

近十年中药药代动力学新技术新方法概述

柏冬 王瑞海 刘丽梅

【摘要】 中药具有多成分、药效物质不确切的特征,长期以来中药药代动力学的研究存在许多困难。新的仪器、分析技术的出现,提高了中药体内成分分析的灵敏度,使得中药多成分药代研究成为可能。目前认为,在中药药代动力学研究中同时监测多个成分的药代动力学特征是十分有必要的,“中药多组分整合药代动力学研究”“中药药代标记物”“代谢组学”的研究思路较好地解决了这个问题。但目前的研究仍然存在许多争议,本文对近十年中药药代动力学的新技术与新方法进行综述,希望对中药药代动力学研究提供借鉴。

【关键词】 中药药代动力学; 中药多组分整合药代动力学; 中药药代标记物; 代谢组学
【中图分类号】 R285.5 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2016.07.040

Review on new technologies and methods of pharmacokinetics of traditional Chinese medicines in recent 10 years BAI Dong, WANG Rui-hai, LIU Li-mei. *Institute of Basic Theory of TCM, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China*
Corresponding author: LIU Li-mei, E-mail: liulimeihrb@163.com

【Abstract】 As the chemical compositions in traditional Chinese medicine is very complex and the effective components are not accurate, there are many difficulties in the study of traditional Chinese medicine. With the developments of new technologies and methods, a lot of achievements in the

基金项目:国家重点基础研究发展计划(973计划)(2012CB518401)

作者单位:100700 北京,中国中医科学院中医基础理论研究所

作者简介:柏冬(1983-),博士,副研究员。研究方向:中药药效物质基础。E-mail:baidong2000@126.com

通讯作者:刘丽梅(1965-),女,本科,研究员。研究方向:中医方证基础研究。E-mail:liulimeihrb@163.com

pharmacokinetics have been made at home. For example, the emergence of new instruments and analysis technology can improve the sensitivity of the analysis the composition of traditional Chinese medicine in vivo, and make it possible to study the composition of traditional Chinese medicine. It has been reached an agreement that monitoring multi-components' pharmacokinetics characteristic at the same time is very necessary. The research idea of "integral pharmacokinetic study of multiple components", "pharmacokinetic markers of traditional Chinese medicine" and "metabonomics technology" can resolve this problems, but there are still of a lot of controversy in the present study. This paper organizes the related literature with pharmacokinetics of traditional Chinese medicine in recent 10 years. We hope it can provide reference for the study of pharmacokinetics of traditional Chinese medicines.

【Key words】 Pharmacokinetics of traditional Chinese medicines; Integral pharmacokinetic study of multiple components; Pharmacokinetic markers of traditional Chinese medicine; Metabonomics

中药药代动力学是借助于动力学原理,研究中草药活性成分、组分、复方在体内吸收、分布、代谢和排泄的动态变化规律及其体内时量——时效关系,评价中药的安全性、有效性。中药药代动力学研究困难,存在着药效成分不明确、成分检测困难等问题,针对这些问题,国内学者开展了许多研究,提出并建立了适合中药特点的多成分药代动力学研究新模式,发展了一批新的研究技术和方法,本文对近十年来这些技术和方法进行了整理。

1 国内外对中药(植物药)药代动力学的研究要求

1.1 国内对中药药代动力学的研究要求

国内在中药、天然药物 I 类新药的研发中要求进行药代动力学研究,其要求与化学药相似。在 2007 年颁布的《中药、天然药物注射剂基本技术要求》中明确指出,多成分的中药注射剂需要进行药代动力学的探索性研究,必要时还应进行多成分间的药代动力学相互作用研究^[1]。

目前中药药代动力学常用的方法有“有效成分法”“生物效应法”等。中药成分众多、药效物质基础不确切,“有效成分法”很难选择合适的指标性成分;“生物效应法”对于大多数中药而言,难以选择适宜的客观、量化生物活性指标,这一方法的局限性较大。《中国中医药创新发展规划纲要(2006-2020)》中明确指出建立符合中药自身特点的研究、评价方法和标准规范体系是当前中药现代化研究的主要任务之一^[2]。如何建立符合中药多成分、多靶点特点的中药整体药代动力学评价体系,是目前需要解决的关键科学问题。

1.2 FDA 对植物药药代动力学的研究要求

2004 年,美国食品和药物管理局(food and drug administration, FDA)正式颁布了《Guidance for

Industry Botanical Drug Products》,“Botanical Drug”与中药类似,来源于植物,含有多种成分,化学组成不清楚,有效成分不明确,这个指导原则对中药的研发也具有重要参考价值。

FDA 强调进行植物药非临床药代动力学的目的是辅助设计合理的毒理学研究方法,并能解释毒理学实验的结果^[1]。对植物药有效物质基础的复杂性和不确定,FDA 建议可以采用已知的有效成分、代表性的标识成分或主要化学成分进行药代动力学研究,如果现有化学技术不能满足检测需要,可用生物效价检测方法进行药代动力学研究^[3]。Veregen 软膏为上述指南公布后 FDA 批准的第一个植物药,Veregen 为绿茶提取物,包含多种已知的并且可能是活性成分的混合物,主要成分是茶多酚(epigallocatechin gallate, EGCg)。研究者为了充分评估其全身暴露程度,以确保其在体内的最大暴露并不足以危害人体健康,进行了一系列实验:(1)不同浓度的 EGCg 在体外经人体皮肤的吸收试验;(2)³H-EGCg 在 Beagle 犬体内的组织分布和药代动力学研究;(3)雌性小型猪皮肤和阴道反复使用 10%、15% 的 Polyphenon E 乳膏后血浆中 EGCg、表儿茶素没食子酸酯(epicatechin gallate, ECg)、表儿茶素(epicatechin, EC)药代动力学研究。可见,研究者选用了有效部位中含量最高的几种主要成分进行药代动力学研究。FDA 认为提供的数据表明局部应用该软膏,4 种主要成分全身暴露很低,非临床实验未观察到明显的全身毒副作用,考虑到药物成分复杂,绿茶本身口服/局部使用安全,全身暴露少,最终通过了申请^[4]。

2 新技术在中药药代动力学中的应用

中药成分复杂,进入体内的药物成分含量很

低,且检测时有大量干扰。许多新的分析仪器和技术提升了中药体内成分检测的灵敏度和专属性。

2.1 液相质谱联用技术在中药药代动力学中的应用

三重四级杆质谱灵敏度高、专属性好,多用于中药多成分的分析定量^[5]。大鼠注射脉络宁后,利用三重四级杆质谱可以同时检测到大鼠血浆中二咖啡酰奎宁酸的三个同分异构体,3 个成分的回收率均大于 85%^[6]。飞行时间杂交质谱可以用于研究药物的结构及体内代谢物,灵敏度、分离度也大大增加,通过保留时间、碎片离子信息以及其他的特征进行识别,可推断化合物的类型与结构^[7]。例如利用 LC-IT-TOF/MS 技术,建立各类成分快速检出与结构推断分析策略,鉴定了参麦注射液中 30 种人参皂苷类成分及 20 种木脂素类成分^[8],以及脉络宁注射液中 87 种成分^[9]。

2.2 “液相色谱电解质效应”和“脉冲梯度色谱技术”在中药药代动力学中的应用

李川等^[10]针对体内样品含量低、基质干扰大,难以准确检测药物成分浓度的问题,在质谱检测和液相分离技术上进行创新,发现了“液相色谱电解质效应”、建立了“脉冲梯度色谱技术”,提高了中药多成分药代动力学研究中分析方法的可靠性。在利用 LC-MS 检测血浆中小柴胡汤中的多种甘草黄酮成分时,发现通过添加微量的甲酸(0.01%甲酸)可以大大提高化合物的离子化效率,提高检测的灵敏度^[11]。在检测血浆中银杏叶提取物中的黄酮、内酯类成分时,通过添加微量甲酸铵(0.2 mM),也可以大大提高检测的灵敏度^[12]。李川等^[10]把这种通过在流动相中添加微量电解质,提高 ESI 离子源响应值和减少血浆基质成分干扰的现象称为“液相电解质效应”,这种现象适用于正离子和负离子状态。

脉冲梯度洗脱色谱技术使用两种溶剂,先用水把生物样品的基质干扰冲下去,让化合物留在柱头,然后再用有机溶剂冲出化合物,让化合物出峰在没有基质干扰的时间。该方法可以抑制样品的“基质效应”和“溶剂效应”、改善峰形、提高分析灵敏度、优化方法快。利用“液相色谱电解质效应”和“脉冲梯度洗脱色谱技术”,可有效提高中药多成分复杂样品分析的技术水平^[10]。例如蔡飞等^[13]采用以下流动相梯度检测血浆中滋肾丸双苯吡酮苷类与知母皂苷类成分:A 相为乙腈,B 相为水(含 0.05% 甲酸):0~0.3 分钟为 7% A→50% A,0.3~

2.3 分钟为 50% A,2.3~2.5 分钟为 50% A→7% A,2.5~5.5 分钟为 7% A;post time 为 1.5 分钟;流速为 0.3 mL/min;每个样品的分析周期为 7 分钟。

3 新方法在中药药代动力学中的应用

3.1 同时监测多个成分的药代动力学特征

中药具有多成分、多靶点的特征,近年来同时检测中药中多个成分的药代动力学特征是国内中药药代研究的热点之一。例如刘彦娜等^[14]利用 LC-Q-TOF 检测大鼠静脉注射给药麦冬皂苷提取物后,不同时间血浆中的麦冬皂苷浓度,共检测了其中 28 种皂苷成分,由于母核结构不同,在血浆内的代谢具有不同特征。任浩等^[15]用 UPLC-TQ/MS 测定大鼠灌胃复方柔肝后,血浆中姜黄素和双去甲氧基姜黄素的含量,发现复方柔肝配伍显著提高姜黄素峰浓度,增加了其生物利用度,并加快双去甲氧基姜黄素在体内吸收速度,但对其生物利用度影响不大。

中药与化药最大不同在于药效物质基础的不确定,所检测的成分并不能确定其为有效成分,而且中药可获得的对照品数量有限。在进行药代动力学研究时,检测指标的选择一直争论不断,目前文献中多数只交待多成分的体内测定方法,而简化选择该成分的原因,多选择容易购买到对照品的成分进行测定^[16]。而且各成分的药代动力学参数是孤立的,相差较大。根据药物半衰期设计临床给药方案是药代动力学的基本作用,但孤立的若干成分药代动力学结果尚不足以指导临床用药^[17],这也是目前许多人质疑中药是否有必要进行药代动力学研究的原因之一。

3.2 中药多组分整合药代动力学研究

上文提及中药中不同成分的药代动力学特征差异较大,如何获得中药的整体药代动力学行为,从而指导临床用药,是中药药代需要解决的首要任务。郝海平等^[2]提出了中药多组分整合药代动力学的概念。利用 AUC 为计算各成分药代动力学权重的参数,将各成分进行整合,获得能够最大限度表征复方整体行为的药代动力学参数。李晓宇等^[18]进行了三七总皂苷多效应成分整合药代动力学研究。利用 LC-MS 检测了大鼠灌胃及静脉注射后,血浆中三七皂苷 R1、人参皂苷 Rg1、Rd、Re、Rb1 的浓度,计算了各成分的药代动力学参数,利用 AUC 百分率作为各成分的百分系数,将各成分

血药浓度整合为整体的血药浓度,估算总皂苷的药代动力学参数。研究发现灌胃后二醇型皂苷的半衰期远大于三醇型皂苷,整合后注射给药和灌胃给药的 $t_{1/2}$ 、AUC 分别为 18.88, 19.15 小时和 25.33, 84.83 mg/(h·L), 可以反映不同给药途径药代动力学的特征, 可以尝试指导临床应用。但这个方法所得的参数与整体药效关联度不够, 只用于反映药物成分在体内的存留特征。这种方法适用于结构类似、药代动力学特征相似的有效部位研究, 而对于结构类型差异较大、药代特征差异较大的混合物, 整合参数只具有数学意义, 而且整合后 AUC 和 C_{max} 会低于各成分原始值, 在安全性研究时, 对药代研究结果要谨慎对待。

3.3 中药药代动力学标志物研究

在 2009 年的第九届全国药物和化学异物代谢学术会议上, 刘昌孝院士、李川教授提出了药代动力学标记物 (pharmacokinetic markers) 的概念^[19]。他们认为如果中药中某些成分具有合适的药代动力学性质, 可以代表该药物的整体药代动力学行为, 这需要满足以下条件: (1) 存在于所研究的药物中或与药效相关的代谢物; (2) 与药效相关; (3) 可以被现有分析方法检测, 并且药物浓度随时间变化。如果有效成分不确定, 药物中的主要成分 (代谢物) 也可以作为药代标志物。通过对药代标志物研究, 就可以了解药物中其他成分在体内的药代动力学特征, 从而评价药物整体的药代动力学特征。

Liu 等^[20]对三七的药代动力学研究, 大鼠灌胃三七水提液后, 利用 LC-MS 检测血浆中的原人参二醇类皂苷 (人参皂苷 Ra3、Rb1、Rd)、原人参三醇类皂苷 (人参皂苷 Re、Rg1、和三七皂苷 R1)。研究发现人参皂苷 Ra3、Rb1、Rd 在体内具有合适的药物浓度, 相对缓慢的胆汁排泄使得它体内滞留时间较长, 与剂量具有一定依赖性, 个体差异较小, 使得这几种成分适宜作为三七的药代标志物。而其他人参皂苷 Re、Rg1、和三七皂苷 R1 和其他主要代谢物不具有以上特征。研究结果还发现, 三七总皂苷药代标志物与多组分整合药代动力学的药时曲线十分相似。

通过对复方丹参滴丸的研究, 发现比格犬注射和口服给药后, 血浆中丹参素的浓度与剂量高度相关, 达峰时间为 0.5 小时, 生物利用度 50% 左右, 与该制剂起效迅速的特点相符合, 故血浆中丹参素可以作为复方丹参滴丸的药代标志物^[21]。

3.4 代谢组学与药代动力学

代谢组学研究的对象主要是内源性小分子及其变化规律, 反映了生物体自身病理状态和药物等外界刺激下的应答。代谢组学能够精确表征生物体自身的病理状态和对外界刺激后的响应, 其中内源性生物标志物可以用来简单而直接地描述生物体的生理、病理状态, 其浓度的上调或下调反映了生物体的生理平衡被扰动, 药物干预的结果在代谢层面上实质是反映其恢复了内源性标志物的平衡浓度^[22]。

罗国安等^[23]认为中药复方作用于人体是一个“干预系统 (中药复方) - 应答系统 (生物机体)”相互作用整合的生物学过程。生物体受到干预系统的影响而产生药效或毒性。生物机体系统受中药系统作用后将会在内源性代谢物组上产生应答, 而这种应答可以用代谢组学来准确表征。代谢组学间接地反映药代动力学的特征, 甚至能表征个体用药的药代动力学差异^[24]。目前已有学者尝试运用代谢组学的研究技术思想进行药物复杂代谢产物的检出与鉴定^[25]。王广基等^[26]提出通过药物代谢动力学与代谢组学的整合研究, 建立符合中药方剂多组分、多靶点作用特征的 PK/PD 结合研究方法, 旨在融合二者在分析技术方法上的相通性及研究对象上的互补性, 同步揭示中药方剂复杂的体内药效物质基础与整体药效作用, 并试图通过有效成分体内动力学过程与相关生物标记物群的整体量变关系, 揭示各成分的药效作用特点与其对整体药效作用的贡献度。

4 结语与展望

由于中药成分的复杂性和药效物质基础的不确定性, 增加了中药药代动力学研究的难度。中药含有多种化学成分, 对每种成分进行研究既无必要也不可能, 而且目前中药缺乏足够丰富的对照品。已有的研究资料表明, 许多中药中已知的化学成分在体内运转过程中发生较大变化, 并不是该成分本身产生药效作用, 也不能在生物体内测定到该成分的存在。例如芍药苷^[27]、甘草酸^[28]口服后以原型吸收进入血液的成分较少, 多数以肠内菌群代谢物的形式进入血液。所以说虽然目前提出了许多解决的办法, 但距离解决药代动力学指导临床用药有着很大距离。

中药药代动力学研究的目的是为了保证药品

的安全性和有效性,在中药研究中药物的安全性和有效性才是首要的,在这两点得到确认的前提下,对中药的药代动力学不应要求过于苛刻。中药的用法、用量大多来源于临床,所以中药的安全性和有效性评价才是关键,而不应过度追求以药代参数指导中药的临床用药。

参 考 文 献

[1] 黎国富,赵浩如,杨劲. 中草药新药多成分药代动力学评价的研究进展[J]. 中国中药杂志,2011,36(05):644-649.

[2] 郝海平,郑超满,王广基. 多组分、多靶点中药整体药代动力学研究的思考与探索[J]. 药学报,2009,44(3):270-275.

[3] 叶祖光. 评美国 FDA 的《植物药研制指导原则》[J]. 医药世界,2004,6(11):31-33.

[4] 黄芳华. 从美国首个被批准植物药探讨中药药代动力学研究与评价策略[J]. 中国中药杂志,2010,35(7):932-935.

[5] 刘安昌,赵丽霞,邢杰,等. 液相色谱-串联质谱法测定大鼠血浆中脱水葛根素浓度及其药代动力学研究[J]. 中国天然药物,2013,11(5):566-571.

[6] Wang W, Hao HP, Wang GJ, et al. Simultaneous quantitation of dicaffeoylquinic acids in rat plasma after an intravenous administration of mailuoning injection using liquid chromatography-mass spectrometry[J]. J Chromatogr Sci, 2009, 47(3):216-222.

[7] 朱超,胡坪,梁琼麟,等. 脂组学及其研究进展[J]. 分析化学,2009,37(9):1390-1396.

[8] Zheng C, Hao H, Wang X, et al. Diagnostic fragment-ion-based extension strategy for rapid screening and identification of serial components of homologous families contained in traditional Chinese medicine prescription using high-resolution LC-ESI-IT-TOF/MS; Shengmai injection as an example [J]. J Mass Spectrom, 2009, 44(2):230-244.

[9] Hao H, Cui N, Wang G, et al. Global detection and identification of nontarget components from herbal preparations by liquid chromatography hybrid ion trap time-of-flight mass spectrometry and a strategy[J]. Anal Chem, 2008, 80(21):8187-8194.

[10] 李川,牛巍,孙艳,等. 利用液相色谱电解质效应结合脉冲梯度色度谱技术提高药代筛选中生物样品液-质联用分析的速率[J]. 中国临床药理学与治疗学,2007,12(10):1181.

[11] Li L, Liang S, Du F, et al. Simultaneous quantification of multiple licorice flavonoids in rat plasma[J]. J Am Soc Mass Spectrom, 2007, 18(4):778-782.

[12] Zhao Y, Sun Y, Li C. Simultaneous determination of ginkgo flavonoids and terpenoids in plasma; ammonium formate in LC mobile phase enhancing electrospray ionization efficiency and capacity[J]. J Am Soc Mass Spectrom, 2008, 19(3):445-449.

[13] Cai F, Xu W, Wei H, et al. Simultaneous determination of active xanthone glycosides, timosaponins and alkaloids in rat plasma after oral administration of Zi-Shen Pill extract for the pharmacokinetic study by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2010, 878(21):1845-1854.

[14] 刘彦娜,梁艳,王广基. 麦冬提取物中多种皂苷类成分的药代动力学[J]. 中国实验方剂学杂志,2014,14(9):137-142.

[15] 任浩,宿树兰,管汉亮,等. 复方柔肝中姜黄素类成分大鼠药代动力学特征[J]. 中成药,2014,36(3):498-503.

[16] 张英丰,董宇,朱晓新. 中药复方药代动力学研究的方法与思考[J]. 中国天然药物,2008,6(5):321-324.

[17] 赵保胜,刘洋,王晶娟,等. “暴露-反应-机制”三联研究模式学术思想及其中医药领域应用[J]. 世界中医药,2014,9(9):1234-1237.

[18] 李晓宇,郝海平,王广基,等. 三七总皂苷多效应成分整合药代动力学研究[J]. 中国天然药物,2008,6(5):377-381.

[19] 刘昌孝,王广基,钟大放,等. 我国近年来药物代谢与药代动力学研究[C]//中国药理学会药物代谢专业委员会. 第九届全国药物和化学异物代谢学术会议论文集,武汉,2009.

[20] Liu H, Yang J, Du F, et al. Absorption and disposition of ginsenosides after oral administration of Panax notoginseng extract to rats[J]. Drug Metab Dispos, 2009, 37(12):2290-2298.

[21] Lu T, Yang J, Gao X, et al. Plasma and urinary tanshinol from Salvia miltiorrhiza (Danshen) can be used as pharmacokinetic markers for cardiotoxic pills, a cardiovascular herbal medicine [J]. Drug Metab Dispos, 2008, 36(8):1578-1586.

[22] 高鹏飞,刘卫红,吴俊珠,等. 代谢组学在中医药研究中的应用进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2011,17(21):284-288.

[23] 罗国安,梁琼麟,王义明,等. 中医药系统生物学发展及展望[J]. 中国天然药物,2009,7(4):242-248.

[24] 向铮,蔡小军,曾苏. 基于复杂网络与代谢组学的中药药代动力学研究思考与探索[J]. 药学报,2012,47(5):558-564.

[25] Plumb RS, Stumpf CL, Granger JH, et al. Use of liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry and multivariate statistical analysis shows promise for the detection of drug metabolites in biological fluids [J]. Rapid Commun Mass Spectrom, 2003, 17(23):2632-2638.

[26] 王广基,郝海平,阿基业,等. 代谢组学在中药方剂整体药效作用及机制研究中的应用与展望[J]. 中国天然药物,2009,7(2):82-89.

[27] 王晓玲. 芍药苷的微生物转化研究[J]. 西南民族大学学报(自然科学版),2011,37(3):425-430.

[28] 宋丽,徐璐扬,张宁. 大鼠肠内微生物对甘草酸代谢的影响[J]. 上海中医药杂志,2008,42(9):70-72.

(收稿日期:2014-06-30)

(本文编辑:董历华)