依据,因为:(1)药物成分只有在被吸收进入血液后,才能通过血液循环经肾小球过滤,进入尿液;(2)进入血液的药物成分在尿液中经浓缩后排出,使浓度大大增加,有利于检测;(3)根据药理学研究,麻黄类生物碱不被肝脏破坏,在体内仅发生少量脱氨氧化,而大量的(约60-70%)麻黄类生物碱是以原形药从肾脏排出。因此推断口服麻黄后,进入实验动物体内的麻黄药效成分有E、PE、NE

(盐酸去甲麻黄碱)和NPE(盐酸去甲伪麻黄碱)。这与文献报道的麻黄类生物碱是麻黄中最主要的有效成分相符。

3. 天麻中活性成分的筛选

用天麻浸膏灌胃后,分析大鼠各组织和尿液中的天麻化学成分。在反相柱上因动物组织成分影响苷和苷元的分离,所以采用正相硅胶柱Zorbax Rx-Sil分离。测定了灌胃2h后,各个脏器中天麻苷元和苷的含量(图3)。苷元在各器官中的分布为:胃>肾>肝,苷在各器官中的分布为:肝>胃>肾。脑中几乎检测不到,心、血浆中含量极微。天麻苷在肝和肾中的含量分别是天麻苷元的21倍和4倍。

用HPLC分离时,在空白组织

心、肾脏等脏器中,对应于天麻苷元和苷的保留时间处也有小峰,基质干扰较大,用GC/MS法进一步确定了大脑、尿液中含有天麻苷元和苷。测定前样品及标准品用醋酸-吡啶衍生化。通过比较药材与尿的总离子流色谱图,同时用质谱库检索,发现尿中含有天麻苷元和苷。同样测得大鼠大脑中含有天麻苷元和天麻苷。文献报道天麻的主要活性成分为天麻苷元和天麻苷,且苷在生物体内易代谢为苷元,本实验验证了这一结果。

参考文献

- 1 刘德麟. 分子网络紊乱与调节-分子中医药学导论. 北京:清华大学出版社,1999, 241~244.

(责任编辑 柳莎)

indicate that the wild *Salvia miltiorrhiza* Bge. from Shanxi province is the best one among the 8 varieties and then the planting ones in Sichuan, wild ones in Shandong and planting ones in Henan. The wild *Salvia miltiorrhiza* Bge. in Ankang county of Shanxi Province and in Lu county of Henan province are the worse.

Key Words: *salvia miltiorrhiza* Bge. pharmacodynamics, cluster analysis, matrix sum

Sieving Active Ingredients of Chinese Traditional Medicines by Biological Methods

*Ding Mingyu and Li Hongxia (Department of Chemistry ,Tsinghua University, Beijing, 100084)
liu Delin (Institute of Basic Theories, Chinese Academy of Traditional Chinese Medicine, Beijing, 100700)*

In this article a biological method for sieving active ingredients of traditional Chinese medicines is described, by which the active ingredients of Chuanxiong ,Mahuang and Tianma have been obtained as follows: The main active ingredients are vanillin, ferulic acid and senkyunolides in Chuanxiong; ephedrine alkaloids in Mahuang; gastrodin and p – hydroxybenzyl alcohol in Tianma. These results coincide with those reported in literatures, which show that biological methods are rapid and reliable for sieving active ingredients of traditional Chinese medicines.

Key Words: Biological sieving method, traditional Chinese medicines, Chuanxiong ,Mahuang ,Tianma

Overview of Taxus Resources in China and Strategy for their Sustainable Utilization

*Chen Zhenfeng, Zhang Chengwen, Kou Yufeng and Cui Shuyu
(Xi' an Tiancheng drugs & Bio – engineering Co. Ltd. Xi' an 710075)*

This paper gives an illustration of the present situation of the distribution of *Taxus* species, Taxol content and particular status of *Taxus* resources in China. Meanwhile, it advances the discussion on the sustainable utilization of *Taxus* resources.

Key Words: *Taxus*, Taxol, resources, sustainable utilization

Ultra – fine Powders of Traditional Chinese Medicine and their application to Prescription Granules

*Zhang Xiaojuan and Chen Changzhou
(The Society of Traditional Chinese Medicine of Guangdong Province, Guangzhou, 510095) Gui Jingchao (Institute of Traditional Chinese Medicine and Yifang Drugs Corporation Ltd. Of Guangdong Province, Guangzhou, 510095)*

This article discusses the advantages and prospects of micron traditional Chinese medicine and its application to prescription granules (formally called condensed granules of single drugs) and analyzes the problems which may possibly emerge in its industrization.

Key Words: ultra – fine powder of traditional Chinese medicine, prescription granules of traditional Chinese medicine