

HPLC指纹谱技术在中药新药质量控制中的应用

沙 明¹,王嘉伦²,曹爱民¹,孟宪生¹,张东方¹

(1. 辽宁中医学院 中药系,辽宁 沈阳 110032; 2. 辽宁省药品监督管理局,辽宁 沈阳 110015)

摘要:通过 HPLC指纹谱技术对 10种中药材及注射剂的质量评价实践探讨该技术对中药材及新药中未知成分定性鉴别的可行性,对中药材不同种基源鉴定的可靠性,对注射剂中药材、中间体及成品之间的图谱相关性,采用该法对仪器、色谱柱、柱效、流动相要求的统一性等诸多与规范化有关的技术问题,目的在于推进 HPLC指纹谱技术应用于中药材及中药新药质量评价过程中的科技含量,保证运用该技术结果的真实性。

关键词: HPLC指纹谱;中药新药;质量控制

中图分类号: R282.71 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2002)02-0181-03

Application of HPLC fingerprint technique in quality control of new drug of Chinese medicine

SHA Ming¹, WANG Jia-lun², CAO Ai-min¹, MENG Xian-sheng¹, ZHANG Dong-fang¹

(1. Department of Chinese Materia Medica, Liaoning College of TCM, Shenyang Liaoning 110032, China;

2. Liaoning Drug Administration, Shenyang Liaoning 110015, China)

Key words HPLC fingerprint; new Chinese medicine; quality control

中药材及中药新药的质量可控性是中药以药品名义进入国际市场的主要问题之一。要想使中医药走向世界,中药学研究应以提高中药材及新药的质量为主要目的,其任务之一就是采用先进手段开展中药及新药的质量标准研究,研究思路应当全面反映中药的内在质量,而指纹图谱技术是反映中药及新药内在质量国内外认可的方法。HPLC指纹图谱技术是对中药及新药质量实行规范化评价的有效手段之一。由于该法具有分离效率高,分析速度快,检测灵敏度高,方法重现性好的特点,近年来,在中药材及新药质量控制上开始研究与应用。

然而,在采用 HPLC指纹谱技术对中药材及新药质量进行评价中,尚有许多理论与实践问题需要研究解决。大量的研究还是分散的,缺乏系统规范,特别是应用 HPLC指纹谱技术时,如何考虑到中药材之间的千差万别,坚持实事求是,既寻求带有规律性的东西,又要考虑一些中药的特殊性,制定可操作强的法规细则显得十分重要,总而言之,规范化研究势在必行。

1 HPLC指纹图谱技术在《中国药典》(一部)上应体现出特殊性和权威性

到目前为止,《中国药典》(简称《药典》)采用 HPLC法对中药品种进行鉴别项检出的尚属空白,而美国药典 23版采用 HPLC法鉴别项达 519种,杂质检查项达 206种^[1],这种情况应当得到改变。因为只有在采用 HPLC法或 HPLC指纹谱对《药典》中大量品种设立鉴别项目的基础上,HPLC指

纹图谱技术在对《药典》的中药及成药品种质量评价上才能形成权威性,从而也才能对中药新药开发品种中实施指纹图谱鉴别技术过程中起到指导和推动作用。

《药典》采用 HPLC法的品种具有权威性是显而易见的,因为申报中药新药的任何品种,如果选定处方中某药味的定量检测指标为《药典》收载过的品种,常以《药典》为准。例如我们辽宁中医学院申报的四类新药《橘红化痰片》的定量指标选定君药橘红,采用 HPLC法测定其中柚皮苷的含量,在省药检所复检时,方法重现性良好,但在药材名称上与药典不符。药典的化橘红项下采用 HPLC法测定其柚皮苷含量,而橘红项下无含量测定项,文献查阅证实,橘红中不含柚皮苷,因为柚与橘不同种,最终以《药典》为准,处方的橘红改为化橘红,更正了地方品种名称的混乱现象。

然而,《药典》单纯采用 HPLC法对某些品种进行含量测定,并不能解决品种鉴别和定量指标专属性问题,应考虑附加 HPLC指纹谱鉴别作为定量的补充。如《中国药典》2000年版一部中的化橘红、骨碎补和枳壳同选柚皮苷作为定量指标^[2],专属性不强,我们的研究证明这 3个品种的 HPLC指纹谱可以进行药材间区别。我们在新药开发中发现枳实品种混乱,同为枳实药材,有的含有橙皮苷,有的既有柚皮苷又有橙皮苷,指纹谱明显不同,因此,这类药材的指纹谱建立确有必要且有意义。像《药典》中淫羊藿的 5个不同种;葛根药材的粉葛与野葛;赤芍与白芍等有条件时均应建立 HPLC指纹谱,与含量测定项形成互补。

中药新药鉴别项的数量一般要求为处方药味三分之一以上,不能全方药味鉴别的原因之一是受到对照品和对照药材不足的限制,如果采用 HPLC法或指纹图谱法,鉴别项将有所增加。根据我们多年来用 HPLC法对中药新药复方制剂质量控制的探索性研究的体会,有些处方的药味尽管指标性成分不明确,但却能够确立有特征的共有峰,鉴别专属性很强,只要认真观察,反复试验,就会得到可控的鉴别方法。

我们在起草三类新药《清肺解毒止嗽口服液》鉴别项时就注意到,该制剂工艺为水提取,有些药味用 TLC法鉴别检出有困难,必须采用 HPLC药材对照法进行研究。将欲鉴别药味分别水提取,药液经紫外扫描,找出其最大吸收波长,再经 HPLC法对药材液进行分析,综合多味药材分析结果,特别是阴性液考察,确定具有专属性的指标,经成药供试品检测,获得理想的 HPLC鉴别图谱,在一个固定波长下,一种流动相系统中,可同时检出紫花地丁、蒲公英、重楼的特征峰。如果选择不同条件,制定多张指纹谱,结果将更有鉴别意义。同样,三类新药《癰闭消》,一张色谱图可检出阴行草、莲须两种药材。

采用 HPLC法或 HPLC指纹谱法对中药新药及中药材鉴别项研究与 HPLC指纹谱对中药注射剂的质量研究技术要求应有所区别^[3]。鉴别项指纹谱与注射剂指纹谱不同点是:一般药材或成药的指纹谱具备特征共有峰即可,峰面积的比值要求不必像注射剂那样严格。鉴别项指纹谱重点在同药不同种药材中应用或某些药味在群药中的特征峰鉴别等,而注射剂指纹谱要求药材固定产地、固定品种及采收期条件,要求指纹谱所有共有峰严格的一致性。如前胡,《药典》有白花前胡和紫花前胡两个种,无化学鉴别依据,饮片上外观区别不明显,我们随机抽取前胡饮片,采用 HPLC法测定,色谱图可明显分辨两个种,进一步研究证实,含有白花前胡丙素的为白花前胡,该种主要含有角型二氢吡喃香豆素;紫花前胡中不含白花前胡丙素,属线型二氢吡喃香豆素,这一研究支持药厂开发前胡新药时固定产地,确定前胡品种,避免药材混淆。

《药典》的权威性和特殊性的更重要特征是一药一规范,这样才能反映出中药的特色,因为中药品种繁多,成分复杂,建立普遍适用的技术通则十分必要,但同时针对不同品种的特殊情况进行专门规定并建立细则,对方法学做出实事求是的评价,有利于检测结果的真实性。

2 提高 HPLC指纹谱技术对中药新药质量评价的专属性

中药材指纹图谱系指中药材经适当处理后采用一定的分析手段,得到的能够标示该中药材特性的共有峰的图谱。这里所谓标示该中药材特征性的概念就是强调指纹谱的专属性。只有提高专属性,才能反映出“指纹”这一词的特殊意义,首先是鉴定功能,其次具有评价意义,也就是说指纹谱既要说明药材是不是的问题,然后又要说明药材好不好的问题。

2.1 深化指标性化学成分的研究:根据注射剂指纹谱技术要求,需设立参照物(标准峰),理想情况应该是这一标准峰

的化学结构明确。实施这一技术将推进化学成分的研究。我们在承担国家“九五”科技攻关课题《独活质量标准规范化研究》过程中,考虑采用 HPLC指纹谱对独活进行内在质量评价,首先想到的是分离对照品,从独活中分离得到 7 个香豆素化合物,并选择其中的二氢欧山芹醇、花椒毒内酯、二氢欧山芹醇醋酸酯、甲基欧山芹素、二氢欧山芹素作为指标性成分,绘制指纹谱,由于这些标准物极性分布合理,基本可以控制指纹图谱的质量,采用这种方式,对全国 30 个地区独活饮片进行分析,确定了其共有峰,专属性很强^[4]。

再如中药淫羊藿,根据我们的研究表明,尽管药典淫羊藿品种有 5 个,但指纹谱可以非常明显地出现了 4 个峰,这 4 个峰的化学成分清楚,即淫羊藿定 A(epimedin A)、B、C、淫羊藿苷,表现出极强的专属性^[5]。

有些中药指标成分并不专属,如大黄药材含有大黄素,而何首乌、决明子^[6]、虎杖等药材均不同程度含有该指标性成分,如果不同药选用相同指标,进行含量测定,缺乏鉴别意义,而 HPLC指纹谱将有可能解决这一问题。

我们在三类新药《长宝心胶囊》鉴别标准研究上采用 HPLC法对其大黄药材进行全成分指纹图谱鉴别研究,选择大黄等 5 个对照品进行鉴别以提高专属性。

HPLC指纹谱也可以增强色谱的可视性,我们在中药西红花鉴别时,曾采用药典规定的薄层鉴别方法进行试验,薄层斑点较浅,日光下观察不显著,拍照效果较差,而采用 HPLC指纹图谱进行观察,色谱峰明显,分离完全,图谱既具有可视性又可长期保存。

2.2 注意同属药材间的对比性研究:药材指纹谱的专属性需要大量实验数据来证实。由于中药材来源复杂,野生与栽培共存,品质低劣的药材与地道药材并存,因此,制定药材指纹图谱一则需要大样本考察,二则标准需要多家单位复核确认,同一品种,多家申报的指纹图谱最终应该择优统一标准,形成固定检测条件的权威的药材指纹谱,同时注意同属甚至同科植物指纹谱的对比研究。

我们在进行独活药材指纹谱研究时,考虑到伞形科作为药用植物的药典收载的就有十几种,同属植物化学成分相近,有必要进行区别。选择同属植物当归、白芷、拐芹当归、朝鲜当归等进行比较,并扩展到伞形科植物蛇床子、防风等,对比研究表明,独活指纹图谱具有专属性。

2.3 加强 HPLC指纹谱与其它指纹谱的配合: HPLC指纹谱不是指纹谱的唯一方式,在药材品种复杂,成分相近,不易区别时建立 DNA 指纹谱可提高鉴别的专属性。例如为了从分子水平开展独活药材及同属植物的鉴别工作,采用任意引物聚合酶链式反应(AP-PCR)技术对独活及同属植物进行研究,结果表明,用一种引物,即可获得清晰可靠的 DNA 指纹图谱^[7]。再如采用 RAPD法对榆药材不同种进行 DNA 指纹谱分析,结果可以区分地榆、白花地榆、粉花地榆、长叶地榆和翻白叶^[8]。

3 采用 HPLC指纹图谱技术应强调科学性和可操作性

采用 HPLC技术对中药及注射剂进行指纹谱分析,应

考虑中药及复方新药的特殊性及复杂性。实际操作中,有许多因素影响结果的准确性。西药测定指标明确单一,一般来讲,进样质量可以加大,结果误差减小,而中药相似成分普遍存在,分离困难,减少进样量,结果的误差是不可避免的。同时,中药材有多类有效部位,指纹图谱也应制作多个。

3.1 应体现与中医功能主治、药理活性的一致性:一味中药本身就有多种药理活性,在中医用药原则上,一味中药也有多种治疗功能,因而指纹谱确立应考虑中医特色。如中药淫羊藿,药典中功能主治为用于治疗阳痿遗精,风湿痹痛,更年期高血压症,支气管炎。在对淫羊藿进行质量评价时,应考虑中医治疗功能,研究多张指纹谱。选择活性成分作为标准峰(S),经过实验摸索,确立不同色谱条件下的色谱图。例如:①以提高冠脉血流量药理作用的淫羊藿苷作标准峰;②以有强烈镇痛作用金丝桃苷作标准峰^[9];③以有降压作用的木兰碱作标准峰^[10];④以有抗炎作用的绿原酸作标准峰^[11]分别建立4个指纹谱,既全面评价该药质量又符合中医用药原则。

我们在研究地榆药材指纹谱时,根据所含有效部位,确定薄层扫描法建立的皂苷指纹谱,HPLC法确立黄酮类成分指纹谱和鞣质类成分的指纹谱^[12,13]。不仅可以辨认不同种的地榆,而且可以判断药材优劣。

3.2 应注意药材与成品相关性:由于药材来源的复杂性,一批药材指纹谱会出现不一致的情况。例如:丹参药材有些是野生,有些为人工栽培,外观上有差别,因而在指纹谱上不尽相同。但中间体差别不显著,这可能是由于丹参提取物已形成规模生产,一个品种多厂生产,往往由一家供应中间体,似乎药材指纹谱对控制中间体没有直接意义。

再如,西洋参茎叶主要含有人参皂苷Rb₃等成分,但注射剂为提取物的降解物,主要成分Rh₂,药材与成品HPLC指纹谱没有相关性,药材指纹谱也无法控制成品质量。因此,需要考虑建立西洋参成品中以Rh₂为标准峰的指纹谱,以解决与人参降解物的区别。由此,注射剂指纹谱应根据具体品种专门研究建立可操作性强的标准。

3.3 实验条件的优化与规范:首先,遇到的是色谱柱问题。目前用于中药检测的色谱柱为多厂家多种型号,虽然填料均为十八烷基硅烷键合硅胶,但性质有明显不同,我们在同一条件下考察3根不同厂家相同长度的色谱柱,保留时间有明显差别,因此,采用不同公司生产的色谱柱做指纹谱分析,结果将有不一致的可能。由于注射剂指纹谱为质量检测标准,不仅药厂要正常检验,药检所还要进行复核,不像单一指标检测,按药典规定,根据不同色谱柱,流动相可作相应调整。指纹谱受条件影响较大,峰形变化,峰面积比值也会变化,容易造成重复性差的结果。建立国家能根据指纹谱评价的实际,总结一段工作的经验,规定标准色谱柱。

洗脱方式同样是指纹图谱建立的重要条件,目前,在同

样的品种指纹谱中会出现等度洗脱和梯度洗脱两种情况,指纹图会明显不同。在研究指纹谱时,首先考虑等度洗脱方式,条件容易控制,如有必要,也可采用梯度洗脱,但条件需要严格控制。

3.4 引进人工智能手段:指纹图谱建立以后,如何评价,将是我们遇到的又一课题。在独活指纹谱研究中,由色谱提供化学信息,应用数学手段进行数据重组,聚类分析进行分类,数学检验法进行判别,最终实现科学客观对药材进行真伪优劣评价目的^[14]。在地榆指纹谱分析中引入了人工神经网络方法对地榆进行特征提取,建立模式识别BP网络,并不断总结经验,以便于提高运用这些技术结果的准确性。

指纹图谱标准研究是一项提升中药质量评价水平的系统工程,需企业和研究单位协作攻关,国家政策调整,但实践证明,通过系统条件摸索,化学成分研究分析,样品来源考证,方法条件优选等细致工作,指纹图谱技术必将在中药新药质量研究中发挥巨大作用^[15]。

参考文献:

- [1] 田颂九,王慕邹,倪坤仪,等. 药物分析展望[C]. 中国药学会学术年会大会报告集, 2000, 66-68.
- [2] 中国药典(2000年版一部)[S].
- [3] 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[J]. 中国药品标准, 2000, 1(4): 3-7.
- [4] 才谦,沙明,杨松松,等. HPLC法测定独活中3种香豆素的含量[J]. 中国中药杂志, 1999, 24(9): 552-554.
- [5] 沙明,曹爱民,杨松松,等. 高效液相色谱法测定朝鲜淫羊藿中淫羊藿苷的含量[J]. 色谱, 1997, 15(2): 166-167.
- [6] 曹爱民,沙明,孟淑智,等. 高效液相色谱法测定决明子中大黄酚的含量[J]. 中国中药杂志, 1997, 22(2): 107-108.
- [7] 沙明,曹爱民,孟宪生. DNA指纹谱与HPLC指纹谱对中药独活质量评价研究[C]. 中国药学会2000年学术年会论文集(下册): 532-536.
- [8] 沙明,张东方,孟宪生. DNA指纹谱与HPLC指纹谱对中药地榆质量评价研究[C]. 中国药学会2001年学术年会论文集(上册): 325-328.
- [9] 沙明,曹爱民,杨松松,等. 高效液相色谱法测定朝鲜淫羊藿中金丝桃苷含量[J]. 中国中药杂志, 1995, 20(6): 357-358.
- [10] 陈翠萍,沙明,杨松松,等. 朝鲜淫羊藿中木兰碱的定量研究[J]. 中国中药杂志, 1996, 21(11): 681-682.
- [11] 沙明,曹爱民,杨松松,等. 高效液相色谱法测定朝鲜淫羊藿中绿原酸的含量[J]. 中国中药杂志, 1996, 21(2): 108-109.
- [12] 沙明,曹爱民,王冰,等. 高效液相色谱法测定地榆中金丝桃苷的含量[J]. 色谱, 1998, 16(3): 226-228.
- [13] 沙明,曹爱民,王冰,等. 高效液相色谱法测定地榆中没食子酸的含量[J]. 中国中药杂志, 1999, 24(2): 99-100.
- [14] 沙明,曹爱民,孟宪生,等. 高效液相色谱法在中药规范化研究中的应用[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2000.
- [15] 罗国安,王义明,饶毅,等. 中药注射剂指纹图谱建立实践分析[J]. 中国药品标准, 2000, 1(4): 36-39.