

中药注射剂指纹图谱分析

□ 曹进 饶毅 沈群 王义明 罗国安
(清华大学生命科学与工程研究院 北京 100084)

摘要: 建立指纹图谱是中药现代化的必然趋势。本文从建立中药注射剂指纹图谱的意义、阶段性、建立细则,以及建立指纹图谱对中药企业的促进等4个方面,阐述了指纹图谱的建立对提高中药质量标准的作用。并对如何建立指纹图谱,如何操作提出了一些见解。

关键词: 中药注射剂 指纹图谱 HPLC

近年来西方发达国家医药市场逐渐开始接受天然复合药物,承认中国的中药复方是有临床疗效和安全的,但希望中药的质量应做到可控。然而,目前国内一些新中药复方制剂,虽来源于有效的临床实践,也经过新药开发研究阶段的药理和临床等实验证明有效,而得以生产。但在生产过程中,或因药材来源不稳定,或因生产工艺控制不严,致使大生产的药品远远不如实验室研究阶段样品所达到的疗效。如何实现中药质量标准的现代化已成为当前中药行业无论是在国内市场,更主要的是进入国际市场迫切需要解决的重大关键问题之一。制订中药现代质量标准是实现中药现代化

的必然趋势。

一、建立中药注射剂指纹图谱的意义^[1-3]

中药材和中药复方制剂能发挥治疗效果的物质基础是其化学成分。无论是中药材,还是复方制剂,从现代科学观点来看,均是复杂体系。对于复杂体系必须采用多种高科技来表征其不同的特性。现行的中药质量标准中列入了显微鉴别、理化鉴别、含量测定等多种方法,尚且不足。国际上目前较通用指纹图谱法。中药注射剂起效快,疗效好,化学成分相对中药其他制剂来说要少得多,但对其产品质量要求又比其他中药制剂更高。国家

药品监督管理局最近发布的“中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)”(以下简称技术要求)明确了要首先对中药注射剂开展制订指纹图谱。选择中药注射剂,开展制订其指纹图谱工作,相对来说工作的难度要小一点,易于突破,取得成功,因此具有很强的可行性。我们在实践工作中也有所体会。因此,中药企业应看到建立中药注射剂指纹图谱势在必行,对企业的发展和提高竞争力是极为有利的。

二、建立指纹图谱的阶段性^[4]

就目前而言,指纹图谱的研究还尚处于起步阶段。虽然,经过数十年的研究和发展,中药包括中药

材,中药饮片,中成药等等均得到了大量的研究,对于其中物质的分离和成分测定积累了大量的数据,在一定程度上,为中药的整体性说明打下了较好的基础。不过,从对中药全面质量控制的角度,还未达到指纹性描述的作用,不能有效的反映和控制中药的整体质量,中药指纹图谱的研究还需要进一步深入探讨。我们认为中药指纹图谱的研究及建立应该分为两个阶段,即初级阶段和高级阶段。

首先在初级阶段,针对中药注射剂这一相对简单的体系,进行大量研究和深入探讨。充分利用指纹图谱这一现代科学技术手段表征中药注射剂的特性,表达成品的质量,以达到对工艺操作和原药材的质控,利用指纹图谱追根溯源来寻找工艺操作中的问题和实现对原药材GAP的质量要求。通过对大量注射剂的指纹图谱研究,建立系统的测定方法和全面的指标控制参数,寻找一定的数学模型,最终达到指纹图谱的可操作、可控、稳定、显性和量化的目的,提高整个中药注射剂的质量控制水平。并以此抛砖引玉,逐步建立其它类中药制剂、中药复方制剂的指纹图谱。在这里需要指出的是指纹图谱建立的目的应区分实际质量控制和指纹性研究两个方面的内容。针对实际质量控制应结合所分析中药的特点,寻找通用的测定仪器和方法,例如现有的GC,HPLC,CE,TLC,IR等等方法,保证指纹图谱的测定简便、可行、有效。但这并不是说指纹图谱的测定是基于技术操作上的简单重复,它

必须在数据积累、统计分析和深入指纹性研究的基础上不断地提高。指纹图谱的指纹性研究则应着眼于先进的分析手段和高科技前沿,利用优良的分析仪器和测试手段,例如GC/MS,HPLC/MS,CE/MS,NMR,LC/NMR,X射线衍射等等方式,结合数学统计手段以及计算机模拟的方法学研究,将中药体系的内涵进一步揭示、定性和量化,反过来指导实际指纹图谱的测定,使指纹图谱不断的完善和充实,以达到中药全面质量控制的目的,最终使中药走向世界。在整个初级阶段,工作的重心应该放在对测定方法的建立,方法稳定性和适用性考查,有效部分基础研究,图谱多指标控制,数学建模,物理指标间相关性研究等多个方面,力求基本说清中药化学基础、质量控制参数,将中药质量控制的黑箱尽量灰色、白色化。

在对中药指纹图谱的研究进行到一定阶段,得到相对完备的指纹性数据,相对合理的数学模型后,指纹图谱的研究就应该进入研究的高级阶段了,即指纹特征和药效相关性研究,指纹图谱的生物等效性的研究。这也就是我们提出的多维多息化学特征谱的研究。所谓多维,即采用多种分析仪器联用的模式,目前最常用的是用高效液相色谱(或毛细管电泳)/二极管阵列检测器/质谱/质谱联用方式(HPLC或CE/DAD/MS/MS)所得的多维指纹图谱,这里包括了用HPLC或CE所得的色谱峰图(各个成分的保留时间);二极管阵列检测器所得的在线紫外光谱图(n-line UV图);一

级质谱图(各个成分的质量)和二级质谱图(某成分的特征碎片)。所谓多息,即指中药的特征谱应努力做到包括化学和药效两方面的信息,化学信息即上面提到的多维谱图,可采用有效部分的概念来解决包含药效信息这个问题。即根据中药已知的疗效,确定相应的药效实验方法,根据组成中成药(或药材)的各味药材(或有效部分和成分)的现有化学和药理资料,结合工艺,确定中药中可能存在的化学成分类别,采用现代分离手段(如超临界萃取、大孔树脂柱、逆流色谱及各种制备色谱)将其分离成各个化学部分(化合物群),分别做各种药效实验,最终确定中药中的各有效部分(即药效实验肯定的化学部分)和其所含的有效成分(各种化合物)间量的比例。这样得到的中药多维多息特征谱,包括了体现药效信息的多个有效部分的各种指纹图谱,更进一步解决了如何体现中药制剂的整体性和复杂性的难题。

三、中药注射剂指纹图谱的技术要求分析

从目前的实践可以看到现行的“技术要求”在技术上是完全可行的。下面就我们近期来按该“技术要求”所做的一个4味药、一个7味药两种中药复方注射剂指纹图谱实践来分析说明。

1. 指纹图谱的整体要求 “技术要求”中明确规定“在固定中药材品种、产地、采收期、炮制方法前提下,测定中药材、有效部位或中间体、注射剂的指纹图谱,应保证方法

和样品的稳定性、精密度和重现性。”目前国际上对天然植物药品均要求其固定品种、产地和采收期,根据中药特色,“技术要求”又增加了固定产品加工和炮制方法。在5固定的情况下,制订的3类指纹图谱(中药材、有效部位或中间体、注射剂)才有可能真正起到控制质量的作用。药材生产的质量管理,较好的办法是建立药材GAP基地,对一些野生药材,则应用指纹图谱配合含量测定方法实现野生中药材栽培、驯化和优质优价。原药材的质控是目前实施指纹图谱要求所遇最大的实际困难。

建立3类指纹图谱,既能保证了原药材的质量要求,又可对从原料到中间体,直至最终产品的全过程进行质量监控。好的指纹图谱应达到样品稳定,仪器的精密度良好,方法可靠(重现性好),才能真正使指纹图谱能在各个实验室(包括药检所复核)通用,实现交流。

2. 指纹图谱的控制要点

建立指纹图谱是有一定技术要求的。我们在建立一个4味药复方注射剂和一个7味药复方注射剂指纹图谱过程中,感到供试品的制备、指纹图谱测定方法的选定和共有峰的标定是控制的要点。至于对指纹图谱中共有峰的保留时间和峰面积等,“技术要求”中均提出了明确的技术参数,本文不再赘述。

3. 指纹图谱测定方法的选定

好的指纹图谱应能体现对中药材原料和生产工艺操作的全过程质量控制。首先应对注射剂的处方组成、有效成分和有效部位及原药材

(生药、饮片)的化学及药理等相关资料作详尽分析,尽可能推断出中药注射剂可能有的有效部位和有效成分;根据中医药理论和方解及现有化学、药理现代资料推断君药中有效部分或有效成分以便确定参照物参考用。在此基础上,我们对所要建立指纹图谱的中药注射剂就基本心中有数。如对4味药复方注射剂,经多方资料分析确证其主要是生物碱类成分,我们选择了高效液相色谱(HPLC)来建立其指纹图谱。对7味药复方注射剂,根据其方剂和治疗原理,我们考虑用3张指纹图谱来综合体现其特征和可进行全过程质量控制,选用HPLC、原子吸收光谱(AAS)和氨基酸分析3种方法。HPLC用于表征7味药复方注射剂中有机小分子化合物,AAS则表征了7味药中无机成分,氨基酸分析则表征了7味药中生物大分子(蛋白)的水解产物。这样针对各个注射剂特征而建立的针对性的指纹图谱就可达到目的。

一般来说对于复方中药注射剂,应据情况确定建立一张或多张指纹图谱。鉴于目前指纹图谱工作刚起步,因此每个品种先建立一张指纹图谱,以后在实践中再逐步完善。至于做到控制原药材和工艺操作,则可以考虑从一张指纹图谱中确定共有峰的归属的方法来弥补。

中药注射剂,尤其是复方注射剂是一复杂体系,要达到全过程质量控制的目的,必须考虑采用分离和分析、鉴定相结合的方法来解决,因此指纹图谱建立方法首选色谱法特别是HPLC法。

4. HPLC法的建立和优化

中药注射剂大部分是可溶性成分,采用HPLC法建立指纹图谱应考虑如下几点:

(1) 梯度洗脱方法的应用。

中药注射剂用HPLC法建立指纹图谱时,可先用等度洗脱方式进行尝试。在等度洗脱不能奏效情况下,应采用梯度洗脱方式,理由有4:

A. 中药注射剂中含有大量的未知成分,采用梯度洗脱得到指纹图谱能保持在整个分析时间段(1小时或更长)里峰形尖锐,分离效果好。

B. 从图谱特异性考虑,如能对尽可能多的成分进行很好的分离,就可对各峰的归属进行合理解释,最终有效控制质量。

C. 对于含有多个组分的共有峰,其不同组分提取制备所产生的误差,往往会叠加于共有峰的峰面积,造成共有峰面积超标,而引起产品不合格。

D. 国际上现行银杏提取物的指纹图谱采用梯度洗脱方式,对33个黄酮类成分作了很好的分离,得到公认。

结合我们的实践,对4味药和7味药复方注射剂建立的梯度洗脱指纹图谱基线平稳,分离度好,也证实了梯度洗脱的可行性。

梯度洗脱在重现性上有一定要求,可以通过固定仪器(低压混合或高压混合)色谱柱、简化溶剂系统,尽量简化梯度条件、恒定测定温度等方式得到有效控制,可利用系统适应性实验和方法学考察来规范操

作过程。

(2) 检测器的选择。

HPLC 法建立指纹图谱可据物质情况选择紫外 (UV) 二极管阵列检测器 (DAD) 蒸发光散射或折光等方式。我们建议在建立和优化 HPLC 指纹图谱方法时采用 DAD, 确定方法后, 改用紫外检测器 (UV) 进行日常控制。采用 DAD 可进行测定波长的优化选择, 检测峰纯度和对化学成分的溯源等工作。DAD 能对 HPLC 指纹图谱中各峰给出每个峰的在线紫外图谱。为了达到“技术要求”的规定, 我们应选择出峰较多, 各共有峰响应尽可能相当的, 作为指纹图谱的选定波长。这样便于表征更多的信息, 避免以偏概全的情况发生。用常规 UV 需多次实验完成, 而 DAD 一次就可达到目的。另外使用 DAD 时有相应软件可标识各峰的纯度, 可使我们对各峰的分离和确认做到心里有数。更为有用的是, DAD 结合对照药材指纹图谱可对各峰化学成分进行溯源 (药材)。

(3) 方法的优化和规范化。

指纹图谱 HPLC 法的各种条件应进行优化, 可以进行技术创新。方法要规范化, 便于交流和移植。

5. 供试品的制备

供试品包括注射剂、有效部位或中间体、原药材 3 类。对于注射剂供试品制备, 最理想的是用注射剂本身或适当浓缩、稀释后直接进样。对于复杂的中药注射剂可考虑采用提取等方法。供试品的制备首先必须保证各主要有效部分或有效成分的体现。如我们对 4 味药复方

注射剂建立指纹图谱时, 根据成品工艺路线的情况, 在明确其有效部分为生物碱类成分时, 对注射剂、中间体确定了 HPLC 条件后, 对 4 味药材制备了相应有效部分供试品, 并制备了各个单味药的阴性对照供试品。通过注射剂、中间体、单味药材供试品和单味药阴性对照供试品 4 张指纹图谱 (包括使用 DAD) 的比较, 就可确定各共有峰的归属来源, 明确了药材、中间体和成品之间的相关性, 为控制药材质量和工艺操作条件提供了依据。当然供试品制备中还需考察提取溶剂、提取方法、纯化方法及粉碎度等方面的稳定性。

为了更好控制 GAP 中药材的质量, 对中药材应进行全成分的指纹图谱分析, 可作为药厂的内控标准。

6. 共有峰和参照物的确定

共有峰的标定需有 10 批供试品的检测结果, 按照相对保留时间 (以参照物峰为准) 确定峰位, 并按规定计算峰面积比。共有峰选择时应扣除确证的溶剂峰、辅料及助溶剂等产生的峰, 并提供空白对照, 选定灵敏度, 提供一定的信噪比值 (以参照物计), 防止将基线波动记为峰。共有峰选择应达到占总峰面积注射剂为 95%, 药材为 90%。

参照物选择应根据中医药理论和方解及有关化学、药理资料, 首选有标准品提供的君药中主要有效成分, 其次是其它有效成分, 再次是大量存在的指标成分, 最后才选一定的内标作为参照物。选择有效成分的优点是可以方便地通过峰比值比,

控制相对的量比, 为以后成分和药效相关性提供一定依据。在没有合适的标准品情况下, 选定内标, 一定要保证所选峰稳定、可靠、峰值较大, 并且与供试品的制备也应有正相关, 即该内标不会由于提取工艺的影响有较大的变化。如我们在 4 味药复方注射剂指纹图谱中, 改变了各种 HPLC 条件, 最后分离到了君药中主要有效成分为一独立峰, 定为参照物就可实现上述目标。当然指纹图谱工作刚开始, 对参照物要求不能太高, 应据实际情况而定。

四、建立指纹图谱过程对中药企业的促进作用

在建立指纹图谱的过程中, 通过 10 批供试品的测定, 和中间体、药材的指纹图谱测定, 可以和中药企业对其原料中药材和生产全过程进行监控, 协助企业寻找工艺操作的最佳条件和确保工艺操作的规范化, 提高了企业的整体素质。

以上是我们通过一阶段建立中药复方注射剂指纹图谱工作总结的一些心得体会。实践表明指纹图谱可通过文献调研、物质成分分析、样品来源考察、方法选择等诸方面协调得到圆满解决。它可为中药注射剂、中药材乃至今后其它剂型中物质基础阐释、化学成分测定方法、物质基础和药效相关性等提供依据。

参考文献

- 1 罗国安, 等. 中药复方有效部分研究方法以及理论初探, 中成药, 1997, 19 (6): 46.

- 2 罗国安,等. 中药复方物质基础和药效相关性研究, 中药现代化杂志, 1999, (1): 16-19.
- 3 罗国安,等. 中药复方的化学研究体系, 中药现代化杂志, 1999, (1): 11-15.
- 4 罗国安,等. 多维多息特征谱及其应用, 中成药, 2000, (22): 395-397.

本文联系人:

罗国安, 1964-1969年就读于华东理工大学生化工程专业。1979-1982年于华东理工大学化学系攻读硕士学位。毕业后于中国药科大学分析化学教研室任教研室副主任, 副教授。1990年赴美国宾州大学 (Penn. State U-

niv.) 化学系任客座教授, 后任研究员。1994年应聘回国, 于清华大学化学系任教。现为教授、博导、药物研究所副所长、生命科学与工程研究院院长助理。1994-1998年应邀赴香港大学、香港科技大学、香港浸会大学任客座教授。

(责任编辑: 柳莎)

我国中药天然药物化研究 存在六大问题

中国工程院院士、沈阳药科大学教授姚新生在全国药师周所作的大会报告中提出, 从中药天然药物出发研究开发创新药物是一条必由之路, 目前全国已形成了一股中药研究的浪潮, 但目前中药、天然药物化学研究中存在六个值得重视的问题, 对中药研究将产生不利影响。

1. 一些研究者只是单纯进行化学研究, 满足于发现一些新化合物发表文章, 对活性则极不重视, 很少有人进行活性成分研究。为了能够发现新的化合物或新的结构, 一些人对有临床多年经验积累的中药或民间药兴趣不大, 宁可去研究寻找新的植物资源, 而不管它是否有活性或是否有临床经验。

2. 活性成分研究的思路和方法不当, 多半只是将分离得到的化合物在测定结构后, 再送至有关活性筛选部门进行活性筛选。较少有人采用活性指导下的导向分离方法, 那些含量甚微、又难于分离的活性成分在分离途中可能丢失, 丢失了也难于察觉。

3. 化学家与生物学家相互脱节。生物学家尽管不断宣布在身体机能、细胞或基因调控方面有新的发现, 但未能投入实际应用, 并在此基础上建立起新灵敏、简便、可靠的活性筛选体系。化学家即使想进行活性成分研究, 也常常无法进行。

4. 未能充分重视中医药的传统经验。中药多以汤剂形式应用, 但是水溶性成分很少成为化学研究者的工作对象, 迄今多沿用西方做法, 将中药当作一般的植物药进行研究。但中药很少单用, 多为组方用药, 中药的疗效主要是方剂的药效。但中药方剂的有关成分的研究, 化学家很少涉足。

5. 多采用西医哲学思想研究中药。西药多强调外因的

作用, 中医强调治本或者标本兼治, 因此研究中药活性成分时如果选用的是体现西医哲学思想的活性筛选模型, 用作阳性对照的又是那些符合西医对症治疗的观点、作用剧烈的西药时, 则中药活性成分的研究结果常常令人失望。在研究常用中药、尤其是中药中的上品或其制剂时, 这种情况更为多见, 导致研究成效不大。

6. 从中药或天然药物中得到的活性成分, 往往未做进一步的结构修饰或者结构改造, 并就结构—活性相关问题进行深入探讨, 对创新药物的贡献不大。研究成果也未能更好地用于指导中药制剂的标准化、规范化, 对推动中药现代化起的作用不大。

上海创立黑素细胞移植 治疗白癜风新方法

复旦大学医学院附属华山医院经过多年科技攻关, 将体外培养的黑素细胞进行异体移植, 有望成为治疗白癜风的新方法。

据华山医院皮肤细胞研究室主任郑志忠介绍, 华山医院科研人员采用细胞培养、电镜、免疫组化、特殊染色、同位素掺入等方法, 系统地研究了体外培养黑素细胞的生物学特性, 在细胞水平上进行了体外试验, 探讨黑素细胞异体移植的可行性, 并通过动物实验探查了活体黑素细胞异体移植的排异情况。此后, 科研人员将体外培养的黑素细胞通过注射方式应用于临床治疗白癜风, 结果显示黑素细胞同种异体移植治疗白癜风有显著疗效, 目前已对30多位患者进行治疗, 有效率达到95%以上。

临床试验证明, 黑素细胞异体移植有望成为白癜风治疗的新方法。鉴定这项技术的专家认为, 这一研究成果达到国际先进水平。

(文摘)

combination with the development in this field, the authors suggest to establish an artificial intelligence system for quality evaluation of Chinese medicinal materials. This system uses the characteristic fingerprinting of multi - data (macroscopic, microscopic, and genetic fingerprinting as well as qualitative fingerprinting for the analysis of chemical components of Chinese medicinal material plus computer image recognition technology and expert system to achieve digital and automatic control of their quality.

Key words: Chinese medicinal materials Characteristic fingerprinting of multi - data Artificial intelligence quality evaluation

Analysis of TCM Injection Fingerprinting

*Cao Jin ,Rao Yi ,Shen Qun ,Wang Yiming ,Luo Guo' an
School of Life science and engineering, Tsinghua University, Beijing*

Starting from the four aspects of the significance, stage and details as well as the promotion of TCM industry of TCM injection fingerprinting, this article expounds the role of fingerprinting in the improvement of TCM quality as well as the feasibility and operability of the establishment of fingerprinting and therefore, it is an inevitable trend to establish fingerprinting in TCM modernization, as indicated above.

Key words: TCM fingerprinting HPLC

Opinion on the Innovation of the Theory of TCM — To Analyze the Critical Problem of the Research on the Basic Theory of TCM

Li Jingbo Chen Xiaoyin Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405

At present, how to give the play to the advantages and characteristics of TCM, and explore a new situation of the research with the features of Chinese culture and scientific ideology on the basic theory of TCM are the critical problem of TCM basic theory research. For this cause, we should clarify the following questions in the process of studying the basic theory of TCM, i. e. the guiding idea of TCM, the distinction between the modern medicine and TCM, the special ways of diagnosis and treatment of TCM, and the status of TCM in the medical and healthy care in the future. By analyzing and thinking over these questions, we can revise the unreasonable research direction and supply some new idea for the innovation of the research on the basic theory of TCM.

Key words: the basic theory of TCM modern research academic exploration clue and method comparison between the modern medicine and TCM

The International Standardization of the Writing in the prescription of the Traditional Chinese Clinical Soupy Medicaments in Common Use

Liao Jun Liu Hui

To solve the long - term suspecting problem - different names for the same medicinal plant in TCM and one name shared by different herbs, we worked at the way of an international standard for the TCM prescriptions for its popularity in the world. Method: The key research lies in the international standard of the herb' s names as the standardization of the dosage has been achieved, which combined with the herb' s names makes the clinical prescription in TCM. Our modal proves practical that is made up of two parts - "Latin word of the medicinal part of the plant " + "Latin word of the plant' s source". Solution: The prescriptions written by Latin modal should be added to the "China Pharmacopoeia" and the national textbook "TCM Formula"(the 6th publication). Conclusion: Latin modal for TCM prescription in clinic proves necessary and feasible as well.

Application of Molecular Biological Technology in Identification of Traditional Chinese Medicine

*Yang Guangming Cai Baochang Wang Mingyan Pan Yang
Nanjing University of Traditional Chinese Medicine Nanjing, 210029*

We summarized the application of molecular biological technology in identification of TCM in recent years, including the identification of animal and plant medicine. We also described in brief the principles and methods of the molecular biological techniques. These techniques applied are divided into three parts, Electrophoresis, Immunity and DNA Molecular Genetic Marker. The third one includes 1) techniques based on Polymerase Chain Reaction, which includes