

中药注射液“Q-Markers”的辨析研究^{*}

—丹红注射液研究实例

杨 静¹, 江振作¹, 柴 欣¹, 王 毅², 赵步长³, 赵筱萍⁴, 王跃飞^{1**}

(1. 天津中医药大学天津市现代中药重点实验室 天津 300193; 2. 浙江大学中药科学与工程学系 杭州 310058; 3. 山东丹红制药有限公司 菏泽 274000; 4. 浙江中医药大学 基础医学院 杭州 310053)

摘 要: 中药质量控制是保证中药临床用药安全性和有效性的重要措施, 也是制约中药现代化进程的重要因素。由于中药的复杂性, 目前的中药质量标准研究仍比较薄弱。构建符合中药特点的质量控制体系, 是当前中药现代化进程中亟待解决的难题。本文以丹红注射液为例, 从化学物质基础、质量标志物、质控方法 3 个层次, 阐述中药注射液“Q-Markers”辨析策略, 为中药质量控制研究提供新思路。

关键词: 质量标志物 质量控制 中药注射液

doi: 10.11842/wst.2016.12.005 中图分类号: R288 文献标识码: A

中药质量标志物(Q-marker)存在于中药材及其相关产品(如中药饮片、中药煎剂、中药提取物、中成药制剂), 是药材固有的或加工、制备过程中形成的, 且与中药的功能属性密切相关的化学物质, 因其是反映中药安全性、有效性的标志性物质, 在研究中需要对其进行质量控制^[1]。中药质量控制是中药临床用药安全、有效的基础和保障, Q-marker 是中药质量控制的核心, 对它的辨析研究是“深入”研究、“浅出”标准系统研究工程的重要组成部分。近年来, 自刘昌孝院士提出“中药质量标志物”这一新概念后, 国内知名的专家、学者提出了一些研究思路和方法。张铁军等^[2,3]提出基于“性-效-物”三元论的基本认识, 建立中药药效物质基础、作用机制及质量标志物的研究策略和研究模式, 确定了延胡索甲素、延胡索乙素、原阿片碱、欧前胡素、异欧前胡素为元胡止痛滴丸的质量标志物。孙蓉等^[4]提出基于“效-毒”关联评价的 Q-marker 的辨析技术, 确定了吴茱萸中 4 个代表性化合物吴茱萸碱、吴茱萸次碱、去氢吴茱

萸碱、 β -蒎烯为质量标志物, 其体现了吴茱萸质量标志物对“效-毒”网络调控的“多组分、多靶点、多途径”的作用机制。熊亮等^[5]基于化学物质基础研究、化学成分专属性研究、化学结构和生物活性研究、可测性研究、指纹图谱研究辨析了益母草和赶黄草的质量标志物。

本研究以丹红注射液为例, 研究构建中药注射液化学物质基础、质量标志物、质控方法的质量控制研究模式。围绕中药注射液中化学物质基础的问题, 采用定量核磁共振技术、UPLC-UV、火焰原子吸收分光光度法分别对丹红注射液中氨基酸、单糖、小分子有机酸、酚酸、核苷、黄酮、钠、钾离子进行了分析, 已知化合物占总固体量的 60% 以上; 围绕中药注射液质量标志物的问题, 构建了“蛛网模式”辨析丹红注射液中的“Q-markers”的方法; 围绕中药注射液质控方法的问题, 构建了指标成分分析和活性评价相结合的双标准质量评价方法, 并结合指纹图谱技术综合评价丹红注射液的质量。本研究可以为构建符合中药特点的中药注射液质量控制模式提供了有益的借鉴。

收稿日期 2016-12-20

修回日期 2016-12-20

* 国家自然科学基金项目(81503239) 中药注射剂(丹红注射液)“量-稳-活-代”多维“质控 markers”的辨析研究, 负责人 杨静。

** 通讯作者: 王跃飞, 博士, 副研究员, 主要研究方向: 中药质量控制及肠道微生态研究。

1 化学物质基础

中药化学物质基础研究是认识和研究中药的基石,也是深入研究中药作用机制的关键步骤。系统阐释中药的化学物质基础,有助于进一步开展深入研究。然而,中药成分复杂、各成分理化性质差异较大,单一检测技术难以全面表征中药的全部化学成分。为此,需借助多种分析技术,整合分析多种检测结果,进而系统表征中药的化学成分。根据丹红注射液的特点,本课题组基于核磁共振波谱法、液质联用法、火焰原子吸收分光光度法,解析了其中 60% (质量占比) 的化学成分,具体分析策略如图 1 所示。

本课题组建立了一种无偏向性、简单快速、准确的质子核磁共振指纹图谱方法,用于丹红注射液中多酚酸类成分(丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛)和氨基酸、糖类、有机酸类成分(缬氨酸、苏氨酸、丙氨酸、焦谷氨酸、天门冬氨酸、果糖、葡萄糖、芸香糖、琥珀酸、丙二酸)的定性及定量研究^[6]。该方法通过 25 批次丹红注射液的成分检测与分析,同时测定其中 13 个主要化合物,并结合多元统计模型,可以发现过期的丹红注射液样品。

基于 UPLC-DAD/ESI-Q-TOF MS 技术,本课题组共鉴定了丹红注射液中的 21 个化合物,它们主要为核苷、黄酮、酚酸类成分^[7]。进一步的研究中,我

们采用基于波长切换技术的 UPLC-UV 法同时测定 10 批次丹红注射液中 16 个成分(胞苷、尿苷、腺苷、苯丙氨酸、5-羟甲基糠醛、丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、羟基红花黄色素 A、紫丁香苷、咖啡酸、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、丹酚酸 A、丹酚酸 C)的含量^[8]。

根据《中华人民共和国药典》2010 版规定,静脉注射液必须开展钾离子的限度检查^[9]。结合钠离子在调节人体细胞和血液渗透压的作用,本课题组开展了基于火焰原子吸收分光光度法测定丹红注射液中钠、钾离子含量的方法,样品经微波消解系统消解后,采以氯化铯为电离抑制剂,分别于 589.0 nm 和 766.9 nm 处测定丹红注射液中钠、钾离子的含量^[10]。

2 质量标志物

在系统阐释丹红注射液的化学物质基础上,辨析丹红注射液的质量标志物,即解决质量标志物的难题。中药注射液化学成分复杂,全面监控所有成分不仅满足不了实际需求,也增加了监控难度。而且,对无效成分监控不仅增加成本、浪费资源,还可能影响对中药注射液质量的判断。因此,需要从复杂的成分中摒弃无效、干扰成分,遴选关键的或核心的质量标志物。这种物质既能代表中药注射液的药效,又能反映中药注射液的内在质量,是质量控制的关键,也是质量标志物优选的关键。为辨析丹红注

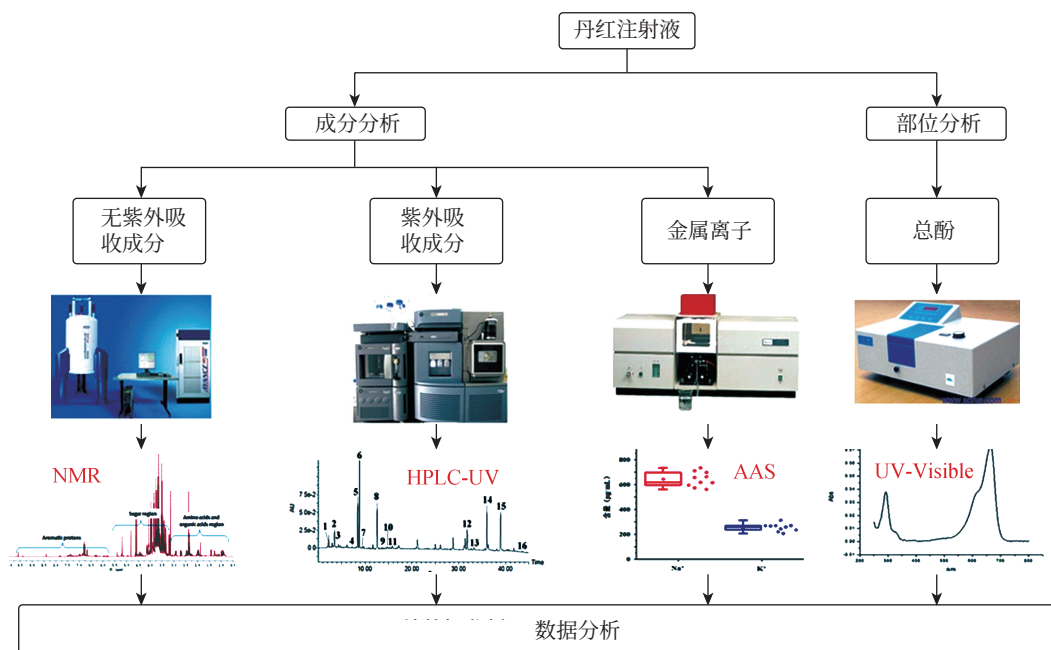


图 1 中药注射液化学物质研究策略

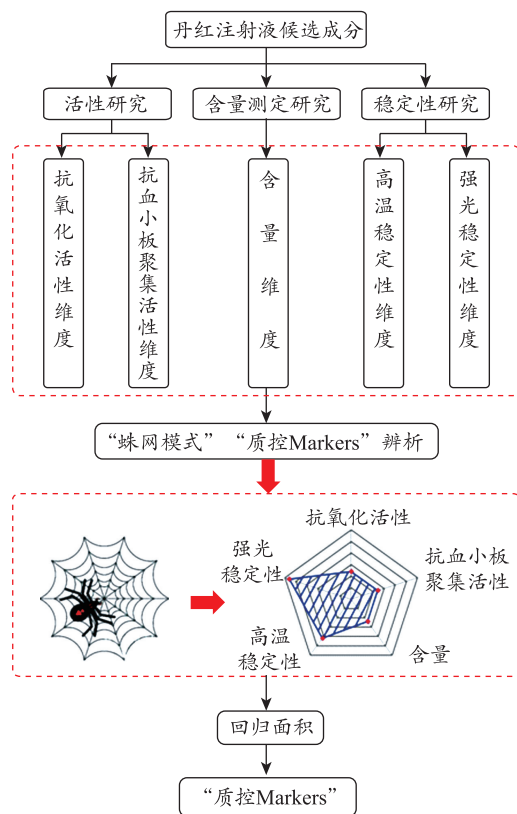


图2 基于“蛛网模式”辨析丹红注射液“Q-markers”的技术路线

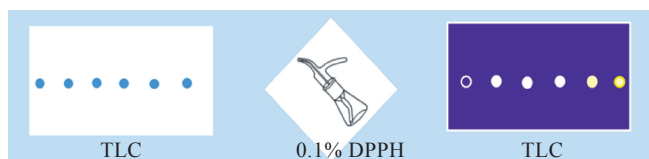


图3 原位定点 TLC-DPPH 生物自显影法

射液的质量标志物,本课题组提出了“蛛网模式”辨析质量标志物的方法。丹红注射液的质量标志物需满足以下3个条件:①中药注射液代表性成分;②具有制剂条件下较好的稳定性;③具有与药物疾病治疗作用相关的活性。具体的技术路线如图2所示。

根据丹红注射液特点,以胞苷、尿苷、腺苷、苯丙氨酸、5-羟甲基糠醛、丹参素、原儿茶酸、原儿茶醛、羟基红花黄色素A、紫丁香苷、咖啡酸、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸B、丹酚酸A、丹酚酸C为候选化合物,从3个方面(活性、含量、稳定性)、5个维度(抗氧化活性、抗血小板活性、含量、高温稳定性、强光稳定性)综合辨析丹红注射液“Q-markers”。以化合物各维度得分连线所得的面积(多元网络回归面

积)作为“Q-markers”的选择依据。化合物的回归面积越大,即表明该成分的“Q-markers”属性越好,综合贡献越大,为首选的“Q-markers”;反之,化合物的回归面积越小,即说明该成分在丹红注射液中的综合贡献越小,应作为备选“Q-markers”或者不选。

2.1 抗氧化活性维度

本课题组构建了原位定点 TLC-DPPH 生物自显影法,用以快速筛选丹红注射液中抗氧化活性成分^[8](图3)。以维生素C为阳性对照,将测试化合物点样于薄层板上,喷0.1% DPPH 无水乙醇溶液显色,在紫色背景下具有 DPPH·清除活性的化合物为淡黄白色斑点,斑点亮度强弱显示样品 DPPH·清除活性的强弱。在此基础上,采用 DPPH 微孔定量测定法测定并绘制具有 DPPH·清除活性化合物的 S 型剂量-效应曲线,获得丹酚酸 B、原儿茶酸、原儿茶醛、丹酚酸 C、咖啡酸、丹酚酸 A、迷迭香酸、紫草酸、丹参素的 IC₅₀ 值。将各成分 IC₅₀ 值的倒数除以其中的最大值进行数据归一化处理,计算结果作为“抗氧化活性维度”,计算公式如下:

$$\text{抗氧化活性维度} = 1/\text{IC}_{50}(n) \div 1/\text{IC}_{50}(\text{Max})$$

(n 为候选化合物 1-16)

2.2 抗血小板活性维度

构建基于微孔板的抗血小板聚集活性研究方法,以健康志愿者的重悬血小板为筛选模型,以血栓烷 A2 类似物 U46619 为激动剂,筛选 16 个候选化合物的抗血小板聚集活性并获得活性化合物(丹酚酸 A、丹酚酸 B)的 IC₅₀ 值。将各成分 IC₅₀ 值的倒数除以其中的最大值进行数据归一化处理,计算结果作为“抗血小板聚集活性维度”,计算公式如下:

$$\text{抗血小板聚集活性维度} = 1/\text{IC}_{50}(n) \div 1/\text{IC}_{50}(\text{Max})$$

(n 为候选化合物 1-16)

2.3 含量维度

根据 10 个批次丹红注射液中 16 个候选成分的含量测定结果^[8],分别计算 10 批丹红注射液 16 个候选成分的平均值($\bar{C}_n$),该值反映各成分在丹红注射液中的含量高低。将各成分平均含量除以其中成分平均含量的最大值(C_{max})进行数据归一化处理,作为“含量维度”,计算公式如下:

$$\text{含量维度} = \bar{C}_n \div \bar{C}_{\text{max}} \quad (n \text{ 为候选化合物 } 1-16)$$

2.4 高温稳定性、强光稳定性维度

根据丹红注射液特点,本课题组系统考察了丹

红注射液中 16 个候选化合物的高温、强光稳定性^[11]。将丹红注射液置于恒温恒湿箱中, 分别于 60 °C (避光)、强光 (4 500±500 lx) 条件下放置 10 天。于第 5 天和第 10 天取样分析, 研究高温、强光对丹红注射液中候选成分的影响。计算 16 个候选成分相对于 0 天含量测定结果的比值减 100% 的绝对值, 以表示含量变化的程度, 含量变化越大, 稳定性越差; 再用 1 减去该绝对值, 使计算结果与稳定性正相关, 得到

“高温或强光稳定性维度”, 计算公式如下:
高温或强光稳定性维度 = 1 - |CR_n - 100%|
其中, CR 为丹红注射液在高温或强光条件下放置 10 天的候选成分的含量相对于 0 天含量的比值; n 为候选化合物 1-16。
综合上述结果, 得到丹红注射液 16 个候选成分抗氧化活性、抗血小板聚集活性、含量、高温稳定性、强光稳定性 5 个维度的数据归一化结果 (图 4), 进一

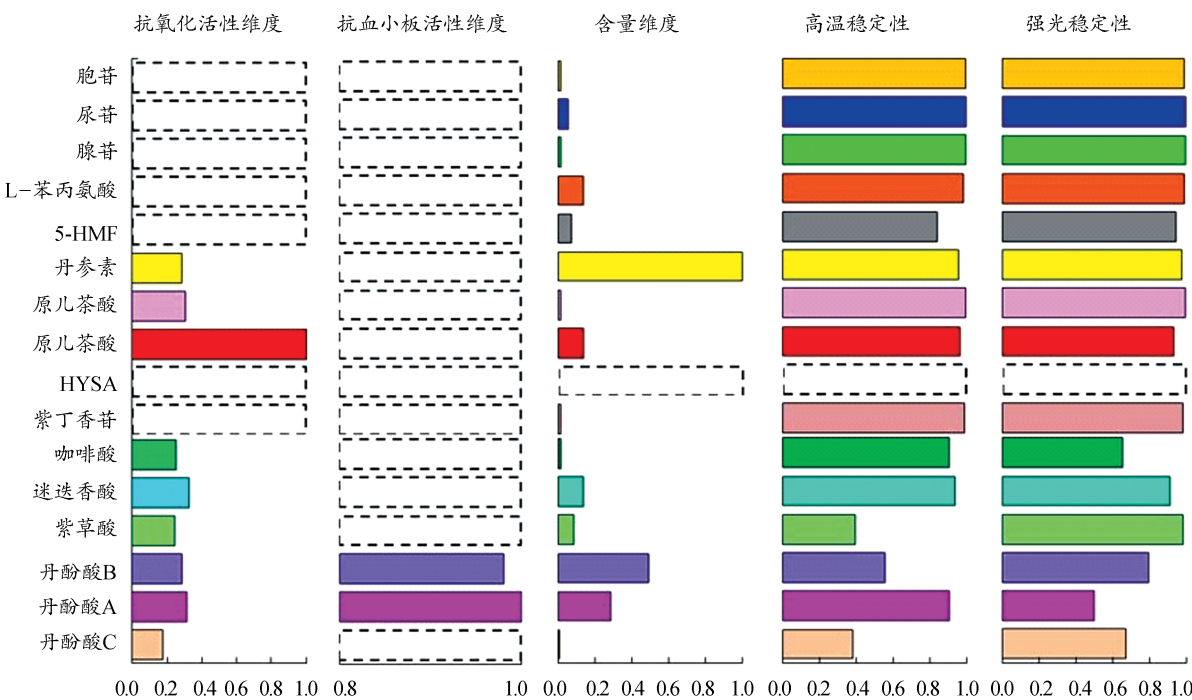


图 4 丹红注射液 16 个候选成分抗氧化活性、抗血小板聚集活性、含量、高温稳定性、强光稳定性数据归一化结果

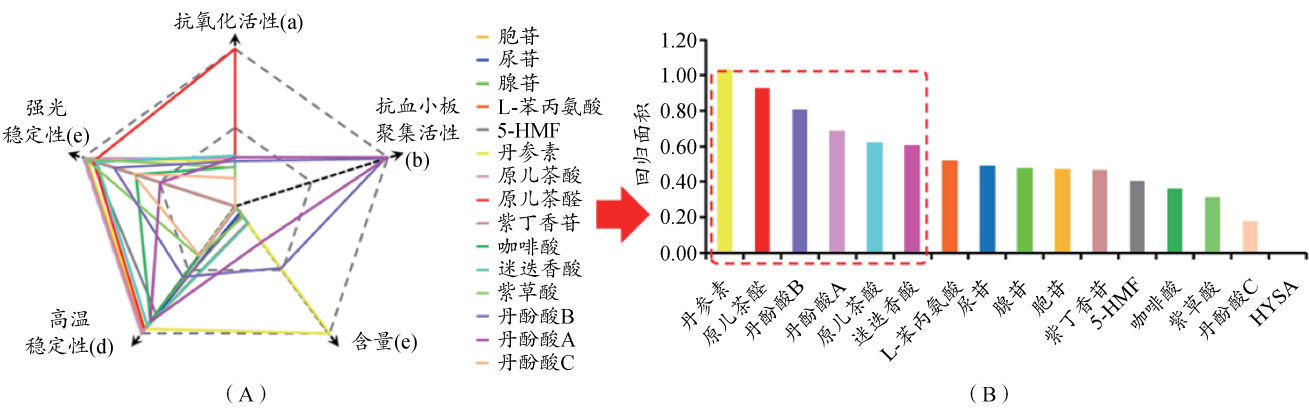


图 5 基于“蛛网模式”的丹红注射液“Q-Marker”辨析研究

注:A. 丹红注射液 16 个候选成分的“蛛网模式”图;B. 丹红注射液 16 个候选成分的回归面积, 其中红框内化合物为优选的质量标志物。

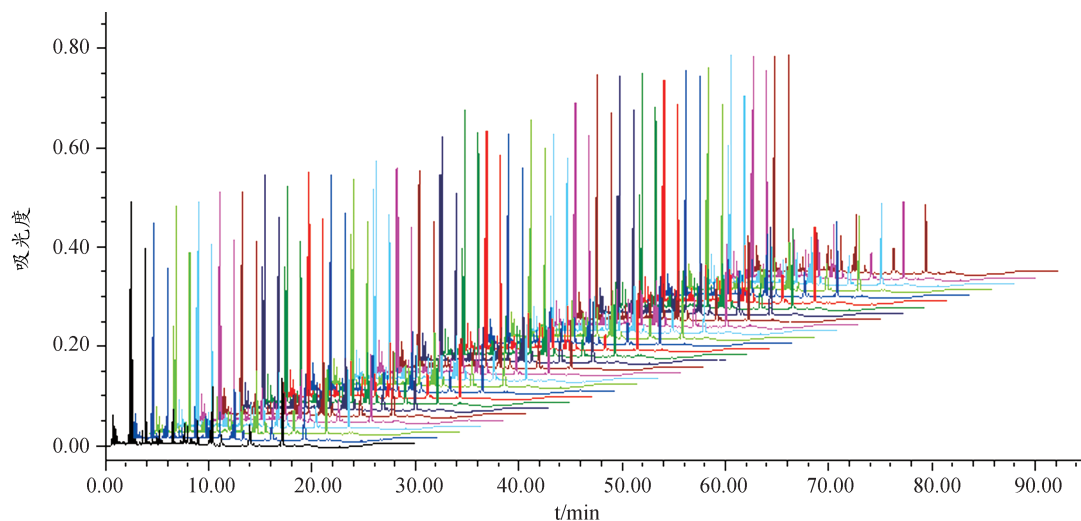


图6 丹红注射液指纹图谱研究

步构建“蛛网模式”图用于辨析丹红注射液的质量标志物(图5)。综合分析可知,丹参素、原儿茶醛、丹酚酸B、丹酚酸A、原儿茶酸、迷迭香酸等成分是丹红注射液优选的质量标志物。

3 质量控制方法

本研究通过“蛛网模式”分析方法,系统辨析并获得了丹红注射液“Q-markers”。结合中药注射液的特点并考虑质量控制方法的适用性,课题组提出了“指标成分测定-活性评价相结合的双标准质量控制研究”与“指纹图谱研究”相结合的中药注射液质量控制方法,以科学、全面地评价中药注射液的质量。

3.1 双标准质量控制研究

中药有别于化药和生物制剂,简单的化学或生物评价模式均无法全面反映中药的复杂性和整体性。中药注射液化学成分复杂,应该从“宏观”控制中药注射液的整体活性,从“微观”控制“Q-markers”或指标成分的含量,基于“整体活性评价”和“Q-markers或指标成分测定”,构建双标准质量评价体系(Dual-Standard Quality Assessment System, DSQAS)^[8]。采用DPPH微孔定量测定法测定丹红注射液清除DPPH自由基的活性,构建了丹红注射液DPPH自由基清除活性的标准;采用UPLC-UV法构建了指标成分的含量测定方法及标准,并且基于“Q-markers”辨析结果,进一步建立了丹红注射液的“Q-markers”的含量测定方法及标准。因此,建立以DPPH自由基清除活性评价中药注射液的整理活性,

以指标成分或“Q-markers”测定成分的含量,构建“宏观”和“微观”控制相结合的双标准质量控制方法,实现对中药注射液的质量控制。

3.2 指纹图谱研究

基于指标成分测定的中药质量控制方法,只控制中药中的部分成分,忽略了中药中的成分多样性、多种机制的协同作用,难以全面衡量中药的疗效和质量^[12,13]。中药指纹图谱(Fingerprints of Traditional Chinese Medicine)指采用一定的分析手段,得到能够标示中药特性的共有峰的图谱^[14]。因其整体性、模糊性的特点,被广泛用于评价中药质量的均一性和稳定性研究^[15]。本课题组在构建的双标准质量控制方法的基础上,亦构建了丹红注射液指纹图谱^[7],共指认了24个共有峰,鉴定了丹参素、原儿茶醛、原儿茶酸、咖啡酸、羟基红花黄色素A、丹酚酸A、丹酚酸B等21个成分,实现丹红注射液的全局质量控制(图6)。

4 总结与展望

本文以丹红注射液研究为例,从化学物质基础、质量标志物、质控方法三个层次,阐述了丹红注射液“Q-Markers”的辨析技术。通过多种分析方法,阐释丹红注射液的化学物质,综合利用活性评价、稳定性研究、含量测定研究等多种方法构建了“蛛网模式”辨析丹红注射液的“Q-Markers”;建立活性评价和指标成分定量相结合的质量评价方法,并结合指纹图谱研究全面评价其质量。

参考文献

- 1 刘昌孝, 陈士林, 肖小河, 等. 中药质量标志物 (Q-Marker): 中药产品质量控制的新概念. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1457.
- 2 张铁军, 许浚, 韩彦琪, 等. 中药质量标志物 (Q-Marker) 研究: 延胡索质量评价及质量标准研究. 中草药, 2016, 47(9): 1458-1467.
- 3 张铁军, 许浚, 申秀萍, 等. 基于中药质量标志物 (Q-Marker) 的元胡止痛滴丸的“性-效-物”三元关系和作用机制研究. 中草药, 2016, 47(13): 2199-2211.
- 4 孙蓉, 李晓宇, 王亮, 等. 基于“效-毒”相关的 Q-marker 合理辨识与科学控制. 世界科学技术—中医药现代化, 2016, 18(8): 1224-1231.
- 5 熊亮, 彭成. 基于中药质量标志物 (Q-Marker) 的基本条件研究益母草和赶黄草 Q-Marker. 中草药, 2016, 47(13): 2212-2220.
- 6 Jiang M M, Jiao Y J, Wang Y F, *et al.* Quantitative profiling of polar metabolites in herbal medicine injections for multivariate statistical evaluation based on independence principal component analysis. *PLoS One*, 2014, 9(8): e105412.
- 7 陈瑞雪, 焦玉娇, 朱彦, 等. 基于 UPLC-DAD/ESI-Q-TOF MS 技术的丹红注射液指纹图谱的构建. 药物分析杂志, 2016, 36(3): 457-464.
- 8 Liu H T, Wang Y F, Olaleye O, *et al.* Characterization of in vivo antioxidant constituents and dual-standard quality assessment of Danhong injection. *Biomed Chromatogr*, 2013, 27: 655-663.
- 9 国家药典委员会. 中国药典 (一部). 北京: 中国医药科技出版社, 2010.
- 10 王琰, 焦玉娇, 朱彦, 等. 火焰原子吸收分光光度法测定丹红注射液中钠、钾离子的含量. 天津中医药, 2016, 33(1): 43-46.
- 11 杨静, 刘海涛, 王跃飞, 等. UPLC-UV 法应用于丹红注射液多个活性成分的稳定性研究. 天津中医药, 2012, 29(6): 579-582.
- 12 李强, 杜思邈, 张忠亮, 等. 中药指纹图谱技术进展及未来发展方向展望. 中草药, 2013, 44(22): 3095-3104.
- 13 张宏, 夏伟, 张磊, 等. 中药应以临床功效为导向进行质量标准研究. 中华中医药杂志, 2014, 29(12): 3686-3688.
- 14 国家药品监督管理局. 中药注射剂指纹图谱研究的技术要求 (暂行). 中成药, 2000, 22(10): 671-675.
- 15 梁逸曾, 易伦朝, 黄熙, 等. 中药分析新思路及其质量控制. 分析测试学报, 2014, 33(2): 119-126.

Discriminant Analysis of “Q-Markers” of Traditional Chinese Medical Injections —Taking Dan Hong Injection as a Model

Yang Jing¹, Jiang Zhenzuo¹, Chai Xin¹, Wang Yi², Zhao Buchang³, Zhao Xiaoping⁴, Wang Yuefei¹

(1. Tianjin State Laboratory of Modern Chinese Medicine, Institute of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China;

2. Department of Chinese Medicine Science & Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;

3. Shandong Danhong Pharmaceutical Co., Ltd., Heze 274000, China;

4. College of Basic Medical Sciences, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

Abstract: Quality control of traditional Chinese medicine is of great importance to ensure its safety and effectiveness in clinic, and is also an obstacle impeding the modernization of traditional Chinese medicine. Though, the complexity of traditional Chinese medicine resulted in some relative weakness of quality standard researches. The critical point need addressing is to establish a sound quality standard system conforming to the characteristics of traditional Chinese medicine in the process of the modernization of Chinese medicine. In this paper, in regard to Dan Hong injection, discriminant strategy of “Q-Markers” from traditional Chinese medicine injection was clarified from three aspects: what ingredients, which to control and how to control, providing a new vision in the field of the quality standard researches of traditional Chinese medicine.

Keywords: Quality-markers, quality control, traditional Chinese medical injection

(责任编辑: 马雅静, 责任译审: 朱黎婷)