

谱效结合在中药提取纯化工艺研究中的应用

李雪静^{1,2}, 范成龙¹, 宋洪涛² (1. 福建中医药大学药学院, 福建 福州 350108; 2. 南京军区福州总医院药学科, 福建 福州 350025)

[摘要] 如何实现对中药安全性及有效性的合理评价是目前中药质量评价体系面临的主要难题。中药质量的优劣直接影响其临床疗效, 缺乏客观、科学的质量评价标准已成为制约中药现代化的一大瓶颈。中药的制备工艺对中药的质量具有很大影响, 提取纯化是其中的重要环节。本文简要介绍了谱效结合技术在优化中药提纯工艺中的应用进展, 以及在中药制剂质量控制中的作用。

[关键词] 中药; 提取纯化; 谱效结合; 质量控制

[中图分类号] R284 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2012)05-0340-04

[DOI] 10.3969/j.issn.1006-0111.2012.05.006

Application of fingerprint-efficacy in studies of extraction and purification method of traditional Chinese medicine

LI Xue-jing^{1,2}, FAN Cheng-long¹, SONG Hong-tao² (1. School of Pharmacy, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350108, China; 2. Department of Pharmacy, Fuzhou General Hospital of Nanjing Military Region, Fuzhou 350025, China)

[Abstract] To build a effective method to evaluate the safety and efficacy of TCM was a main problem in TCM quality control system. The TCM quality affected the clinical curative effect directly, which was the bottle neck of the TCM modernization according to the deficiency of an objective and scientific quality control standard. The preparation method would affect the quality of TCM and the key link was extraction and purification. The application of fingerprint-efficacy in optimizing the extraction and purification method of TCM and its effect on quality control of TCM were reviewed in this paper.

[Key words] TCM; extraction and purification; fingerprint-efficacy; quality control

提高中药质量, 改变中药“大、黑、粗”的状态, 让中医中药进入国际市场, 对中药的制备加工工艺提出了更高的要求, 中药有效成分的提取分离是其中的重要环节, 有效成分的含量测定项目已成为评价提取中不可缺少的内容, 这关系到中药提取物在临床中的应用疗效。为了建立中药制备工艺的优选评价体系, 对制备工艺进行全程把关, 对品质进行精确评价, 越来越多的高新技术应用于中药提取分离过程中, 谱效结合技术便是其中之一。

1 谱效结合技术的建立与发展

1.1 谱效结合技术的建立 “中药谱效学”是一个近几年才提出的概念, 是指将标示活性成分群特征峰的中药指纹图谱与药效结果对应起来, 将中药指纹图谱中化学成分的变化与中药药效结果联系起来, 从而建立中药谱效关系, 反映中药的内

在质量^[1]。

中药和西药不同, 它的特点是作用的整体性。指纹图谱反映的是中药的化学信息, 所检测的特征指纹有可能并不包含中药中的有效成分, 因此不能直接体现中药药理活性信息, 也不能直观地反映中药具有的疗效。于是相关学者提出开展药效与指纹图谱相关性研究, 即中药谱效关系研究^[2]。中药谱效关系研究弥补了以化学指纹图谱控制中药质量与药效脱钩的不足, 可为中药质量控制提供更为科学有效的数据。

1.2 谱效结合技术在中药研究中的应用 谱效结合技术目前在单味中药、复方中药、中药制剂以及药动学的研究中应用较多。实验研究较早的是宁黎丽等^[3]对吴茱萸汤药效物质基础的方法学研究, 该研究通过对吴茱萸汤进行组方药量变化, 在原方基础上按正交试验法组成 9 个不同配比的处方, 同时对其进行 HPLC 分析和镇痛与止呕两个指标的药理实验, 对所得化学信息和药理数据进行逐步回归分析, 确定吴茱萸汤主要色谱峰成分对药效的归属。郭承军等^[4]应用 HPLC 指纹图谱方

[作者简介] 李雪静(1988-), 女, 硕士研究生。Tel: (0591) 22859972, E-mail: lixuejingcool@126.com。

[通讯作者] 宋洪涛。Tel: (0591) 22859459, E-mail: sohoto@vip.sohu.com。

法分析给药后模型小鼠血清药物成分,研究金银花抗流感作用的物质基础及谱效关系,发现绿原酸是金银花抗流感作用的主要有效成分之一,另外尚有 3~4 个重要成分参与这一药理过程。

在复方中药方面,李鹏等^[5]分析桃红四物汤抑制小鼠痛经有效部位的谱效关系,以阐明相关的物质基础,采用己烯雌酚结合缩宫素致小鼠痛经模型,对桃红四物汤及其单味药石油醚部位进行筛选,并结合 GC-MS 法对其分析,运用数理统计方法将药理数据与气相色谱峰相对面积相关联。结果表明 23 号峰即亚油酸在延长扭体潜伏期和减少扭体次数方面起主要作用,其次 24 号峰(十八碳烯酸) 45 号峰(花生酸)和 61 号峰(二十七烷)对镇痛效果有一定的协同作用。证明用谱效结合的方法,可以较客观的分析评价化学物质与效应之间的关系。

在中药制剂方面,卢红梅等^[6]对鱼腥草注射液质量控制中的谱效学进行初步探讨,以抗炎效果为例,为中药的指纹图谱建立提供新的思路。林立等^[7]研究泻白散 HPLC 谱效关系,将泻白散方中各药进行正交组合,测定 HPLC 图谱及评价祛痰、抗炎作用,并对 HPLC 图谱进行峰归属分析,运用数理统计方法将药理数据和 HPLC 图谱中各色谱峰面积相关联,研究谱效相关性。结果证明桑白皮中有 2 个峰显示与祛痰作用和抗炎作用呈正相关,初步推断为二苯乙烯苷类成分。

在药动学方面,贺福元等^[8]提出了中药多成分体系药动学研究的新方法——总量统计矩法,即满足在中医宏观要求(宏观量化可算)的同时又满足现代科学微观可测(可按目前单个成分药动学方法进行研究)的要求。

2 谱效结合技术在中药提取纯化中的应用

2.1 中药提取纯化工艺的评价标准

中药、天然药物的提取应尽可能的提取出有效成分,或根据某一成分或某类成分的性质提取目的物。不同的提取纯化方法均有其特点和适用范围,应根据与治疗作用相关的有效成分(或有效部位)的理化性质,或药效研究结果,通过实验对比,选择适宜的方法。复方提取纯化的评价指标应考虑其多成分作用的特点,既要重视传统用药经验、组方理论,充分考虑药物作用的物质基础不清楚的现状,又要尽量改善制剂状况,以满足临床用药要求。在评价指标的选择上,应结合药物品种的具体情况,探讨能够对其安全、有效、质量可控作出合理判断的综合评价指标,必要时可采用生物学指标等。在提取纯化研究过程中,有可能引起安全性隐患

的成分应纳入评价指标。

目前中药制剂工艺逐渐形成了浸出物、指标成分、大类成分、生物学方法、工程及经济指标等评价指标^[9]。这些指标各有其优势及局限性,浸出物可直接影响固体制剂的服用量与剂型选择,影响液体制剂的澄明度与稳定性,但未必真实的代表部分药材及复方的药效物质基础;指标成分技术含量高,更加精细,在一定程度上表明工艺研究的现代水平,是现有常用的评价指标,但并非所有药材都具备使用指标成分的基础,能找到与疗效密切相关的具备说服力的指标成分,即使具备这样的指标成分,但其未必真实反映中药复方多成分多靶点的特征;大类成分具有综合性,但不够精细,无法反映单一成分在工艺过程中的降解、转化;生物学方法以工艺产物的药理效应评价工艺,具备说服力,但生物学指标的敏感性不足,未必可以反映不同工艺的优劣^[10]。

对于这些问题,章臣桂提出了“抓住君臣、不放佐使;抓住有效物质,不放协同效应”的科研思路^[11]。总而言之,中药制剂工艺的评价经历了从无指标到有指标,评价指标从笼统、模糊到精细,又从精细回归综合的过程。

2.2 指纹图谱对中药提纯工艺评价

开展谱效相关性研究可以为中药制剂工艺优选建立较为完善的评价体系,可以选择多组分考察指标优选提取纯化工艺,并界定这些指标的权重因子大小。由于资源的限制,中药对照品的缺乏,对所有的药效成分均采取含量测定,效率低,成本高,不太现实。选择多个具有代表性成分进行含量测定,在一定程度上保证质量的有效性,中药复方指纹图谱在制备工艺应用已有初步研究,通过指纹图谱峰面积比较,可获悉不同成分在不同工艺中的成分积累程度的差异,实现成分的含量相对大小比较。

王冬梅等^[12]采用 HPLC-UV-MS 法测定了贯叶连翘及其提取物的指纹图谱,并对主要色谱峰进行定性定量分析,旨在对提取物制备工艺的有效性、稳定性以及抗氧化剂、药材采收部位对提取物质量的影响进行综合评价。结果证明将极性较大的金丝桃素类和黄酮类成分与极性较小的贯叶金丝桃素类成分分别进行提取,然后勾兑贯叶连翘提取物,这种提取工艺的稳定性良好,可有效地富集金丝桃素类和黄酮类化合物。

吴永江等^[13]研究 3 种不同的提纯工艺对参麦注射液质量的影响,用 HPLC 测定红参药材以及不同工艺提纯的红参中间体和参麦提取液的指纹图谱,并测定人参皂苷 Rg1、Re 总量和 Rb1 含量以及

参麦提取液中总皂苷含量。结果发现 3 个不同工艺的红参中间体和参麦提取液在指纹图谱和人参皂苷含量上都有显著的差异。用 HPLC 指纹图谱法可以快速准确地检测不同工艺对参麦提取液质量的影响。

陆臻等^[14]为改进丹参注射液的制备工艺,利用指纹图谱来考察工艺的稳定性。选择明胶醇沉法对丹参注射液的制备工艺进行改进,采用 HPLC 法对多批样品进行考察,建立指纹图谱来确认制备工艺的稳定性。结果证明明胶沉淀法制备工艺稳定可控。吴永江等^[13]研究 3 种不同的提纯工艺对参麦注射液质量的影响,结果发现 3 个不同工艺的红参中间体和参麦提取液在指纹图谱和人参皂苷含量上都有显著的差异。用 HPLC 指纹图谱法可以快速准确的检测不同工艺对参麦提取液质量的影响。

2.3 谱效结合评价方法的应用 对于作用机制复杂但相关基础研究薄弱的中药,药材在具体处方中发挥作用的有效成分和有效部位还不够明确,一些含量较低或现有检测手段未能反映的药效成分就很有可能在中药提纯的过程中被当做杂质去除。故中医药业内人士提出了全新的、处于学术前沿的中药现代化研究思路,即建立在中药指纹图谱研究基础上,但并不等同于中药指纹图谱,而是比指纹图谱更深入一层的谱效关系^[15]。

“谱效结合”评价方法的优势在于综合考虑了物质基础及其效应,将指纹图谱技术运用于工艺评价。将其作为评价指标,与大类成分相比更加精细,与单一成分相比更加全面。即使药效物质基础在我指纹图谱视野之外,药效学指标的复核也会避免工艺路线的差错。采用“谱效结合”的评价方法,有助于我们在尚未完全把握药材或复方药效物质基础的现有状况下,减少因药效物质基础及协同作用的“黑箱”因素所导致工艺研究现差错的概率^[16]。

王凤云等^[17]分别以 HPLC 指纹图谱的主成分保留率和急性肝损伤的药效模型为指标,评价绵茵陈提取液的大孔吸附树脂精制工艺的合理性。以 HPLC 指纹图谱的主峰保留率为指标,对绵茵陈提取液的精制工艺进行评价;建立 CCl_4 致小鼠急性肝损伤模型,测定血清中谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST),并观察肝组织病理学变化,进行小鼠灌胃给药的急性毒性实验,考察绵茵陈提取液精制前后口服给药的安全性。结果发现绵茵陈提取液精制前后的 HPLC 指纹图谱基本一致,绵茵陈提取液精制前后的保肝作用无显著差异,绵茵

陈提取液精制前后均未发现明显的急性毒性反应。以 HPLC 指纹图谱和药效学实验相结合的评价方法,证实了绵茵陈提取液大孔吸附树脂精制工艺的合理性。

张军等^[18]对护心复方药液大孔吸附树脂精制工艺进行评价。以过柱前后复方的 HPLC 图谱特征峰所代表的化学成分保留率及抗心肌缺血活性相结合的方法对复方药液精制工艺进行评价。结果发现护心复方药液过柱后 HPLC 图谱中特征峰相对保留率达到 90% 以上,上柱原液与醇洗液 HPLC 图谱基本一致,大鼠灌胃给予上柱原液、水洗液、醇洗液,上柱原液及醇洗液均可明显改善急性心肌缺血症状,而水洗液药效作用微弱,其活性为:醇洗液 > 上柱原液 > 水洗液。该过柱工艺在显著降低得膏率的同时,保留了复方药液 HPLC 图谱特征峰所代表的化学成分及其抗心肌缺血活性。

3 结语

中药谱效关系学的研究虽已提出多年,但是还没有形成成熟稳定的研究思路和方法,现有的研究内容也存在一些值得商榷的问题。在谱效相关性研究过程中,如何确立化学指纹图谱和生物指纹图谱中的特征峰信息,如何将指纹图谱所获取的化学成分特征信息与生物效应相关信息进行关联,采取什么数学模型和方法进行化学特征与生物学特征信息关联等等这些都是中药指纹图谱谱效相关性研究的关键问题。

而且,中药在提纯过程中溶媒、环境等因素都会对成分产生影响,而在药效研究方面,很多西化的药理模型不能全面的反映中药的临床功效。将指纹图谱技术与药效学结合,分析指纹图谱主要色谱峰所对应成分,再经组合配比和主要药效学验证,确定谱效相关性,优化中药提纯工艺,将成为解决中药质量控制这个制约中药现代化发展问题的主要途径之一。

【参考文献】

- [1] 李戎,闫智勇,李文军,等. 创建中药谱效关系学[J]. 中医教育 2002, 21(2): 62.
- [2] 戚进,余伯阳. 中药质量评价新模式——“谱效整合指纹图谱”研究进展[J]. 中国天然药物 2010, 8(3): 171.
- [3] 宁黎丽,毕开顺,王瑞,等. 吴茱萸汤药效物质基础的方法学研究[J]. 药学报 2000, 35(2): 131.
- [4] 郭承军,石俊英. 金银花抗小鼠流感作用的谱效关系研究[J]. 中药药理与临床 2009, 25(4): 50.
- [5] 李鹏,李祥,陈建伟,等. 桃红四物汤干预痛经模型小鼠有效部位的谱效关系研究[J]. 中国实验方剂学杂志 2006, 13(11): 52.

- [6] 卢红梅,梁逸曾,钱频.鱼腥草注射液质量控制中的谱效学初步探讨[J].药学报,2005,40(12):1147.
- [7] 林立,刘晓秋.泻白散 HPLC 谱效关系初探[J].中国现代中药,2009,11(8):35.
- [8] 贺福元,罗英杰,邓凯文,等.中药(复方)药动学研究现状及研究方法探讨[J].中草药,2005,36(10):1582.
- [9] 张军.隔山香药效物质基础及其复方大孔吸附树脂精制工艺“谱效结合”的评价研究[D].广州中医药大学,2008:2.
- [10] 谢秀琼.对中药制剂工艺研究评价指标的浅见[J].中药新药与临床药理,1999,10(4):197.
- [11] 李静.浅谈中药制剂专家章臣桂的科研思路[J].天津药学,2000,12(2):87.
- [12] 王冬梅,刘朝荣,杨得坡.指纹图谱技术对贯叶连翘提取物制备工艺过程的评价[J].中国中药杂志,2006,31(10):800.
- [13] 吴永江,崔勤敏,程翼宇.制备工艺对参麦注射液质量的影响[J].中国中药杂志,2005,30(9):662.
- [14] 陆臻,汝芸.丹参注射液制备工艺的改进及其指纹图谱[J].中国医院药学杂志,2007,27(6):769.
- [15] 李戎,阎智勇,徐涛,等.“谱效关系”研究是中药质量与药效标准规范的关键环节[J].医药简讯,2002,10:18.
- [16] 张军,李文周,王凤云,等.中药大孔吸附树脂精制工艺“谱效结合”评价方法研究[C].2009.
- [17] 王凤云,陈玉兴,周瑞玲,等.谱效结合方法对绵茵陈大孔吸附树脂精制工艺的评价[J].中药新药与临床药理,2009,20(2):166.
- [18] 张军,卫昱,李文周,等.护心复方药液大孔吸附树脂精制工艺的评价研究[J].中国新药杂志,2009,18(12):1159.
- [收稿日期]2011-12-01
[修回日期]2012-01-09

(上接第 330 页)

- [10] Fan TY, Wei SL, Yan WW, et al. An investigation of pulsatile release tablets with ethylcellulose and Eudragit as film coating materials and cross-linked polyvinylpyrrolidone in the core tablets [J]. J Control Release, 2001, 77(3):245.
- [11] Gao C, Huang J, Jiao Y, et al. In vitro release and in vivo absorption in beagle dogs of meloxicam from Eudragit FS 30 D-coated pellets [J]. Int J Pharm, 2006, 322(1-2):104.
- [12] 许建辰.微囊化技术用于脉冲给药系统的研究[D].天津大学,2005.
- [13] He W, Du Q, Cao DY, et al. Study on colon-specific pectin/ethylcellulose film-coated 5-fluorouracil pellets in rats [J]. Int J Pharm, 2008, 348(1-2):35.
- [14] 侯世祥,杜守颖,夏新华,等.现代中药制剂设计理论与实践[M].北京:人民卫生出版社,2010.620.
- [15] Efentakis M, Koligliati S, Vlachou M. Design and evaluation of a dry coated drug delivery system with an impermeable cup, swellable top layer and pulsatile release [J]. Int J Pharm, 2006, 311(1-2):147.
- [16] 谢燕,马越鸣,李国文.口服脉冲控制释药系统的释药机制及其应用[J].中国医药工业杂志,2011,42(1):60.
- [17] 施祥杰,周建平.胃内滞留释药系统的研究新进展[J].药学进展,2010,34(2):55.
- [18] Miyazaki Y, Ogihara K, Yakou S, et al. In vitro and in vivo evaluation of mucoadhesive microspheres consisting of dextran derivatives and cellulose acetate butyrate [J]. Int J Pharm, 2003, 258(1-2):21.
- [19] 邹豪,孔令山,谢明萱.漂浮型脉冲释放胶囊的人体内 γ -闪烁扫描示踪研究[J].中国医药工业杂志,2004,35(12):724.
- [20] 唐宇,罗杰英,王文革.胃内膨胀型制剂的研究进展[J].中国新药杂志,2009,18(14):1304.
- [21] Park K, Chen J, Park H. Hydrogel composites and superporous hydrogel composites having fast swelling, high mechanical strength, and superabsorbent properties [P]. US, 6271278, 2001-08-07.
- [22] 郭涛,周俭平,隋因,等.硫酸沙丁胺醇脉冲片的制备及体外释放度研究[J].中国药理学杂志,2000,35(6):388.
- [23] 杨正管,朱家壁,刘锡钧.茶碱脉冲式控释片的研制[J].中国医院药学杂志,1998,18(11):483.
- [24] 匡玉霞,刘生友.心血管疾病的昼夜节律与时辰给药[J].中国药师,2010,13(10):1514.
- [25] 孙学惠,郭涛,宋洪涛,等.单硝酸异山梨酯定时脉冲控释片的研究[J].解放军药学报,2005,21(4):258.
- [26] 吴芳,张志荣,何伟玲,等.磷酸川芎嗪脉冲塞胶囊的制备与体外释放[J].药学报,2002,37(9):733.
- [27] 陈燕忠,岗艳云,金志忠,等.法莫替丁脉冲控释胶囊剂的研究[J].中国药科大学学报,1997,28(3):150.
- [28] 曹赛宏.浅谈糖皮质激素的合理应用[J].安庆医学,2005,26(1):6.
- [29] 郭涛,郑春丽,宋洪涛,等.双氯芬酸钠脉冲控释微丸的研究[J].药学报,2003,38(9):707.
- [30] 郑春丽,郭涛,宋洪涛,等.双氯芬酸钠脉冲控释微丸的制备与体外释放影响因素的研究[J].中国药理学杂志,2003,38(2):111.
- [31] 安娜.栓塞控制型盐酸维拉帕米双脉冲胶囊的研制[D].河北医科大学,2010.
- [32] 胡文静,张良珂,刘静.含果胶盖塞型脉冲胶囊的制备及体外释放研究[J].中国药理学杂志,2009,44(9):685.
- [33] 刘伟芬,张会丽.硝苯地平脉冲释放微丸的试制[J].中国中医药现代远程教育,2010,8(14):201.
- [34] 梁雪丹,郑颖,范田园.丹参酮 II A 脉冲微丸的制备与体外质量评价[J].北京大学学报,2010,42(5):559.
- [35] 屈勇,张怡,林宁.丹参口服脉冲控释片的制备及体外释药研究[J].湖北中医学院学报,2010,12(6):24.
- [36] 逢凤娟,邹梅娟,刘国良,等.盐酸伪麻黄碱脉冲小片包衣液处方优化[J].沈阳药科大学学报,2009,26(3):170.
- [收稿日期]2012-02-01
[修回日期]2012-03-01