

• □ □ □ □ •

中药及复方全成分□ □ □ □ 通量□ □ 技术的现状 及□ □ □ □ □ □ 法

贺福元^{1,2,3*}, 邓凯文⁴, 曾姣丽^{1,3}, 戴儒文^{1,3}, 夏赞韶^{1,3},
刘文龙^{1,2,3}, 石继连^{1,2,3}

- (1. 南中医药大学药学院, 南 410208;
2. 中药药与药 国家中医药 重点实验室, 南 410208;
3. 南中医药大学 中药制 制与 实验室, 南 410208;
4. 南中医药大学 医院, 南 410007)

[□ □ □] 中药及复方成分的□ 性□ 量分析可分 化学与仪 分析法,其中仪 分析法占□ ,□ □ 有 HPLC, HPLC-MS, HPLC-NMR, GC, GC-MS, 化及 □ 应 方法。因中药及复方成分复杂,化学方法专属性不 ,少□ □ 慎□ ;而仪 分析因其专属性 ,□ □ 复杂 □ 成分的分析, 中药及复方多成分,目前□ 兴 了 □ □ 图 □ □ 手段的分析技术,但□ 分析方法 □ “□ 分离□ □ 分析”、“□ 乏通□ 的□ □ ”的限制,□ 现中药及复方全成分的□ □ 。□ □ □ 的“□ 、己”成分□ 通,“□ □ 与□ ”决□ 簇的 □ 与 □ 性进行识别, 将中药成分直 □ 化学□ 成□ □ ,□ □ 内, □ □ 性□ □ 诸成分 □ □ 的□ 叉 应信息, 没有□ 叉 应者,依 记□ □ □ □ 性竞争 应□ 制率□ □ 直 读□ □ 成分的□ 量; 有□ 叉 应者□ 建立□ 叉 □ 制率矩阵,□ 进行□ 与中药及复方成分 □ □ 记□ □ 竞争 应,建立成□ 叉成分□ □ □ □ □ 数与□ 制率的多元□ 性方 ,□ 解□ 得各成分的□ □ ,两者□ □ □ □ 建立 中药及复方成分□ □ □ □ □ □ 法。

[□ □ □ □] 中药;复方;全成分□ ;□ 通量;□ 性□ 量分析; 记□ □ 法;中药化学;□ □

中药复方 多成分 ,□ 阐 中药及复方作□ 机制, □ □ 解决中药及复方多成分的□ 性□ 量分析□ 题^[1]。现□ 报道的□ □ 方法□ □ □ □ □ 成分□ □ ,很少有同时□ □ 多成分的方法 □ □ 现,而 同时□ □ 全成分□ 的□ 则更少。□ 中□ 药现代化 □ 学的代□ 组学研究的兴 ,解决中药多成分□ 与 □ 学的代□ 成分□ 全成分□ 的同□ □ □ □ 题□ 眉睫^[2]。几年□ ,□ 研究□ □ 试图采□ □ □ □ 图 技术解决□ □ □ □ 题,但缘 □ □ 的分离□ 力、□ □ 的 复性、通□ □ □ 的□ 因,很□ 现中药及代□ 组全成分□ □ □ ^[3]。因此怎样□ □ □ 通量□ □ 中药及复方成分□ 成 国际性□ 题,不得不 解决。本文将□ □ □ 目前成分的□ 性□ 量分析方法 手,□ □ □ □ □ 成分□ 与辨别的□ □ 学基本 理, □ 目前

各种分析方法的弊端,□ □ □ □ □ 中药及复方全成分□ 分析的方法,并□ □ 黄 5种成分予 证。

□ □ 中药及复方分析方法的现状

纵 成分的□ □ 方法可分 化学方法与仪 方法,化学方法多□ 无机化□ 的分析,而仪 分析方法多□ □ 有机化□ 的分析。传□ 的中药成分分析多采□ □ 学□ 理 基础的仪 分析技术,□ □ □ 成分的□ 性□ 量分析□ 全可行。但 中药及复方多成分分析, 年□ 兴 了□ □ 图 多 □ 同时□ 性□ 量分析方法,但缘 目前尚□ 有通□ 型的□ □ ,因此□ □ 图 中的 □ □ □ 表达中药的□ 部分成分,同时 少应有的 照 ,□ □ 部分中的 成分□ 有□ 小数□ 进行□ 量分析, 者□ □ □ □ □ 分离与其性□ □ 应的部分成分,当遇□ 象中药及复方、代□ 组□ 样复杂的有机成分□ (□ 分 质量□ 几□ □ 上万,成分□ □ □ □ 简□ 的□ 基 □ 复杂的三帖□ □ □)□ □ 时, □ □ □ □ □ 的限制,不□ 进行全成分□ 全分离□ □ □ □ □ 必□ 的。因此建立 □ 种“法 □ □ ”的仿 全成分□ □ □ 通量□ □ 技术□ 解决中药质量控制、 现中药现代化□ 键□ 颈□ 题,□ 解决代□ 组学全成分□ □ □ 国际性□ 题的客

[□ □ □ □] 20120306010

[□ □ □ □] 国□ □ □ 科学基□ 项目(81073142,30901971);湖南□ □ □ 基□ 项目(11JJ2055)

[□ □ □ □] *贺福元,教授,□ 士 □ 师,□ □ □ 事遗传中药药理学、 学、 □ 学、 □ 力学、 量学、中药药剂学及中□ 药信息数学研究工作,Tel:(0731)85381372, E-mail :pharmsharking@tom. com

观需,不 不面对和解决。

□□ 生物体对 己成分的辨别

众所 , 的生物体,包括 体对中药成分 代谢组成分 的快速“辨识”却不按上 的化学分析 理,而 将其 作“外源性”物质经 应答识别。 质与多糖 等 分子具有 性,而中药 代谢组的成分多为小分子, 不具备 性。 可将小分子成分 作为半抗 , 通过与载体 成抗 ,将小分子成分结构信息以抗 决定簇 表达,经递呈而被辨识^[4]。因此, 辨识可识别可以抗 决定簇表现 的 、小分子,可 括 与 工 成所有的有机物分子类 , 中药与代谢组成分 绝 好的 测方法。

□□ 中药及复方全成分 测定方法建 的基本思路

□.□□ 标记技术及对中药全成分 测定的现状

标记技术 指 光素、酶、 射性同 素、化学发 光物、胶体、 电子致密物质等标记的抗 体 抗 进行抗 抗体反应测定的技术,其中酶联 技术应 最广。目前 标记技术及产品多 对具有 性的 质、多糖设 , 于病理、生理状 的 因子测定,少 于象中 药、代谢组研究中所遇的成分 的测定, 已有 申请 与文 报道中药成分 的质量控制可 特 性的抗体抗 反应, 目前仅有芍药苷等 10 种小分子成分建 了酶 联 测定(也有其 的标记 测定),多 成分测定 成分分析,没有适 全成分 的同 标记测定技术及 产品的面^[5]。

□.□□ 中药及复方 标记技术不受重 的 因

首先 传统成分测定多注重、成分的精确测定,少 注 多成分的同 测定,测定方法多受 成分测定 的影响; 另者也没有学科研究的需 。近年来,随着中医药现代化与 代谢组学研究的需 ,全成分 的快速同 测定已 学科发展亟需解决的 键 ,引起了国内外广泛的 注与重 , 已成为中药、生物医药、分析化学 的国际 ;其二 有 量高、精、尖测定的现代仪器,对 成分的测定研究 致深入, 对多成分的测定 研究却不 深入,其缺点还没有 引起 的认识和重 ,多认为凭借现代化的仪器可以解决 小分子多成分 的测定 ,因此,近年来推动了指纹图谱 测定多成分技术的兴起, 缘于指纹图谱测定技术具有与 现代仪器分析 样的弱点,亦在 多数 况 , 先分离才、 分析,故 地制约了对多成分 体系的同 快速分析;其三 目前还没有、满足全成分 测所需的通 测器;其 对于 分子化 物目前有 标记 技术的报 道, 所 对的物质数目不 , 互 不考虑 叉反应的 , 而 多数小分子有机化 物本 没有 性, 与载体结 才、有 性, 目前有 小分子酶联 测定方法的报 道,也有 特 性的抗体抗 反应来进行 中药成分 的质量控制的 申请, 建 适 中药与代

谢组全成分 成 上 样测定方法,不 不解决成分 的 叉反应;其 由于抗 与抗体的结 属性决定抗 表 的决定簇,而中药及代谢物成分往往 同母 生, 存在 似的抗 决定簇,因此 中的特 抗体与成 上 成分反应时非常有可、发生 叉反应,如莱克多 胺抗体 对多 酚丁胺有 8.3% 叉反应,链霉素抗体对 氢链霉素的 叉反应率达 90.6%,青霉素过 病 与头 菌素有 17.38% 叉过 反应。因此,怎样 理 叉反应 实现全 成分 测定的最为 键的技术。

□.□□ 中药及复方全成分 快速高通量分析亟需解决的 键

怎样对待 叉反应 。 对 样本抗体与成分 的 叉反应有 2 种解决思路,第 种思路为传统的观点,亦追 求抗 表 的决定簇的特 性, 量地消除 叉反应,对于 具有 性的 分子物质,因不易 现表 决定簇 全 同,可直接注入 动物体内产生特 性抗体,其抗体抗 反应特 性强,在 成 时可以不考虑抗体与成分 的 叉反应,目前很多生物、剂盒 据此 理设 制而成; 对于中药及代谢组学中的小分子有机物,没有 性, 一、 作为半抗 ,与载体(质、高分子物)结 成抗 ,注射 动物体内,才、产生所需特 性抗体,因此,抗体与小分子 半抗 的作 程 决于各小分子 的 似程 以及 与载体 质的 成方法,随着半抗 成分 似程 的增 ,其 叉反应表现 强, 量文 也报道了各成 分标记 竞争法 测时所产生的 叉反应,因此 全消 成分 的 叉反应既不 律,也不现实与可、, 故 按传统的消除 叉反应的思路来进行 样本特 性抗 抗体测定会 棘手,为此, 另辟蹊径, 第二思 路,亦在 可、消除 叉反应的 况 ,不畏 、不特 回 叉反应,而

后 免疫原 大 直接注入 内产 抗 ,没
免疫原 小 大 直接反 学合
抗原, 合 可能 增强抗 半抗原间 异
反 , 除 间 又反 所产 抗 离,再
记抗 抗原,包被未 记抗 抗原, 群
免疫芯片 通 抗 抗原 竞争 记免疫反
群 线 回归 又反 息,再根 精确
度 需要,将 群 需 虑 又反 需 虑 又反
2 类,前者可直接 芯片包埋抗原 抗 点阵 号
、无、强、直接由线 回归 读出含 ,后者需
数 度 度 线 组,求 群 含
, 而 中药、谢组学 至 学合 半合
群 定 定 , 把钥匙 开 把锁 锁, 互
联匹配 测 目
0.00 中药一 群快速高通 技术 案
根 免疫原 结构 点, 免疫原
大 合 直接 抗原,将没 免疫原 小 用
直接 学合 大 备 抗原 免疫抗
原 合 学 : 含氨 团 半抗原 ,
用重氮 酰 异氰 酯
氮苯 胺 酯 合 抗原, 含糖 半抗
原 , 用 碘 氧 ,然后 白 中 氨
形 Schiff 氏 合 抗原, 含 团 半抗
原 , 用 合 酰 胺 活泼酯 合 抗
原 含酮 团半抗原 ,可 用 - 胺 者
胍 苯 者 Mannich 反 合 抗原, 含
酯 半抗原 , 用叠氮 , 酯
经胍、硝 ,转变 叠氮 ,再 白上 氨 反
合 抗原, 含 团半抗原 , 用氯
氯 嗪 合 抗原 含氨 、 、硫
半抗原,可 用 硝 苯 合 抗原 合 所
使用 白 : 球 白、人血清白 白(HSA)、血
清白 白(BSA)、 血清白 白(RSA)、 球 白
(TG)、血蓝 白(hemocyanin) 人、 鸡 γ -球 白
白, 者是人 聚 氨 、聚谷氨 、聚
合氨 者 用聚 烯吡咯酮、 聚
酯 粒、 末
上 抗原 合注射 内产 抗 ,并 离
出抗 ,所 抗原所产 抗 IgA, IgD, IgG, IgE, IgM
中 一 6-7
上 抗原 抗 记,所 抗原 抗 记
记、酶 记 射 记、 金
学 记
将未 记 抗 抗原 目 律 包被 芯
片板,所 律包被 学类 、中 编码、英 编
码、药材所含 类群、功效、功能团、 、类 合

一组 谢产 测目 要求而编排
芯片点阵,包被未 记 抗原 抗
又反 矩阵 R 、斜率矩阵 B 、一抗 距 列
 A 、度 数 度列 C 叠加抑 率列 I
待测 数目 5~6 倍 芯片板, 包被 抗
原(抗) 芯片板, 内 又加入 1~4 数
梯度 , 一块板 加呈梯度 度
中 一 度 ,5~6 块板 一 异 抗
原抗 反 又 线 察 加 后再
, 内 加入 记 克隆抗 (记抗原)反
洗 后,加入底 色测定 直接测定 、射 强
度、强度,先 抑 率,再 抗原
抗 反 抑 率线 ,再 异 反 IC_{50} 除 非
异 IC_{50} 又率, 又 息,根 精密
度确定 又反 率 , 大 又反 率 组
又率矩阵 $R_{(r_{i,j})}$, (1)
其中 i 包被 抗 抗原, j 竞争 又 , i
 j 又 用超 精度 , n 需 虑 又反
数目 根所 又率矩阵 R 组 斜率矩阵

$B_{(b_{i,j})}$, (2)

$$R_{(r_{ij})} = \begin{pmatrix} r_{11} & r_{12} & r_{13} & \cdots & r_{1j} & \cdots & r_{1n} \\ r_{21} & r_{22} & r_{23} & & r_{2j} & & r_{2n} \\ r_{31} & r_{32} & r_{33} & & r_{3j} & & r_{3n} \\ \vdots & \vdots & \vdots & & \vdots & & \vdots \\ r_{i1} & r_{i2} & r_{i3} & & r_{ij} & & r_{in} \\ \vdots & \vdots & \vdots & & \vdots & & \vdots \\ r_{n1} & r_{n2} & r_{n3} & & r_{nj} & & r_{nn} \end{pmatrix} \quad (1)$$

$$B_{(b_{ij})} = \begin{pmatrix} b_{11} & b_{12} & b_{13} & \cdots & b_{1j} & \cdots & b_{1n} \\ b_{21} & b_{22} & b_{23} & & b_{2j} & & b_{2n} \\ b_{31} & b_{32} & b_{33} & & b_{3j} & & b_{3n} \\ \vdots & \vdots & \vdots & & \vdots & & \vdots \\ b_{i1} & b_{i2} & b_{i3} & & b_{ij} & & b_{in} \\ \vdots & \vdots & \vdots & & \vdots & & \vdots \\ b_{n1} & b_{n2} & b_{n3} & & b_{nj} & & b_{nn} \end{pmatrix} \quad (2)$$

$b_{i,j}$ B 矩阵中 任一 ,亦 入 又反 虑 任一
抗 任一 用线 斜率 A
距矩阵, (3)

$$A_{(a_{ij})} = \begin{pmatrix} a_{11} & a_{12} & a_{13} & \cdots & a_{1j} & \cdots & a_{1n} \\ a_{21} & a_{22} & a_{23} & & a_{2j} & & a_{2n} \\ a_{31} & a_{32} & a_{33} & & a_{3j} & & a_{3n} \\ \vdots & \vdots & \vdots & & \vdots & & \vdots \\ a_{i1} & a_{i2} & a_{i3} & & a_{ij} & & a_{in} \\ \vdots & \vdots & \vdots & & \vdots & & \vdots \\ a_{n1} & a_{n2} & a_{n3} & & a_{nj} & & a_{nn} \end{pmatrix} \quad (3)$$

再 包被 抗原(抗) 芯片板, 内加
入待测 , 内加入 记 抗 (记抗

值, 采 D (值) / D_0 (值) 计算, 乘 100, 再 $(n-1) \times 100$ 叠向 I ; 采 $(D_0 - D) / D_0$ 计算, 乘 100 即叠向 I , 式(4)。

当叠置 B_0 计算 $I = I_1 = (B_1 B_0 + n - 1) \times 100, I_2 = (B_2 B_0 + n - 1) \times 100, I_3 = (B_3 B_0 + n - 1) \times 100, \dots, I_j = (B_j B_0 + n - 1) \times 100, \dots, I_n = (B_n B_0 + n - 1) \times 100)^T$ 。

当叠置 n 个 $A(B_0 - B_j) / B_0$ 计算 $I = I_1 = [(B_0 - B_1) / B_0] \times 100$, $I_2 = [(B_0 - B_2) / B_0] \times 100$, $I_3 = [(B_0 - B_3) / B_0] \times 100, \dots, I_j = [(B_0 - B_j) / B_0] \times 100, \dots, I_n = [(B_0 - B_n) / B_0] \times 100)^T$ 。

叠, 斜矩阵乘 浓 (浓) 向
 截 向
 叠 向 $I, 0$ 式(5)。

$$BC + A' = I \Rightarrow BC = I - A' \quad (5)$$

摘要：目的：建立传统中药和方剂成分的定性定量分析方法。方法：采用化学和仪器分析方法。其中，仪器分析方法包括 HPLC、HPLC-MS、HPLC-NMR、GC、GC-MS、生化及生物效应等。但由于传统中药和方剂成分复杂，化学方法特异性差，使用较少或需谨慎。而仪器分析方法特异性强，适用于分析单一成分。传统中药和方剂成分分析技术受限于分离的前置条件和通用检测器的缺乏，难以实现所有成分的定性定量分析。在自然界中，生物体通过特异性和非特异性识别天然和外来成分，如将传统中药成分直接或间接合成抗原并注射到动物体内，以产生特异性抗体，从而收集交叉反应信息。对于无交叉反应的成分，其含量可通过竞争性反应的特异性抗原和抗体的抑制率曲线直接读出。此外，首先建立交叉抑制率矩阵，然后建立交叉成分浓度或浓度对数与抑制率之间的多元回归线性方程，通过标记免疫竞争性反应中抗体和半抗原的交叉反应，求解得到各成分浓度。将两种结果结合，建立合成免疫芯片方法，用于传统中药和方剂成分的定性定量分析。结果：传统中药和方剂成分；所有成分；高通量；定性定量分析；标记免疫方法；传统中药化学成分。

HE Fu-yuan^{1, 2, 3*}, DENG Kai-wen⁴, ZENG Jiao-li^{1, 3}, DAI Ru-wen^{1, 3}, DAI Ru-wen^{1, 3}, XIA Zan-shao^{1, 3},
LIU Weng-long^{1, 2, 3}, SHI Ji-lian^{1, 2, 3}

- (1. Department of Pharmaceutics, Hunan University of Tradition Chinese Medicine, Changsha 410208, China;
2. Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Property and Pharmaceutical Effect, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China;
3. Laboratory of Modern Preparation and Evaluation for Traditional Chinese Medicine, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China;
4. The First Affiliated Hospital, Hunan University of Tradition Chinese Medicine, Changsha 410007, China)

[摘要] The qualitative and quantitative analysis on traditional Chinese medicine and formula components can be made by chemical and instrumental analysis methods. Of both, the instrumental analysis methods play a dominant role, including HPLC, HPLC-MS, HPLC-NMR, GC, GC-MS, biochemical and biological effect. But because traditional Chinese medicines and formula have complicated components, chemical methods are so unspecific that they shall be used less or with caution. While instrumental analysis methods are so specific that they are appropriate for analyzing complicated single component. The analysis techniques for multiple components of traditional Chinese medicines and formula focus on fingerprints, but all of these analysis techniques are limited by the prerequisite of separation and the lack of general-purpose detectors and therefore being hard to realize the determination of all components of traditional Chinese medicines and formula. In the natural world, however, organisms identify native and alien components through specificity and non-specificity of clusters decided by antigens and antibodies. For example, components of traditional Chinese medicines are directly or indirectly synthesized into antigens and injected into animals, in order to generate specific antibodies and then collect cross reaction information of these components to specific antibodies. As for components without cross reaction, their contents shall be directly read out on the basis of the inhibition rate curve of competitive reaction for specificity of antigens and antibodies. Besides, a cross inhibition rate matrix shall be established first, and then a multiple regression linear equation between cross component concentration or concentration logarithm and inhibition rate by labeling the immunity competitive reaction between antibodies and haptens of traditional Chinese medicine and compound components, and then solved to obtain concentration of each component. The two results are combined to establish the synthetic immunity chip method for traditional Chinese medicine and formula components.

[关键词] traditional Chinese medicine; formula; all components; high throughput; qualitative and quantitative analysis; labeled immunity method; chemistry of traditional Chinese medicine

中图分类号：R286.1

[责任编辑 马超一]