

文章编号:1008-9926(2004)03-0214-03

中图分类号:R28;R917

文献标识码:A

中药指纹图谱的研究概述

王 瑾,胡璟华

(中国人民解放军总医院 门诊药房; 中药房 北京 100853)

摘要:综述中药指纹图谱在控制中药材及中成药质量方面的作用 and 特点,介绍光谱法(紫外和红外光谱);色谱法(薄层色谱、气相色谱、高效液相色谱、高效逆流色谱)、高效毛细管电泳法、分子生物学方法等指纹图谱的建立和应用;指出了指纹图谱法可在尚不完全清楚其化学成分的情况下,得到全部药材组分的图谱,从而,可作为可控指标。提出了构建指纹图谱中的问题以及今后发展的方向。当前,国内外认可和研究较多的为高效液相色谱指纹图谱,其它指纹图谱技术的发展,也将对中药质量控制有深远的意义。

关键词:中药材;指纹图谱;质量控制;判断;识别

中药是我国的传统医药,从神农尝百草开始利用中草药治病,至今,已有1700多年的历史。传统的中药大部分都是复方剂,受科学条件的限制,中药在质量控制上缺乏科学的检验手段。随着医药工业的发展,片剂、颗粒剂、口服液、注射剂等新剂型不断出现,医药工业企业生产实现了机械化和现代化,但中药内在成分的稳定性、一致性和相对可控性不够,跟不上发展的步伐。中药由于成分复杂,具疗效作用的部分往往不是单一成份,而是群体疗效,所以如何控制中药材、中成药的质量,成为中药现代化,中药走出国门的瓶颈。以往的鉴别方法和以某一单一成分作为质量控制指标的方法越来越不适应中药质量控制的发展。随着现代分析手段的发展,各种色谱、光谱技术越来越多的应用到中药的成分分析上来,在尚不清楚药材全体化学成分的基础上,可得到物质群整体的图谱。于是逐渐提出了用指纹图谱的方法来控制在中药材中成药的的质量的方法。

1 中药指纹图谱的概念

中药指纹图谱是指某种(或某产地)中药材或中成药经适当的处理后,采用一定的分析手段,得到的能够标志该中药材或中成药特征的色谱或光谱的图谱。指纹图谱的作用主要是反应复杂成分的中药及其制剂内在质量的均一性和稳定性。利用色谱技术进行指纹图谱分析的中药材因生长年限、生长环境的变化而可能产生个体间较为明显的差异,但个体间必然有群体共有的相似性^[1]。所以作为指纹图谱应该既具有判断该药材真伪的“共性”,又可能反映不同的产地、不同采收期、不同处理加工工艺的“特性”特征,具有物种

的唯一性和个体的相似性,从而能够从整体上控制中成药或中药材的质量。目前,指纹图谱已成为国际上公认的控制中药或天然药物质量的最有效的手段。国家药品监督管理局于2000年8月下发《中药注射剂图谱研究的技术要求》,率先要求中药注射剂执行指纹图谱的质控办法,将促进我国中药质控的发展。

2 指纹图谱建立的方法

2.1 光谱法 常用的有紫外光谱(UV)和红外光谱(IR)。有人根据紫外光谱准确的鉴别羚羊角、山羊角和绵羊角粉末^[2]。田进国^[3]等人利用红外光谱研究并发现不同采集时间的葛根和小蓟的红外光谱具有很好的特征性、稳定性和可重复性。根据红外光谱可以非常准确的鉴别葛根和小蓟。吴启南等^[4]应用UV、IR分析仪对泽泻及其混淆品窄叶泽泻进行了鉴别研究,结果显示:窄叶泽泻在指纹图谱区与正品泽泻存在较大差别。周红涛等^[5]首次运用傅里叶变换红外光谱技术对不同产地芍药根部的混合化学体系进行了全组分快速分析,为赤芍道地商品的鉴别及质量控制提供了可靠的依据。

2.2 色谱法

2.2.1 薄层色谱(TLC)法 米莉莉^[6]等发现薄层色谱能有效鉴别出虫草中核苷类成分以及评价不同虫草样品的质量,建立了不同虫草样品的荧光淬灭薄层色谱指纹图谱。罗敏等^[7]研究了五种蛇胆液的薄层色谱图特征,得到了一组指纹图谱。有人对不同产地的枳壳药材样品进行了薄层色谱分

[23] Hidaka Y, Satoh T, Kamei T. Regulation of squalene epoxidase in Hep G2 cells[J]. *J. Lipid Res*, 1990, 31: 2087

[24] Rolf Gebhart, Halgund Beck, Karl G Wagner. Inhibition of cholesterol biosynthesis by allicin and ajoene in rat hepatocytes and Hep G2 cells[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1994, 1213: 57

[25] H G 沃格尔著, 杜冠译. 药理学实验指南—新药发现和药理学评价[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 2

[26] Myung S Chi, Eunsook T Koh, Troy J Stewart. Effects of garlic on lipid metabolism in rats fed cholesterol of lard[J]. *J. Nutr*, 1982, 112: 241

[27] Hiromichi Matsuura. Saponins in Garlic as Modifiers of Risk of Cardiovascular Disease[J]. *Journal of Nutrition*, 2001, 131: 1000

(收稿日期: 2003-09-25; 修回日期: 2004-01-19)

(本文编辑 梁爱君)

析,得到了体现枳壳药材共性、可对其进行有效鉴别的特征峰^[8]。

2.2.2 高效液相色谱(HPLC)法 高效液相色谱法是应用较多的方法,60%~70%的有机物均可应用。高效液相色谱和质谱(MS)联用,能够将未知成份的各峰进行归属。刘春丽^[9]对 HPLC 分析中药的研究进展进行了综述性评价,认为最适合指纹图谱分析。特别是三维高效液相色谱的发展,使定性分析更为方便。邹华彬^[10]应用 HPLC 和四维 UV 指纹图谱研究一种秘鲁产人参保健品与人参及西洋参的异同。侯艳鹏等^[11]采用 HPLC/UV 测定旋覆花药材甲醇提取液的指纹图谱。张琪等^[12]通过高效液相色谱-二极管阵列检测器(HPLC-DAD)得到的中药苦荞麦指纹图谱的最佳检测波长。刺五加药材水溶性和脂溶性成分的 HPLC/UV 及 HPLC/MS 指纹图谱也已得到^[13]。用反相高效液相法已建立了红车轴草^[14]中异黄酮类、不同产地掌叶大黄^[15]药材的指纹图谱。丁岗等^[16]在茯苓的研究中,利用 RP-HPLC、线性梯度洗脱筛选最佳测试条件,并应用 LC/MS 技术指认指纹图谱中的主要色谱峰,建立茯苓中三萜酸类成分 HPLC 指纹图谱的测试方法。

2.2.3 气相色谱(GC)法 气相色谱适合于挥发油及其制剂的指纹图谱的研究和应用。气相色谱-质谱-计算机联用技术的发展,已成为鉴别富含挥发油类药材的首选方法。苏薇薇^[17]通过此法对 45 个细辛样本进行分析,从中得出不同样品化学本质差异的数量化分类特征,实现计算机对 3 种细辛的鉴别分类。采用顶空气相色谱-质谱(HSGC-MS)计算机联用技术研究发现,肉桂^[18]的顶空气相指纹图谱与混伪品桂皮、柴桂有明显区别。魏刚^[19]等采用 GC-MS 法对不同采集期石牌藿香,以及同基地栽培的高要、湛江藿香挥发油进行主成分比较分析,初步拟定石牌藿香挥发油特征指纹图谱指标成分群中含挥发油的成分可采用裂解气相色谱或闪蒸气相色谱鉴别。不同产地的连翘^[20]指纹图谱建立采用的是裂解色谱法(PGC)。还有方法将气相色谱各色谱峰的相对保留值和峰面积构成样品相对保留值指纹谱^[21],此法实现了图谱的数据化,便于进一步推广应用。

2.2.4 高效逆流色谱(HSCCC)法 应用动态液-液分配原理,利用相对移动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离。其特点是不用固相载体作固定相,克服了样品吸附、损失、峰形拖尾问题。可用于分析各类化合物,尤其用于中药成分的分离纯化。农平娘^[22]用此法分析鉴定生物碱、木脂素、三萜类化合物取得了进展。

2.2.5 高效毛细管电泳(HPCE)法 HPCE 可鉴别大分子物质,是近年发展起来的新的分析技术,从根本上解决了 HPLC 的柱效问题,它集 HPLC 与电泳技术的优点于一身,使中药成分的分析范围更广、更灵敏。张朝晖^[23]等曾对 12 种海马、海龙采用 HPCE 鉴别其种间区别明显,速度快,分辨率高,重现性好,为动物类的鉴别提供了新的分析手段。目前,已有红花道地药材、黄连、六种决明属植物种子中的水溶性成分、栀

子等的高效毛细管电泳指纹图谱的研究报道^[24~27]。近年来,非水毛细管电泳技术的应用也得到发展。非水毛细管电泳技术是用单纯的非水溶剂作为毛细管电泳介质,扩展了分析对象的范围。一般可与质谱或激光诱导荧光检测器联用,在分离分析结构相似的药物上有明显优势。这也是一种极有发展前途的指纹图谱分析方法。王钢力等^[28]采用 HPCE 的 MECC 的分离模式,研究黄酮类化合物在 11 种卷柏属药用植物中的分布,建立了 18 个样品的毛细管电泳的指纹图谱。

2.3 分子生物学方法 核苷酸序列是生命遗传物质基础。每一种属的中药材,由于遗传背景不同,其产生的次生代谢产物也不同,因而其疗效也有差异。分析其遗传物质,可以区分出药材的真伪性和进行品质评价。DNA 分子标记直接分析的是生物的基因型而非表现型,所以结果不受环境、样品形态和材料来源的影响。日本曾经用 RAPD 标记法分离人参属 3 种植物的基因组 DNA 发现^[29]:人参的新鲜根毛组织与干燥药材产生相同的指纹图谱。现在应用较多的有随机扩增多态性 DNA 标记,可以在特定 DNA 序列未知的情况下,检测 DNA 的多态性,是构建指纹图谱的新方法。采用任意引物 PCR(arbitrarily primed PCR,AP-PCR)技术扩增植物基因组 DNA 样品,可获得清晰可靠的 DNA 指纹图谱:如在对中药材厚朴、凹叶厚朴及其常见的伪品和混淆品的鉴别^[30]、对鱼腥草种质资源分析的研究^[31]。RAPD 法能有效的鉴别射干类药材,把射干和鸢尾、野鸢尾、蝴蝶花、德国鸢尾等药用植物区分开^[32],并可为正品和伪品大黄的基原鉴定^[33]提供分子依据,此方法可对同一采集地的具有不同叶面特征的金线莲^[34]进行 DNA 指纹鉴定。马永红等^[35]通过计算遗传相似性系数,建立 UPGMA 聚类图,建立了新疆 3 个不同地理群体的中麻黄指纹图谱,进行遗传多样性分析。

同一品种,具有相同遗传背景的药材,由于种植及采收期不同,会导致其中次生代谢产物不同,用分子标记方法是否可区分清楚,尚待考证。曾明^[36]等对中药葛根及其近缘种的分类地位及系统发育关系进行了探讨。

3 构建指纹图谱中的问题

3.1 药材质量的稳定性 中药是天然产物,产地分散,具有内在不稳定性,加之采收、炮制等多因素的影响致使质量不稳定,不利于指纹图谱的研究应用^[37]。因此迫切需要建立优化、稳定的中药栽培基地,实施药材 GAP。在工艺过程跟踪指纹图谱的建立上,药政部门、药材生产单位、中药厂家、科研单位应共同协调,统计各方面数据、统一标准。

3.2 指纹图谱的技术问题 在从药材到制剂的研究过程中,最好能分别制作中药材、中间体和制剂的指纹图谱。对于复方制剂,由于成分复杂,在一张图谱不能反映全貌的情况下,可以分成几张图谱。用适当的方法将不同极性的成分分开,分别做成指纹图谱。注射剂以水溶性成分为主。尽可能做成一张图谱。不同的制备提取工艺可能会使提取的有效成分有差异。应该分别比较不同工艺的图谱,从而确定其

共有峰和非共有峰^[38]。

4 指纹图谱的判断与识别

现阶段由于中药的复杂易变性,及实际测定方法的可变性,保证图谱良好的可靠性、重现性和稳定性有一定难度。指纹图谱建立完成以后,在判断上存在着整体性和模糊性。应注意图谱的共有峰和特异峰。在判断上不能只注意某个或某几个峰,要注意全貌比较。仅靠人眼的判断往往难以确定真伪^[38]。利用计算机模型和模糊数学的方法,可以比较好地解决这一问题。

中药指纹图谱在研究实施过程中,必将碰到许多问题,但随着鉴定技术和分析仪器的不断发展,作为中药质控的有效手段,将会全面应用实施,这将极大的推动中药的发展。

参考文献:

- [1] 谢培山. 中药色谱指纹图谱鉴别的概念、属性、技术与应用[J]. 中国中药杂志, 2001, 26(10): 653
- [2] 周友华, 黄振宇, 王振忠, 等. 羚羊角粉末及其二种混淆品的紫外光谱鉴别[J]. 中草药, 1996, 27(10): 626
- [3] 田进国, 程秀民, 任健, 等. 不同采集时间葛根和小蓟红外光谱的鉴别研究[J]. 中草药, 1994, 25(10): 533
- [4] 吴启南, 王立新, 杜倩. UV、IR 光谱法鉴别泽泻与窄叶泽泻[J]. 中药材, 2002, 25(12): 871
- [5] 周红涛, 胡世林, 冯学锋, 等. 不同产地赤芍的 FTIR 指纹图谱对比分析[J]. 中草药, 2002, 33(9): 834
- [6] 米莉莉, 张素文, 孙家进, 等. 冬虫夏草及人工虫草核苷类成分的 TLC 研究[J]. 中成药, 2003, 25(5): 402
- [7] 罗敏, 霍永昌, 魏献春. 五种蛇胆的薄层色谱扫描指纹图谱研究[J]. 中药材, 2002, 25(1): 16
- [8] 苏薇薇, 招嘉文, 彭维, 等. 中药枳壳的化学模式识别研究[J]. 中药材, 2002, 25(10): 714
- [9] 刘春丽, 刘满仓, 朱彭龄. 高效液相色谱法分析中药及植物药的进展[J]. 分析化学, 2000, 28(5): 631
- [10] 邹华彬, 袁久荣, 袁浩. 秘鲁人参保健品 HPLC 和四维 UV 指纹图谱研究[J]. 中成药, 2003, 25(4): 261
- [11] 侯艳鹏, 王建华, 尚明英, 等. 旋覆花药材 HPLC 指纹图谱研究[J]. 中国药理学杂志, 2002, 37(12): 894
- [12] 张琪, 张雪辉, 陈建民. 化学计量学在中药苦荞麦指纹谱最佳检测波长选择中的应用[J]. 中国药理学杂志, 2003, 38(6): 419
- [13] 余静, 李茜, 沈文斌, 等. 刺五加 HPLC/UV/MS 指纹图谱研究[J]. 中国药科大学学报, 2003, 34(2): 148
- [14] 徐艳春, 魏璐雪, 周玉新, 等. 红车轴草中异黄酮的指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(3): 196
- [15] 陈斌, 蔡宝昌, 潘扬, 等. 不同产地掌叶大黄 HPLC 指纹图谱的比较[J]. 中草药, 2003, 34(5): 457
- [16] 丁岗, 王振中, 章晨峰, 等. 茯苓中三萜酸类成分 HPLC 指纹图谱的初步研究[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(10): 756
- [17] 苏薇薇. 中药细辛的化学模式识别研究[J]. 中药材, 1999, 22(6): 279
- [18] 张海霞, 陈建伟, 吴志平. 肉桂及其混伪品的 HSGC-MS 的实验比较研究[J]. 中草药, 2003, 34(1): 76
- [19] 魏刚, 李薇, 徐鸿华. GC-MS 建立石牌广藿香挥发油指纹图谱方法学研究[J]. 中成药, 2003, 25(2): 91
- [20] 袁敏, 张铭光, 杨挺, 等. 裂解色谱法测定连翘的指纹图谱[J]. 中草药, 2003, 34(1): 70
- [21] 洪筱坤, 王智华, 柴胡属 19 种植物挥发油的气相色谱相对保留值指纹分析[J]. 药学报, 1998, 23(11): 839
- [22] 农平娘. 高速逆流色谱技术与色谱指纹谱[J]. 中成药, 2001, 23(5): 313
- [23] 张朝晖. 12 种海马、海龙类药材高效毛细管电泳法鉴别[J]. 中国中药杂志, 1998, 23(5): 259
- [24] 孙沂, 隋因, 郭涛, 等. 不同产地红花药材的高效毛细管电泳指纹图谱研究[J]. 中国药理学杂志, 2003, 38(3): 176
- [25] 魏英勤, 袁久荣, 闫滨. 黄连的毛细管电泳特征指纹图谱研究[J]. 中草药, 2003, 34(6): 563
- [26] 宋贤丽, 郭宝林, 刘克武, 等. 6 种决明属药用植物种子毛细管电泳法鉴别[J]. 中国中药杂志, 2003, 28(6): 491
- [27] 曹敏, 季一兵, 陈玉英. 栀子药材毛细管电泳指纹图谱的研究[J]. 中国药科大学学报, 2002, 33(4): 284
- [28] 王钢力, 戴忠, 鲁静, 等. 11 种卷柏属药用植物 HPCE 指纹图谱的研究[J]. 中成药, 2002, 24(7): 489
- [29] Shaw P C, But PPH. Authentication of Panax Species and Their Adulterants by Random-Primed Polymerase chain Reaction[J]. Planta Med, 1995, 61: 466
- [30] 苏应娟, 朱建明, 王艇, 等. 厚朴的任意引物 PCR 指纹图谱分析[J]. 中草药, 2002, 33(6): 545
- [31] 吴卫, 郑有良, 陈黎, 等. 鱼腥草种质资源的 RAPD 分析[J]. 药学报, 2002, 37(12): 986
- [32] 黄芸, 秦民坚, 杨光, 等. RAPD 法鉴定射干类中药[J]. 中草药, 2002, 33(10): 935
- [33] 杨美华, 张大明, 刘健全, 等. 正品和伪品大黄的 RAPD 指纹图谱鉴定研究[J]. 中草药, 2003, 34(6): 557
- [34] 胡珊梅, 张启国, 周涵韬, 等. RAPD 法在金钱莲的鉴别研究中的应用[J]. 中草药, 2002, 33(10): 949
- [35] 马永红, 党荣理, 吴霞, 等. 新疆产中麻黄不同地理群体遗传关系的 RAPD 分析[J]. 中国药理学杂志, 2003, 38(6): 414
- [36] 曾明, 马雅军, 郑水庆, 等. 中药葛根及其近缘种的 rDNA-ITS 序列分析[J]. 中国药理学杂志, 2003, 38(3): 173
- [37] 郑颖, 刘汉清, 贾献慧. 指纹图谱在中药质量控制中的应用[J]. 中药材, 2001, 24(10): 763
- [38] 候小平, 何新新, 苏薇薇. 中药指纹图谱质量控制技术[J]. 中药材, 2002, 24(5): 370

(收稿日期: 2002-12-09; 修回日期: 2003-11-17)

(本文编辑 王绪明)