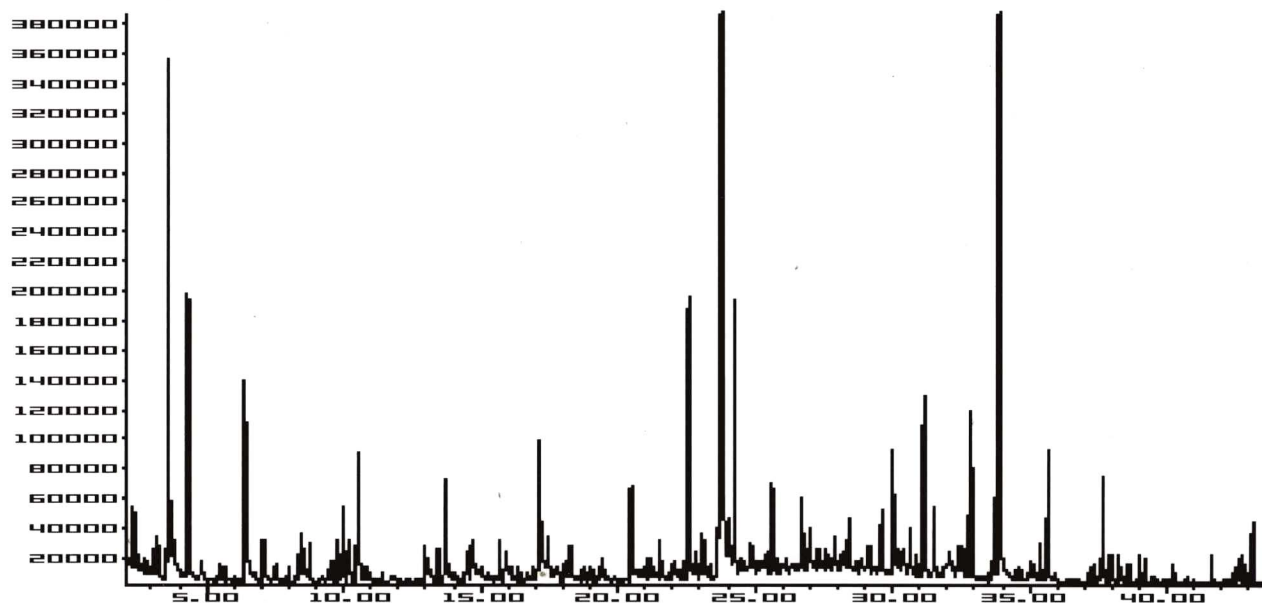
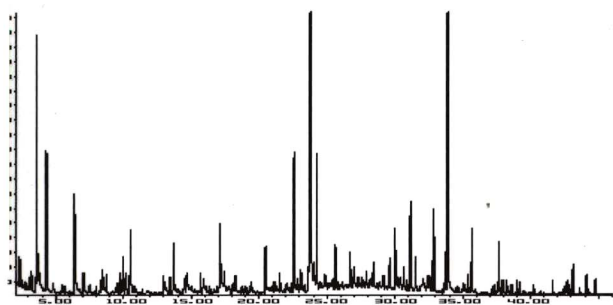




中药色谱指纹图谱技术与应用

ZHONGYAO SEPU ZHIWEN TUPU JISHU YU YINGYONG

王苏静 常世卿 ● 主编

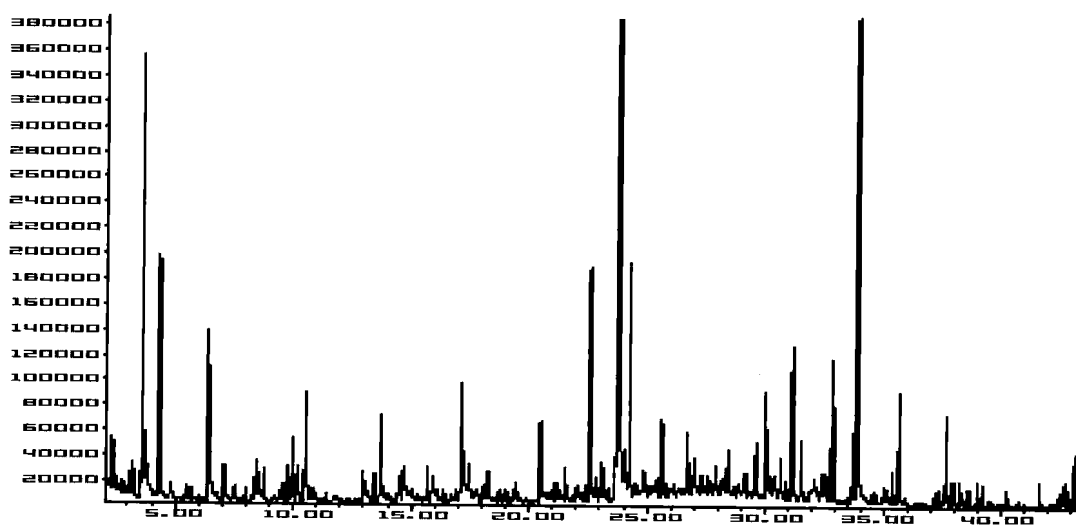


 郑州大学出版社

中药色谱指纹图谱技术与应用

ZHONGYAO SEPU ZHIWEN TUPU JISHU YU YINGYONG

王苏静 常世卿 主编



郑州大学出版社

图书在版编目(CIP)数据

中药色谱指纹图谱技术与应用/王苏静,常世卿主编. —郑州:
郑州大学出版社,2008.9
ISBN 978-7-81106-928-0

I. 中… II. ①王…②常… III. 中药化学成分-色谱法-
研究 IV. R284.1
中国版本图书馆CIP数据核字(2008)第129528号

郑州大学出版社出版发行

郑州市大学路40号

出版人:邓世平

全国新华书店经销

河南新丰印刷有限公司印制

开本:787 mm×1 092 mm

印张:11.5

字数:275千字

版次:2008年9月第1版

邮政编码:450052

发行部电话:0371-66966070

1/16

印次:2008年9月第1次印刷

书号:ISBN 978-7-81106-928-0 定价:28.00元

本书如有印装质量问题,由本社负责调换

编委名单

BIANWEIMINGDAN

主 编 王苏静 常世卿

副主编 赵新杰 夏华玲

编 委 (按姓氏笔画排序)

吴雪峰 张宏都 常 青

马丽萍

前言

QIANYAN

指纹图谱技术应用于植物药质量控制可追溯到 20 世纪 70 年代,主要局限于学术研究的层面,在常规的中药质量标准中,并没有要求指纹图谱,所以对中药产业没有任何触动。因为草药及其制剂是以整体为活性物质,单靠测定某种有效成分来考察质量的稳定性是不够的,采用指纹图谱则可通过其整体性和模糊性来体现。2000 年,我国正式推行中药指纹图谱,国家药品监督管理局下发了《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》,2002 年,国家药典委员会印发了《中药注射剂色谱指纹图谱实验研究技术指南(试行)》,对加强中药注射剂的质量管理,确保中药注射剂的质量稳定可控有巨大的推动作用。

本书作者为多年从事药物开发的研究人员,结合《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》,作者系统介绍了色谱指纹图谱研究的具体方法,并结合自身体会,提出了许多建议,供广大科研工作者参考。

王苏静

2008 年 4 月

目录

MULU

第一章 中药色谱指纹图谱技术	1
第一节 中药色谱指纹图谱的起源	1
第二节 中药色谱指纹图谱建立的意义与原则	3
第三节 中药色谱指纹图谱的局限性	5
一、指纹图谱与药理作用的相关性	5
二、指纹图谱与化学成分的相关性	5
三、指纹图谱与实验条件的一致性	6
参考文献	6
第二章 中药色谱指纹图谱的方法学	7
第一节 薄层色谱法	9
一、器材	9
二、样品的预处理	10
三、展开剂	10
四、其他因素	10
第二节 高效液相色谱法	11
一、色谱柱	11
二、检测器	15
三、供试品溶液的制备	18
四、建立方法	19
五、梯度洗脱	20
六、注意事项	21
第三节 气相色谱法	23
一、填充柱气相色谱	23
二、毛细管柱气相色谱	24
三、检测器	24

四、实验条件的选择	26
参考文献	27
第三章 中药色谱指纹图谱的建立	28
第一节 中药指纹图谱的获取	28
一、研究对象的确定	28
二、供试品的收集	29
三、供试品溶液的制备	31
四、对照品(参照物)溶液的制备	33
第二节 色谱条件的选择	33
一、高效液相色谱	34
二、薄层色谱	35
三、气相色谱	35
第三节 中药色谱指纹图谱的建立	36
参考文献	38
第四章 中药指纹图谱方法验证及相似度评价	39
第一节 中药指纹图谱方法验证	39
一、专属性	39
二、准确度	39
三、精密度	40
四、范围	40
五、稳健性	40
第二节 中药指纹图谱的评价原则	41
一、整体性	41
二、模糊性	41
第三节 中药指纹图谱的评价方法	41
一、数据获取的途径	42
二、相似度计算法	43
三、中药色谱指纹图谱评价软件	44
参考文献	45
第五章 中药色谱指纹图谱的应用研究	46
第一节 白术药材的指纹图谱研究	46
一、仪器与样品来源	46
二、实验方法	46
三、讨论	49
第二节 温莪术挥发油的指纹图谱研究	49
一、仪器及样品来源	49
二、实验方法	49
三、讨论	52

第三节 三七药材的指纹图谱研究	52
一、仪器与样品来源	53
二、实验方法	53
三、讨论	55
第四节 红花药材的指纹图谱研究	56
一、仪器与样品来源	56
二、实验方法	57
三、讨论	59
第五节 葛根的指纹图谱研究	60
一、仪器与样品来源	60
二、实验方法	60
三、讨论	61
第六节 粉葛的指纹图谱研究	62
一、仪器与样品来源	62
二、实验方法	63
三、讨论	66
第七节 当归挥发油的指纹图谱研究	66
一、仪器与样品来源	66
二、实验方法	67
三、讨论	70
第八节 人参总皂苷的指纹图谱研究	70
一、仪器与样品来源	70
二、实验方法	71
三、讨论	72
第九节 香橼的指纹图谱研究	72
一、仪器与样品来源	72
二、实验方法	73
三、讨论	77
第十节 徐长卿的指纹图谱研究	78
一、仪器与样品来源	78
二、实验方法	78
三、讨论	79
第十一节 银柴胡的指纹图谱研究	80
一、仪器与样品来源	80
二、实验方法	80
三、讨论	82
第十二节 荆芥穗药材的指纹图谱研究	82
一、仪器与样品来源	82

二、实验方法	82
三、讨论	85
第十三节 白鲜皮药材的指纹图谱研究	85
一、色谱条件	86
二、对照品溶液及供试品溶液的制备	86
三、测定法	86
四、讨论	87
第十四节 丹参药材及其注射液的指纹图谱研究	89
一、丹参的化学成分	89
二、丹参药材的指纹图谱研究	90
三、丹参注射液中水溶性成分的 HPLC 指纹图谱分析	98
四、讨论	102
第十五节 刺五加 HPLC 数字化的指纹图谱研究	103
一、仪器与样品来源	103
二、实验方法	104
三、讨论	111
第十六节 不同产地穿心莲药材的指纹图谱初步研究	111
一、仪器与样品来源	111
二、实验方法	111
三、讨论	116
第十七节 麦冬的 HPLC 指纹图谱分析方法研究	116
一、仪器与样品来源	116
二、实验方法	116
三、讨论	118
第十八节 银杏叶片剂中银杏黄酮的指纹图谱研究	119
一、仪器与样品来源	119
二、实验方法	119
三、讨论	122
第十九节 穿心莲注射液的生产工艺和指纹图谱	123
一、仪器与样品来源	123
二、实验方法	123
第二十节 筋骨痛消丸的 GC - MS 指纹图谱研究	127
一、仪器与样品来源	127
二、实验方法	127
三、讨论	132
第二十一节 开胸顺气丸的指纹图谱研究	135
一、仪器与样品来源	135
二、实验方法	135

三、讨论	140
第二十二节 银黄胶囊指纹图谱的建立及质量相关性研究	140
一、仪器与样品来源	140
二、实验方法	140
三、讨论	143
第二十三节 注射用双黄连(冻干)指纹图谱的建立	143
一、仪器与样品来源	143
二、实验方法	143
三、讨论	145
第二十四节 注射用广炎灵冻干粉针的指纹图谱研究	146
一、仪器与样品来源	146
二、实验方法	146
三、讨论	148
参考文献	148
附 录	153
附录1 关于印发《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)》的通知	153
附件 中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行)	154
一、注射剂用中药材指纹图谱研究的技术要求	154
二、中药注射剂及其有效部位或中间体指纹图谱的检测标准	157
附录2 关于印发《中药注射剂色谱指纹图谱实验研究技术指南(试行)》 的通知	161
附件 中药注射剂色谱指纹图谱实验研究技术指南(试行)	162
一、供试品收集	162
二、供试品溶液的制备	164
三、参照物	165
四、实验	166
五、色谱指纹图谱的建立和辨认	168
六、色谱指纹图谱的校验和复核	169

第一章 中药色谱指纹图谱技术

第一节 中药色谱指纹图谱的起源

人的“指纹(fingerprint)”鉴定始于19世纪末20世纪初的犯罪学(criminology)和法医学。人的指纹基本有拱形(arches)、环形(loops)和螺纹形(whorls)三种模式,即指纹所具有的共同特性,但每一个人的指纹在微小的细节构造上又各有不同,从共性特征中找出这些“绝对不同”之处,就形成了指纹的“绝对唯一性(absolute uniqueness)”。这种“唯一”的指纹就形成了每个人的特征。法医学要解决的问题是在共性(基本指纹模式)中寻找犯罪嫌疑人指纹的“唯一”特征。

指纹鉴定一般要经过分析(analysis)、比较(comparison)、评价(evaluation)和校验(verification)过程。由于基因学的发展,近代将指纹分析的概念结合生物技术延伸到DNA指纹图谱分析中,而且应用范围从犯罪学扩大到医学和生命科学的领域。指纹分析和DNA指纹图谱分析的主要任务是“鉴别”和“鉴定”。对于中药而言,指纹图谱不同于传统的鉴别之处在于它不是从一个“点”,而是从一个二维的“面”(一个在特定条件下的完整图谱的整体特征信息)来鉴别真伪。同时在定量操作的前提下,得到的“量”方面的信息还可以估量待测样品之间总体“量”的差别,从而从“量”的角度给以动态的质量评价。

指纹图谱(图像)不强调个体的绝对唯一性,而强调同一药材群体的相似性,即物种群体内的唯一性。相似性是通过图谱的整体性和模糊性来体现的。整体性强调的是比较图谱特征的“完整面貌”,而不是将其“肢解”,这样才能在不同环境的样品图谱中搜索和提取与该药材指纹图谱整体“面貌”相关的特征,加以鉴别。模糊性强调的是对照样品与待测样品指纹图谱的相似性,而不是完全相同。所以说指纹特征的整体性和模糊性是中药指纹图谱(图像)分析的最基本的属性。

严格来说,指纹图谱本身不是技术,而是以各种波谱、色谱技术为依托的又一种质量控制模式,与传统质量控制模式的区别,可以比喻为“横看成岭侧成峰”的不同。过去模仿西药(化学药)的模式,只是“侧看”,强调的是“峰”,是孤立地看问题,反映的质量信息是单方面的;指纹图谱则要“横看”,强调的是“岭”,是综合地看问题,也就是强调图谱的“完整面貌”,即整体性,反映的质量信息是综合的。以人参和西洋参为例,无论个体差异有多大,它们总体的图像或图谱作为一个整体去辨认,是很容易区别的;再加上人参含有人参皂苷 Rf,西洋参没有,而西洋参含伪人参皂苷 F11,人参却没有,抓住这几个关键点,即可准确辨认。

指纹图谱技术应用于植物药质量控制可以追溯到 20 世纪 70 年代,主要局限于学术研究的层面,在常规的中药质量标准中,并没有要求指纹图谱,所以对中药产业没有任何触动。随着色谱技术尤其是薄层色谱技术的发展,人们大量运用薄层色谱(thin layer chromatography, TLC)的方法,将植物药中化学成分展开于由各种载体铺成的薄层板上。根据薄层板上斑点的位置(R_f 值)、斑点大小、斑点颜色、斑点数目的多少来进行定性鉴别,这种薄层鉴别方法已经具备了指纹图谱的特征,并被广泛应用。与此同时,高效液相色谱技术得到了长足发展,20 世纪 80 年代及 90 年代,随着植物药中化学成分的分离鉴定、活性成分的不断阐明,人们更多地应用高效液相色谱法进行定性、定量分析。西方国家(如德国、美国、加拿大等)普遍采用高效液相色谱法对植物药中已知及未知组分进行控制,并形成相应的规范。近几年来国内有关学术期刊也刊登了许多应用高效液相色谱法研究指纹图谱的论文,因此高效液相色谱法已成为当前研究指纹图谱的主要手段。

指纹图谱技术在植物药领域的研究方法与研究思路相对成熟,学术界与从事植物药开发和经营的公司已达成共识,普遍接受采用色谱法(HPLC、TLC、GC)或近红外技术(NIR)对植物药中的有效成分进行全成分质量控制(total quality profiling),即指纹图谱技术。然而过去我们在中药新药研究与开发过程中对质量的认识不够重视,普遍采用的是一种粗放的质量控制模式,即规定一个成分的含量、一个或几个成分的定性鉴别实验,显然这种质量控制模式水平较低。另外,中药复方用药的特点、中药产品的复杂性、相关基础研究,尤其是化学与药效学的薄弱,使得中药指纹图谱的研究难度也是不言而喻的,涉及的问题也比较多,尤其是技术问题,这需要在较广泛的范围内和相当长一段时间的实践中才能逐步得到解决。

此外,指纹图谱的推广应用也为东西方如何对待和处理植物药方面的沟通架起了桥梁。以美国食品和药品监督管理局(FDA)为代表的西方,过去将“草药”归入 dietary supplement 管理,现在开始承认它是植物药品,并允许用“指纹图谱”表达市场产品质量的一致和稳定,实施指纹图谱为东西方沟通找到了共同点。2004 年 6 月美国 FDA 发布了《植物药研制指导原则》(Guidance for Industry Botanical Drug Products)。2006 年 10 月 FDA 依据《植物药研制指导原则》批准了自 1964 年 6 月美国颁布新的药品法以来第一个植物药 VeregenTM,它是从绿茶中提取的儿茶素类和其他绿茶组分的混合物。从 FDA 批准 VeregenTM上市的审评报告可以看出,FDA 对待植物药的药学技术要求是不同于化学药的,具有灵活性。化学药的有效成分是能够明确地定性鉴别和定量测定,而由于植物药化学组成的复杂性,植物药有时则不能定性和定量地测定其有效成分,如果经研究证明确实如此,在其申报新药临床研究申请(IND)、申请新药证书或生产申请(NDA)时,可以不提交植物药有效成分的定性鉴别和定量测定资料。但这并不是 FDA 对植物药中不能定性鉴别和定量测定的有效成分放手不管,而是要求申请人通过其他的检测方法,如指纹图谱法、标识成分(不是上述的有效成分)的定性和定量测定以及生物效价测定法加以控制。总之,FDA 批准植物药 VeregenTM的上市对我国中药、天然药物(特别是单味中药药材的提取物)的研发既是机遇也是挑战,也给我们技术评价部门带来不少借鉴和思考,这必然对我国中药、天然药物的创新和现代化有所推动和促进。

现在除美国 FDA 允许草药保健品申报资料可以提供色谱指纹图谱外,WHO 在 1996

年《草药评价指导原则》中已有规定,如在植物药的制备及成品的章节中均提到,如果草药的活性成分不明,可以提供色谱指纹图谱以证明产品质量的一致和稳定。1997年 Kathlee Finn Mendola 在 Nutrition Science News 的《草药生产实验室及实验室标准》一文中提到,草药色谱指纹图谱可以提供复杂成分的定性甚至定量的信息,考察在生产过程中有无变化,或者监测其成分是否与标签声称的内容相一致。欧共体在草药质量指南中也称,单靠测定某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整体为活性物质,色谱指纹图谱尤其薄层色谱鲜明的指纹图谱是很有用的。在欧共体药品注册表格中,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。

国外关于植物药指纹图谱的研究论文也日渐增多,他们提出指纹图谱鉴别,目的是解决成分复杂、有效成分不明的草药检测和证明产品批间质量的稳定。如果草药成分比较简单,如银杏叶中二萜内酯成分主要有银杏内酯(A,B,C,J,M),倍半萜内酯主要有白果内酯,这些内酯成分都有化学对照品,可以实现内酯成分的含量测定;而银杏叶中黄酮类化合物共47个,其中黄酮醇苷24个、黄酮苷5个、黄酮苷元8个、双黄酮6个、儿茶素类成分4个。企业标准只做黄酮醇苷的色谱指纹图谱。国外生产厂家工艺要求比较严格,所以他们研究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、不同时间采集的同一品种草药,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品种、固定产地、固定采收季节和固定加工方法。此外,他们的另一种做法是标准化提取物,不同批次的原料在投料前“勾兑”,或者不同批次的提取物“勾兑”,使最终产品的质量基本稳定在一个水平上[$\pm(5\% \sim 10\%)$]。

从发展的眼光看,指纹图谱研究不应该只停留在显示中药产品表观质量一致这个层面上,中药指纹图谱的研究如果能够结合药效和临床观察,还可以试图通过指纹图谱建立疗效与化学成分的关联。在这一方面,以色谱为例,不应该形而上学地将色谱的各个峰拆开机械地一对一地“峰效结合”,而应该从色谱的整体特征考虑“谱效关系”,利用越来越先进的分析技术、强大的计算机计算功能、化学信息技术等对图谱“解码”,而药效研究也应该针对中药的特点有所创新,互动地阐明“谱”与“效”的关系。

第二节 中药色谱指纹图谱建立的意义与原则

中药指纹图谱鉴别是借用了法医学的指纹鉴定的概念,但不是概念的重复。即由次生代谢产物组成的中药提取物的指纹图谱不仅具备个体的绝对唯一性,更强调的是物种特征的唯一性与同种个体之间的相似性。指纹图谱是以各种光谱、波谱、色谱等技术为依托的一种质量控制模式。指纹图谱不强调个体的绝对唯一性,而强调同一药材群体的相似性,与传统质量控制模式的区别在于:指纹图谱是综合地看问题,也就是强调图谱的“完整面貌”,即整体性,反映的质量信息是综合的。由于植物药的次生代谢产物,即各种化学成分天然潜在的不稳定性,如同日常许多模糊现象一样,它的化学指纹图谱具有无法精密度量的模糊性。“整体性”和“模糊性”是指纹图谱的基本属性,指纹图谱的相似性是通过其基本属性来体现的。指纹图谱分析强调准确的辨认,而不是精密的测量,比较

图谱的相似,而不是相同。在不可能将中药复杂成分都搞清楚的情况下,指纹图谱的作用是反映复杂成分的中药内在质量的均一性和稳定性。综上所述,中药指纹图谱的定义为:运用现代分析技术对中药化学信息以图形(图像)的方式进行表征并加以描述。“表征”是将中药化学信息通过色谱图(液相色谱图、气相色谱图或薄层色谱图)等方式进行表达;“描述”是对指纹图谱经过计算、分析、比较和评价等过程,以技术参数、指纹特征等加以说明。

植物药(包括来源于植物的中药材)的提取物(包括中药的汤剂)与化学合成药最根本的区别是,它(即使是单味药材)是多种化学成分的混合体。这种多种化学成分的综合构成了“中药化学信息”。以中药材而言,经过一个多世纪的植物化学研究和药理药效研究,人们越来越认识到中药的药效不是来自任何单一的活性成分,而基本上是多种活性成分,甚至与“非活性成分”的协同作用或“生克作用”,因此中药中的化学信息具有一定的模糊性。只有部分化学信息(包括已知的活性成分、已知的非活性成分、一部分未知成分)可表征于指纹图谱中。

中药指纹图谱实际是中药(包括中药单味药与中药复方制剂)所含化学成分的整体性表征,它不但是中药整体质量控制手段,而且还是中药种植基地规范化、中药生产标准化的有力监控手段。只有对中药指纹图谱的化学成分建立起快速定性和相对定量分析的新方法,较为全面地探明中药指纹图谱的化学基础,才能解决中药长期处于“丸散膏丹,神仙难辨”的被动局面。

中药指纹图谱研究须经过制备、分析、比较、评价和校验等过程。分析色谱指纹图谱要求“准确的辨认(accurate recognition)”,而不是“精密的测量(precise measurement)”;比较供试品与对照品的指纹图谱是要求“相似(similarity)”,而不是“相同(identity)”。评价比较的结果,是根据指纹图谱的模糊属性(fuzzy feature),着眼于宏观规律的特征分析,即着重辨认完整色谱的“图貌”,而不是求索于细枝末节。分析比较的结果,是对供试品与对照品之间的差异或一致性作出评价。

药物研究的主要内容包括药物的安全性、有效性、稳定性和可控性,四者缺一不可。对已生产并临床应用的注射剂等中成药,由于经过了药效学测试、临床评价,安全性与有效性应不存在问题。然而,现有质量控制方法的不全面性及生产过程中的不稳定性导致各批次产品之间质量出现差异,在临床应用过程中往往出现非正常的医疗事故。指纹图谱研究的直接目的有以下两个方面:第一,对中药质量控制的补充和提高。现有《中华人民共和国药典》质量控制方法及新药申报资料7,往往以1个或2个以上成分为控制指标,在一定程度上反映了原药材、中间体及成品的质量,但任何单一的活性成分或指标成分都难以准确、全面地评价中药质量,不仅不能进行真伪鉴别和优劣判别,有很多情况所检测的指标成分(活性成分)还不具有“唯一性”,如熊果酸、齐墩果酸、大黄酸、人参皂苷Rg1、人参皂苷Rb1等,同属其他植物也均含有该成分;而且使用的器材比较简单,操作也比较粗糙,有时重现性差。《中药注射剂色谱指纹图谱实验研究技术指南(试行)》要求将指纹图谱检测指标及技术要求作为质量标准单列项目,这是对现行中药质量控制方法的有益补充。

另外,一个理想的色谱指纹图谱不仅能达到定性鉴别的目的,而且色谱图中大部分

色谱峰理应达到基线分离,因此对大部分成分应可进行定量分析。即使没有对照品,也可以用已知标准品针对其他未知或无标准品的色谱峰进行定量分析。从这个角度来看,中药指纹图谱是对现行中药质量控制方法的提高。另外还可控制中间体、成品的一致性,减少批间差异。中药生产的原药材,因土壤、气候等环境因素及采收加工的不同,实际使用时不能保证药材质量的稳定,经加工提取得到的中间体,每个批次在成分含量、成分组成及各成分比例方面都不能保持一致。通过色谱指纹图谱研究,可以掌握每一个批次的原药材、中间体中成分的变化,进行有指导的合理“勾兑”,保证成品在成分含量、组成比例上保持一致,减少批间差异。

无论是原药材、中间体还是成品,因组方已固定、生产工艺相对恒定,药品的安全性不可能直接通过色谱指纹图谱来控制,药品的有效性也不可能直接通过指纹图谱来保障,但中药色谱指纹图谱可直接解决中间体、成品的批间一致性及稳定性问题,从而可以间接并最终保障成品的安全性和有效性。

中药色谱指纹图谱的建立,应以系统的化学成分研究和药理学研究为依托,体现专属性、重现性、可行性三个基本原则,保证其标准化,做到统一规范,这样才可以使中药指纹图谱得以推广应用。中药指纹图谱可以全面反映中药所含化学成分的种类与数量,进而反映中药的质量,尤其在现阶段中药的有效成分绝大多数没有明确,采用中药色谱指纹图谱的方式,将有效地表征中药质量。同时指纹图谱也为国际社会所认可,有利于中药及其产品进入国际市场。

第三节 中药色谱指纹图谱的局限性

经过多年来对药理药效和植物化学的研究,特别是近几十年来对中药药效的深入了解,作者进一步认识到中药的药效不是来自单一的活性成分,而是整个中药群体作用的结果,这个中药群体包括含有活性成分的物质数量及组成比例等,它们之间的差异决定了中药的药效。因此,任何单一的活性成分都不能评价中药的真伪和优劣,悠久的中药理论与实际的非线性,要求给出中药质量的综合评价。虽然中药色谱指纹图谱在实现中药物质群体整体性控制方面具有一定的优势,但应用于中药质量控制还存在着一定的局限性。

一、指纹图谱与药理作用的相关性

中药指纹图谱质量控制方法是采用被认定合格的产品或原料的指纹图谱作为比对标准,采用多指标比对的方法来控制中药质量,所以,中药指纹图谱质量控制方法是比较完整地控制了中药的物质群体。然而,指纹图谱与药理作用之间的相关性仍然是模糊的,我们还无法从指纹图谱中解析某一条曲线或者某一段峰所代表的药理作用。

二、指纹图谱与化学成分的相关性

中药指纹图谱质量控制方法的局限性还表现在指纹图谱与化学成分之间缺乏相关性,这主要是由于指纹图谱中色谱峰纯度不够所致。采用色谱分析方法获得的指纹图谱

通常也会将未达到基线分离的色谱峰作为特征组分峰,因此无法检验这些峰的纯度,无法排除不同组分对同一峰的干扰,也不能确定某一组分对该峰的贡献。换言之,当色谱峰的纯度受到质疑时,这些特征组分峰与化学成分的对对应关系是不确定的,不同的指纹图谱可以表示样品之间的差异,但是相同的指纹图谱并不一定能代表彼此具有相同的化学组分,样品的指纹图谱与校准指纹图谱相符并不一定表示样品与标准相符。

三、指纹图谱与实验条件的一致性

中药指纹图谱质量控制方法采用标准指纹图谱作为比对标准,因此可以省去用对照品和做对照实验,这是中药指纹图谱质量控制方法的优点。但是缺少对照品和对照实验却无法保证获得标准指纹图谱实验条件与测定样品的实验条件的一致性。因此,建立在化学成分模糊不清基础之上的中药指纹图谱质量控制方法只能是一种过渡的质量控制手段。

参考文献

- [1]张迪清,何照范. 银杏叶资源化学研究[M]. 北京:中国轻工业出版社,1999
- [2]祝国光. 中药如何进入欧共体市场[M]. 北京:中国医药科技出版社,2000
- [3]姜秋风. 中药指纹图谱[J]. 青海医药杂志,2005,39(9):57-58
- [4]王少坤,燕兰英. 中药指纹图谱应用于中药质量控制的局限性[J]. 药学进展,2001,25(6):352-353
- [5]谢培山. 中药指纹图谱概念—属性—技术—应用[J]. 中国中药杂志,2001,26(10):653-655

第二章 中药色谱指纹图谱的方法学

中药指纹图谱研究所采用的方法大致分为色谱法、光谱法及其他方法。根据研究对象的不同,指纹图谱研究的方法与技术也有所不同。而且,中药指纹图谱的研究也由过去的“四大鉴别”(基原鉴别、性状鉴别、显微鉴别、理化鉴别)方式发生了相应的改变。

色谱法是分析化学领域中发展最快、应用最广的分析方法之一,也是中药指纹图谱最基本的技术。常用的色谱技术包括薄层色谱法(thin layer chromatography, TLC)、液相色谱法(liquid chromatography, LC)、气相色谱法(gas chromatography, GC)、高效毛细管电泳法(capillary electrophoresis, CE)等。各种色谱技术均有其优点和不足,选择何种色谱技术,取决于供试品的性质和研究目的。

采用薄层色谱法的优点是经济、简便、直观,经常应用于中药鉴别,至今仍然是中国药典、英国药典、美国草药典、印度草药典、欧洲药典、德国医学委员会编辑的草药专著等普遍应用的鉴别手段。

薄层色谱法的主要优点有:

- 时效高,同板同时分析的样品多达 18 个。
- 所用的是正相展开剂,组成变化灵活多样,可适应多种成分的分离。
- 色谱图像色彩丰富(可见光及荧光)、直观,同时一些功能团显色剂还可以提示分的类别(如生物碱、黄酮、氨基酸、酚类等),更提高了鉴别专属性,可满足多数中药指纹图谱鉴别的基本要求。

- 离线操作,既可直观比较图谱,又可通过扫描得到轮廓图和处理数据。

同时,薄层色谱也有柱效低、受环境因素影响大、重现性不好等缺点。

液相色谱法是最常用的指纹图谱研究方法,其中高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)具有分离效能高、选择性高、检测灵敏度高、分析速度快、应用范围广等特点。由于中药样品中含有的成分绝大多数均可在高效液相色谱仪上进行分析检测,且在该领域已有几十年的应用经验,因此高效液相色谱法在中药质量控制中具有极其重要的位置,中药指纹图谱研究应优先考虑高效液相色谱法。

气相色谱法主要用于分析气体、挥发性和半挥发性液体以及能够产生足够蒸汽压的固体,或者沸点在 500 ℃ 以下、相对分子量在 400 以下的物质。在中药质量控制中主要用于挥发油、极性较小的成分或衍生后可挥发性成分(如脂肪酸的酯)。该方法分离效能高、分析速度快、灵敏度高,气相色谱能够提供保留值信息,与质谱联用,还可以提供更丰富的化学结构信息。气相色谱法定量分析的精度优于 1%,但分析范围只局限于低沸点成分是其主要不足之处。该方法为中药指纹图谱研究的主要方法之一。

光谱法包括紫外光谱法(UV)、红外光谱法(IR)、近红外光谱法(NIR),另外还采用