

中药标准组分系统分离制备研究*

□肖远胜 徐 青 金 郁 薛兴亚 章飞芳 梁鑫森**

(中国科学院大连化学物理研究所 大连 116023)

摘 要:以中药强极性组分、类组分、同系组分、微量组分为研究重点,采用新颖的分离表征策略和发展新型分离材料进行中药标准组分系统分离制备。发展硅胶基质的亲水性色谱填料分离中药强极性组分,以组合大孔树脂技术研究类组分,发展组合分子印迹技术分离同系组分,以差异化富集策略研究微量组分。同时,采用多模式、多柱色谱及其联用技术进行标准品的制备,建立标准品资源库,推动中药物质基础的研究。

关键词:组分中药 系统分离策略 分离材料发展 同系组分

2002至2010年《中药现代化发展纲要》^[1]中提出中药现代化的基本原则之一是继承和创新相结合。其发展战略目标是坚持“继承创新、跨越发展”的方针,制订和完善现代中药标准和规范,实现传统中药产业向现代中药产业的跨越。其中符合国际规范的中药标准化建设是中药走向国际的基本条件。

传统中药具有疗效确切,临床验证有效的特点。现代中药的基本要求是高效、安全、稳定、可控。中药的发展经历了从传统方剂、传统中药到现代中药的过程,每一个阶段都有其相应的质量控制标准与方法。在早期阶段,传统方剂几乎没有可遵循的质量控制标准,传统中药则以少数几个指标性成分为质量控制方法,现代中药采用了以半定量指纹谱为基础的质量控制方法。组分中药的提出则是以定量指纹

谱为质量控制方法,是更高标准的创新中药。它体现了中药现代化过程中建立中药标准化的制高点战略,展现了具有自主知识产权,并与国际接轨的自主标准的发展目标。组分中药是以组分及组分配伍为基础,并融合传统中医理论的中药创新研究模式。它的标准化工作的实现依赖于组分的标准化。因此,建立中药组分有效质量控制标准将直接提高组分中药的开发效率,而且,系统研究中药标准组分的分离与制备,将对中药物质基础研究起到极大的促进作用。

一、标准组分系统分离制备意义与思路

中药是一个化合物丰富的宝库,也是一个无法预知的巨大黑箱体系。如何打开此黑箱体系,展现中华民族几千年的历史文化瑰宝,继承和发扬其精髓,是中药现代化的主要任务。

对于一个复杂事物,最简单而直接的了解方式

组稿日期:2006-04-20

修回日期:2006-06-05

* 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KGCX2-SW-213):基于现代理论和技术复方中药系统研究,负责人:梁鑫森;国家自然科学基金重点项目(20235020):中药药效组分的指纹图谱分析的方法研究,负责人:梁逸曾。

** 联系人:梁鑫森,本刊编委,博士,研究员,主要从事组分中药的研究,Tel:0411-84379519,Email:liangxm@dicp.ac.cn。

[World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica] 79

是分解和简化。中药作用机理研究难以深入的原因之一就在于中药的复杂性。组分中药的提出恰恰是以简化了的中药标准组分为基础,为阐明中药化学物质基础与作用原理提供了可能。标准组分是指具有一定可重复获取的中药部位。标准组分系统制备的关键在于其系统性、重复性、普适性。由于中药所含化合物极为丰富,且含量的差异大。对这种复杂体系的系统分离研究具有相当大的困难。以中药组分作为中药物质基础研究的突破口,化繁为简,把中药分割成较小的单元,有利于降低研究目标的复杂性,使众多化合物定性定量解析成为可能,而且,从较小单元相对于中药材来制定质量控制标准更具有可操作性和更高的准确性,对建立符合国际规范的自主标准研究有积极意义。

对标准组分的系统制备研究是在继承常规中药分离的基础之上,以近年来国际上对中草药的研究成果为标准突破,结合传统中医理论,在创新中药研究过程中进行新材料开发和新技术应用的有益探索。同时,标准组分的制备,无论是对中药现代过程中质量控制标准发展,还是对中药本身物质基础的研究,都有促进作用。标准组分的系统制备把中药物质基础研究与中药现代化过程中所要求的标准化工作等环节有机的联系起来,对中药的二次开发或新药的创新开发有着重大而直接的影响。

标准组分的系统制备包括不同层次的组分,从中药系统制备的整体性而言包括溶剂分配组分、大孔树脂组分、膜分离组分、工业色谱组分等。其组分有的相对复杂的,有的较为精细,乃至分离纯化后的单一化合物。

中药标准组分系统分离中,单一化合物的制备与表征具有重要意义。以对照品为目的的单一化合物的制备,为系统分离方法评价,标准组分质量控制标准建立与提高,乃至中药作用原理的研究提供了基础。

标准组分的系统制备的基本流程(见图1):

标准组分制备的总体思路是以现有分离技术为基础,结合新的分离材料与技术,发展系统分离制备方法与策略;通过中药复杂体系化学物质基础的研究,为中药新药的创制提供前瞻性、基础性的思路与方法。中药研究目前存在的难点和重点主要包括强极性化合物、类化合物、同系化合物、微量成分等的分离与表征。在标准组分的系统制备研究中,同样存在这些问题。发展相关的分离材料与技术,以及采用有效的分离策略是解决这些问题的有效而积极的工作。

二、标准组分系统分离制备

1. 树脂组合优化技术实现类化合物组分的分离制备

中药所含化合物丰富多彩,按含量分为常量、微量、痕量,按极性大小分为强极性、中等极性、弱极性,按酸碱度分为酸性、中性、碱性,按分子量可分为大分子(分子量大于10000)、中分子(分子量介于1000与10000间)、小分子(分子量小于1000),而按

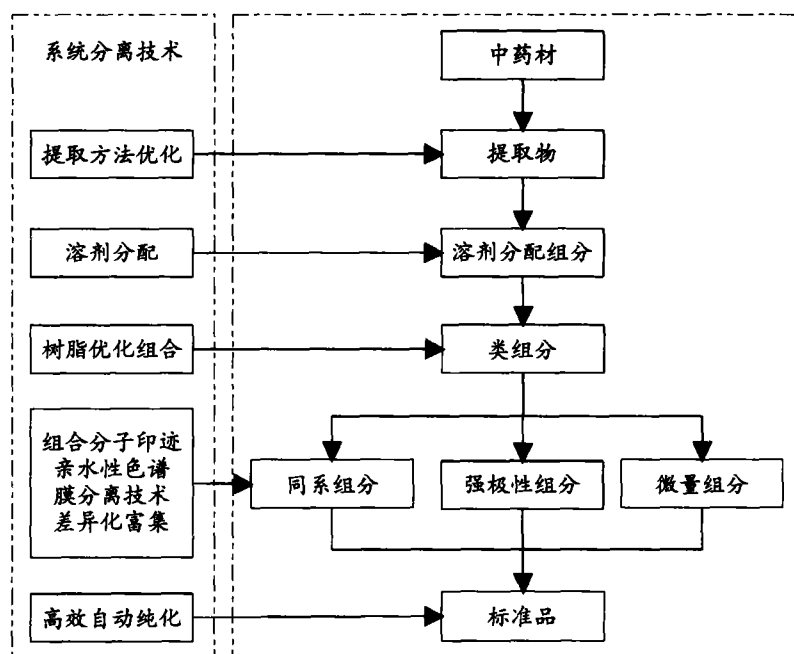


图1 标准组分的系统制备的基本流程

化合物种类分,则主要包括黄酮类、生物碱类、皂苷、萜类、多糖类等成分。针对药材的不同活性成分种类,以不同方式选择性地分离制备类组分,是中药标准组分系统制备中的重要环节。在类组分的分离中,多功能树脂作为一种普适性的类组分分离材料将得到广泛应用,尤其是在黄酮类化合物的分离中。但以单一种类的树脂分离策略有明显的局限性。大孔树脂常用在类组分的粗提中,其优点是速度快、经济,且对分离对象吸附较少,缺点是选择性相对较差。而离子交换树脂在生物碱、有机酸等一些可离子化的类化合物分离中有独特优势,但其适用对象的范围较小。另外一些高选择性树脂的出现为这两类树脂提供了补充,如聚酰胺树脂常应用黄酮、内酯类化合物的分离。因此,作为类组分分离的主要分离材料,不同选择性树脂的优化组合使用将对目标类化合物纯化效果有极大的提升。

大孔树脂的优化组合技术就是利用不同类型大孔树脂对类组分的分离性能,通过有效组合,或富集目标组分、或除去干扰杂质,并选择合适的洗脱剂,高选择性地从溶剂分配组分中进行类组分的分离纯化,为同系组分、强极性组分等的进一步分离提供基础。当然,组合与优化并不局限于树脂单一类型,还应同其它的一些分离技术相结合,以实现为目标组分的纯化,如超滤膜与纳滤膜技术的应用将有效地除去大分子或进行组分浓缩。再如在溶剂分配阶段,通过针对性地选择合适的溶剂,可以达到初步富集组分的目的。

2. 组合分子印迹技术实现同系组分的分离制备

同系组分是指具有相同的结构骨架,不同的取代位点或取代基的一类化合物。在类组分中,化合物仍然存在较大的结构差异,如生物碱中还包括有吡咯类、吡啶类、喹啉类、吲哚类等丰富的亚类。为了更深入地开展类组分的研究,开展同系组分的分离制备、化学表征等系统研究工作,提高同系组分研究的系统性和深入性,以推进中药化学物质基础的研究和组分中药创制的进程。

对类组分的研究是中药组分研究中的一个求同的过程,即把类似结构的化合物分离出来作为独立

单元,以进行化学、药理、作用机理等方面的研究,有助于对某一类化合物的化学特征、生物学特征进行深入的表征和认知。同系组分是建立在对类组分系统研究和深刻理解的基础之上,较之类组分,它对中药活性成分的药理及作用机理的阐释有更深刻的促进作用。同系组分具有相同的骨架,由于结构决定功能,在一定程度上同系组分中的化合物会体现其活性功能的相似性,因此,分离和表征同系组分,并以同系组分为基础进行组分配伍新药的研究开发。这种同系组分的深入研究即保持了中医药理论中多成分协同效应的可能性,又简化了物质基础研究对象,使中药作用原理进行定性定量研究成为可能。因此,同系组分的系统分离与纯化,对组分中药配伍研究、创新中药的开发有重大意义。

从类组分中分离制备同系组分是一项极具挑战性的研究工作。类组分中的同系组分具有类似的骨架结构,其物化性质非常接近,如黄酮醇类与黄酮烷类。因此用于同系组分的分离材料需要更高的选择性。分子印迹聚合物(MIPs)是将功能单体在模板分子(印迹分子)存在下,交联聚合,然后洗脱除去模板分子制得的聚合物,对目标分子具有可预定的选择性。由于MIPs具有选择性强、化学性质稳定、对环境的耐受性好和制备简单等优点,目前已被应用于色谱分离、固相萃取、MIP模拟抗体的药物分析、仿生传感器、模拟酶催化等领域,成为目前化学研究的热点之一。近年来,分子印迹技术在中药分离中也有所应用,如利用白藜芦醇^[2]、(-)-麻黄碱^[3]、青藤碱^[4]作为模板分子合成分子印迹材料,分别提取虎杖、麻黄、青风藤中相应的有效活性成分,获得了较好的效果。

但我们应该看到,这些应用都是以单一目标化合物结构为模板分子,其结果对模板分子结构的分离具有专属性。但在同系组分的分离中,要求分离材料对相同骨架结构分子群具有一定的保留,需要一定的通用分离性能。有鉴于此,这种分离技术无法高效获得同系组分。但针对同系组分的分子群的结构共性,发展分子群印迹技术,在保留其高选择性的基础上,适当增加其类似结构的保留,就有可能对同系结构的化合物进行分离纯化。然而,分离材料的合成

对研究者而言极具挑战性,模板分子在洗脱后形成的功能性空腔,一方面需要专一性的截留目标分子,同时,还需要选择性保留相同骨架结构的衍生物,这个“度”的把握极为关键。以多种甾类分子作为印迹分子模板^[9],所得的聚合物可以同时对这几种分子进行分离的成功为我们提供了良好的思路。根据同系组分的相似性,针对同系组分的分离目标,挑选具有结构代表性的同系化合物为模板,所制得的分离材料有可能具有同系结构的分离纯化能力。而组合分子印迹技术就是利用多个已有的同系结构作为混合模板分子合成的分子印迹分离材料进行同系化合物分离纯化技术。在同系化合物的分离中,发展采用多个模板分子的组合分子印迹技术将是同系组分分离制备的重要方向。在整个分离材料的发展过程中,混合模板分子的选择极为重要。

3. 硅胶基质亲水性分离材料的发展分离制备强极性组分

研究发现,中药含有大量极性较强的成分。这类成分在实验室常规的 ODS 反相柱上几乎没有保留,其分子量分布范围也比较广,现阶段研究的手段不多。迄今为止,与之相关的研究报告还比较少,物质基础亦不明确。因此,针对此类组分进行研究,发展新的分离材料与相关制备技术,制备出强极性化合物,对中药物质基础的全面阐述有重要意义。

极性较大是本组分的显著特点。在标准组分的系统分离中,强极性组分常以水溶性好、ODS 反相柱保留小为特征。这些强极性组分的成分仍十分复杂,在以往为数不多的研究中已表明,这部分组分中常常含有多糖、多糖甙、蛋白质等大分子化合物,也有寡糖、寡糖甙等分子量较小的化合物。但总的说来,这些化合物都有极强的亲水性。以超滤膜除去大分子化合物是简化强极性组分研究的第一步,寡糖、寡糖甙等中小分子化合物是我们的研究目标。对这些化合物的分离,亲水作用色谱的发展为强极性化合物的分离提供了有力的技术手段。在现有商业化的分离材料中,已发展了硅羟基、氨基、酰胺基、氰基、醇基等功能团的分离材料。然而对于中药而言,这些仅在一定程度上解决了强极性化合物分离问题,还

远远不能满足中药强极性组分分离的需要。新型硅胶基质的各种新型分离材料的发展,特别是作为亲水固定相,将成为中药强极性组分的主要分离手段。以碱基、聚醇羟基为官能团发展分离材料,可获得具有不同分离特点的亲水固定相。环糊精、寡糖、直链多糖等大分子亦是一类良好的亲水固定相的功能基团,特别是以蛋白质为功能基团的分离材料研制,由于同时存在疏水区域和亲水区域,有可能获得对强极性化合物的特殊分离能力。另外,寡糖和多糖特异的空间结构可能会对各种被分离物质有不同的亲和作用,其分离特点兼顾了亲水作用色谱和亲和作用色谱两大优点。

这些强极性硅胶基质分离材料的发展,将为中药强极性组分的分离提供适当的保留和分离,以及制备型强极性成分的研究提供了更广阔的空间。

4. 差异化富集技术实现微量组分的分离制备

在中药研究中,微量成分含量虽少,往往能独立表现出很强的药效活性,或与其它成分产生协同作用而发挥药效。如同低丰富度蛋白在人体生命中的作用,微量成分在疾病治疗中亦可发挥重要作用。曼地亚红豆杉叶中的紫杉醇含量为极微,却有很强的抗癌活性,已经成为一类重要的抗癌新药,广泛应用于临床;长春花碱、美登木碱等成分在植物中的含量亦低,同样具有良好的活性。微量成分这种特点虽已被人们所认识,但因其含量低且存在于中药复杂体系中,检测和分离比较困难,研究上缺乏系统和深入。

任何一种检测方法对化合物都有其极限检测量,中药复杂体系中的成分含量千差万别,其中的一些微量成分的含量都已超过现有仪器的检测极限。对中药中大量微量未知成分的研究,富集与纯化是其分离制备的主要策略。

尽管类组分的分离已经简化了中药复杂体系的研究,其中仍然存在大量的化合物。人们常关注这些组分中的常量成分,而一些微量成分因检测制备困难被放弃。实际上,在人们分离制备类组分中的常量成分的同时,由于常量成分的除去,微量成分的含量得到了提升。通过除去常量成分可以去掉检测干扰,

提高对微量成分的检测灵敏度。而反复富集策略则是研究不同含量层面微量成分的需要。

中药的微量成分不仅含量低,而且存在于众多常量成分中,样品结构十分复杂,检测极为困难。因此,发展多模式、多柱互补分离分析方法,对类组分进行系统表征,发现和锁定组分中的微量成分,通过工业色谱等方式进行常量成分的切除,达到微量组分的富集。在这个过程中,系统的表征是关键,以液相色谱及与紫外、质谱、蒸发光散射、荧光等多种检测手段的联用技术对类组分中的微量成分进行确认与表征,建立标准色谱-质谱指纹谱,实现分离与富集过程中的流向识别,以确保分离过程中微量成分的保留。

5. 多模式、多柱色谱的自动纯化技术实现标准品的高效制备

标准品的高效制备以及标准品资源库的建立,将为阐明中药复杂的化学组成以及中药作用原理提供物质资源。从标准品出发,通过表征中药复杂体系中化合物,归纳和总结其内在规律性,以提高和加深中药化学物质基础研究,从各个环节提升中药标准与品质。

在中药标准组分的系统分离中,根据研究的目的不同,选择性地利用现有分离材料的优化策略与发展新的分离材料等段,在不同阶段获得了类组分、同系组分、强极性组分、微量组分等系列标准组分。这些组分仍然是一个十分复杂的混合体系,由于在前期的分离过程中已经利用其物化性质的共同点进行纯化,在某些性质上具有一定的相似性。因此,对这些组分的二次分离将面临着更大的困难。

多模式、多柱分离策略在自动纯化系统中的应用将是分离制备同系组分、强极性组分、微量组分的有益的方法。在这些组分的制备过程中,采用正交分离或多柱互补策略将会是有助于这类问题的解决,尤其是在强极性组分的分离制备中。一直以来,中药中的强极性组分由于其一般色谱上的保留时间极短。大力发展亲水作用色谱是解决强极性组分分离制备的有效途径。以高效液相制备为基础,以多模式、多柱分离策略为指导,将是解决标准组分中化合物

分离与高效制备的有效手段。

高效液相色谱制备技术,在分离纯化领域中具有重要地位。与传统的分离纯化方法相比,具有高效、快速及自动化的操作等特点,正成为药物分离纯化技术发展与应用的主流。

纯化工厂系统是以高效液相色谱分离为基础,以质谱、紫外及其逻辑运算为馏分收集触发条件的多通道高效制备技术。较之普通的高效液相制备色谱,纯化工厂同时具备高柱效、高灵敏度、高选择性馏分收集、自动化操作及高通量等多种优点,更适用于中药标准组分等复杂体系的高效分离制备研究。以纯化工厂为代表的高通量自动纯化技术已在药物研究中得到广泛应用^[6-11],尤其在组合化学中对大规模类化合物库的纯化技术已日趋成熟,一套完备的四通道纯化系统在一个星期内可以完成1000个化合物的纯化工作^[12]。由于组合合成的化合物具有一定的结构类似性,可以减少分析表征等预试验工作,且研究的体系和纯化的目标相对简单,仅为一种或两种主要含量的化合物,因此,不经过对体系的简化,就可以实现大规模、自动化纯化工作。在中药标准组分等复杂体系中,化合物具有数目多,且多数未知的特点,给纯化工厂等高通量纯化技术的应用带来了一定的困难。

对上述所得组分进行单一化合物高效制备,首先需要进行有效的分离,因此,多模式、多柱色谱的应用将会加强纯化的效率。通过优化分析条件,考察柱系统、流动相、添加剂、进样量、检测灵敏度、质谱规律等影响制备放大的主要因素,实现组分的优化分离。以优化的分析条件为指导,选择合适的制备柱系统及操作条件,提出相应的完善策略,实现制备的线性放大。同时,由于纯化工厂具有紫外、质谱双触发模式。可以通过质谱、紫外双模式互补收集条件,实现目标制备成分的高效制备。

三、结 论

中药标准组分的系统分离制备将会推动中药化学物质基础研究的深入,是中药现代化进程中的必要环节,是中药走向国际的重要研究内容之一。由于

中药的复杂性,标准组分的系统分离与制备面临着十分困难的局面,采用新颖的分离策略,利用现有分离材料的优化组合,积极发展新的分离材料,以及加速纯化分离的自动化将是解决这一问题的有效途径。

- 1 科学技术部,国家计委,国家经贸委,卫生部,国家药品监督管理局,知识产权局,国家中医药管理局,中国科学院. 中药现代化发展纲要. 世界科学技术-中药现代化, 2002, 4(6), 9~12.
- 2 向海艳,周春山,钟世安,等. 应用化学. 2005, 22(7), 739~743.
- 3 X.-Ch., Dong; W., Wang; Sh.-J., Ma; H., Sun; Y., Li; J.-Q., Guo. J. Chromatogr. A, 2005, 1070, 125~130.
- 4 L.-Q., Lin; J., Zhang; Q., Fu, L.-Ch., He; Y.-Ch., Li. Analytica Chimica Acta, 2006, 561, 178~182.
- 5 K., Sreenivasan. Molecularly imprinted polyacrylic acid containing multiple recognition sites for steroid. J. Appl. Polym. Sci., 2001, 82(4), 889~893.
- 6 U., Rosentreter; U., Huber. Optimal fraction collecting in preparative LC/MS. J. Comb. Chem., 2004, 6(2), 161~163.
- 7 T., Karancsi; L., Godorhazy; D., Szalay; B., Papp; L., Németh; F.,

Darvas. Application of main component fraction collection method for purification of compound libraries. J. Chromatogr. A, 2005, 1079, 349~353.

- 8 B., Yan; N., Collins; J., Wheatley; M., Irving; K., Leopold; C., Chan; A., Shornikov; L., Fang; A., Lee; M., Stock; J., Zhao. High-throughput purification of combinatorial libraries I: A high-throughput purification system using an accelerated retention window approach. J. Comb. Chem. 2004, 6, 255~261.
- 9 K. F., Blom; B., Glass; R., Sparks; A. P., Combs. Preparative LC-MS purification: improved compound-specific method optimization. J. Comb. Chem. 2004, 6, 874~883.
- 10 T., Karancsi; L., Godorhazy; D., Szalay; F., Darvas. UV-triggered main-component fraction collection method and its application for high-throughput chromatographic purification of combinatorial libraries. J. Comb. Chem. 2005, 7, 58~62.
- 11 W., Goetzinger; X., Zhang; G., Bi; M., Towle; D., Cherrak; J. N., Kyranos. High throughput HPLC/MS purification in support of drug discovery. Int. J. Mass Spectrom., 2004, 238, 153~162.
- 12 K. F., Blom; R., Sparks; J., Doughty; J. G., Everlof; T., Haque; A. P., Combs. Optimizing preparative LC/MS configurations and methods for parallel synthesis purification. J. Comb. Chem. 2003, 5, 670~683.

Systematic Separation and Preparation of

Standard multi-component Collectives from Traditional Chinese Medicine

Xiao Yuansheng, Xu Qing, Jin Yu, Xue Xingya, Zhang Feifang, Liang Xinmiao

(Dalian Institute of Chemical physics, Chinese Academy of Sciences, Da Lian 116023, China)

Focusing on polar components, similar compounds, homologue components and trace compounds in Traditional Chinese Medicine (TCM), novel strategies and material are developed for systematic separation and characterization of standard multi-component collectives from TCM. Solid phase for hydrophilic interaction chromatography is developing to separate polar components, resin-combination technique is suitable for similar compounds collection, multi-molecular imprinting technology is using to extract homologue components, and differential enriched strategy is applied to afford trace compounds. Also, multi modes and columns chromatography as well as their coupled technologies are applied to prepare standard compounds for library construction. All these works will elucidate the chemical constitution in TCM.

Keywords: Multi-component Chinese Medicine, Systematic separation strategy, Solid phase development, Homologue components

(责任编辑:王 瑀, 责任编审:柳 莎, 张志华, 责任译审:熊艳艳)