

• 中药现代化论坛 •

“区间指纹图谱”的构思与研究

易延遼¹, 蔡光先², 杨永华²

1. 南方医科大学中医药学院, 广东 广州 510515

2. 湖南中医药大学 超微工程技术中心, 湖南 长沙 410006

摘要: 目前指纹图谱已成为国际公认的控制中药或天然药物质量的有效手段。近年来对中药指纹图谱进行了很多探索性研究, 但是真正将指纹图谱作为质量标准的只有中药注射剂, 而其他的中药指纹图谱研究多只停留在研究阶段。造成中药指纹图谱研究瓶颈的原因很多, 如天然产物成分的复杂性, 指纹图谱的分析结果中往往有大量的杂质峰群存在, 而现有的分析手段很难使这些杂质峰群达到很好的分离, 为此提出了构建“区间指纹图谱”。对“区间指纹图谱”构建程序、建立方法、构建模式、应用问题等进行了较全面地研究和分析, 并以神安颗粒为例进行了分析。

关键词: 区间指纹图谱; 中药; 天然产物; 杂质峰群; 神安颗粒

中图分类号: R284 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2013)04-0379-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2013.04.001

Construction and research of interval fingerprint

YI Yan-kui¹, CAI Guang-xian², YANG Yong-hua²

1. College of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

2. Ultramicro Engineering Center, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410006, China

Abstract: At present, fingerprint has become an effective mean recognized internationally in controlling the quality of Chinese materia medica (CMM) or natural products. In recent years, there are some exploratory studies on the fingerprint of natural product, while only the injection of CMM has taken the fingerprint as one of the quality criteria. Other fingerprint studies on natural products were all staying in the researching phase. There are many reasons for the bottleneck of natural product fingerprint research, such as the component complexity of natural product. There are always a lot of impurity peaks in the analytic result of fingerprint, while it is very difficult to dissociate these impurity peaks by forthcoming analytic methods. Therefore we propose to construct the “interval fingerprint”. The studies and analyses on the construction program, approach, model, and application problem of the “interval fingerprint” have been carried out with Shen'an Granule as the example.

Key words: interval fingerprint; Chinese materia medica; natural products; impurity peaks; Shen'an Granule

中药指纹图谱是指中药中所共有的、具有特异性的某类或数类成分的色谱或光谱的图谱, 其特点在于通过指纹图谱的特异性, 能有效鉴别样品的真伪与产地; 通过指纹图谱主要特征峰的量或比例, 能有效控制样品的质量, 确保样品质量的相对稳定。在有效成分不完全明确的前提下, 特征指纹图谱对于有效控制中药的质量具有重要的意义。目前指纹图谱已成为国际公认的控制中药质量的最有效手段之一^[1-3], 美国 FDA、WHO、欧共体等都指出草药

及其制剂是以其整体作为有效物质, 单靠测定已知的指标性成分是不够的。因此, 国际市场要求通过色谱指纹图谱显示其所含的各种成分在草药及其制剂中是稳定的, 其质量比例应保持恒定。

1 指纹图谱研究面临的问题

近年来, 对中药指纹图谱进行了很多探索性研究^[4-8], 但是将指纹图谱作为产品质量标准的只有中药注射剂。2000年, 国家食品药品监督管理局在《关于加强中药注册管理有关事宜的通知》(国药管注

收稿日期: 2012-09-28

作者简介: 易延遼 (1975—), 男, 湖南洪江人, 博士, 主要研究方向为药物新剂型、新技术的研究。

Tel: (020)61648263 13160895281 E-mail: dareyyk@sina.com

网络出版时间: 2013-01-21 网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20120121.1374.003.html>

[2000]157号)中要求“中药注射剂应固定药材产地,建立药材和制剂的指纹图谱标准”^[9]。而其他中药指纹图谱研究多只停留在研究阶段,没有将指纹图谱收入产品质量标准中。

造成中药指纹图谱研究瓶颈的原因很多,常见的原因主要有:(1)中药材等因产地、种植、生长环境、采收季节等造成原料来源很难统一。(2)中药成分复杂,相互之间会发生很多化学反应,外界条件稍有变化,即造成中药成分可能存在明显的差异。(3)中药的加工炮制方法也会造成其成分产生不同的变化,如产地的粗加工,采用日光晒干和烤房或烤箱烤干就会使成分产生变化;炒制、加辅料炙等不同的炮制工艺和不同的工艺参数也会造成中药成分产生不同的变化。(4)产品的制备工艺也会影响中药成分,现代的制药设备虽然能保证制备工艺参数基本一致,但很难做到完全一致,工艺参数的轻微变化可能造成中药制品成分的不一致。(5)中药原材料和成品在储存过程中所含成分也会发生一些变化。(6)指纹图谱的分析处理方法会影响到分析结果,分析过程中,因为分析环境不同,选用的器材设备不同等都会影响到分析结果。

除了上述诸多原因之外,在研究中还发现存在一种重要的现象,指纹图谱的分析结果中往往出现大量的杂质峰群,这是因为天然产物成分的复杂性,而现有的分析手段很难使这些杂质峰群达到很好的分离。

2 区间指纹图谱的构思与研究

针对指纹图谱分析结果中杂质峰群的存在,本课题组在研究中提出了构建“区间指纹图谱”。所谓“区间指纹图谱”就是建立某一区间的指纹图谱,整个指纹图谱可以将其分为几个区间,也即是分为几个时间段,在一定区间内可能杂质峰群比较集中,这样就不对这一区间的杂质峰群进行指纹峰的定位,而对一定区间内色谱峰均分离较好的组峰尤其是参比峰所在区间进行指纹峰的定位,从而构建起这一区间的指纹图谱。

当然,区间指纹图谱构建的可行性也是基于以下条件:(1)首先要求某一区间内色谱指纹峰分离较好,有较明显的色谱指纹峰;(2)要求该区间没有明显的杂质峰群;(3)参比峰应该在这一区间内,且与其他指纹峰分离较好;(4)不同批次的杂质峰群应具有较好的相似性,因为进行相似度评价时依然会采用全谱进行相似度评价。

3 区间指纹图谱的构建程序

很明显,“区间指纹图谱”的建立过程比一般指纹图谱的建立要复杂得多,一般指纹图谱的建立只是其中一部分。

3.1 分析条件的确定

制定指纹图谱的原则是要尽量使主要成分峰基本分离。因此,同样首先要选择多种分析方法对样品进行分析,采用多种仪器分析方法进行比较,尽量使主要成分峰分离,而“区间指纹图谱”所针对的是存在杂质峰群的情况,因而分析处理的目的一方面是使主要成分峰达到分离;另一方面要使杂质峰群一是尽量小,二是尽量集中于某一区间。

3.2 “区间指纹图谱”区间的确定

对于优化分析条件后所获得的指纹图谱,一般因某些区间存在较多的杂质峰群,而主要成分峰集中于某一区间,那么这一区间就是要选择的区间,杂质峰群所在其他区间将不再考虑。

3.3 “区间指纹图谱”的建立

确定了“区间指纹图谱”区间后,接下来就是对这一区间的指纹峰进行标注,进而建立起指纹图谱,建立的过程同样参照国家食品药品监督管理局关于“中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)”的通知^[9]及有关指纹图谱的一般建立程序:(1)以具体成分为参比,选定参比峰。(2)根据多批次的检测结果所给出的相关参数,标定共有指纹峰,绘制指纹图谱,并且依次进行方法学考察,包括精密度试验、稳定性试验、重复性试验、相似度评价。最后,根据10批次以上供试品图谱中各共有指纹峰的比值,计算平均比值,进行聚类分析。具体可以将峰面积、峰高、保留时间等作为计算依据,从而建立起指纹图谱。

基于目前指纹图谱研究中出现的问题提出的“区间指纹图谱”这一概念,可以很好地解决指纹图谱研究中出现的杂质峰群问题,从而为中药指纹图谱的建立打开新的思路和方法,也为指纹图谱建立的可行性提供了更多的实验依据。

4 “区间指纹图谱”的应用问题

4.1 中药成分复杂

若有效成分和效应成分不清难以判断整个指纹图谱“杂质峰群比较集中”的时段,可能有效成分和效应成分就在所谓的“杂质峰群”中,而“区间指纹图谱”主要是提供了鉴别药物的一种方法,要想达到有效成分和效应成分定格在“区间指纹图谱”

的区间里, 需要进一步进行相关的研究。

4.2 优化梯度洗脱区间

HPLC 梯度洗脱色谱包含了“区间指纹图谱”区间信息, 可以从中提取有用的信息, 采用梯度区间来建立中药的“区间指纹图谱”, 即优化梯度区间, 使药物在某一梯度区间内达到较好分离。

4.3 “区间指纹图谱”的建立过程比一般指纹图谱的建立要复杂得多

“区间指纹图谱”应用难度较大, 还需要进行大量的研究, 而要上升为国家标准, 还有很长的路要走。而在目前质量控制中, 企业可以考虑将其作为内控标准, 在无法建立指纹图谱的情况下, 建立自己产品的“区间指纹图谱”, 如食品、化妆品、保健品、中药新药及其他天然产物制品等, 提高自己产品的可控性, 提高产品的质量。

5 神安颗粒“区间指纹图谱”的研究

因神安颗粒由多味中药组成, 成分复杂, 在对神安颗粒指纹图谱的研究中, 进行了神安颗粒中3类成分的指纹图谱研究^[10-11], 即研究了以天麻素为代表的苷类成分, 以五味子醇甲为代表的脂溶性部分成分和以斯皮诺素为代表的水溶性成分的指纹图谱。

在研究以天麻素为代表的苷类成分指纹图谱中, 优化了色谱条件, 并进行了供试品溶液制备方法的优化, 建立该类成分指纹图谱(图1)。在区间0~5 min内有大量的杂质峰群, 而在区间5~35 min内主要指纹峰分离较好, 因而选择了这一区间作为神安颗粒苷类成分的“区间指纹图谱”。

在研究以五味子醇甲为代表的脂溶性成分指纹图谱中, 优化了流动相等色谱条件, 并进行了供试

品溶液制备方法的优化, 建立了其指纹图谱(图2)。在区间0~10 min内有大量的杂质峰群, 而在区间15~60 min内主要指纹峰分离较好, 因而选择了这一区间建立了神安颗粒脂溶性成分的指纹图谱。

在研究以斯皮诺素为代表的水溶性成分指纹图谱中, 优化了流动相等色谱条件, 并进行了供试品溶液制备方法的优化, 建立了其指纹图谱(图3)。在区间0~18 min内和区间48~55 min内有大量的杂质峰群, 而在区间18~48 min内主要指纹峰分离较好, 因而选择了这一区间建立了神安颗粒水溶性成分的指纹图谱。

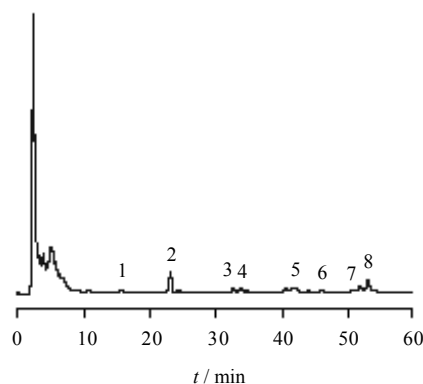


图2 神安颗粒中脂溶性成分共有指纹峰
Fig. 2 Common fingerprint peaks of liposoluble constituents in Shen'an Granule

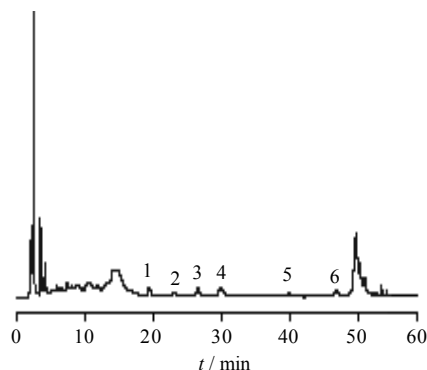


图3 神安颗粒中水溶性成分共有指纹峰
Fig. 3 Common fingerprint peaks of water soluble constituents in Shen'an Granule

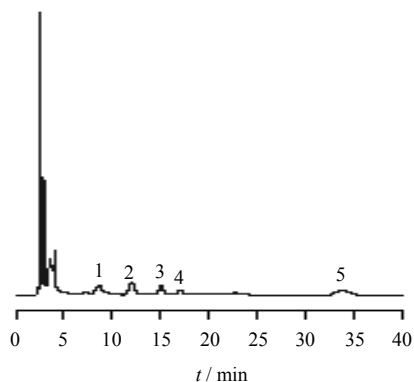


图1 神安颗粒中苷类成分共有指纹峰
Fig. 1 Common fingerprint peaks of glycosides in Shen'an Granule

6 展望

中药指纹图谱的研究中, 总是会面临很多复杂的瓶颈问题, 而每次思路与方法的突破, 将一个一个问题迎刃而解。“区间指纹图谱”的构建可以很

好地解决指纹图谱研究中出现的杂质峰群问题,在目前研究阶段,可以为企业内控标准提供很好的思路和借鉴。而随着现代分析手段的不断提高,“区间指纹图谱”一方面可能消除杂质峰群的存在,另一方面可能逐步通过反复建立成为这一领域的标准,从而逐步上升为法定标准。中药指纹图谱的研究需要研究者不断地打开新的思路和方法,不断地为中药指纹图谱建立提供更多的实验依据。

参考文献

- [1] Natalie L. Use of fingerprinting and marker compounds for identification and standardization of botanical drugs: strategies for applying pharmaceutical HPLC analysis to herbal products [J]. *Drug Inf J*, 1998, 32: 497-512.
- [2] Houghton P J. Establishing identification criteria for botanicals [J]. *Drug Inf J*, 1998, 32: 461-469.
- [3] 任德权. 中药指纹图谱质控技术的意义与作用 [J]. *中药新药与临床药理*, 2001, 12(3): 135-140.
- [4] 颜月园, 萧伟, 吴云, 等. 散结镇痛胶囊中皂苷类成分的指纹图谱研究 [J]. *中草药*, 2012, 43(3): 496-500.
- [5] 赵恒强, 陈军辉, 史倩, 等. 基于核苷类化合物 HPLC-ESI-TOF/MS 分析的海洋动物药指纹图谱方法 [J]. *高等学校化学学报*, 2012, 33(1): 44-48.
- [6] 黎阳, 刘素香, 张铁军, 等. 麻仁软胶囊的指纹图谱研究 [J]. *中草药*, 2012, 43(3): 496-500.
- [7] 李文博, 韩建平, 高钧, 等. 养血清脑颗粒的高效液相色谱指纹图谱研究 [J]. *分析化学*, 2011, 42(6): 1097-1100.
- [8] 马丽娜, 张岩, 陶尊威. 色谱分析技术在中药指纹图谱研究中的应用 [J]. *药物评价研究*, 2012, 35(1): 58-62.
- [9] 国家药品监督管理局. 关于印发《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》的通知 [J]. *中成药*, 2000, 22(10): 671-675.
- [10] 易延遂, 陈志良, 邓虹珠. 中药指纹图谱的研究评析 [J]. *中成药*, 2006, 28(8): 1192-1197.
- [11] 易延遂, 陈志良, 杨永华. 中药“全指纹图谱系”的研究分析 [J]. *中草药*, 2007, 38(7): 1105-1107.