

高效液相色谱法

在中药规范化 研究中的应用

沙 明 曹爱民 著
孟宪生 杨松松

辽宁科学技术出版社

· 沈阳 ·

内容提要

高效液相色谱法是具有分离效率高、分析速度快、灵敏度高、重现性好的分析技术,在中药质量规范化评价中占有重要地位。本书分上、下篇。上篇介绍高效液相色谱法在中药质量规范化研究上的理论与实践。下篇介绍中药独活质量规范化研究应用实例,涉及高效液相色谱法的指纹谱分析、重金属测定、药代动力学研究及液-质联用技术。全书内容新,详尽实用。内容全部为作者的研究成果,可供中药检验、中药分析研究、生产企业中有关技术人员参考使用。

前 言

高效液相色谱技术在中药质量规范化评价中占有重要位置。该技术具有分离效率高、分析速度快、灵敏度高、重现性好的特点,同时兼有分离和分析两种功能,可以鉴别中药真伪,区别类同品,控制剧毒药的微量成分限度。它既可对已知有效成分的品种定性定量,又可对成分未明确或成分复杂的品种进行特征性成分分析或进而作指纹图谱分析,20年来,该项技术在中药材及中药新药质量控制上得以广泛应用。

针对高效液相色谱法应用于中药质量评价中存在的理论与实践问题,我们编写了《高效液相色谱法在中药规范化研究中的应用》,本书试图通过高效液相色谱法对20种中药的质量评价及对中药独活药材质量标准的规范化研究来解决高效液相色谱法对中药未知成分定性的可行性,高效液相色谱法方法回收率的可操作性,高效液相色谱法对样品前处理的要求,高效液相色谱法流动相系统的优选等诸多与规范化要求有关的技术问题,目的在于提高高效液相色谱法应用中药质量评价过程的科技含量,保证运用该方法结果的真实性。

本书应用高效液相色谱法进行指纹谱的聚类分析、重金属分析、药代动力学研究及液相色谱—质谱联用技术,为中药质量规范化研究作了大量实用的探索。内容系统新颖,具有可操作性,面向从事色谱工作及中药教学、研究、质量检验等人员。

本书涉及的实验,承蒙刘桂芳、郑太坤、王冰、梁茂新、朱新生、富伟能等老师的指导与帮助。张振学、杜树山、徐兴家、穆培、董黎、张文军、马学敏、闻亮、陈立君、刘井良、陈剑峰等协助完成了部分实验工作,在此一并表示感谢。

2 高效液相色谱法在中药规范化研究中的应用

由于我们水平和实验材料有限,书中难免有不足及错误,敬请读者指正。

著者

2000年3月

目 录

上篇 高效液相色谱法用于中药质量标准方面的规范化研究

第一章 高效液相色谱法用于中药质量规范化研究上的思考	3
一、高效液相色谱法在中国药典(一部)上应体现出特殊性和权威性	4
二、高效液相色谱法检测的指标应体现与中医治疗功能主治相一致的药理活性	7
三、高效液相色谱法用于中药检测应考虑多指标性	8
四、高效液相色谱法对中药材及成药质量的评价应不断提高专属性	10
五、高效液相色谱法对中药材及成药质量的评价应坚持科学性和可操作性	12
六、高效液相色谱法对中药材及成药的质量评价应立足于灵活性和创新性	14

第二章 高效液相色谱法用于中药质量规范化研究上的实践	16
一、高效液相色谱法测定牛蒡子中牛蒡子甙的含量	16
二、高效液相色谱法测定地榆中金丝桃甙的含量	24
三、高效液相色谱法测定地榆中没食子酸的含量	29

2 高效液相色谱法在中药规范化研究中的应用

四、高效液相色谱法测定朝鲜淫羊藿中淫羊藿甙的含量	32
五、高效液相色谱法测定朝鲜淫羊藿中绿原酸的含量	35
六、高效液相色谱法测定朝鲜淫羊藿中金丝桃甙的含量	38
七、高效液相色谱法测定朝鲜淫羊藿中木兰碱的含量	42
八、高效液相色谱法测定苦杏仁中苦杏仁甙的含量	45
九、高效液相色谱法测定决明子中大黄酚的含量	48
十、高效液相色谱法测定肉豆蔻中丁香酚类成分的含量	51
十一、高效液相色谱法测定肉豆蔻中肉豆蔻醚等的含量	55
十二、高效液相色谱法测定莲须中槲皮素和山萘酚的 含量	58
十三、高效液相色谱法测定白花前胡中白花前胡丙素 的含量	63
十四、高效液相色谱法测定痔必消软膏中苦参碱的含量	68
十五、高效液相色谱法测定紫草及含紫草成药中左旋紫草素 的含量	73
十六、高效液相色谱法测定化可宁颗粒中异补骨脂素的 含量	78
十七、高效液相色谱法测定出血止颗粒中芦丁的含量	82
十八、高效液相色谱法测定乳块消颗粒及橘叶中橙皮 甙的含量	86
十九、高效液相色谱法测定延生护宝液中蛇床子素的含量	90
二十、高效液相色谱法测定正心泰颗粒剂中葛根素的含量	95
二十一、高效液相色谱法测定人工蛹虫草子实体中虫草 素的含量	100
二十二、高效液相色谱法测定长宝心胶囊中血竭素 的含量	104
二十三、高效液相色谱法测定龙羌济生胶囊中黄芩甙 的含量	109
二十四、高效液相色谱法测定洋参保肺颗粒中罂粟碱的	

含量	113
二十五、高效液相色谱法测定橘红化痰片中柚皮甙的	
含量	116
下篇 中药独活质量标准的规范化研究	
第三章 综述	123
第四章 独活药材鉴别专属性的综合研究	126
一、独活药材及几种同属植物的粉末显微鉴别研究	127
二、独活药材及部分同属植物的高效液相色谱指纹图与聚	
类分析鉴别研究	136
三、高效液相色谱—质谱联用技术对独活及部分同属植物	
的鉴别研究	165
四、独活药材及几种同属植物的 DNA 指纹鉴别研究	182
第五章 独活药材品质定量评价的综合研究	187
一、高效液相色谱法对独活药材的定量评价研究	188
二、薄层扫描法对独活药材的定量评价研究	208
三、荧光分光光度法对独活药材的定量评价研究	221
四、紫外分光光度法对独活药材总香豆素的定量评价	228
五、聚类分析与数学判别法对独活药材质量的综合评价	
研究	238
第六章 独活及羌活质量评价用对照品的分离研究	274
第七章 高效液相色谱—荧光法测定血浆中独活香豆素及	
药代动力学研究	328

第八章	高效液相色谱法对独活药材中重金属含量的测定研究	352
第九章	羌活及含独活、羌活成药的质量评价研究	361
参考文献		373

上篇

高效液相色谱法 用于中药质量标准 方面的规范化研究

第一章

高效液相色谱法用于中药质量规范化研究上的思考

我们已经跨入 21 世纪,中国将对人类做出更大的贡献,其中,中医中药事业应当得到进一步发展。生命科学对 21 世纪的科学发 展产生的重大影响,又使中医药这一古老学科面临新的挑战。要使中医药走向世界,中药学研究应以提高中药材及成药的质量为主要目的,其任务之一就是采用先进手段开展中药材及成药质量标准的规范化研究,而这种研究应当在中医药理论指导下进行,研究思路应当全面反映中药材及成药的内在质量。高效液相色谱法是对中药材及成药质量实行规范化评价的有效手段之一。由于该法具有分离效率高、分析速度快、灵敏度高、重现性好的特点,20 年来,在中药材及成药质量控制上得以广泛应用。

然而,在采用高效液相色谱法对中药质量进行评价中,还有许多理论与实践问题需要研究解决,大量的研究还是分散的,缺乏系统分析研究。特别是应用高效液相色谱法时,如何考虑中药的特殊情况,坚持实事求是,寻求带有规律性的问题,尤其显得至关重要,因而规范化研究势在必行。本研究试图通过高效液相色谱法对二十几种中药的质量评价来解决高效液相色谱法对中药未知成分定性的可行性;高效液相色谱法方法回收率的

可操作性,高效液相色谱法对样品的前处理的要求,高效液相色谱法流动相系统的优选等诸多与规范化要求有关的技术问题。目的在于推进高效液相色谱法应用于中药的质量评价,保证运用该方法结果的真实性和可靠性。总而言之,应用高效液相色谱法对中药及成药进行质量控制,只有考虑中药的特殊情况,发挥出该法的优势,才能对中药及成药进行客观、全面的评价。

一、高效液相色谱法在中国药典(一部) 上应体现出特殊性和权威性

现行中国药典 1995 年版一部共收载中药 920 种,其中药材 522 种,中成药 398 种,收载含量测定的品种为 157 种,占收载总数的 17%,其中高效液相色谱法 11 个,仅占收载总数的 1.19%,而采用高效液相色谱法对中药品种进行鉴别的项目尚属空白。

笔者曾参加过 1995 年版药典培训班学习,会上,药典委员会的专家曾就起草 1995 年版药典的原则进行过说明。1995 年版药典二部(西药部分)本着立足赶超,一部(中药部分)本着立足特色的原则,因此 1995 年版二部采用高效液相色谱法的品种的数量剧增,而一部由 1990 年版的 4 个品种仅增加到 11 个。当时中药新药研制起草的质量标准采用高效液相色谱法的品种远远超出药典收载的数量。到会的基层药检工作者对高效液相色谱法的规范化操作问题给予极大的关注,但当时国家没有权威性的指导细则。

时隔几年,我们在承担“九五”攻关课题《独活质量标准规范化研究》课题过程中,国家药典委员会对拟上 2000 年版药典品种含量测定项目提出了技术要求。明确了高效液相色谱法作为含量测定的首选方法,不再提倡采用分光光度法或薄层洗脱法,

同时对应用高效液相色谱法测定指标性成分的专属性提出了严格的要求。这些技术要求的变化,无疑将推动高效液相色谱法在中药质量标准研究上的规范化进程。

药典采用高效液相色谱法的品种具有的权威性是显而易见的,因为申报中药新药的任何品种,如果成药中选定的定量检测指标为药典收载过的品种,常以药典为准。辽宁中医学院中药系申报的中药四类新药《橘红化痰片》的定量指标选定了君药橘红,采用高效液相色谱法测定了其中柚皮甙的含量,在辽宁省药品检验所复核检验时,结果重现性良好。但在药材名称上出现了问题,药典一部化橘红项下采用高效液相色谱法测定了柚皮甙含量,而橘红项下无定量指标,经文献检索,橘红中并不含有柚皮甙,只有橙皮甙,因为柚与橘是不同的品种。因而,最终以药典为准,处方的橘红改为化橘红,这一实例反映了药典的权威性,也更正了地方品种名称的不规范现象。

胡椒是药典一部采用高效液相色谱法做含量测定方法的又一品种。辽宁中医学院中药系与大连中药厂起草的中药三类新药《海洋胃药》质量标准中,用滴定法测定该制剂中明矾——硫酸铝钾的含量。国家药审中心认为复方制剂采用滴定方法缺乏专属性,建议增加定量指标,我们采用高效液相色谱法测定该制剂胡椒中的胡椒碱的含量,由于也是药典中收载的定量方法,顺利得到药审和药检部门的认可,这也证明了药典确定某一品种含量测定方法的权威性。

但是,药典的权威性更应以中药品种的特殊性来体现,由于中药为检测指标含量在1%以下的混合物,与西药的纯化合物的检测有很大不同。因此,药典一部在附录高效液相色谱法的要求上,除与二部相同的部分外,应有特殊的要求,才能体现出中药特色。

理想的情况应当是一药一规范。同样采用高效液相色谱法,视不同品种区别对待,对方法学做实事求是的评价,有利于

检测结果的真实性。目前应用高效液相色谱法,一方面要求样品前处理,避免污染色谱柱,操作方法繁杂;而另一方面药典及新药审批办法都规定方法回收率需大于 95%,致使某些检测结果不可能反映药材的实际情况,甚至有造假行为。

由于药典收载的采用高效液相色谱法的品种偏少,因而对形成规范化的标准尚有一定距离。首先选择指标性成分的专属性和全面性还有不足,如化橘红与骨碎补同选择柚皮甙作为定量指标,专属性不强。丹参虽然选择了丹参酮 II A 作为检测指标,但由于该指标脂溶性强,许多成药为水煎煮,有的虽采用醇提取,但基本上损失量较大,如果将丹参活性成分丹参素及原儿茶醛考虑进去,有可能全面评价其质量。

其次,限度范围应比化学合成药要宽,因为中药的生物变异性很大,应做大样本分析才能确定限度,现行药典丹参规定丹参酮 II A 不得低于 0.2%。我们抽样分析,有相当一部分样品不合格,但仍然在市场上流通。另外,黄芩为常用中药,90 年版药典规定黄芩甙含量不得低于 4%,1995 年版药典规定黄芩甙含量不得低于 9%,我们做了大量研究,达到 9% 含量的黄芩药材并不多见,分析原因,是在炮制加工中有水解问题。然而,中药新药审批过程中,常以药典规定的限度来考查新药研制工艺的合理性,常常是水提取工艺样品与醇提取标准进行比较,很难得出正确结论。实质上,反映了药典起草中是否考虑中医理论和中医用药习惯的问题。

同时,药典上规定的测定条件也不够严密,例如黄芩甙测定时,选定波长为 280nm,这与实测的最大吸收波长不符,使申报者无法遵循。再者,对柱效规定还不规范,柱效 2000 并不注明柱长,很难统一。

为维护药典的权威性,上药典的品种需经过更多的单位复核、修正,才具有可操作性和指导性。

二、高效液相色谱法检测的指标应体现与中医治疗功能主治相一致的药理活性

一味中药本身就是一个小复方,如果组成复方制剂,情况就更为复杂。复杂样品中微量成分的检测始终是中药分析工作者十分困难的问题。利用高效液相色谱法的分离效能,在中药及制剂中寻找指标性成分,筛选色谱条件,以便获得满意的分离度,继而建立分析方法,是目前质量评价的基本思路。然而指标性成分并不一定是代表该药材基本功能主治的活性成分,制定质量标准,活性成分的指标控制是关键。同时,指标具有多样性。一味中药本身就有多种药理作用,在中医用药原则上,一味中药也有多种治疗功能,因而,活性指标确立应考虑中医的特色。

例如中药淫羊藿,药典中功能主治为用于治疗阳痿遗精、风湿痹痛、更年期高血压症,临床上还常用其治疗支气管炎。在对淫羊藿进行质量评价时,我们就考虑到指标性成分应选择活性成分,而且这些活性成分又应当与其功能主治相一致。尽管有一定难度,但经过大量实验,摸索条件,使多项活性指标的检测获得成功。这些指标是:①提高冠脉血流量以治疗阳痿的淫羊藿甙;②有强烈镇痛作用以治疗风湿痹痛的金丝桃甙;③有降压作用以治疗更年期高血压的木兰碱;④有抗炎作用以治疗支气管炎的氯原酸。这些方法的建立,发挥了高效液相色谱的分离优势,而多项活性指标的检测,又使淫羊藿的质量得以全面评价。国际上对银杏叶制品质量提出了控制黄酮即槲皮素、山萘酚和异鼠李素的含量,内酯的含量及有机酸的限量,并采用高效液相色谱法作为测定方法,也反映了对中药提取物全面控制的概念。中药的质量评价借鉴国际惯用做法,才有利于尽快与国

际新药研制要求接轨。

同样,同一味中药,在不同的复方制剂中,功能主治也有所不同。例如中药山楂的主要活性成分为黄酮和有机酸,在治疗心血管疾病的新药质量控制上,常要求测定山楂中黄酮的含量;而健胃消食新药中常测定山楂中有机酸的含量。因此,我们在起草山楂降压片质量标准中,曾采用高效液相色谱法测定山楂中金丝桃甙的含量;在小儿胃宝口服液中就采用高效液相色谱法测定山楂中绿原酸的含量,也是基于活性成分与该药功能主治相吻合的要求。这也是高效液相色谱法应用于中药质量控制上规范化的需要。

三、高效液相色谱法用于中药 检测应考虑多指标性

目前,仍有相当一部分中药材指标性成分不明确,国家下发的对照品只能针对部分药材进行指标性成分的检验,药学工作者还需花气力从中药材中继续分离新的指标性成分。然而,考虑到某一中药不是一种纯化学物质,而是多种成分的整体药物的存在。因此,采用整体的多指标性成分的分析方法或进而作指纹图分析的方法来控制和评价药材及成药的质量有利于中药研究的科学化和检验结果的客观化,高效液相色谱法是实现这一设想的有效方法。

例如,我们在承担国家“九五”攻关课题《独活质量标准的规范化研究》过程中,就从多指标成分检验考虑,由于独活为常用祛风湿药,中国药典 1995 年一部尚未收载含量测定项。因此,我们从独活中分离出 7 个香豆素化合物,并选择其中的甲氧基欧芹素、二氢欧山芹醇、二氢欧山芹醇醋酸酯和花椒毒内酯为指标性成分,采用高效液相色谱法,流动相为甲醇—乙腈—0.025

mol/L 磷酸的最佳配比,对独活药材进行定量测定,四个指标性成分的色谱峰基本可以得到基线分离。利用这些指标性成分的色谱峰还可对那些尚不明确的色谱峰进行间接定量,以实现全成分分析的实验设计,采用这种方式,对全国三十个地区的独活饮片进行分析,使其质量得以全面评价。

有些药材在尚未进行指标性成分分离研究的情况下,更有必要采用指标性成分与未知成分相结合的测定方式。例如:地榆为凉血止血的常用中药,含有多种化学成分,主要为鞣质,中国药典规定测定总鞣质含量以控制其质量。我们首先采用高效液相色谱法测定了地榆中没食子酸的含量,使地榆的鞣质定量指标更具体化,接着,根据地榆含有黄酮的报道,通过色谱分析发现,在规定的色谱条件下,有 3 个色谱峰十分显著,且分离度良好。通过实验证明,其中一个峰为金丝桃甙。然后,以该成分为指标性成分,其它两个色谱峰面积与金丝桃甙色谱峰面积进行比较,间接测定相对含量,并推广到多个地区地榆饮片的考查,对其质量真伪优劣的评价十分有意义。

在采用高效液相色谱法起草中药新药定量标准时发现,现行药典中成药的含量测定多数只规定一个指标,新药审批办法也不成文地规定,有一个含量测定项即符合要求,这种导向对剂型改革的中药新药的质量的综合控制带来负面影响。我们曾对某一四类新药(已批产)进行指标性成分检测,结果发现君药白芷中无法检出欧前胡素,连翘中无连翘甙,葛根中也测不出葛根素,这至少向我们提示,由丸剂原粉入药改革成提取物制剂过程中将这些指标性成分全部丢失,工艺上缺乏合理性。因而,成药质量控制也必须采用多项指标检测才能保证该药的可靠疗效。我们在起草中药三类新药化可宁颗粒质量标准中,首先确定了多项可控指标,提取工艺设计必须保证指标性成分的含量,并对处方中所有可能检测的指标均采用高效液相色谱法进行测定,包括补骨脂中异补骨脂素、丹参中丹参酮 II A、金银花中绿原