

# 建立中药复方用半仿生提取 研究的技术平台\*

□张兆旺\*\* 孙秀梅 (山东中医药大学 济南 250014)

**摘要:**半仿生提取法(SBE法)是针对中药药效物质提取中存在的“唯成分论”和“通则论”,采用“灰思维方式”将整体药物研究法与分子药物研究法相结合,从生物药剂学的角度为经消化道给药的中药制剂创立的一种提取新技术。经对多种中药及其复方的研究,结果皆提示:半仿生提取法有可能替代(WE法水提取法);(SBAE法半仿生提取醇沉淀法)有可能替代(WAE法水提醇沉淀法)。本文以黄连解毒汤和慈航丹为例,对建立中药复方半仿生提取研究的技术平台作了介绍。

**关键词:**中药复方 半仿生提取 技术平台 黄连解毒汤 慈航丹

中药制剂现代化不仅包括剂型、设备、分析测试手段等的现代化,更重要的是思维方式的现代化。用何种思路和方法将方剂的药效物质最大限度地提取出来,以保持原方剂特有的疗效,是中药现代化的核心与关键之一。目前,中药制剂的研制,往往是以某种单体成分或指标成分优选提取工艺和控制制剂质量,忽视了方剂的整体作用,不能保持原方剂特有的疗效,但仍冠以“中药”制剂。从大医学的角度看,以单体成分为依据的提取对认识方剂中某种药物的化学成分及其药理作用十分有利,也可以从微观上说明方剂的某些药理作用机制,使制成的制剂更精确化、量化,有利于进一步人工合成。但是它忽视了药

物间各种成分的层次性、联系性,不能体现方剂的整体作用,更不符合中医临床用药的综合成分作用的特点。如把此法视为中药现代化的出路,则南辕北辙,最终将会导致中医药的名存实亡。

“十五”国家级火炬计划项目申报指南在“中药提取技术与设备”项下,重点支持项目依次为:半仿生提取技术、微波提取技术、超临界二氧化碳萃取技术、强化浸取技术、双水相萃取技术、微粉提取技术、纳米技术、动态逆流提取技术等。

半仿生提取法(Semi-bionic Extraction Method,简称SBE法)是我们利用“灰思维方式”,将整体药物研究法与分子药物研究法相结合,从生物药剂学的角度为经消化道给药的中药制剂创立的一种提取新技术。它模拟口服给药及药物经胃肠道转运的

收稿日期:2004-11-04

修回日期:2005-01-10

\* 教育部科学技术研究重点项目(地方:03075):方剂药效物质提取新技术“半仿生提取模式”的研究,负责人:张兆旺,孙秀梅;国家自然科学基金资助项目(30472193):中药复方药效物质用“半仿生提取”的方法研究,负责人:张兆旺,孙秀梅。

\*\* 联系人:张兆旺,教授,博士生导师,从事中药新药研究与中药炮制原理研究,Tel:0531-2613459,E-mail:zhangzhaowang@jnnu.com。

56 [World Science and Technology / Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica]

过程,适合工业化生产,体现中医治病综合成分作用的特点,有利于用单体成分控制制剂质量。

SBE法在提取工艺的设计中依据“有成分论,不唯成分论,重在机体药效学反应”的观点,药效物质的提取率高,不改变中药、方剂原有的功能与主治,生产周期缩短,成本降低。自1995年至今,用该法对十余个中药复方进行研究,结果皆提示:SBE法有可能替代水提法(WE法);半仿生提取醇沉法(SBAE法)有可能替代水提醇沉法(WAE法)<sup>[11-11]</sup>。SBE法已被“十五”国家级规划教材《中药药剂学》收载,在国内核心期刊发表理论和实验性论文50余篇,有10余篇被国外权威期刊收载。

随着中医药现代化学术争鸣的深入,SBE法将会被大多数人所接收。它开拓了既符合中医药理论,又能体现现代科学技术水平的提取方法。

为了便于推广使用半仿生提取技术,我们以黄连解毒汤和慈航丹为例,对建立符合中药现代化内涵的中药复方半仿生提取研究的技术平台作简单介绍。

### 一、研究的基本内容

#### 1. 不含挥发性成分的中药复方

- (1) 方药是否符合有关规格标准。
- (2) 方剂用SBE法提取条件的优选。
- (3) 方剂用SBE法提取药材组合方式的优选。
- (4) 方剂指纹图谱-模式识别研究。
- (5) 方剂SBE提取液醇沉浓度的优选。
- (6) 方剂不同方法[SBE法、SBAE法、WE法、WAE法、AE法(即醇提法)等]提取液成分、药效、毒性的比较。
- (7) 方剂不同方法提取液的药代动力学研究(血清指纹图谱与血清药效学研究)。
- (8) 综合评判该方剂是否以SBE法提取为佳。

#### 2. 含挥发性成分的中药复方

- (1) 方药是否符合有关规格标准。
- (2) 方中挥发性药物用超临界流体萃取条件的优选。
- (3) 萃取后药渣与方中他药用SBE法提取条件的优选。

(4) 方剂SBE提取液醇沉浓度的优选。

(5) 方剂不同方法(SBE法、SBAE法、WE法、WAE法、AE法等)提取液的成分、药效、毒性的比较。

(6) 方剂不同方法提取液的药代动力学研究(血清指纹图谱与血清药效学研究)。

(7) 综合评判该方剂是否以SBE法提取为佳。

### 二、研究的基本模式与技术关键

#### 1. 研究的基本模式

中药复方药效物质用半仿生提取研究的基本模式,如图1所示。不含挥发性成分的中药复方,以黄连解毒汤为例;含挥发性成分的中药复方,以慈航丹为例。

#### 2. 关键技术

(1) 方药来源与品质是否符合法定要求

例如,黄连解毒汤由黄连、黄芩、黄柏、栀子组成。此4种中药均被中国药典2000年版一部收载。其中黄连收载毛茛科植物黄连 *Coptis chinensis* Franch.、三角叶黄连 *Coptis deltoidea* C. Y. Cheng et Hsiao 或云连 *Coptis teeta* Wall. 的干燥根茎。黄柏收载芸香科植物黄皮树 *Phellodendron chinense* Schneid. 或黄檗 *Phellodendron amurense* Rupr. 的干燥树皮。实验研究时首先应鉴别方药品种、检测其质量,不合格药材不能用于工艺研究。

(2) 含挥发性物质的方药应先用超临界流体萃取

例如,慈航丹由益母草、当归、川芎、香附组成。应先将含挥发性成分的中药(香附、川芎、当归)用超临界CO<sub>2</sub>萃取,药渣与方中其他药物(益母草)混合,再用SBE法依法提取。超临界萃取物中除含挥发油外,尚含较多的非挥发物质,仅以萃取物的收率为指标优选工艺有一定的片面性,故慈航丹应以萃取物收率、香附酮、川芎嗪、藁苯内酯为考察指标,综合评判,优选超临界CO<sub>2</sub>萃取工艺参数。SBE法工艺参数以水苏碱、阿魏酸、川芎嗪、HPLC总面积、总糖、干浸膏为指标,综合评判选择。

(3) SBE法提取条件的优选设计是否科学

影响SBE法提取条件的因素较多,优选方法设计是否合理,关系到实验能否科学顺利地进行。为保

证各试验组测得数据的可比性, 在药材粒度 (例如, 10~20 目之间)、煎煮次数(3 次)、煎煮加水量(例如, 药材重量的 10、6、6 倍)、煎煮温度(常压下)、滤过(例如, 4 层纱布加 100 目筛→离心→超滤)、浓缩等条件相同的前提下, 确定实验设计考察因素为: 各次煎煮用水 pH 值与各次煎煮时间。通常可选用均匀设计 UL (9<sup>1</sup> × 3<sup>3</sup>) 表, 安排各因素与水平进行实验。考察指标

以黄连解毒汤为例, 可选小檗碱、黄芩素、栀子苷、总黄酮、总生物碱、HPLC 总面积、干浸膏为指标, 各指标数据按公式  $X'_{i,j} = (X_{i,j} - \bar{X}_j) / S_j$  进行标准化处理 (式中,  $X'_{i,j}$  为标准化后的值,  $X_{i,j}$  为样品液 i 中成分 j 的含量,  $\bar{X}_j$  为各种样品液 i 中成分 j 的平均值,  $S_j$  为 j 成分的标准偏差), 根据各指标在提取工艺选择中的主次, 给予不同的加权系数, 以标准化指标值加权求和后, 作为综合评判指标值, 优选出 SBE 法工艺条件。

(4) 评价提取效果的指标与方法是否可靠

以黄连解毒汤为例。黄连与黄柏含小檗碱等多种生物碱, 黄芩主含黄芩苷等多种黄酮类成分, 栀子主含栀子苷等多种环烯醚萜苷类成分。故评价提取效果的指标中选用小檗碱、黄芩素、栀子苷 3 种单体成分。另外, 要体现“有成分论, 不唯成分论”, 发挥“活性混合物”综合作用的 SBE 法观点, 评价指标中还有总生物碱、总黄酮、HPLC 总面积、干浸膏得率 4 个指标。同时用主要药效指标和毒性指标追踪比较。各指标所得数据, 进行标准化处理, 以消除各指标的单位 and 量纲不同, 以及各指标变量范围相差悬殊所造成的影响。这样更为合理。

(5) 方剂用 SBE 法提取药材组合方式的优选

药材组合方式优选的目的不仅仅是要得到一个最佳的组合, 同时要考察提取中各种组合的变化, 故方剂提取时选择药材最佳组合, 是将方药用排列组合成若干组 (例如, 黄连解毒汤可组合为 15 组)。对不同组合提取液进行定性与多指标的定量比较。并对各组合提取

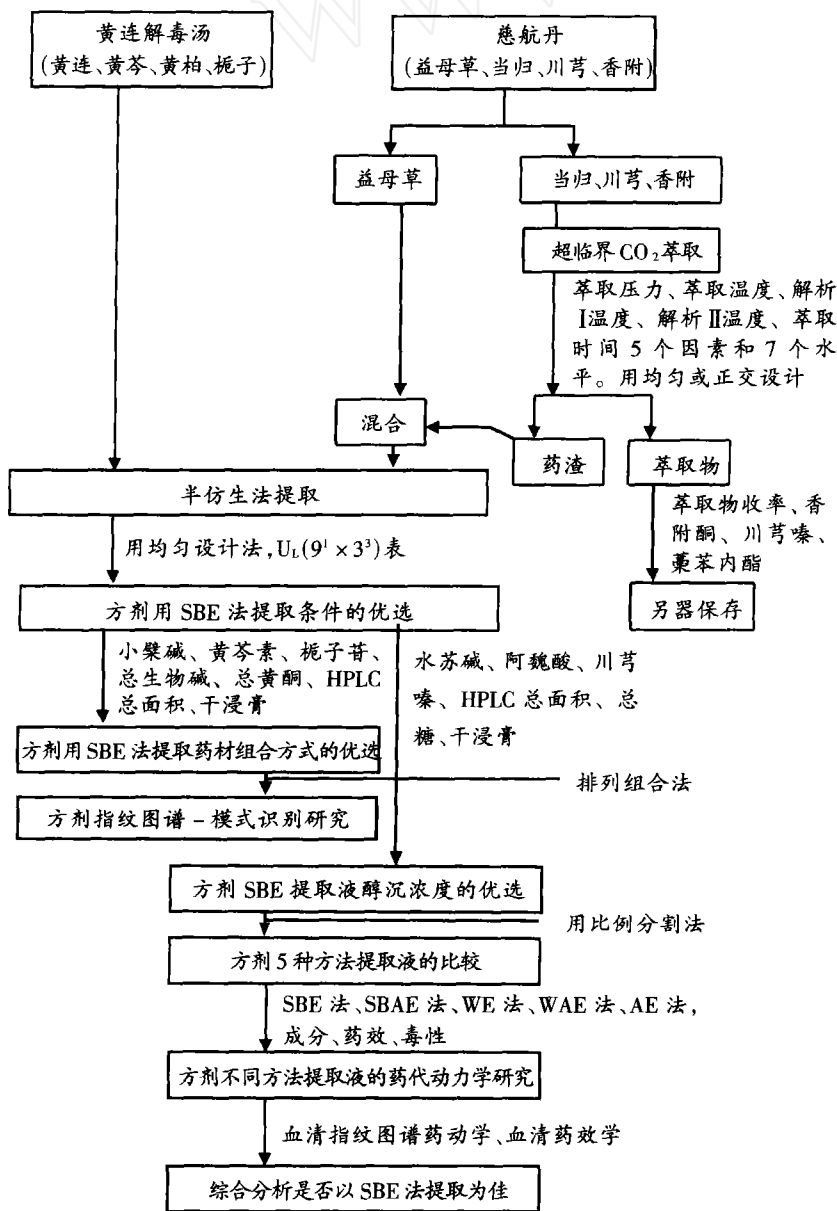


图 1 二种类型复方药效物质半仿生提取研究模式

液分别制成不同极性部位的提取液,采用正相 TLC 及反相 HPLC 分离分析,获得 TLC 及 HPLC 全部分析数据,比较不同组合提取液的成分异同。

由于色谱峰较多,为了消除由于操作参数和柱效的变化引起的保留值的变化,避免选取色谱特征时的困难,对色谱峰的保留值进行标准化处理。处理方法<sup>[12]</sup>:从各色谱图中选取 2 个变化不明显,易于区别的参考峰,对所有保留值按下式进行处理:

$$t_i^s = t_a^s + \frac{(t_i^r - t_a^r)(t_c^s - t_c^r)}{(t_c^r - t_a^r)}$$

式中,  $t^r$  为未标准化的保留时间,  $t^s$  是标准化的保留时间,峰 a、c 为指定的参考峰。取保留时间标准化后选定的若干个色谱峰峰面积作为特征值。对不同组合提取液进行聚类分析,以综合反映不同组合提取液内在化学成分的变化及其相关性。同时,给予不同的加权系数,综合评判确定该方剂提取时药材较佳组合方式。

对 TLC 中新增减的斑点及 HPLC 中新增减的主要峰,在经费允许时,进行该成分的大孔树脂分离或色谱分离制备,鉴定其结构,进一步探讨该成分与药效的关系。

#### (6) 方剂 SBE 提取液醇沉浓度的优选

采用比例分割法,将醇沉浓度安排在 30% ~ 80% 内选择,共选 6 个点实验,提得 6 个样品液,依法测得各种指标成分的含量,经标准化、加权处理后,综合评判优选出该方药提取液醇沉较佳浓度。

乙醇计的标准温度为 20℃,测量乙醇本身的浓度时,如果温度不是 20℃,应作温度校正。根据实验证明,温度每相差 1℃,所引起的百分浓度误差为 0.4,因此,这个校正值就是温度差与 0.4 的乘积。可用下式求得乙醇本身的浓度。

$$C_{实} = C_{测} + (20 - t) \times 0.4$$

式中,  $C_{实}$  为乙醇的实际浓度(%);  $C_{测}$  为乙醇计测得的浓度(%);  $t$  为测定时乙醇的温度。

#### (7) 方剂不同方法提取液的药代动力学研究

根据 SBE 法“有成分论,不唯成分论,重在机体药效学反应”,以及“化学等值不一定生物等效”的生物药剂学观点, SBE 法研究的基本模式应将体外

药效物质的化学研究与体内血清药效物质的化学研究有机地结合起来研究。除用单体成分及“活性混合物”为指标综合评判外,还要对方药不同提取液作指纹图谱及兔血清指纹图谱的研究。仅以一两个有效成分或指标成分选择工艺,不能体现中药复方的整体功能。只用化学药物常用的血药浓度法或尿药浓度法,不能反映复方中多种药物、多种成分的综合疗效与协同效应。

近年来,以药理效应法、药物累积法和生物指标法等对中药复方制剂进行体内药物动力学研究,能反映制剂的体内动态过程,体现中医理论体系的特点,在设计思路与方法上有突破。但药理效应法等需要有作用迅速的药理指标。而利用给药前后的血清指纹图谱,从整体上考察和反映中药复方在体内吸收和代谢过程,不是只考察其中的一两个成分,这是对中药复方药代动力学研究的一种新的尝试。

利用欧氏距离<sup>[13]</sup>综合反映指纹图谱中的多个特征值来度量图谱间的差异较为全面客观,能从整体上反映给药前后血清指纹图谱的变化,因此通过对血清指纹图谱用欧氏距离作整体比较来研究中药复方药代动力学,更符合复方整体作用的特点。

对  $n$  个含  $m$  个指标的样本,可定义为  $m$  维空间的点;在  $m$  维空间中的任意两点,其相似性可用“距离”度量,定义为“ $d_{i,j}$ ”,若将任一样本看作一类,其类间相似性可用欧氏距离  $D_E$  表示。欧氏距离  $D_E$  越大,其类间相似性越小。

$$D_E = d_{ij} = \left[ \sum_{l=1}^m (x_{il} - x_{jl})^2 \right]^{\frac{1}{2}}$$

式中:  $l = 1, 2, 3, \dots, m$ , 表示样本指标数;  $i, j$  表示样本序号;  $x_{il}, x_{jl}$  表示样本各指标。

#### 参考文献

- 1 孙秀梅,张兆旺,卢连华等.黄连解毒颗粒剂 4 种提取方法的成分比较.中国中药杂志,1996,21(8):474.
- 2 孙秀梅,张兆旺,相菊英等.寒痛定泡腾冲剂 4 种提取方法的比较.中国中药杂志,1996,21(3):159~161.
- 3 孙秀梅,张兆旺,郭婕等.芍甘止痛颗粒剂 4 种提取方法的成分比较.中成药,1996,18(11):3~4.

(下转第 66 页)

- cell lines of *Taxus Brevifolia* (Pacific New). *Plant Cell Rep*, 1993, 12: 479 ~ 482.
- 4 甘烦远, 郑光植. 植物培养细胞次级代谢产物高产细胞系的筛选. *国外医药. 植物药分册*, 1990, 5(1): 10 ~ 14, 48.
  - 5 杜金华, 郭勇. 高产花色苷玫瑰茄细胞的筛选. *生物工程学报*, 1997, 4: 437 ~ 439.
  - 6 Harigae Yasushi, chen, Wenpin et al. *Shokuhin Sangyo Senta Gijutou Kenkyu Hokoku*, 1991, 17: 79 ~ 88.
  - 7 刘佳佳, 郭勇, 郑穗平等. 缺氧胁迫小细胞团法选育高产黄酮苷悬浮细胞系. *中南工业大学学报*, 2001, 32(1): 41 ~ 45.
  - 8 刘佳佳, 李晓如, 郭勇等. 缺氧胁迫法选育高产银杏内酯悬浮细胞系研究. *天然产物研究与开发*, 2001, 18(2): 1 ~ 4.
  - 9 孙敬三等. *植物细胞工程实验技术*. 北京: 科学出版社, 1995, 181 ~ 204.
  - 10 李景原, 王太霞, 杨相甫等. 商陆单细胞平板培养及色素高产细胞株的筛选. *天然产物研究与开发*, 2000, 12(4): 62 ~ 65.
  - 11 吴蕴祺, 朱蔚华, 陆俭等. 红豆杉愈伤组织中 sinenxans 高产细胞系的选择及其培养. *中国药学杂志*, 1998, 33(1): 15 ~ 18.
  - 12 罗建平, 郑光植, 甘烦远. 高产人参寡糖素培养细胞克隆系的筛选. *植物学报*, 1994, 36(3): 209 ~ 214.
  - 13 甘烦远, 郑光植. 红花细胞培养中高产  $\alpha$ -生育酚克隆系的筛选. *云南植物研究*, 1992, 14(3): 289 ~ 294.
  - 14 孙勇如, 安锡培. *植物原生质体培养*. 北京: 科学出版社, 1991: 108 ~ 116.
  - 15 Fujita Y, Takahashi S, Yamada Y. Selection of cell lines with high productivity of shikonin derivatives by protoplasts cultures of *Lithospermum erythrorhizon* cells. *Agric Biol Chem*, 1985, 49: 1755 ~ 1759.
  - 16 Sakamoto Kauso, Kumiko Lida et al. *Planta Meel.*, 1994, 60(3): 253 ~ 259.
  - 17 Balitc. L P, K Hattori. Effect of  $\gamma$ -rays on callus growth of *Nicotiana* species. *Journal of Breeding*, 1989, 39(1): 25 ~ 30.
  - 18 顾瑞琦. 辐射对植物细胞的伤害及其修复. *植物生理学通讯*, 1981, (5): 1 ~ 6.
  - 19 郑光植, 何静波, 王世林. 药用植物组织培养的研究 V. 生长速率和东莨菪碱含量皆高而稳定的变异体. *植物生理学*, 1983, 9(2): 129 ~ 134.
  - 20 林廷安. 梯度磁场对农作物的增产效应及其激励. *核农学通报*, 1990, 11(4): 189 ~ 190.
  - 21 张华, 曹日强, 杨永华.  $\gamma$ -射线对滇紫草细胞产生色素的影响. *植物资源与环境*, 1990, 8(1): 42 ~ 45.
  - 22 许明淑. 贯叶金丝桃高产细胞系筛选的基础研究. *中国中医研究院硕士学位论文*, 2000.
  - 23 Brash DE, Haseltine WA. UV induced mutation hotspots at DNA damage hotspots. *Nature*, 1982, 298: 189.
  - 24 罗建平, 郑光植, 甘烦远. 高产人参寡糖素培养细胞克隆系的诱变筛选. *植物生理学报*, 1994, 20(4): 332 ~ 338.
  - 25 成浩, 李素芳, 沈星荣等. 利用茶树培养细胞合成  $^{14}\text{C}$ -儿茶素的研究. *核农学报*, 2001, 15(1): 38 ~ 44.
  - 26 万贤国. 我国植物激光诱变育种的概况. *激光生物学报*, 1996, 5(3): 865 ~ 869.
  - 27 王立秋, 杨国忠, 陈风德. 激光诱变的生物学效应及其在动植物遗传育种上的应用. *激光生物学报*, 1997, 6(2): 1097 ~ 1102.
  - 28 郭斌, 尉亚辉, 曹炜. He-Ne 激光诱变选育高产白藜芦醇细胞系. *光子学报*, 2002, 31(3): 277 ~ 280.
  - 29 李耀维, 冯文新, 武增寿等. 激光诱变选育雷公藤次生物质高产细胞系. *激光生物学报*, 2000, 9(4): 281 ~ 284.
  - 30 罗建平, 郑光植. 高产人参寡糖素培养细胞变异克隆系的筛选. *云南植物研究*, 1995, 17(1): 83 ~ 88.
  - 31 赵寿经, 李昌禹, 钱延春等. 人参发根的诱导及其适宜培养条件的研究. *生物工程学报*, 2004, 20(2): 215 ~ 220.
  - 32 宋经元, 张荫麟, 祁建军等. 人参冠瘿组织高产株系选择和丹参酮的产生. *生物工程学报*, 1997, 13(3): 317 ~ 319.
  - 33 Swapna Mukherjee, Biswajit Ghosh, Sumita Jha. Establishment of forskolin yielding transformed cell suspension cultures of *Coleus forskohlii* as controlled by different factors. *Journal of Biotechnology*, 2000, 76: 73 ~ 81.

(责任编辑:左 向)

(上接第 59 页)

- 4 孙秀梅, 张兆旺, 张学兰等. 四神茶剂 4 种提取方法的成分比较. *中国中药杂志*, 1997, 22(6): 349 ~ 351.
- 5 张学兰, 张兆旺, 孙秀梅等. 四神茶剂 4 种提取方法的药效比较. *中国中药杂志*, 1997, (增刊): 201 ~ 203.
- 6 张兆旺, 孙秀梅, 王蕾等. 麻杏石甘汤 2 种提取方法的成分比较. *中国中药杂志*, 1997, 22(7): 413 ~ 415.
- 7 张兆旺, 王英姿. 当归苦参丸 2 种方法提取液的成分比较. *中国中药杂志*, 1999, 24(12): 734 ~ 736.
- 8 孙秀梅, 张兆旺, 修彦凤. 参附汤 2 种方法提取液的成分比较. *中成药(电子版)*, 1999.
- 9 修彦凤, 孙秀梅, 张兆旺. 参附汤方药 4 种方法提取液的成分比较. *中成药*, 2002, 33(8): 699 ~ 702.
- 10 吕青涛, 张兆旺, 孙秀梅等. 乙肝颗粒剂 4 种方法提取液的成分比较. *中成药*, 2000, 22(11): 752 ~ 756.
- 11 孙秀梅, 张兆旺, 张学兰等. 复壮胶囊方药 4 种方法提取液的成分比较. *中成药*, 2001, 23(10): 703 ~ 706.
- 12 方杏春, 相秉仁, 安登魁. 裂解-高分辨气相色谱-模式识别技术在中药牡丹皮分析中的应用. *药学学报*, 1990, 25(6): 462 ~ 468.
- 13 郭祖超. *医用数理统计方法*. 北京: 人民卫生出版社, 1988.

(责任编辑:刘维杰)

**Establishment of A Platform for Study of Compound Drugs of  
Chinese Medicine by Method of Semi - bionic Extraction**

*Zhang Zhaowang and Sun Xiumei*

*( Shandong University of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica, Jinan 250014 )*

The method of semi - bionic extraction (SBE) is a new technology of extraction, which is created, by the way of "gray thinking" to combine the method of study on the wholism of drugs with the method of study on the molecules of drugs and in view of existing "the theory of unique importance of medicinal components" and "the theory of general rules", especially for the preparations of Chinese medicine taken through digestive tract as considered from the viewpoint of bio - pharmaceutics. The result of study on quite a lot of Chinese drugs and their compounds shows that the SBE method may replace the method of water extraction(WE) and the method of semi - bionic alcohol extraction (SBAE) may replace the method of water alcohol extraction (WAE). Taking Huangliangjiedutang (Panax Notoginseng Detoxicating Liquid) and Cihangdan Pill for examples, this article describes the establishment of the technical platform for the study of the semi - bionic extraction of the compounds of Chinese drugs.

**Key Words:** Chinese medicine, compound drugs, semi - bionic extraction, technical platform, huangliangjiedutang, Cihangdan Pills

**Breeding of High - yield Clones in Cultivation of Medicinal Plants**

*Guo Xiaohong, Gao Wenyuan and Chen Haixia*

*( School of Pharmaceutical Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072 )*

*Xiao Peigen ( Institute of Medicinal Plants, Chinese Academy of Medical sciences and  
China Union University of Medical sciences, Beijing 100094 )*

It is an effective means to tap the resources of medicinal plants by the way of fermenting plants to obtain the secondary metabolites of useful medicinal plants. Nevertheless, most of useful secondary matters are extremely low in the cells of plants. For this reason, people have to first breed and improve the cells of plants in order to increase the content of secondary matters in industrialized production. This article summarizes the breeding methods and research of high - yield clones of medicinal plants and purposefully discusses the problems, such as the screening of high - yield clones, mutation breeding and gene transfer and the study of key techniques and its solution of the instability of high - yield clones.

**Key Words:** medicinal plant, high - yield clone, breeding

**Cultivation of Panax Notoginseng and Progress of Its GAP Study**

*Chen Zhongjian, Zhang Yuqin, Huang Tianwei and Wang Bingyan*

*[ World Science and Technology / Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica ] 139*