

中药指纹图谱的研究与应用

葛万霞¹, 张艳秋², 董根玲³

(1. 天津大冢制药有限公司, 天津 300193; 2. 海南省药物研究所, 海南 海口 570314;

3. 天津中天制药有限公司, 天津 300110)

中药的有效性通过长期的临床实践被越来越多的人认同, 得到了国际国内社会的重视, 中药走向国际市场将成为必然。但由于中西文化的差异, 传统的中药制剂难以让国外的患者所接受, 要打入国际市场必须走中药现代化之路, 一方面要改革剂型使其现代化, 另一方面要有可控的质量标准, 就是从药材到成品制剂整个过程的质量特性进行整体相关性、有效性的控制, 建立中药指纹图谱的目的正是要反映这一理念。中药指纹图谱技术作为控制中药质量的一种手段, 经过大量研究与实际应用逐渐得到认可。

中药指纹图谱是指中药经适当处理后, 采用现代科学分析手段, 得到的能够标示该中药化学特性的共有图形(图像)的图谱。研究建立药品的指纹图谱就等于给药品贴上了质量条形码。其意义在于, 指纹图谱在中药质量评价中有着重要的作用, 第一, 观察色谱指纹图谱的整体特征可以鉴别中药材的真伪; 第二, 指纹图谱可以区分植物药材的不同部位; 第三, 指纹图谱可以考察商品药材及成品制剂的质量; 第四, 从标准药材色谱指纹图谱可以追踪制剂中某些化学成分的变化; 第五, 指纹图谱可以监测原料与成品之间, 成品的批间质量的稳定性。其必要性在于, 一方面中药的特性决定的, 中药的特点不是单一的化合物, 其成分复杂, 结构性质不清楚, 就是研究比较多的人参, 其化学成分也尚未研究透彻, 因此, 单纯以某一成分的量作为指标不能完全反映药物的整体状况。另一方面, 药品要求安全、有效、质量可控, 中成药质量可控性差, 有原料的原因, 也有工艺的原因, 质量不稳定直接影响药品的安全性。只有全面控制质量, 才能保证质量可控, 因此, 指纹图谱就应运而生了, 它可以比较全面反映出所含成分的多少及量的比例关系, 每个产品的指纹图谱是唯一的, 犹如人的指纹。以指纹图谱鉴别植物药在欧洲各国早已实行, 这是中药走向世界的需要。

1 国外植物药指纹图谱的应用

在美国FDA1996年8月16日制定的《FDA有关植物制品的指南(试行)》对植物食物补充品和植物药进行了规范和法制化, 对植物药品的临床研究申请中的化学、生产和控制部分的植物原料、植物药中间品和植物药产品均要求提供指纹图谱, 尤其是色谱指纹图谱; WHO在1996年草药评价指导原则中也有规定, 在植物药制备及成品章节中均提到如果草药的活性成分不明, 可以提供色谱指纹图谱证明产品质量的一致; 欧共体对草药质量的指南中也称, 单靠某个有效

成分考察质量的稳定性是不够的, 因为草药及其制剂是以其整体为活性物质。欧共体药品注册申请表中植物药制品的“药物专家报告”要求通过已知的具有治疗作用的活性物质对原料中间体及成品进行标准化控制。国外关于植物药色谱指纹图谱的研究论文也日渐增多, 提出色谱指纹图谱鉴别, 目的是解决成分复杂、有效成分不明的草药如何监测和证明其质量的稳定性。国外生产厂家工艺要求比较严格, 所以他们研究的色谱指纹图谱主要是针对原料药材的质量, 他们也发现, 不同产地、不同采收季节的同一品种的草药所含成分都有可能不同, 也知道稳定原料质量不是一件易事, 所以要求厂家必须固定产地、固定采收季节和固定加工方法。此外, 他们的另一种做法就是标准化提取物, 不同批次的提取物进行“勾兑”, 使最终产品质量基本一致在一个水平上(5%~10%)。德国的银杏提取物是一个很突出的例子, 其固体剂型产品色谱指纹图谱的重现性非常好, 质量分数相当稳定(±5%); 还比如加拿大对人参的质量控制, 都是通过对原料、标准提取物色谱指纹图谱的分析并控制投料, 能确保最终产品的量稳定在一定的范围内, 以保证产品的稳定性、安全性及治疗作用。

2 我国中药指纹图谱研究进展

我国走中药现代化就必须按现代中药制剂规范的要求进行生产, 中药注射剂首当其冲, 为此, 国家食品药品监督管理局专门为注射剂的质量控制做了规定, 要求2004年底, 所有中药注射剂都要有指纹图谱进行质量控制, 并对中药注射剂的质量标准进行完善, 达到国家标准, 这是国家为保证人民用药安全、有效、质量可控所采取的措施。

用色谱指纹图谱来评价中药产品质量的1个优点在于它常常不需要知道指纹图谱中各化学组分是什么化学成分, 只要比较被测物与参照物的指纹图模式, 如峰的数目、位置和相对强度就足以确认了。因此, 中药的指纹图谱不仅能表达药材及产品的质量, 更可以达到控制药材采收季节、成品制造工艺的目的, 即可以从指纹图谱追根溯源, 寻找工艺中的问题及对原药材GAP的质量要求。国家药品监督管理局《关于加强中药注册管理有关事宜的通知》(国药管注[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。随即印发了《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》把建立药材和制剂指纹图的标准提到议事日程, 并强调药材产地对影响药物制剂质量的重要性。

目前中药注射剂指纹图谱研究已在我国全面铺开,并对现有中药注射剂品种实行研究招标,大部分研究成果通过专家审核已开始实施,意味着我国中药走向现代化迈出了积极的一步。其他剂型中药指纹图谱的研究也在逐步展开。

3 正确认识中药指纹图谱的应用

作为中药材的常规鉴别的延伸,色谱指纹图谱质量控制模式逐步受到重视,但同时也引起热烈的争论,色谱指纹图谱的基本属性是完整性和模糊性。作为一种综合的、量化的鉴别模式,中药产品的真实性和质量的一致性以及稳定性均可有效地加以检测和控制。显然,不论何种色谱方式,对指纹图谱的要求最主要是专属性、重现性和可应用性。这就要求要认真实施药材种植的 GAP、产品生产过程的 GMP 以及实验室药品安全评价的 GLP,才能保证色谱指纹图谱评价中药内在质量的真实性和质量的一致性。从方法学而言,色谱指纹图谱的建立、辨认、分析、判断应进行方法学验证。此外,研究指纹图谱的难度不容低估。指纹图谱与药效学和临床结合才是更有意义的评价药品质量的手段。

大量事实证明,在相同的色谱条件下,不同品种的中药所得的色谱是不同的,即使品种相同,如产地不同,也会表现出显著差异。虽然色谱图中各色谱峰的保证值常会受各种因素的影响而产生变化,包括一系列操作因素,甚至色谱柱本身在实验过程的变化,以及生物样品的多样性,个体差异会出现色谱的不同或不同品种产生相同的色谱峰,这些情况会给指纹图谱分析带来很大困难,但并不能说它不能为国内学者对多种中药材指纹图谱进行成功的分析,如 19 种柴胡属植物挥发油的气相色谱指纹分析、地榆属几种植物的 HPLC-FPS 比较研究,中国红参与高丽参的指纹图谱比较研究等。通过重叠率,这一量化的定性参数,反映待鉴定药材与标准药材在相同萃取条件下所含组分方面的相似程度; n 强峰,列出了峰面积值居前的几个色谱峰, n 值由总峰数的多少而定,使比较鉴定更具量化的概念。

中成药质量标准中的色谱指纹图谱研究存在一定难度。由于中成药是经一系列提取、制剂等工艺后所形成的药品,它已完全彻底改变了中药材或中药饮片的原形态,若以传统的方法进行中成药鉴定显然不可能。而对中成药所含药味做正确无误的鉴定的要求已提到议事日程,对欲打入国际市场中成药产品控制质量有重要意义。目前对中成药指纹图谱研究有成功的先例,例如麝香保心丸的质量研究就利用气相色谱指纹图谱鉴定了冰片、麝香、苏合香和桂皮;利用高压液相色谱指纹图谱鉴定了蟾酥;同时还实现了麝香酮、龙脑、异龙脑等 10 个成分的定量测定。可见中药指纹图谱将对中药质量

标准现代化起到推动作用。

4 药材指纹图谱研究注意的问题

首先应注重品种情况,对资源、产销、所含化学成分及其量的现状进行调查;二是样品收集,要实地考察、收集样品并做相应的标本收集记录,按不同地域、季节分别取样;三是药材质量标准的提高,进行有效成分的提取分离,对照品的鉴定;四是药材与成品同类成分的指纹图谱研究,采用 HPLC、TLCS 等方法,同时要考察方法的可行性;五是确定最终使用的药材(包括产地、部位等)。

5 注射剂(制剂)与中间产品的指纹图谱基本研究步骤

首先生产工艺的实验室重复、小样制造及对不合理处的再研究,提供 3 批实验数据参数等。其次按成品 10 批、中间体 10 批进行指纹图谱摸底测定,按指纹图谱的研究指南进行,考查研究条件、方法的可行性等。其中 10 批样品用原料应是分别独立的 10 批药材,对 10 批样品中间体进行图谱相关性测试。然后进行稳定性考察,从实验开始留样,考察 0、1、2、3、6、9 个月与 18 个月的图谱稳定性,如有变化,调整图谱判定标准。

指纹图谱研究应参照《中药注射剂指纹图谱研究的技术指南(试行)》进行,最好以指纹图谱相似度软件判定,减少工作量及人为误差。

指纹图谱的研究还应注意以下几方面关键技术:(1)检测方法(提取方法、分析用试剂、仪器参数选定等);(2)以相关参数建立指纹图谱,标定共有指纹峰,选择参照峰;(3)确定指纹图谱检测标准。

指纹图谱研究的基本技术路线:药材鉴定,确定名称、来源→选取参照物→制备供试物,样本图谱测定→列出检测数据,各项技术参数分析→建立特征指纹图谱→提供标准指纹图谱检测标准。

6 结语

中药指纹图谱的倡导者,中药界的老前辈谢培山教授认为:中药指纹图谱是综合可量化的鉴别手段,是《中国药典》对中药实施对照药材,以完整的色谱图像进行鉴别的合乎逻辑的发展,是当前符合中药特色的评价中药真实性、稳定性和一致性的可行性模式。它配合有效成分测定和有针对性的检查,可以从深层次监测中药产品的质量。

中药指纹图谱是一项新技术,用于中药研究还有许多待解决的问题,特别是怎样从学术成果转化为产业界可操作的、在实际可应用的技术。因此只有不断总结经验,结合科研、生产实际不断完善,才能建立起符合中国特色的中药指纹图谱技术体系,为我国的中药打入国际市场奠定良好的基础。

保 护 植 被 造 福 人 类