

复方中药质量标志物的发现与量效色卡可视化技术

孟宪生^{1,2,3*}, 包永睿^{1,2,3}, 王 帅^{1,2,3}, 李天娇^{1,2,3}, 罗国安⁴

(1. 辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600; 2. 辽宁省组分中药工程技术研究中心, 辽宁 大连 116600;
3. 辽宁省现代中药研究工程实验室, 辽宁 大连 116600; 4. 清华大学化学系, 北京 100084)

摘要: 针对复方中药化学成分复杂、治疗病症宽泛、质量控制指标不能准确反映其功能属性的现状, 笔者以气滞胃痛颗粒复方的质量标志物研究过程为例, 创新研究思路与技术方法, 构建了“基于功能, 明确主治”、“组效相关, 多组多效”、“组分解析, 系统整合”、“谱效相关, 见谱见效”、“量效色卡, 质量可视”逐层递进的五步复方中药质量控制与评价新模式。建立了基于多重功效的组效对应、多组多效药理药效综合评价体系, 完善发展了全时段等基线多波长覆盖融合指纹图谱技术, 首次研制开发“谱-效色卡”软件, 实现中药药效的“可视化”。旨在为复方中药整体性质量控制提供探索性解决方案。

关键词: 中药复方; 质量标志物; 谱效关系; 量效色卡

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2019)02-0222-06

Discovery of quality markers of traditional Chinese medicine compounds and visualization technology of content-effect colour atlas

MENG Xian-sheng^{1,2,3*}, BAO Yong-rui^{1,2,3}, WANG Shuai^{1,2,3}, LI Tian-jiao^{1,2,3}, LUO Guo-an⁴

(1. School of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China; 2. Province Multi-Component Chinese Medicine Engineering Technology Research Center of Liaoning, Dalian 116600, China;
3. Modern Traditional Chinese Medicine Research and Engineering Laboratory of Liaoning, Dalian 116600, China;
4. Department of Chemistry, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: The chemical composition of traditional Chinese medicine (TCM) compounds is complex, the treatment is broad, and the quality control indexes cannot accurately reflect the functional properties. According to the above problems, the authors take the research process of quality markers of Qizhiweitong granules as an example to innovate the research ideas and technical methods, and constructed five progressive steps of TCM compounds quality control and evaluation model: "based on function, to figure out the attending", "components and pharmacodynamics correlation, multiple components with multiple effects", "to analyze the components, and systematically integrate them", "spectrum and effect correlation, from a spectrum to see the efficiency", and "from the content-effect colour atlas to see the quality". Based on the multiple effects of components, multiple components of multi-effect pharmacological efficacy evaluation system were established. All-time isobaric multiwavelength fusion fingerprint technology was improved and developed. "Spectrum-effect colour atlas" software was research and developed for the first time, to realize the "visualization" of TCM efficacy. The aim of this work is to provide an exploratory solution for the integrated quality control of TCM compounds.

Key words: traditional Chinese medicine compound; quality marker; spectrum-effect relationship; content-effect colour atlas

收稿日期: 2018-08-24; 修回日期: 2018-10-22.

基金项目: 辽宁省特聘教授项目 (辽教发 [2014]187 号); 辽宁省中医药现代化研究创新团队项目 (LT2017015).

*通讯作者: Tel: 86-411-85890185, E-mail: mxsvvv@126.com

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0775

我国传统中医药在复方中药的使用上有着悠久的历史,遵循着“君、臣、佐、使”配伍规律的复方中药一直被认为是中医药的精髓所在。20世纪初,以单一成分化药治疗为主的国外市场,也开始意识到化合物“联用”的强大作用,逐渐出现复方制剂的研发与应用。目前进入国家医保目录的中成药有1 200多种,多由复方中药组成。在国内近百万家医疗机构、药房等地广泛应用,在保障人民生命健康方面发挥着重要作用。因此,保障中药复方制剂质量均一、稳定,确保中药复方制剂应用安全、有效尤为重要。完善中药质量控制标准,一直被认为是制约我国传统中医药现代化发展的重点、难点问题,从而受到国家、社会层面的广泛关注。

中药质量评价方法是中药/复方中药质量控制的关键,也是保证中药药效的必须手段^[1-3]。目前国内、外中药质量评价的主流方法包括:一是在化学成分和活性研究的基础上,建立中药/复方中药中某一或几个有效成分的定性、定量分析方法,进而控制中药质量,该方法已成为我国药品标准中的中药/复方中药质量控制的主要方法之一。二是考虑到中药/复方中药的多成分和整体作用,应用指纹图谱技术,控制中药/复方中药直接提取物中尽量多的成分^[4]。但随着科学研究的逐渐深入,来源现代化学药物理念的质控技术中存在的单一或几个化学成分的定量检测难以全面评价中药/复方中药质量优劣的问题,及来源中药化学成分的指纹图谱技术中存在的化学指纹图谱难以有效评价中药/复方中药药效等问题^[5]逐渐显露出来。建立符合中药多成分、多靶点作用特点、直接反映中药特征药效的中药质量评价研究方法成为目前研究的新热点。

2016年国务院发布《关于促进医药产业健康发展的指导意见》中重点提出“完善质量标准体系,健全以《中国药典》为核心的国家药品标准体系”的要求^[6,7]。同年5月,刘昌孝院士在现有质量评价与控制方法及存在问题的基础上,提出“质量标志物(Q-marker)”的概念。即中药Q-marker是存在于中药材和中药产品中固有的或加工制备过程中形成的、与中药的功能属性密切相关的化学物质,作为反映中药安全性和有效性的标示性物质进行质量控制。这一概念强调了中药质量控制应遵循的本质,即真正控制有效成分的含量。然而,由于中药/复方中药所含化学成分本身的复杂性,如何全面、合理地找到并控制有效成分含量成为众多科研工作者关注的焦点。

笔者结合课题组对中药质量评价方法多年研究积累,在目前“谱效关系”研究基础上,结合等基线多波长覆盖融合技术,自主研发开发“谱-效色卡”工作站,实

现复杂中药复方质量可视化(图1)。针对典型复方中药大品种-气滞胃痛颗粒,从药材→有效组分→有效成分,逐层深入发现其疏肝理气、和胃止痛的质量标志物(图2)。本文以气滞胃痛颗粒的质量标志物研究过程为例,总结研究经验,探索研究思路,旨在为复方中药质量控制方法的完善与发展提供参考。

1 “基于功能,明确主治”中药复方治疗病症的精准分析

中药复方成分复杂,功效多样,治疗病症相对宽泛,对于其安全性、有效性的合理评价,是复方中药质量标志物研究的关键问题所在。众所周知,由于中医药的特殊性,能够完全、真实反映中医功效,而用于实验研究的药理模型近些年来虽有所发展,但除气虚血瘀等证候模型外,仍不太成熟,大部分病症很难找到恰当的模式用于研究,限制了中药复方质量标志物的全面、合理评价。

气滞胃痛颗粒是在古方“四逆散”的基础上,加入香附和延胡索两味药材。其功效是舒肝理气、和胃止痛,用于肝郁气滞、胸痞胀满、胃脘疼痛。气滞胃痛颗粒经多年实践,现已成为临床治疗胃脘痛一线用药。在临床上单独使用或联合应用,对功能性消化不良、慢性胃炎、肠易激综合征、胃食管反流病、消化性溃疡和糖尿病胃轻瘫等方面均表现出较好的治疗效果。故课题组成员对气滞胃痛颗粒质量标志物发现的药效学研究,是在中医药理论指导下,从该复方整体治疗胃脘疼痛研究出发,结合临床实际,将其准确“翻译”成西医的促胃肠动力、抗炎镇痛、抗溃疡三大药效,采用西医的药理模型进行评价,实现气滞胃痛颗粒复方治疗病症的精准分析。

2 “组效相关,多组多效”中药复方药效组分和病症相关性分析

气滞胃痛颗粒具有促胃肠动力、抗炎镇痛、抗溃疡三大药理作用,课题组在提取并纯化处方中各药味所含组分基础上,针对以往单个药效研究中所忽略的中药复杂相互关系,依据均匀设计、优化拉丁方设计和正交设计等系列设计原理,建立促胃肠动力、抗炎镇痛、抗溃疡有效组分与各药效指标之间的相关性,分析得出发挥各药效的指标性成分和不同药效组分之间的协同、拮抗、增益作用^[8-10],构建基于促胃肠动力、抗炎镇痛、抗溃疡的组效对应、多组多效药理药效综合评价体系。

采用体外细胞实验与体内动物实验相结合的方式,相互验证,建立了多功效多组分配伍研发模式,即基于单一药效的单个组分筛选,基于单一药效的协同组分筛选,基于单一药效的协同组分配比,基于多重药

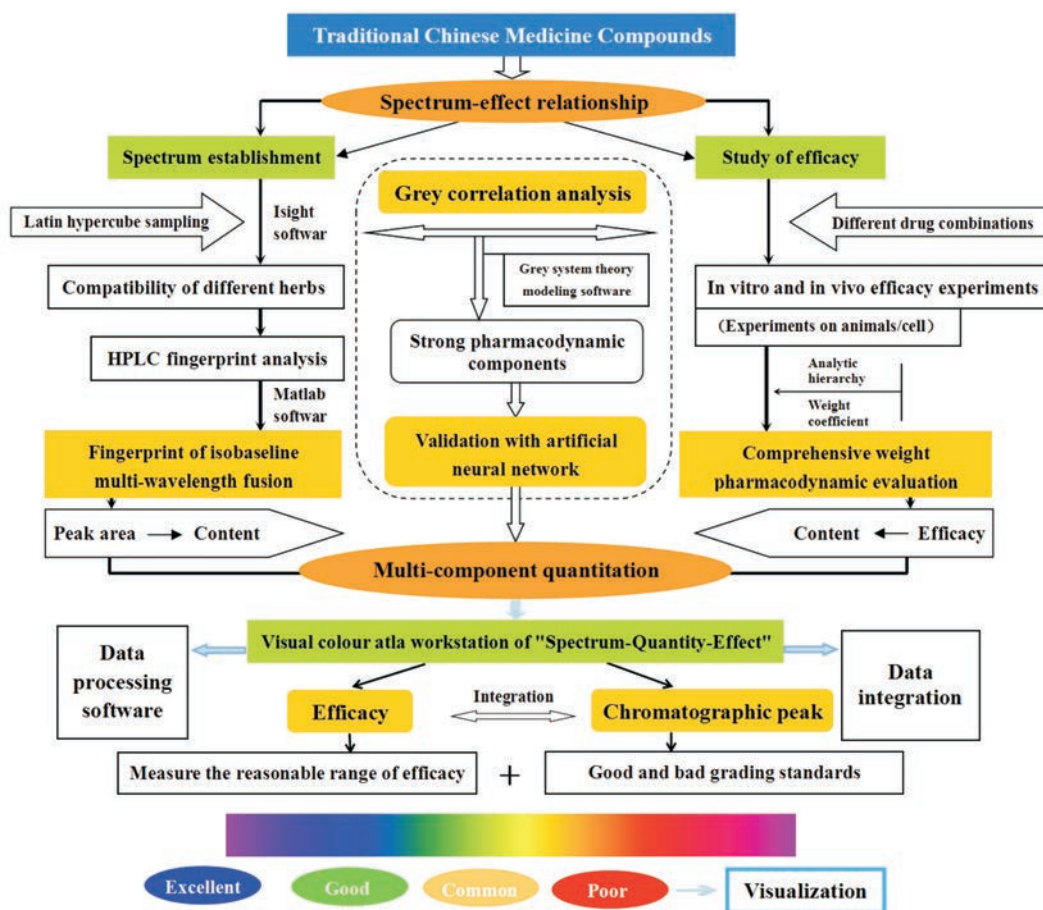


Figure 1 Screening chart of quality marker components/ingredients of TCM compounds

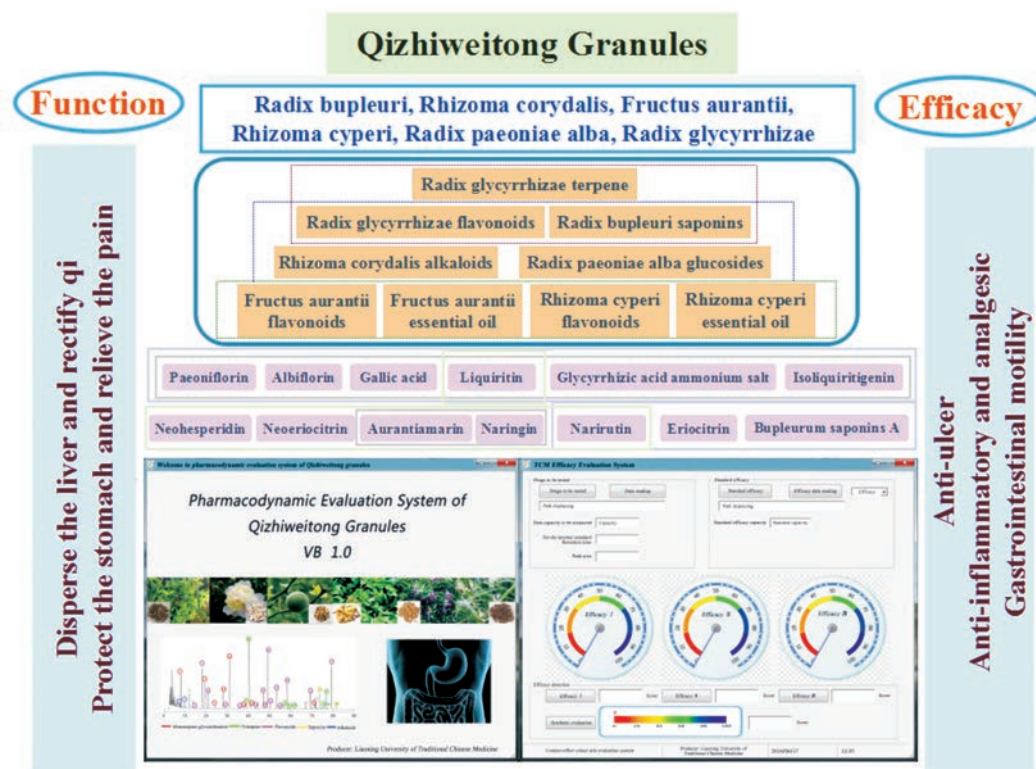


Figure 2 The characteristic spectrum of quality markers of TCM compounds corresponds to pharmacodynamic colour atla

效的协同组分配比逐级降维的方式对气滞胃痛颗粒中促胃肠动力、抗炎镇痛和抗胃溃疡3个药效的有效组分进行缺失和配伍研究。通过一级筛选初步确定气滞胃痛方中发挥3个药效的所有有效组分,为甘草三萜、甘草黄酮、甘草多糖、延胡索生物碱、柴胡皂苷、柴胡多糖、白芍总苷、枳壳挥发油、枳壳黄酮、香附挥发油、香附黄酮11个组分。通过二级筛选即对发挥3个药效的所有有效组分进行缺失研究,通过精简有效组分得到发挥三个药效的明确的有效组分,筛选出促胃肠动力有效组分为枳壳挥发油、枳壳黄酮、香附挥发油、香附黄酮4个组分;抗炎镇痛有效组分为白芍总苷、甘草黄酮、柴胡皂苷、延胡索生物碱4个组分;抗溃疡有效组分为甘草三萜、甘草黄酮、柴胡皂苷3个组分。通过三级筛选即对精简的有效组分进行配伍研究,得到发挥3个药效明确的有效组分的最佳配比,最后通过多重药效综合评分得到最终的最佳配伍组分与配比,即延胡索生物碱-白芍总苷-柴胡皂苷-甘草黄酮-甘草三萜-枳壳黄酮-枳壳挥发油-香附黄酮-香附挥发油(4.45:7.94:12.89:3.77:1.94:10.51:1:9.51:1.68)^[11]。经药理学验证,形成的组分复方与气滞胃痛颗粒复方功效基本一致,从而明确了中药复方药效组分和病症的相关性,筛选出复方质量标志组分,为气滞胃痛颗粒质量标志成分的确立奠定基础。

3 “组分解析,系统整合”中药复方化学成分整合分析

气滞胃痛颗粒由柴胡、延胡索(炙)、枳壳、香附(炙)、白芍、炙甘草6味中药组成,含有单萜苷类、三萜皂苷类、黄酮类、多糖类、生物碱类和挥发油类等不同性质的化学物质组,其化学物质组成复杂。对于这样一个复杂的中药复方,课题组采用化学物质组学的研究思路,采取从整体到组分再到整体的策略,从复方的整体化学物质组中逐步发现和确认有效化学物质组的组成,从复方→组分→成分层次逐步深入研究,辨识关键药效成分。利用HPLC-TOF-MS、LCMS-IT-TOF、GC-MS及ICP-MS等联用技术,对照品比对、相关数据库查询和质谱解析等手段对其整体化学物质组成进行全面表征,并对这些成分进行药材、组分归属研究,“组分解析,系统整合”揭示气滞胃痛颗粒复方的药效化学成分构成。

4 “谱效相关,见谱见效”中药复方质量标志物的确定

近年来,国内外学者通过不断的探索研究,在指纹图谱技术的基础上,提出了符合中药整体性特点、能够较为全面评价中药质量的质控研究新模式—中药谱效关系^[12,13]。在国内外学者的一致努力下,谱效关系的

研究模式逐渐多元化,也取得了阶段性的进展^[14],虽然在指纹图谱的基础上,对以药效为导向的中药质量评价方法有了一定的提高,但仍存在指纹图谱指纹峰药效指示不明确,疗效及量化指标对应不确切,药效无法通过图谱整体、直观评判等问题,制约了中药质量标志物的全面、准确发现。

课题组借助化学质控的先进分析技术手段,遵循中医“方(药)证相关”的逻辑和现代“病证结合”的思路,在气滞胃痛颗粒复方化学成分和药理作用研究基础上,结合全时段等基线多波长融合色谱技术^[15,16],构建气滞胃痛颗粒230、254和283 nm三波长融合指纹图谱。该图谱将不同性质化学物质组分的最大吸收波长进行全时段、等基线融合,反映在同一张谱图中,可避免由于单一波长检测信息量少和某些化合物灵敏度低导致的定量不准等问题。将气滞胃痛颗粒所含6味药材比例进行合理调整,应用Isight软件对各个配伍组的药材量进行随机抽样,得到20个不同配伍比例的气滞胃痛颗粒复方,将配伍组中的各个色谱峰进行化学成分归属,结合体外药理实验,灰色关联分析、人工神经网络等化学计量学方法分别建立促胃肠动力、抗炎镇痛、抗溃疡谱效关系^[17-19],相互验证,综合筛选出体现不同药效的复方质量标志物。即筛选出气滞胃痛颗粒发挥促胃肠动力作用的质量标志物为柚皮苷、新橙皮苷、橙皮苷、芸香柚皮苷、新圣草苷、甘草苷6个成分;发挥抗炎镇痛作用的质量标志物为甘草苷、芸香柚皮苷、柴胡皂苷A、异甘草素、没食子酸、甘草酸单铵盐、芍药苷、圣草次苷、芍药内酯苷9个成分;发挥抗溃疡作用的质量标志物为没食子酸、甘草苷、甘草酸单铵盐、芍药苷、芍药内酯苷、异甘草素、橙皮苷、柚皮苷8个成分。其中有些成分同时发挥双重或三重药效。

5 “量效色卡,质量可视”中药复方质量直观分析

课题组成员根据具有多重功效复方中药存在的质量标志物复杂的特点,结合复方中药质量控制的生产实际,首次研制开发“谱-效色卡”软件,针对指纹图谱和药效作用的相关性,建立相应的谱效关系方程,将气滞胃痛颗粒单一或多种药效通过“谱-效色卡”这一直观的形式表现出来,实现对中药药效的“可视化”预测及中成药整体性质量控制。

具体研发过程包括“色卡”软件的程序设计、气滞胃痛颗粒“谱效色卡”软件程序的校正及气滞胃痛颗粒“谱效色卡”的验证三部分内容。首先应用Visual Basic (VB) 编程语言对色卡软件进行程序设计,加入合适的内标,以内标峰为参照,计算各色谱峰相对保留时间及相对峰面积,以相对保留时间确定峰归属,计算与药效相关的各色谱峰的相对峰面积与其相关系数的

乘积, 并加和, 建立量效关系方程, 最终得到气滞胃痛颗粒对三大药效的药效评分。将气滞胃痛颗粒有效成分的高效液相色谱检测结果输入“谱效色卡”软件, 经待检药品选择、内标物保留时间与峰面积设定、读取数据、标准药效数据选择、读取药效数据、药效检测过程, 药效结果便以指针形式显示在带有0~100分刻度和红、橙、黄、绿、蓝、紫6个颜色区域的色卡条带上, 直观反映单一或多种药效。气滞胃痛颗粒“谱效色卡”软件程序的校正, 采用 $L_{18}(3^7)$ 正交试验设计方法, 根据气滞胃痛颗粒生产工艺, 将6个因素(6味中药)分别设置3个水平, 一水平为气滞胃痛颗粒最佳药材配比, 三水平为0, 二水平为最佳药量的1/2, 制备18批供试品溶液, 建立气滞胃痛颗粒全时段多波长融合指纹图谱, 数据导入“谱效色卡”软件, 将其输出结果与人为计算结果比对, 二者基本一致, 但有部分结果超过了100分, 重新计算后校正程序, 确定软件阈值。为了更为准确、真实地预测气滞胃痛颗粒促胃肠动力、抗炎镇痛、抗溃疡药效, 课题组将10批气滞胃痛颗粒成方制剂的指纹图谱数据导入“色卡”软件, 预测药效。同时采用体内动物实验, 分别研究10批气滞胃痛颗粒的促胃肠动力、抗炎镇痛、抗溃疡作用。结果“色卡”软件输出结果与其药效结果趋势一致, 验证了软件的适用性。

应用“谱-效色卡”软件, 对气滞胃痛颗粒促胃肠动力、抗炎镇痛、抗溃疡作用进行评价, 即通过输入指纹图谱数据, 直接计算出该药的药效作用, 此方法操作简便, 可以实现对药效作用的预测和计算, 进而评价气滞胃痛颗粒的质量。将此方法应用于企业实际生产, 通过测定有效成分含量即可直观反映其药效, 对于企业保障药品质量, 稳定临床疗效, 树立良好品牌意义重大, 具有较好的实际应用价值。

6 小结

中药复方治疗病症的精准分析是其质量标志物研究的关键。中药复方药效评价, 始终要以其功能主治为基础, 以临床疗效为依据, 选择恰当的中/西医药理模型进行研究, 全面、真实的反映复方功效。对于具有多重功效的中药复方, 构成复方的药材、组分、成分间存在着更为复杂的协同、增益、拮抗作用, 为此, 课题组构建了基于多重功效的组效对应、多组多效药理药效综合评价体系, 逐级降维地筛选有效组分, 并将其整合, 明确质量标志组分。在质量标志物的筛选过程中, 课题组借鉴了谱效关系的研究方法并对其有所完善、发展。针对谱效关系研究中指纹图谱整体性、模糊性的特点, 完善了全时段等基线多波长覆盖融合指纹图谱技术, 强化了指纹图谱的整体性; 克服指纹图谱指纹峰药效指示不明确, 疗效与量化指标对应不确切, 药效

无法通过图谱整体、直观评判等模糊性问题, 建立了谱效色卡技术, 上述技术为解决谱效关系难点问题, 构建能够适应中药复方多成分、多靶点作用特点, 揭示中药复方质量标志物, 解决真正控制中药有效成分含量方法提出了一条探索性解决方案。

课题组以中药的有效组分为先导, 遵循中医药基本理论框架, 打破原有复方中药质量控制研究模式, 通过有机化合物轮廓谱和药效活性研究相结合, 组分全程解析与针对多环节病理过程的药理作用对比分析, 建立了一套复方中药质量标志物的技术路线, 丰富和发展了中药质量评价体系, 为复方中药质量评价方法瓶颈问题的解决提供借鉴, 也为复方中药质量评价研究提供了新的思路与方法。

References

- [1] Luo GA, Liang QL, Wang YM. Traditional Chinese Medicine Fingerprint-Quality Evaluation, Quality Control and New Drug R&D (中药指纹图谱-质量评价、质量控制与新药研发) [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2009.
- [2] Xiao XH, Wang YY. To Review and Study TCM from the Perspective of Thermodynamics (从热力学角度审视和研究中医药) [M]. Singapore: Singapore Medical and Health Press, 2004: 74.
- [3] Xiao XH, Jin C, Zhao ZZ, et al. Probe into innovation and development of pattern of quality control and evaluation for Chinese medicine [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2007, 32: 1377-1381.
- [4] Li P, Qi LW, Wen XD, et al. Methods for the elucidation of bioactive components and quality control of traditional Chinese medicines [J]. Chin J Nat Med (中国天然药物), 2007, 5: 1-9.
- [5] Qiao SY. Quality control of traditional Chinese materia medica: a discussion [J]. J Int Pharm Res (国际药学研究杂志), 2012, 39: 441-444.
- [6] Liu CX. Recognizing healthy development of Chinese medicine industry from resources quality-quality markers of Chinese medicine [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2016, 47: 3149-3154.
- [7] Liu CX, Chen SL, Xiao XH, et al. A new concept on quality marker of Chinese materia medica: quality control for Chinese medicinal products [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2016, 47: 1443-1457.
- [8] Cui YL, Meng XS, Bao YR, et al. Synergy effect of effective substances group and mechanism of Qi-Zhi Wei-Tong granules in promoting gastrointestinal dynamic effect [J]. World Sci Technol Mod Tradit Chin Med Mater Med (世界科学技术-中医药现代化), 2014, 16: 52-57.
- [9] Xu WW, Wang S, Meng XS, et al. Studies on activity of effective components in Qizhiweitong granules based on anti-inflammatory and analgesic effect [J]. Lishizhen Med Mater Med Res

- (时珍国医国药), 2013, 24: 295-298.
- [10] Wu YP, Wang S, Meng XS, et al. Effects of anti-gastric ulcer effective components in Qizhi Weitong granules on gastric ulcer model rats based on two evaluation methods [J]. China Pharm(中国药房), 2013, 24: 2116-2118.
- [11] Li S, Bao YR, Wang S, et al. Component compatibility of Qizhiweitong granules evaluated by multiple effects and indexes [J]. China J New Drugs (中国新药杂志), 2014, 23: 2860-2865.
- [12] Qin KM, Zheng LJ, Shen BJ, et al. Application of spectrum-effect relationship in Chinese medicine research and related thinking [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2013, 38: 26-31.
- [13] Jiang JD, Du WF, Cai BC. Application of spectrum-effect relationship in quality control of traditional Chinese medicine [J]. China J Tradit Chin Med Pharm (中华中医药杂志), 2015, 30: 3811-3814.
- [14] Sun LQ, Qi J, Yu BY. Advances of multi-dimensional spectrum-effect relationship for the research on traditional Chinese medicine [J]. J China Pharm Univ (中国药科大学学报), 2013, 44: 487-493.
- [15] Yao D, Meng XS, Wang S, et al. Study on all-time multi-wavelength fusion fingerprint of Qizhiweitong granules and multi-component quantitative analysis [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2013, 38: 1513-1517.
- [16] Wu YP, Meng XS, Bao YR, et al. Simultaneous quantitative determination of nine active chemical compositions in traditional Chinese medicine *Glycyrrhiza* by RP-HPLC with full-time five-wavelength fusion method [J]. Am J Chin Med, 2013, 41: 211-219.
- [17] Bao YR, Wang S, Meng XS, et al. Establishment of spectrum-effect relationship network model of Qizhiweitong granules promoting gastrointestinal motility [J]. J Chin Med Mater (中药材), 2014, 37: 828-832.
- [18] Li TJ, Wang S, Meng XS, et al. Study on spectrum-effect relationship of Qi-Zhi Wei-Tong granules treated for gastric ulcer [J]. World Sci Technol Mod Tradit Chin Med Mater Med (世界科学技术-中医药现代化), 2015, 17: 103-108.
- [19] Xu WW, Wang S, Meng XS, et al. Study on chromatography-efficacy relationship of anti-inflammatory activity of Qizhi Weitong particle compound herbs with neural network and gray correlation method [J]. China J Chin Mater Med (中国中药杂志), 2013, 38: 1806-1811.