

中草药有效成份的标记方法

丁绍凤 仪明光
(北京师范大学) (中国科学院原子能研究所)

一、前言

中草药用于临床已有几千年的历史。最古的著作首推《神农本草经》，大约著于后汉时代(公元一世纪)，其中贡献最大的要算李时珍的《本草纲目》，载药1892种、植物图纸1120幅。它不仅在我国、而且对欧美各国的医药发展都有重要的影响。为了应用近代的科学知识和方法来研究中医中药，以便创造出我国的新医学新药学；近几年来由中草药提取了大量的有效成份，进行药理研究，有的已用于临床。在1979年全国药理学术交流会上，大会发言的有35篇论文，其中就有7篇是中草药的文章。日本、南朝鲜、美国和西德等国对从各种植物中提取有效成份也是很感兴趣的，1971年美国研究高等植物282种、48000个提取物，低等植物99科、10000个提取物，但可供临床应用的不多。日本和南朝鲜首先从人参中提取人参皂苷，并做了同位素标记和示踪^[1]。近二十年来，我国对中草药的抗癌成份研究比较多，全国共筛选了三千多种中草药，提取的有效成份有100多种进行了药理研究和临床验证，投产的有15种，其中大部分进行了同位素标记。特别是1975年以后，广泛开展中草药有效成份的提取和应用，估计每年至少有几十种中草药的有效成份要求标记。为了适应这方面的要求，核技术工作者广泛地研究了各种不同的标记方法和作用机制。到目前为止，用于标记中草药有效成份的放射性同位素主要是³H、¹⁴C、³⁵S。³H使用的数量和次数最多、³⁵S比较少。

二、标记方法

组成中草药有效成份的主要元素是碳、氢和氧。为了不改变有效成份的化学性质，人们往往用它们的放射性同位素³H和¹⁴C进行标记。而氙的同位素丰度较高、价格较低、标记步骤简短，故国内外用³H标记中草药有效成份更广泛。

标记中草药有效成份的方法很多。不同结构的化合物可以采用不同核素、不同标记方法，概括起来，可分四种类型。

1. 同位素交换法

在氙标记中，同位素交换是指氢(H)-氙(T)同位素之间进行交换反应，此反应是可逆的^[2]。



由于使用氙化试剂不同，又可分为两种标记方法。

(1) 氙气-曝射法^[3] 氙气-曝射法是由 Wilzbach 在 1957 年首次建立的，也称为 Wilzbach 氙气-曝射法。

所谓 Wilzbach 氙气-曝射法，就是将被标记物与氙气在曝射瓶内接触数天或数周，即可达到标记目的。这个方法仅仅借助于氙衰变的能量诱导氢-氙同位素交换，其标记物的比度很低。为了提高标记物的比度，国内外作了一系列的改进，大致可分为三种情况。①充分扩大氙气与被标记物的接触面积：将被标记物均匀涂在曝射瓶的内壁上，或者均匀分散在玻璃棉、活性炭上，以扩大接触面积，提高标记效率。使用这种操作技术，标记了秋水仙碱、喜树碱、斑蝥素等中草药有效成份^[4]，其比度和放化纯度均能满足动物实验的要求。②活化氙气：采用高频放电、微波放电、紫外线、γ-射线和 X-射线辐照等方法，把氙分子(T₂)解离为氙原子(T)，或者电离为氙正离子(T⁺)，提高标记效率50~1000倍。国内使用高频放电法比较多，如青蒿素^[5]、青蒿素衍生物—青蒿醚^[6]、三尖杉酯碱^[7]和高三尖杉酯碱^[8]等都是采用高频放电法标记的。它们的比度和放化纯度均能满足动物实验的要求。③用铂、钨作催化剂，降低氢-氙同位素交换反应的活化能，可提高标记效率50倍左右。这个方法对含有芳香环的化合物催化效率高，对脂肪族化合物就差一些，对那些只含有孤立双键和叁键的化合物不宜使用。近年来，我们还研究了氙气循环放电曝射法^[9]和氙气熔融曝射法^[10]，这些方法均能提高标记效率。

(2) 在溶液中催化交换法 以氟气、氟水等为氟化试剂, 钨、铂等为催化剂, 在溶液中进行氢-氟同位素交换反应是另一种常用的方法。如以氟气做氟化试剂时, 则称做非均相催化交换; 氟水等液态氟化物做氟化试剂时, 称做均相催化交换。无论均相还是非均相标记中草药有效成份所得放射性比度和放化纯度都比 Wilzbach 氟气-曝射法高。国外广泛使用这一方法^[11], 国内近几年来也在逐步推广, 如辛酰胺伯喹^[12]、小檗胺^[13]是采用非均相催化交换反应标记的, 抗痢灵^[14]是采用均相催化交换反应标记的。产品的比度一般可达每毫摩尔数百毫居里。

2. 化学合成法

定位标记中草药有效成份, 一般采用化学合成法。如¹⁴C标记的汉防己甲素就是由汉防己乙素与重氮甲烷反应而获得的, 其合成路线如下:

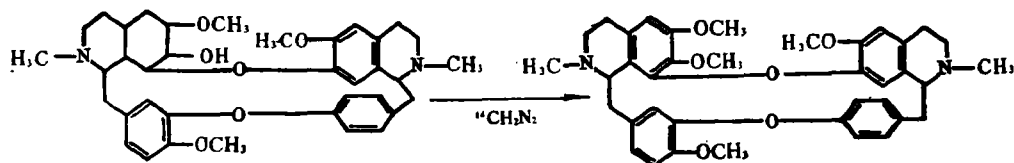


图 1 合成路线

定位标记的氟化物大致可采取三种方法:

1). 还原不饱和有机化合物 选择或制取适当的不饱和有机化合物为前体, 氟气为氟化试剂, 经催化加成反应, 即可达到定位标记目的^[15]。

2). 催化卤-氟交换法 选择适当条件和步骤, 先卤化被标记化合物, 然后再选择合适的溶剂、催化剂和氟气压力进行催化卤-氟交换反应, 获得高比度的标记物^[16]。

3). 用氟化金属氢化物还原含羰基化合物 常常使用硼氟化钠、硼氟化锂和锂铝氟等还原酸、酯、醛和酮等有机化合物而达到定位标记目的。如氟标记的还原青蒿素^[17]是用硼氟化钠还原青蒿素而获得的。

3. 生物合成法

利用酶的专一性, 标记具有生物活性的大分子和氨基酸。如 L-2-3-³H-门冬酰胺^[18]是利用 A_{51.681} 固定化细胞的专一性而制得的。

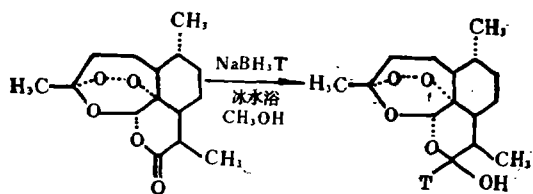
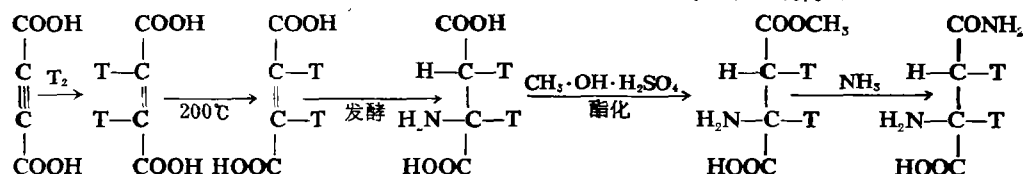


图 2



4. 反冲法

利用 ⁶Li(n, α)³H 或 ³He(n, p)³H 反应, 通过反冲氟原子标记有机化合物。该法标记的化合物比度太低, 没有实用意义, 此法虽然提出较早(1955年), 但迄今未有重大进展。

比较以上四种标记方法, 各有其优缺点:

(1) 同位素交换法是制备标记化合物最常用的方法。溶液中催化交换法制备氟标记化合物, 具有操作简便、快速、比度高和杂质少等优点。但是标记位置很难确定。用氟气做氟化试剂, 容易发生加成反应和还原反应, 破坏被标记物的本来结构, 氟水其毒性比氟气至少大 1000 倍, 因而必须注意防护。用氟气-曝射法也具有操作简便的优点, 但是它的缺点比较突出, 如曝射时间长、比度低、辐射杂质多等。改良的氟气-曝射法^[19]标记中草药有效成份的标记位置问题已引起国内外^[20]广泛注意, 我们也作了初步探讨^[21]。

(2) 化学合成法也是制备标记化合物最常用的方法, 它具有定位标记的特点, ¹⁴C 标记和氟化金属氢化物还原含羰基化合物就是很典型的例子。

(3) 生物合成法对标记生物物质最为合适, 它能够保持被标记物的生物活性和它的构型。

至于某一中草药的有效成份用什么方法标记为宜,要看这个化合物的具体结构和它的性质。如有不少中草药有效成份的结构往往都是很复杂的,至今还没有合成方法,用化学合成法或生物合成法进行定位标记是无法实现的,于是改良的氚气-曝射法对中草药有效成份进行氚标记的作用就显得更加突出了。又如青蒿素是一种具有过氧基团的新型倍半萜内酯,对酸、碱、催化剂敏感,为了确保其结构不变,采用高频放电氚气-曝射法进行标记为好。总之,标记中草药有效成份的原则是:①必须确保被标记物的本来结构和组成不发生任何改变;②操作步骤越简短,用氚量越少,标记速度越快,标记物比度越高越好。为了保证标记物分子结构不变,有时一步反应是不够的,例如,氚标记氧化苦参碱^[22]就是先用高频放电法氚标记苦参碱,再用双氧水氧化而得。

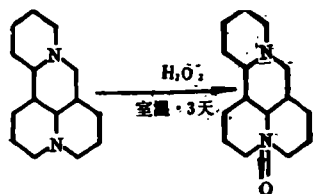


图 3

三、发展趋向

1. 核技术用于中医中药的研究,解决了很多难以解决的问题,是行之有效的办法。为发展祖国的医学事业,应在中医中药研究中,大力推广使用核技术。

2. 开展新的标记方法研究,寻找具有操作步骤简短、标记物的比度高、杂质少、费用低、快速等特点的标记方法。近几年国内外研究的快速标记方法有:循环放电、微波、激光和熔融法等。

3. 开展稳定同位素的标记工作,如 D_2 、 $^{15}N_2$ 等,作为放射性同位素标记的补充。

4. 标记的药物,特别是氚标记物由于放射性比度高,其辐射分解更加严重,今后应开展辐射分解的研究工作,寻找合适的贮存条件。

5. 近几年中草药研究的深入,把药理从器官和细胞水平引入到分子水平,也就是分子药理学,这就要求提高标记药物的放射性比度,一般要从 $100mCi/mmol$ 提高到 $10Ci/mmol$ 以上。

感谢肖伦研究员、刘伯里教授、夏祖平副研究员和金昱泰副教授的帮助和指导。

参 考 文 献

- [1] 大浦彦吉·熊谷朗と柴田承二·高木敬次郎, 药用人参, 共立出版株式会社, 1981年。
- [2] E. A. Evans, Tritium and its compounds, 2nd ed., Butterworth, London, 1976, p.240.
- [3] K. E. Wilzbach, J. Amer. Chem. Soc., 79, 1013 (1957).
- [4] 陆长德等, 核技术, 2, 70(1979).
- [5] 仪明光, 青蒿抗疟研究, 1979, p.103.
- [6] 丁绍凤等, 中药通报, 4, 25(1981).
- [7] 潘少华等, 北京师范大学学报, 1, 59(1979).
- [8] 李良训等, ^3H -高三尖杉酯碱标记位置的测定, 待发表。
- [9] 仪明光, 天津制药工业, 4, 37(1980).
- [10] 仪明光等, 氚气熔融曝射法的研究, 待发表。
- [11] E. A. Evans et al., J. Label. Compounds, 10, 4, 569 (1974).
- [12] 邵茹辛等, 中国药理学报, 3, 1, 60(1982).
- [13] 丁绍凤等, 北京师范大学学报, 1, 91(1983).
- [14] 李志敏等, 原子能科学技术, 1, 95(1979).
- [15] 郭子丽等, 核技术, 3, 50(1980).
- [16] 丁绍凤等, 北京师范大学学报, 2, 95(1981).
- [17] 金昱泰等, 北京师范大学学报, 2, 75(1979).
- [18] 刘伯里等, 北京师范大学学报, 2, 75(1979).
- [19] 仪明光, 原子能科技通讯, 2, 34(1980).
- [20] C. T. Peng, J. Phys. Chem., 70, 4, 1297 (1966).
- [21] 丁绍凤等, 核化学与放射化学, 4, 4, 210(1982).
- [22] 丁绍凤等, 北京师范大学学报, 2, 111(1981).

Methods for labelling effective components of Chinese herbal druge

Ding Shaofeng

(Beijing Normal University)

Yi Mingquang

(Institute of Atomic energy, Academia Sinica)

Keywords: Chinese traditional medicine herbs tritium labelling isotope exchange methods chemical synthesis methods biochemical methods