

• 综述 •

中药血清化学在中药及中药复方研究中的应用

王莉梅, 金向群*

(吉林大学药学院, 吉林 长春 130021)

[摘要] 中药血清化学是在传统的口服给药模式的基础上, 依据中药口服后只有移行入血的成分才可能发挥药效的思路, 通过综合运用现代的提取、分析技术, 对药物口服吸收后含药血清中的原型药物及其代谢产物进行分析研究, 从而可直接筛选和判断出中药及复方中的有效成分并据此较快速地探明其药效物质基础, 同时辅助阐明中药复方的配伍机制和意义, 对中药新药的研发起到加速和推动作用。文中作者总结了一些血清药物化学的成功实践经验, 并对血清药物化学的研究方法进行了归纳和概述。

[关键词] 中药; 血清药物化学; 含药血清; 药效物质基础

[中图分类号] R284.2 [文献标识码] A [文章编号] 1005-9903(2009)01-0077-04

Application of Serum Pharmacochemistry for Traditional Chinese Medicine in the Studies of Traditional Chinese Medicine and Complex Prescription

WANG Li-mei, JIN Xiang-qun*

(Pharmacy College of JiLin University, Changchun 130021, China)

[Abstract] The paper introduces the concept of serum pharmacochemistry for traditional Chinese medicine (TCM) and the research methods of serum pharmacochemistry for TCM, specially reviews the progress in studies on serum pharmacochemistry based on components and the metabolites in blood from the prescription. The authors summarize the analysis method of serum containing drugs, and point out the serum pharmacochemistry for TCM may play an important role in promoting the modernization of TCM.

[Key words] traditional Chinese medicine; serum pharmacochemistry; serum containing drugs; pharmacodynamic material foundation

1 中药血清药物化学的概念和研究进展

中药及中药复方在我国传统中医临床的应用历史悠久, 各药味依据“君臣佐使”的原则配伍组方, 在疾病的临床治疗上发挥重要作用。但中药成分复杂, 尤其是中药复方的药效物质基础不明、粗提理化性质不恒定等原因直接制约了中药复方的发展和中药现代化的进程, 中药血清药物化学正是基于药物必须经由用药部位进入血液循环才能起作用(胃肠

道直接起作用及外用药除外)这一思路, 通过研究中药或复方口服后被吸收入血的各个移行成分, 来间接、快速地筛选有活性的药效成分, 并借此来探究中药复方的配伍机制, 即探明移行成分与传统疗效的相关性, 同时对阐明中药及复方的作用机理、生物转化和代谢等过程, 以及对药理、毒理的进一步研究有一定的辅助作用^[1]。

中药口服给药后药物成分或经过消化道直接吸收入血, 或经消化液、消化酶及肠内菌群的作用代谢分解为次生代谢产物被吸收入血, 或经肝微粒体酶(P450)代谢成有活性的代谢产物, 或诱发机体产生激素等某些生理活性物质, 无论经过上述何种途径, 其有效物质绝大多数以血液为介质输送到

[收稿日期] 2008-04-14

[通讯作者] * 金向群, Tel(0431) 85619662; E-mail: jinxq@jlu.edu.cn

各组织、脏器等病变的靶点,从而发挥作用。因而给药后的血清才是真正起作用的“制剂”,血清中含有的成分才是中药的体内直接作用物质。其组成包括:(1)中药及复方所含成分的原形;(2)中药及复方经肝脏微粒体酶、消化酶及肠内菌群作用而产生的多种具有活性的代谢产物;(3)某些有效成分在经过血液转运过程中,在机体某些部位所产生的如激素、递质等生理活性物质。

中药血清药物化学的研究过程基本包括通过动物口服给药后取血制备含药血清、通过色谱指纹图谱的对比和解析来探究血中移行的活性成分、血中移行成分的分离和结构鉴定、移行成分与传统疗效的药效相关性研究等,此外还包括药效物质基础的体内代谢过程和机制的探讨与阐明等内容。

2 中药血清药物化学研究方法的优势和意义

以往的植物化学成分研究中,多采用系统的提取、分离的方法,将取得的各成分分别进行体内外的药理活性筛选,观察其效应,最后把各种成分的效应相加,来说明某一中药或复方的功效。整个研究过程带有很大的盲目性,而且忽视了进入血清中的成分不一定是原形成分、中药多成分的整体效应并非等于各部分效应之和等重要因素^[2],致使实验的效率很低,同时对所分离化合物的实际意义不够清楚。而血清药物化学方法以口服给药后的含药血清为研究重点,关注血中移行成分,大大缩小了研究范围,锁定了研究目标。将有限的人力、财力有针对性地投入到试验中,从而可以大大提高试验的效率^[3]。1984 年日本国立京都医院内分泌疾病中心的田代真一提出了含药血清方法的设想,并进行一系列富有成效的研究,近年来,我国的学者和科研人员也纷纷投入这一富有潜力的研究领域,其研究的重点主要集中在含药血清的方法学探索和中药血清的药效评价等方面。通过这一领域近 20 年来的实践,血清药物化学对中药及复方体外药效学和药理学研究方法的完善和中药药代动力学的发展日益起到推动作用,同时在帮助阐明中药复方的配伍机制、促进中药新药的开发及中药临床应用中给药方案科学化的研究等方面起到很大的辅助作用^[1]。

3 中药血清药物化学的研究方法及评价

在血清药物化学的实验方法上,目前大多数研究者采用给药-体内吸收-血样采集-成分分析的方法对给药后特定时间采集的血液样品进行分析,并将其相应成分认为是药物在体内的活性成分。在成分分析时多采用色谱指纹图谱的方法,通过对比药物提取液、含药血清、空白血清三者的色谱指纹图谱,直观地来对应和解析各谱图中尤其是含药血清中各种化合物的浓度消长和代谢产物的变化,从而可以依据入血前后各组分相对含量的变化,来判断和预测血液中测得各组分可能存在的生物学活性^[4]。而中药的血清药物化学研究,多是在分析全方、单味药及其相应的动物含药血清指纹图谱的基础上,比较各移行成分来自于那味药或为哪几种药物综合代谢的产物,从而探究其药效物质基础。其主要研究情况报道如下:

3.1 对单味药血清化学的研究结果 北五味子中具有保肝功效的五味子醇甲是血中移行成分和药理活性成分^[5]。土茯苓入血后可能仍保持原型,但针对水提液中较多的二氢黄酮类化合物在血清中不明显的问题还在进一步研究中。同时该文中作者提出不同的血清处理方法表现出不同的 HPLC 指纹图谱,故应对血清采取尽量少的处理步骤,以减少处理过程对图谱产生的影响^[6]。王亚丽综合多维检测技术最终确立了当归入血的 31 个移行组分中 10 个组分的化学结构,其中的阿魏酸、藁本内酯、藁本内酯二聚物等移行为活性药效成分。丁岗等分别对比了地黄水溶性、脂溶性和醇溶性部位等不同部位提取物在大鼠血清中移行成分的差异,初步确定了梓醇等水溶性成分含量较高,可能为地黄的主要有效部位,提示我们对于活性成分较多的中药可多角度地考察其中的化学成分^[7]。此外,对山茱萸的研究表明马钱素为山茱萸的主要入血成分,并可用大孔树脂对该成分进行定向的高效富集^[8]。黄芪甲醇提取物有 6 个较明显的入血成分,黄芪甲苷是黄芪入血的主要成分,此研究也证实了黄芪甲苷作为黄芪药材及其制剂的定性定量分析指标的科学性^[9]。

3.2 对复方血清化学的研究结果 对归苓片的研究结果显示,大鼠血清中的 12 个移行成分中,7 个为原型成分,5 个为代谢产物。当归中的内酯化合物 Levistolide A、白术中的白术内酯 III、白术内酯 II、白术内酯 I 及茯苓中的茯苓酸等为该方配伍后发挥药效的主要活性成分,同时复方中茯苓和当归配伍白术能够显著增加上述三个内酯化合物被吸收入血的能力,而其中的白术内酯 III 已由药效学实验证明是归苓片抗老年痴呆的主要活性成分之一^[10]。大鼠口服醒脑滴丸后,血中出现了 18 个移行成分,其中 10 个为原型成分,8 个为代谢成分。实验中采用添加对照品的方法对指纹峰进行确认,共指出 8 个发挥药效的原型成分,分别为:栀子成分京尼平龙胆双糖苷、栀子苷,三七成分三七皂苷 R₁、人参皂苷 Rg₁、人参皂苷 Re、人参皂苷 Rb₁、人参皂苷 Rh₁(R)、人参皂苷 Rd 等^[11]。小鼠口服生化汤后,血中出现了 9 个移行成分,6 个为生化汤中所含成分的原型,3 个为新产生的代谢产物,其中的成分阿魏酸,来源于当归和川芎;川芎嗪来源于川芎。实验中引入保留时间相对偏差 Δt 作为参考来衡量各谱峰的相关性,以确定口服生化汤后小鼠血中移行成分及其来源生药,有一定的参考价值^[12]。对六味地黄丸的研究结果显示,大鼠口服六味地黄丸后从血中发现了 11 个入血成分,其中 4 个为新产生的代谢产物,7 个成分为六味地黄丸所含的原型成分,该方进一步的研究对上述 11 种进行了分离和结构鉴定,共分离得到熟地、山茱萸和泽泻中的代谢成分 5-羟甲基-2-糠酸;山茱萸直接入血成分莫诺苷、獐牙菜苷、马钱子苷;丹皮酚的代谢产物 2-羟基-苯乙酮-4-葡萄糖醛酸苷、4-甲氧基-5-磺酸基苯乙酮-2-葡萄糖醛酸苷、2,4-二羟基-苯乙酮-2,5-二羟基-4-甲氧基苯乙酮等共 8 个化合物,它们是六味地黄丸的体内直接作用物质^[3,13]。大鼠口服复方安替威胶囊后,血清中出现了 19 个移行成分,5 个为新产生的代谢产物,14

个为原方成分直接入血,经分析其中金银花所含的绿原酸、黄芩中所含的黄芩苷为移行入血的主要成分及众多代谢产物的前体化合物,可能构成该方的药效物质基础,从而发挥其对 SARS 病毒的明确抑制作用和对机体的免疫调节作用^[14~16]。大鼠口服茵陈蒿汤后,血中出现 21 个移行成分,研究同时发现 21 个血中移行成分中有苦藏花甙酸、京尼平龙胆二糖苷、Capillaridin A、2, 5-Dimethyl-7-hydroxy chromone、6-Dementoxycapillarisin 等 8 个成分只有在茵陈蒿汤全方配伍的情况下才能被机体吸收,而这 8 个成分大都具有较强的保肝利胆活性,此外另一成分 6, 7-dimethylesculetin 也是茵陈蒿汤的主要血中移行成分,各成分相互配合,发挥药效^[17,18]。大鼠口服枳术丸后,血清中共检测到了 13 个化合物,其中 6 个为枳术丸中原型成分,7 个为代谢产物,柚皮苷、橙皮苷及新橙皮苷等为枳术丸主要体内直接作用物质,实验同时建立了枳术丸中入血成分柚皮苷、橙皮苷的含量测定方法并以此对枳术丸进行内在质量控制^[19]。大鼠口服双参宁心方后,血清共检测到 15 个来源于双参宁心方的原型成分,其中确定了人参皂苷 Rg₁、丹酚酸 B、延胡索乙素、脱氢紫堇碱等 4 个化学成分。该实验提示上述四种化学成分可能是双参宁心方抗心肌细胞缺氧/复氧损伤的有效物质基础。各成分协同作用,对心肌细胞起到保护作用^[20]。

4 含药血清的分析方法综述

所谓“含药血清”是指给动物或人服用一定量的药物后,经一定的时间采血所获得的血清。由于受到研究手段的限制,这种血清中所含药效成分并不十分明了,但它确实能表现出一定的药理作用^[21]。在这种含药血清中寻找药效成分,是国内外研究者努力的方向。

中药粗制剂口服给动物后,取其血清进行体外各项提取分离、分析鉴定等药化实验及药效学研究,可更准确、直接地把握其中的各有效成分或有效部位群,理论上更具备科学性、真实性。然而由于血清成分本身的复杂性,以及动物给药剂量、给药方式、采血时间、血清处理等诸多因素的影响。采用中药血清药物化学的方法开展研究,就必须预先设计好含药血清的制备和处理及后续的分析方法,现综合探讨如下:

4.1 实验动物的选择、给药方式、给药剂量及采血时间的考察

4.1.1 实验动物的选择 选取的实验动物应结合具体的实验研究而定,同时考虑选择与人类代谢行为相同或相似的物种,多选取大鼠、家兔等动物来制备含药血清,可采用成年大鼠,并将同组数只大鼠的血清相混合,以减少动物间的个体差异^[2]。

4.1.2 给药剂量的确定 通过预试验和参考相关文献解决给药剂量为较好方法。

4.1.3 给药方式的选择 目前在中药含药血清的制备过程中多采用灌胃的方式给药,也可通过皮肤、黏膜、呼吸道等途径给药^[22]。

4.1.4 给药次数与时间间隔 李仪奎等在对大量的中药药物代谢动力学参数进行分析后,提出一种制备含药血清的通行的方案,即每天给药 2 次,连续 3 d,末次给药后 1 h 采血,称为“通法”。这有利于节约财力、人力和时间^[23]。此外给药次数还可采用有(7~10)天法(1 次/d,连用 7~10 d),3 次给药法(连续给药 3 次,第 1、2 次间隔 2 h;第 2、3 次间隔 4 h),2 次给药法(第 1 次给药后 2 h,再以相同剂量重复 1 次)等。各种给药方式都是为了达到稳态血药浓度,从而便于对各种入血成分进行研究。

4.1.5 含药血清的采集 动物给药后,不同药物的浓度达峰时间不同,且同一药物的不同指标有其不同的最佳采血时间。一般来说,采血时间多集中在末次给药后 0.5 h~3 h 之间,但中药成分复杂,含药血清有可能随着时间的延续而转化为药物代谢血清。同时也可能会有相当一部分药物成分的血药峰浓度已过或是尚未达到。

此外有文章报道体内的化学成分群与中药固有化学成分群之间的关系是个动态变化的过程,目前大多数的研究仅限于是在给药后某一特定时间采集血液进行有效成分分析,这种方法在某种程度上仅能反映特定时间点的血清药物化学成分的情况,而在此时间点之前很快吸收入血并被代谢的成分和/或此点之后被吸收入血的成分的情况无法体现。因此,鉴于给药后血清药物成分可能发生变化,有必要建立血清药物化学动态图谱来反映中药化学成分群在体内的动态变化规律及其与药物原型成分之间的相关性,对此,武新安等通过给大鼠在麻醉状态下,左股动脉插管,分不同时间点抽取血样,进行了黄芪血清药物化学的动态谱的初步研究^[9],截止目前,国内外对中药血清动态指纹图谱的研究依然存在很大空间,亟待发展。

同时,需注意的一个问题是,动物在生理和病理状态下,因对药物的消化吸收、转化利用的不同,所制备的含药血清是不完全相同的。目前中药血清药物化学的研究多采用正常动物制备含药血清,这在一定意义上也会使研究结果出现偏差,因此相关文献^[22]建议,血清供体动物以造模的病理血清为宜,通过对病理状态下含药血清的研究可以得出更为真实、可靠的实验结果。

4.2 血清的处理方法 按一定的给药剂量灌胃动物后,取其血样(大鼠多采取麻醉后腹主动脉取血、眼球取血等,家兔多采用耳缘静脉取血),血样多置于预先用肝素钠抗凝处理后的离心管中离心,用微量取液器吸取血清后,采用加入有机溶剂沉淀蛋白法^[4,7,10,19]、高氯酸法^[9,14~16]、热水浴法^[6,12]、固相萃取法^[11,17,18]等方法处理血清,以除去血清中的酶和蛋白等,然后高速离心,取上清液减压干燥成粉末,在进行色谱分析前,加流动相溶解,并过微孔滤膜,取续滤液进样分析。

4.3 空白血清、含药血清、药物供试品的对照分析 将制备的空白血清、含药血清、及药物供试品溶液在同一色谱条件下进样分析,有些还要比对空白血清加药的谱图进行综合分析。复方研究中多将复方提取物、单味药提取物、某些已知

的单味药或复方中的有效成分的标准品、空白血清、含药血清等进行综合对比分析。以查明血中移行成分的可能来源(是原型入血,还是新生成的代谢物,在复方中来源等),同时可以借此差异来研究中药复方配伍的机制和意义等问题。

4.4 对血中移行成分进一步的结构鉴定和分析研究 可通过 GC-MS、NMR 等现代结构分析手段的联用、膜分离技术等,获取多维信息,对各移行成分进行结构解析,以便于为下一步的药效学研究提供原料。王喜军等人通过前期血清药物化学研究所得的移行成分的来源,通过综合运用各种提取分离方法,对相对应的单味药材进行分离,所得成分通过各种光谱和色谱手段分析和解析结构。此研究可大大提高中药提取分离的针对性,对中药及复方的研究起到极大的推动作用。

5 结语

中药走向世界是一项艰巨而长期的系统工程,中药血清药物化学研究方法的引入,使中医药研究进入了系统药物学研究的科学化领域,这对中药及中药复方在世界范围的推广起到了一定的推动作用,它有助于使我国学者在中医药领域的研究与国际接轨,从而提高了中医药在国际医药市场的地位,在不断创新的全医药领域的竞争中,我国的传统的中医药瑰宝必将发扬光大,焕发勃勃生机。

[参考文献]

[1] 王喜军. 中药血清药物化学的研究动态及发展趋势[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(10): 789.

[2] 米永杰, 李健. 中药血清药理学研究概述[J]. 四川解剖学杂志, 2006, 14(4): 34-35.

[3] 王喜军, 孙文军, 张宁, 等. 六味地黄丸血中移行成分的分离及结构鉴定[J]. 中国天然药物, 2007, 5(4): 277-280.

[4] 王亚丽, 梁逸曾, 陈练, 等. 当归活性成分的血清药物化学研究[J]. 现代中药研究与实践, 2004, 18: 75-79.

[5] 张闯. 单味药北五味子的体内成分分析[J]. 黑龙江科技信息, 2007, 08X: 201.

[6] 唐泓皓, 王伟, 刘斌, 等. 单味中药土茯苓血清药物化学的初步研究[J]. 中华中医药杂志, 2005, 20(6): 342-343.

[7] 丁岗, 崔瑛, 盛龙生, 等. 地黄血清药物化学的初步研究[J]. 中国天然药物, 2003, 1(2): 85-88.

[8] 李满郁, 王喜军. 山茱萸富集产物中血中移行成分的含量测定[J]. 中医药学报, 2005, 33(3): 4-6.

[9] 武新安, 魏玉辉, 宋刚, 等. 黄芪血清药物化学动态

谱初步研究[C]. 首届中国中西部地区色谱学术交流会, 2006, 8: 302-305.

[10] 曹艺, 朱丹妮, 林志宏, 等. 归苓片血清药物化学研究(1)[J]. 中国药科大学学报, 2007, 38(6): 519-522.

[11] 阳长明, 陈玉平, 冯长根, 等. 醒脑滴丸血清药物化学研究(I)[J]. 北京中医药大学学报, 2006, 29(9): 621-622.

[12] 宋金春, 曾俊芬, 胡传芹, 等. 生化汤的血清药物化学研究[J]. 中国药学杂志, 2005, 40(13): 977-979.

[13] 王喜军, 张宁, 孙晖, 等. 六味地黄丸的血清药物化学研究[J]. 中国天然药物, 2004, 2(4): 219-222.

[14] 王喜军, 张宁, 孙文军, 等. 复方安替威胶囊大鼠血清药物化学的初步研究[J]. 中国中药杂志, 2006, 31(18): 1538-1540.

[15] 王喜军, 张宁, 孙晖, 等. 复方安替威胶囊血中移行成分的富集工艺研究[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(21): 1654-1656.

[16] 曹洪欣, 于友华, 张华敏. 中药复方安替威血清药物化学和抗 SARS 病毒试验研究[J]. 中国中药杂志, 2004, 29(3): 281-282.

[17] 王喜军, 孙文军, 孙晖, 等. 茵陈蒿汤不同配伍变化对大鼠血中移行成分的影响[J]. 中国天然药物, 2008, 6(1): 43-47.

[18] Yoshihiro Kano, Wang X J, Junko Shirakawa, et al. Pharmacological properties of galenical preparations(IX, X) pharmacokinetics study of 6, 7-dimethylscutellin in rats[J]. J Tradit Med, 1994, 11(3): 176.

[19] 王喜军, 陈曦, 杨舸, 等. 枳术丸口服给药后血中移行成分分析及其定量研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2007, 9(2): 54-57.

[20] 孙宇扬, 刘建勋, 吴晓洋, 等. 双参宁心方血清药物化学和抗心肌细胞缺氧/复氧损伤的实验研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2006, 13(5): 36-37.

[21] 黄敏, 杨坤杰. 中药血清药理学研究方法及其改进思路[J]. 湖北中医杂志, 2006, 28(5): 24-25.

[22] Iwama H, Amagaya S, Ogihara Y. Effect of shosaikoto, a Japanese and Chinese traditional herbal medicinal mixture on the mitogenic activity of lipopolysaccharide: a new pharmacological testing method[J]. J Ethnopharmacol, 1987, 21(1): 45-53.

[23] 李仪奎, 吴健宇. 血清药理实验中采血时间的通法方案[J]. 中国药理学通报, 1999, 15(6): 569-570.