

中药色谱指纹图谱技术及应用前景

康福忠¹, 张立新², 高木珍¹, 杨晓伟¹

(1. 天津市兽药监察所, 天津 300402 2. 天津市畜牧兽医站, 天津 300402)

[收稿日期] 2005-04-20 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280(2005)09-0037-04 [中图分类号] R284.1

[摘要] 简要介绍了中药色谱指纹图谱的概念, 概述了中药色谱指纹图谱的研究现状, 展望了其在中药质量控制领域中的应用前景。

[关键词] 中药; 色谱; 指纹图谱; 质量控制

中药是成分复杂的混合体系, 其疗效不是来自单一的活性化学成分, 而是多种活性成分之间协同作用的结果。用传统质量标准测定单一或几个成分, 显然不能全面衡量中药及其制剂的质量、疗效和稳定性。中药质量控制始终是中药研究、开发和应用的重点与难点; 同时也是阻碍我国中药现代化、国际化进程的重要因素之一。为此, 建立在中药成分系统研究基础上的指纹图谱是全面反映中药内在质量的一个有效手段。2000年国家药品监督管理局(以下简称“国家药监局”)颁布《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》以来, 中药指纹图谱的研究在当前中药界已成为热点, 本文简要综述中药色谱指纹图谱技术的应用。

1 中药色谱指纹图谱的概念

中药色谱指纹图谱(chromatographic fingerprint)是指某种或某产地中药及其制剂所共有的、具有特异性的组分群体(某类或数类成分)经色谱测定得到的特征图谱或图像。它是一种综合的、量化的色谱鉴定手段, 借以鉴别真伪, 评价原料药、半成品和成品质量的均一性和稳定性。其基本属性是“整体性”和“模糊性”^[1]。

2 中药色谱指纹图谱研究概况

2.1 中药样品 对中药材生产的严格规定是进行指纹图谱的先决条件, 中药材的化学成分受种类、产地、生态环境、气候、栽培、生长年限及采集期等因素影响较大, 进而影响中药产品的内在质量。因此, 实行中药材规范化栽培是保证中药材质量高、

稳定性好的最佳选择。国家药监局要求中药注射剂在固定中药品种、产地和采收的前提下, 制定中药材、有效部位或中间体、注射剂的指纹图谱。中药材规范化种植是制定中药材指纹图谱的前提条件, 同时中药材指纹图谱拉动中药材规范化种植的实施, 也是药材生产管理规范(good agriculture practice GAP)项目攻关的关键技术和创新点^[2]。

目前国际上植物药研究部门采用药材生产GAP, 国内许多大型中药生产企业也建立了自己的药材种植基地, 在一定程度上提高了中药原药材质量的稳定性。药材的指纹图谱必须体现其主要化学成分, 并应逐步与药效学研究相结合; 中成药的生产通过对原料、配方和工艺过程严格控制, 提高中成药物质量群的质量及稳定性, 使成品指纹图谱与标准指纹图谱一致。

2.2 检测方法 色谱指纹图谱技术是多学科交叉综合技术手段对复杂物质体系质量稳定性进行评价的计算机辅助分析检测方法。采用适宜的检测方法是制订合格指纹图谱的关键。

中药指纹图谱按测定手段分类可分为中药化学(成分)指纹图谱和中药生物指纹图谱。在中药化学指纹图谱中, 薄层色谱(TLC)、高效液相色谱(HPLC)和气相色谱(GC)技术是公认的三种常规分析手段。在实际工作中, 我们常用多种仪器联用的模式, 如: GC/MS、LC/MS、HPLC(CE)MS等。当前高速逆流色谱(HSCCC)是国际上较流行的新型技术。

作者简介: 康福忠(1965年~), 男, 畜牧师, 从事兽药的质量监督及检验工作。

2.3 图谱信息的处理 在色谱指纹分析中,有采用直观对比,也有引入量化数据如相对保留时间、相对峰面积、N强峰、重叠率等,形成色谱的相对指纹谱,较直观对比更具可比性和准确性。此外,还有引入双参照峰、特征指标含量均值偏移度、特征峰群、Kovats保留指数等作为比较指标。

罗国安等^[3]将多维多息特征图谱应用于中药分析鉴别中,并提出建立中药注射剂多维多特征图谱,既可系统完整地解决药效和质量的相关性问题,也能解决中药研究中缺乏标准品的难题。孟庆华等^[4]采用简单实用的色谱指纹相似度计标方法,将色谱指纹图谱的重叠率和共有峰的峰强度结合计算相似度,能敏感反映谱图内的差异。

建立色谱指纹图谱的计算机模式识别系统,可识别不同检测方法的色谱指纹。国内已有 TLC、HPLC计算机模式识别系统的研究报道。

在研究中结合分子生物学技术,计算机图像分析、模糊聚类分析以及人工神经网络分析等,将会获得更多的有价值的信息。

2.4 图谱技术应用

2.4.1 薄层色谱(TLC)指纹图谱 薄层指纹图谱具有快速、经济、可靠、操作简单、适用范围广、重现性好等优点。它是采用固定波长对薄层展开的各斑点作薄层扫描得到的图谱,尤其适合日常分析和现场检验,是国内学者最先接受的方法。目前在国内的中药研究中 TLC 已被广泛使用,这种方法对失去外形的中药材粉末及浸膏等制剂特别具有优越性。如对高良姜的黄酮成分的 TLC 指纹图谱研究,由高良姜素、山奈素等 8 个特征荧光斑点构成了高良姜乙酸乙酯提取部分的指纹图谱^[5]。谢培山等^[6]对白芍总苷 TLC 指纹图谱进行了实验研究,结果 10 批样品的 TLC 指纹图谱所形成的全谱图像显示批间产品有很高的相似性。

薄层色谱不足之处在于其效能低、灵敏度差等。

2.4.2 高效液相色谱(HPLC)指纹图谱 HPLC 指纹图谱具有高效、快速、准确性和重现性好、适用面广等优点,且检测器不断更新发展,更适于中药指纹图谱的建立。如运用二极管阵列检测器(DAD)可得到三维图谱,适用于成分复杂、多种成分在紫外光区都有吸收的药物的分析。对成分差别较细微的单味药材及成分较复杂的制剂,其分离与鉴定能力大大优于分离原理相同的 TLC^[7]。HPLC 指纹图谱信息量大,对无标准的中药及制剂

的质量可提供较全面的、可靠的科学评价;在有主要成分的对照品时,可进行中药识别、半定量、定量及各成分相对比较定量。

2.4.2.1 品种鉴定 聂国朝^[8]选择以甜菜碱和类胡萝卜素为主要活性成分的枸杞提取物为样品,使用液相色谱配二极管阵列检测器(HPLC-DAD),得出了 3 种枸杞的 HPLC-DAD 化学指纹图谱,并进行比较,用于枸杞品种的识别和真伪的鉴定。金永新等^[9]对乌拉尔甘草进行 HPLC 指纹图谱的研究,确定了具有代表性的 28 个峰作为共有峰,建立了指纹图谱,此方法重现性、精密性均较好,可作为乌拉尔甘草的鉴别依据。严启新等^[10]建立了鸡血藤的 HPLC 指纹图谱,通过获得鸡血藤药材色谱图,再用聚类分析方法进行考察,将提取分析得到的 11 个色谱峰作为指纹特征,发现鸡血藤及其混淆品种的色谱指纹图像有明显差异,可用于鸡血藤药材的鉴别。

2.4.2.2 中药质量控制 封士兰等^[11]研究了 10 个红芪样品的指纹图谱:采用 HPLC 法,乙腈-水梯度洗脱,以五都米仓山红芪药材作为对照品,用毛蕊异黄酮和芒柄花素作为指标成分进行了定位,并测定了它们的含量,找出 23 个共有峰,10 个样品的平均相似度为 97.3% 以上,结果表明,红芪样品指纹图谱及指标成分含量测定可用于全面控制红芪药材的质量。曾令杰等^[12]进行了板蓝根的指纹图谱质量控制研究,采取柱前衍生化 HPLC 法检测,建立氨基酸部位的指纹图谱,以角余弦系数和距离系数来计算不同批次的样品之间的质量一致程度。结果表明,HPLC 法的精密度、稳定性和重现性良好,图谱中绝大部分色谱峰均达到了基线分离:两个系数能够显示样品之间的质量符合程度。此法可以作为板蓝根颗粒指纹图谱质量控制的一种有效方法。

在中药注射剂方面,国家药监局制定的《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》要求对已批准的中药注射剂和申报的新中药注射剂实行药材和制剂的指纹图谱标准,多数中药注射剂都采用了 HPLC 方法来测定其指纹图谱。有的对药材中间体及注射液均做了相当全面的指纹图谱研究。已报道的有三七注射液、复方人参注射液、银杏注射液,近期报道的有红景天注射剂^[13]等。此外,曹进等^[14]运用高效液相色谱-蒸发光散射检测器(HPLC/ELSD)建立了复方清开灵注射液的指纹图

谱,通过指纹图谱相似度评价软件,对10批清开灵注射液的HPLC/ELSD指纹图谱进行了相似度计算,获得很好的样品相似度。该方法为中药质量控制提供了一种可以同时实现整体定性、指标成分定量且简便易行的模式。这些研究为注射剂质量控制提供了可靠的依据。

2.4.3 气相色谱(GC)指纹图谱 GC具有高效、高灵敏度、进样量小及分析速度快等优点。但要求样品必须具有一定的挥发性和热稳定性,因而限制了其应用范围。该法主要用于各种含易挥发性成分的中药材及制剂的分析测定。丁平等^[15]用规范化的色谱分离条件,从10批道地产区阳春砂药材挥发油GC指纹图谱中提取9个共有峰,且有较好的分离,可作为阳春砂药材质量评价的专属性指纹图谱。同时对不同产地引种的阳春砂药材进行相似度比较,以评价不同产地阳春砂的品质。在注射剂方面,应用GC色谱法建立了鱼金注射剂(鱼腥草、金银花)的指纹图谱,得到了由17个特征峰组成的注射剂标准GC指纹图谱^[16]。

2.4.4 高速逆流色谱(HSCCC)指纹图谱 HSCCC是当前国际流行的新型液-液分配技术。该技术应用动态液-液分配原理,利用相对移动的互不混溶的两相溶剂,在处于动态平衡的两相中将具有不同分配比的样品组分分离。它不使用固相载体做固定相,克服了固相载体带来的样品吸附、损失、污染、峰形拖尾等缺点^[17]。HSCCC的分离度和重现性与HPLC基本相同,操作更简便,容易掌握。对样品的预处理要求低,仅需一般粗提即可。从理论上讲,HSCCC可适用于任何极性范围的分离。HSCCC在分离天然产物方面有独到之处,尤其在中药指纹图谱研究中有较好的应用前景。

顾铭等^[18]用国产HSCCC分离纯化中草药——丹参,选用正己烷-乙醇-水体系,采用分步洗脱,从3个产地的丹参中各分离得到12个洗脱组分,经高效液相色谱仪和紫外光谱仪检测证明,3张HSCCC洗脱图谱中对应洗脱峰为同一组分。HSCCC洗脱图谱不包含非共有峰,并且对应洗脱峰保留时间的相对标准偏差(RSD)小于3%,符合国家标准关于制订指纹图谱方法学考察资料的技术参数。因此,HSCCC作为制订指纹图谱的方法之一具有可行性。

2.4.5 色谱联用指纹图谱 由于中药(尤其是复方制剂)成分复杂,现有的单一色谱分析方法给出的信

息难以建立较完善的指纹图谱。随着色谱技术的飞速发展,采用既有色谱分离特性又有光谱特性的联用仪器来进行中药色谱指纹图谱测定,借助近年发展的化学计算技术和已有的光谱(波谱)标准库,是完全可能对大部分中药的化学成分进行定性和相对定量分析的。目前常用的有GC/MS、LC/MS、高效液相色谱(或毛细管电泳)二维阵列检测器和高效液相色谱/质谱/质谱等联用方式(HPLC或CE/DAD和HPLC/MS/MS)所得的多维图谱。

近几年来,随着国外先进仪器分析技术及设备的引进,我国色谱联用技术有了较快发展。如醒脑静注射液是由麝香、栀子、郁金等多种中药提取精制而成的中药制剂,张家骊等^[19]采用顶空固相微萃取GC/MS方法研究了醒脑静注射液的有效成分及其指纹图谱,以控制产品的内在质量。张尊建等^[20]采用HPLC/UV/MS对密花石斛进行指纹图谱研究,得到分离度较好的密花石斛HPLC/UV指纹图谱,标示了9个共有峰,并用HPLC/MS对其部分色谱峰进行了初步定性,为其全面质量控制提供了参考数据。

此外,毛细管电泳法(CE)以其柱效高、分析速度快、分析范围广、进样体积小、运行费用低、适于分析“脏”样品等优点越来越受到关注。

3 应用前景

近年来国内中药色谱指纹图谱的研究越来越多,但要真正建立起符合中药特色的中药色谱指纹图谱质量控制技术体系,还存在许多有待解决的难题。首先,在众多影响色谱指纹图谱测定因素存在的情况下,怎样获得稳定的色谱指纹是我们所要解决的首要问题。这需要对原药材栽培、中药制剂生产直至谱图测定进行全程规范化质量控制,即实施中药GAP管理。中药生产厂家与研究部门形成协调统一的测定条件和方法,使之符合GMP、GLP要求,人员的操作符合SOP要求。总之,只有严格规范可能引起化学成分不稳定的各个环节,才能保证指纹图谱具有专属性、可重复性及实用性。

此外,中药标准图谱库和数据库的建设尚在筹划之中,真正建立一套较完整的中药色谱指纹图谱还有大量细致而繁重的工作要做。采用模糊信息分析法、人工神经网络法、灰色关联聚类法^[21]以及化学计量学统计法^[22]等先进的计算机分析技术,来解析和识别图谱是十分必要的。这将极大提高对色谱有用信息的利用率。

中药色谱指纹图谱的建设目前还处于初级探索阶段,其发展趋势必将向多学科相互渗透。随着指纹性数据的不断完善和相对合理的数学模型的取得,将色谱指纹图谱技术与药效学相结合,就能真正反映中药的安全性与有效性。

国际上采用指纹图谱对植物药进行质量控制的 国家有韩国、日本、德国等。德国用指纹图谱技术控制银杏制剂的质量;美国 FDA 对植物药的质量控制则要求必须控制指纹图谱的检测标准^[23]。我国药品监督管理局首先对注射剂进行指纹图谱的研究和质量标准的建立,并在此基础上对其它一些中药制剂进行指纹图谱的研究,以期使中药走向国际市场^[24]。总之,以色谱指纹图谱作为草药、中成药的质量控制方法已成为国际共识,色谱及其联用技术的应用是中药指纹图谱研究的重要手段,色谱指纹图谱技术在中药质量控制领域已呈现出广阔的应用前景。

参考文献:

[1] 谢培山. 色谱指纹图谱分析是中草药质量控制的可行策略 [J]. 中药新药与临床药理, 2001, 12(3): 141- 151
 [2] 汪建平, 张长弓, 候以付. 试论中药材规范化种植与中药材指纹图谱 [J]. 中国药房, 2003, 14(11): 629- 630
 [3] 罗国安, 王义明, 曹进. 多维多息特征谱及其应用 [J]. 中成药, 2000, 22(6): 395- 397
 [4] 孟庆华, 刘永锁, 王健松, 等. 色谱指纹图谱相似度的新算法及其应用 [J]. 中成药, 2003, 1(4): 4- 8
 [5] 李彩君, 林巧玲, 谢培山, 等. 高良姜中黄酮类成分薄层色谱指纹图谱鉴别 [J]. 中药新药与临床药理, 2001, 12(3): 839- 845
 [6] 谢培山, 林巧玲. 白芍总苷的薄层色谱指纹图谱实验研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2004, 15(3): 171- 173
 [7] 郑颖, 吴凤镔. 中药指纹图谱的研究进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2003, 15(1): 55- 60.

[8] 聂国朝. 3种枸杞的 HPLC-DAD 图谱比较 [J]. 福建林学院学报, 2004, 24(2): 162- 164
 [9] 金永新, 要林青, 封士兰, 等. 乌拉尔甘草高效液相指纹图谱的研究 [J]. 中国现代应用药学, 2004, 21(20): 93- 98.
 [10] 严启新, 李萍. 鸡血藤高效液相色谱指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2004, 35(5): 556- 559
 [11] 冯士兰, 胡芳弟, 赵健雄, 等. 高效液相色谱法研究红芪指纹图谱 [J]. 分析化学, 2004, 32(6): 710- 714.
 [12] 曾令杰, 杨东升, 陈松光, 等. 板蓝根颗粒的指纹图谱质量控制研究 [J]. 中成药, 2004, 26(2): 87- 89.
 [13] 张桂燕, 张早华, 储载农. 红景天注射剂指纹图谱的 HPLC 研究 [J]. 中成药, 2004, 26(4): 259- 261.
 [14] 曹进, 徐燕, 张咏知, 等. 清开灵注射液 HPLC/ELSD 指纹图谱建立及质量相关性研究 [J]. 分析化学, 2004, 32(4): 469- 473
 [15] 丁平, 曾元儿, 何智健等. 不同产地阳春砂挥发油气相色谱指纹图谱研究 [J]. 中国药学杂志, 2004, 39(6): 418- 420
 [16] 王斌, 王燕, 许丹, 等. 鱼金注射剂 GC 指纹图谱研究 [J]. 中成药, 2004, 26(6): 431- 433
 [17] 沈平襄. 高速逆流色谱 (HSCCC) 技术与色谱指纹图谱 [J]. 中成药, 2001, 23(5): 313- 315
 [18] 顾铭, 欧阳藩, 苏志国. 丹参有效部位指纹图谱定性和有效成分定量分析方法研究 [J]. 生物工程学报, 2003, 19(6): 740- 744
 [19] 张家骊, 王利平, 袁身淑, 等. 醒脑静注射液指纹图谱的顶空固相微萃取气质联用研究 [J]. 中国中药杂志, 2004, 29(5): 466- 467
 [20] 张尊建, 王源园, 李茜, 等. 密花石斛的 HPLC-UV-MS 指纹图谱研究 [J]. 中草药, 2004, 35(4): 393- 395
 [21] 苏薇薇. 中药指纹图谱及计算机信息处理 [J]. 世界科学技术- 中药现代化, 2001, 3(3): 30- 33.
 [22] 周福添. 化学计量方法应用于中药化学特征指纹图谱 [J]. 中药新药与临床药理, 2001, 12(3): 164- 169
 [23] 刘玉珍, 牛淑敏. 指纹图谱技术推动中药现代化 [J]. 医药质量, 2003, 12(3): 12- 12
 [24] 陈鹭颖, 苑述刚. 指纹图谱在中药及复方研究中的应用 [J]. 海峡药学, 2003, 15(2): 92- 94.

Technical and application prospect on fingerprint chromatogram of traditional Chinese medicine

KANG Fu-zhong¹, ZHANG Li-xin², GAO Mu-zheng¹, YANG Xiaowei¹

(1 Tianjin Institute of Veterinary Drug Control, Tianjin 300402;

2 The Tianjin Veterinary Station of Animal Husbandry, Tianjin 300402 China)

Abstract This paper introduces the concept of the fingerprint chromatogram of traditional Chinese medicine (TCM) briefly, and states the research present situation of it generally, and looks forward to the application prospect of TCM in quality control

Key words traditional Chinese medicine (TCM); fingerprint chromatogram; quality control