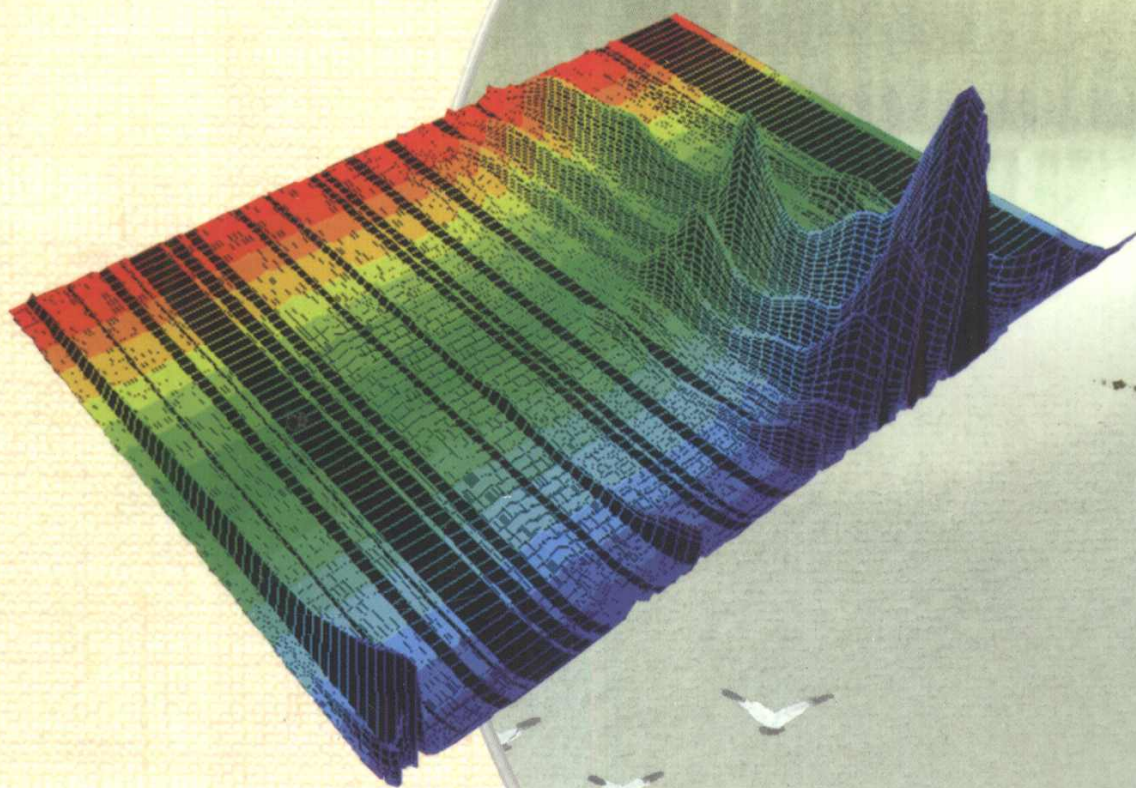


中药指纹图谱 研究技术

主 编 周玉新
副主编 雷海明 徐永红
魏璐雪 许效枫



化学工业出版社

R228.4.1

278

中药指纹图谱研究技术

主 编 周玉新

副主编 雷海明 徐永红 魏璐雪 许效枫

审 校 徐美珍 李家实 袁永生

化 学 工 业 出 版 社

· 北 京 ·

(京) 新登字 039 号

图书在版编目 (CIP) 数据

中药指纹图谱研究技术/周玉新主编. —北京: 化学工业出版社, 2002. 8

ISBN 7-5025-3991-3

I. 中… II. 周… III. 中药化学成分-分析 (化学)-图谱-研究 IV. R284. 1

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2002) 第 053156 号

中药指纹图谱研究技术

主 编 周玉新
副主编 雷海明 徐永红 魏璐雪 许效枫
审 校 徐美珍 李家实 袁永生
责任编辑: 叶 露 郎红旗
责任校对: 李 丽
封面设计: 张 昊

*

化学工业出版社出版发行
(北京市朝阳区惠新里 3 号 邮政编码 100029)
发行电话: (010) 64982530
<http://www.cip.com.cn>

*

新华书店北京发行所经销
北京市云浩印刷厂印刷
三河市东柳装订厂装订
开本 850×1168 毫米 1/32 印张 5 $\frac{3}{4}$ 字数 96 千字
2002 年 8 月第 1 版 2002 年 8 月北京第 1 次印刷
ISBN 7-5025-3991-3/R·119
定 价: 35.00 元

版权所有 违者必究

该书如有缺页、倒页、脱页者, 本社发行部负责退换
京工商广临字 2002—21 号

序

色谱技术作为分离分析科学，已有近一个世纪的发展过程。进入 20 世纪以来，随着对植物化学的深入研究及植物药产品的开发应用，色谱技术尤其是高效液相色谱技术在植物药质量控制上得以广泛应用。美国 FDA 及欧共体药审委（EMA）对进口植物药产品均要求采用指纹图谱技术以保证其产品质量的一致。国家药品监督管理局陆续颁布了《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求》（暂行）、《中药注射剂色谱指纹图谱实验研究技术指南》（试行），有力地促进了中药质量控制的提高与完善，并有利于中药产品进入国际市场。

作者在实际研究与应用的基础上，结合中药注射剂指纹图谱研究的实际需要，编著了《中药指纹图谱研究技术》一书，其内容新颖、实用。书中不仅介绍了指纹图谱研究过程中的关键问题及解决的策略，还结合实例介绍了指纹图谱研究的详细内容，另外还对指纹图谱的热点问题“指纹图谱相

似度评价”从理论与应用的角度作了详细介绍。该书适合药厂、科研单位、药检所等广大科技工作人员使用，可作为医药院校的参考教材，亦可作为医药专业人员继续教育的教材。

A handwritten signature in black ink, appearing to read '屠鹏飞' (Yu Pengfei), written in a cursive style.

屠鹏飞 2002 年 6 月 5 日



作者简介

周玉新，男，1966年生于江苏泰兴。1986年~1990年就读于沈阳药学院，化学制药专业。1992年~1995年就读于沈阳药科大学，药物化学专业，硕士。1995年~1998年就读于沈阳药科大学，药物化学专业，博士。1998年~2000年于北京中医药大学从事中药学博士后研究工作。现就职于北京禾谱康天然药物技术开发有限公司，从事中药新药研究开发、中药质量控制、中药指纹图谱研究工作。

目 录

第 1 章 中药指纹图谱技术与中药质量控制	1
1.1 指纹图谱的起源与发展	1
1.2 中药指纹图谱的定义	3
1.3 中药指纹图谱与中药安全、有效、稳定和可控的关系	5
1.4 中药指纹图谱建立的意义与原则	7
1.5 国外植物药指纹图谱的应用	9
第 2 章 中药指纹图谱研究方法学	13
2.1 常用指纹图谱研究的方法与技术	13
2.2 指纹图谱研究常用的仪器与设备	17
2.2.1 薄层扫描仪	17
2.2.2 高效液相色谱仪	18
2.2.3 气相色谱仪	20
2.3 指纹图谱研究对高效液相色谱仪的要求	23
2.3.1 柱外效应	23
2.3.2 流动相的脱气	24

2.3.3	梯度洗脱	24
2.3.4	样品进样	25
2.3.5	色谱柱	26
2.3.6	柱温	26
2.3.7	检测器	27

第3章 中药色谱指纹图谱研究过程中的关键问题 31

3.1	方案设计与思路	32
3.1.1	研究对象的确定	32
3.1.2	研究方法的选择	33
3.1.3	研究内容	34
3.2	原药材、中间体及注射剂样品选择与收集	34
3.3	原药材、中间体及注射剂的预处理	36
3.4	色谱条件选择	37
3.4.1	流动相	37
3.4.2	检测波长	38
3.4.3	柱温	38
3.4.4	色谱柱	39
3.4.5	进样量	39
3.4.6	色谱条件的优化	40
3.5	指纹特征选择	40

第4章 中药色谱指纹图谱研究示例 43

4.1 复方丹参注射液（香丹注射液）色谱指纹图谱

研究示例	43
4.1.1 复方丹参注射液丹参药材指纹图谱检测标准	46
4.1.2 复方丹参注射液丹参药材指纹图谱检测标准 起草说明	47
4.1.3 复方丹参注射液指纹图谱检测标准	51
4.1.4 复方丹参注射液指纹图谱检测标准起草说明	52
4.1.5 复方丹参注射液中间体指纹图谱检测标准	56
4.1.6 复方丹参注射液中间体指纹图谱检测标准起草说明	57
4.2 含三七主成分注射液色谱指纹图谱研究示例	61
4.2.1 方案设计与思路	61
4.2.2 研究资料	62
4.2.3 血塞通（血栓通）注射液指纹图谱检测标准草案 ...	70
4.2.4 三七总皂苷中间体指纹图谱检测标准草案	71
4.2.5 三七原药材指纹图谱检测标准草案	71
4.3 常用中药材及（复方）制剂色谱指纹图谱介绍	71
4.3.1 冬虫夏草	72
4.3.2 淫羊藿	73
4.3.3 其他原药材、中间体指纹图谱	73
4.3.4 中药复方制剂益肾灵胶囊指纹图谱研究	90
4.3.5 中药注射剂成品指纹图谱研究经验	90

第5章 中药色谱指纹图谱的建立与评价 107

5.1 对照指纹图谱的建立与指纹图谱评价	108
----------------------------	-----

5.1.1	有关技术参数的计算公式	108
5.1.2	中药色谱对照指纹图谱的建立与中药色谱指纹 图谱评价的原则	109
5.2	对照指纹图谱的建立方法	111
5.2.1	对照指纹图谱的建立模式	111
5.2.2	对照指纹图谱（共有模式）算法	111
5.3	指纹图谱评价方法	112
5.3.1	评价指标	113
5.3.2	引用变量	113
5.3.3	数据获取途径	114
5.3.4	相似度算法	115
5.3.5	相似度计算公式的优化	116
5.4	计算机辅助中药色谱指纹图谱评价软件	116
5.4.1	指纹图谱评价软件	116
5.4.2	指纹图谱评价软件应用示例	118
5.4.3	应用中的注意事项	124
参考文献		127
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		129
附录 2 中药注射剂指纹图谱研究的技术要求（暂行）		131
附录 3 中药注射剂色谱指纹图谱实验研究技术 指南（试行）		145

第 1 章 中药指纹图谱技术与中药质量控制

1.1 指纹图谱的起源与发展

现代“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) 和螺旋形 (whorls) 3 种模式,即指纹所具有的共同特性,而每一个人的指纹在微小的细节构造上各有不同,这种“惟一”的指纹就形成了可以据以鉴别每个人的特征。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“惟一”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,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”。

指纹图谱技术应用于植物药质量控制可以追溯到上个世纪 70 年代初,随着色谱技术尤其是薄层技术的发展,人们大量采用薄层色谱(thin layer chromatography, TLC)的方法,将植物药中化学成分展开于由各种担体铺成的薄层板上。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特征,并被广泛应用。我国“七五”^[1]、“八五”^[2]、“九五”期间有关中药质量标准化研究攻关课题中均采用薄层鉴别方法。我国 1990 年版^[3]、1995 年版^[4]及 2000 年版《中华人民共和国药典》^[5]中大量采用薄层鉴别的方法,以标准品或标准药材为对照进行定性鉴别列于【鉴别】项下。20 世纪 70 年代及 80 年代,由于薄层扫描仪的出现,使得薄层鉴别方法得到进一步发展,日本和我国部分学者用当时的薄层扫描仪得到的复方成药扫描图谱作为色谱指纹图尝试应用于药材及成药分析。现代新型的薄层扫描仪还配备有自动点样系统、成像系统、数据处理系统,可将薄层板色谱结果转变成类似于液相的色谱图,薄层扫描色谱图与薄层色谱结果结合,相得益彰,使得薄层扫描技术成为指纹图谱研究的主要方法之一。

与此同时,高效液相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。最近几年国内有关学术期刊也刊登了一些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。

1.2 中药指纹图谱的定义

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色谱指纹图谱不仅具备个体的绝对的惟一性，更强调的是物种特征的惟一性与同种个体之间的相似性。因此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。

现代分析技术：

“现代分析技术”包括光谱、波谱、色谱、核磁共振、X射线衍射及各种技术的联用等。

中药化学信息：

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。

表征和描述：

“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、评价等过程，以技术参数、指纹特征等加以说明。

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色谱指纹图谱是要求“相似（similarity）”，而不是“相同（identity）”；评价色谱比较的结果，是根据色谱指纹图谱的模糊属性（fuzzy feature），着眼于宏观的规律的特征分析，即着重辨认完整色谱的“图貌”，而不是求索细枝末节。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。

1.3 中药指纹图谱与中药安全、有效、稳定和可控的关系

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。对已生产并临床作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。

(1) 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（“关于质量标准研究”），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“惟一性”，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，操作比较粗糙，有时重现性差。《中药注射剂指纹图谱研究的技术要求》（暂行）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，也可以已知标准品针对其他未知或无标准品的色谱峰进行定量。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。

（2）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。它们相互之间的关系如图 1-1 所示。

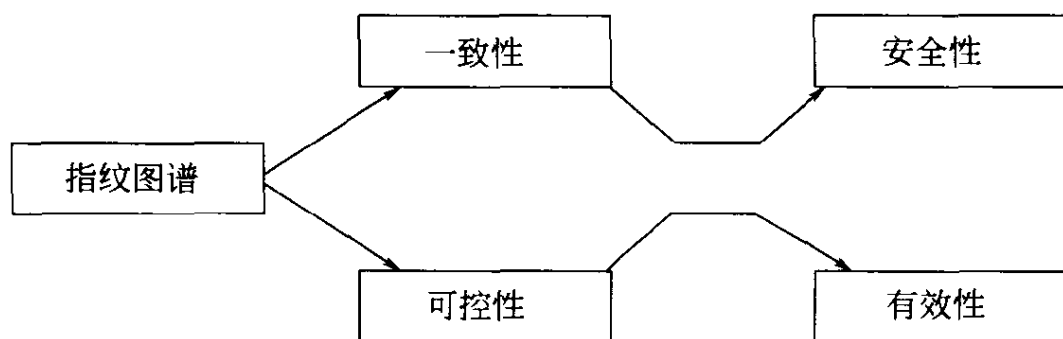


图 1-1 指纹图谱的作用

1.4 中药指纹图谱建立的意义与原则

中药指纹图谱建立的是全面反映中药所含内在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。

中药指纹图谱的建立，应以系统的化学成分研究和药理学研究为依托，应体现**系统性、特征性、重现性**三个基本原则。

系统性：

“系统性”是指指纹图谱所反映的化学成分应包括中药有效部位所含大部成分的种类，或指标成分的全部。如中药人参中所含的有效成分多为皂苷类化合物，则其指纹图谱应