

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（Rf 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 R_{g1} 、人参皂苷 R_{b1} 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。

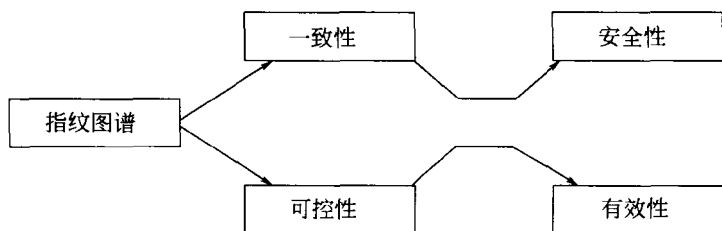


图 1-1 指纹图谱的作用

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

尽可能多地反映其中的皂苷成分；银杏叶的有效成分是黄酮和银杏内酯类，则其指纹图谱可采用两种方法针对这两类成分，分别分析，以达到系统、全面的目的。

特征性：

“特征性”是指指纹图谱中反映的化学成分信息（具体表现为保留时间或位移值）是具有高度选择性的，这些信息的综合结果，将能特征地区分中药的真伪与优劣，成为中药自身的“化学条码”。如北五味子的高效液相色谱（high performance liquid chromatography, HPLC）指纹图谱和薄层色谱（TLC）指纹图谱，不仅包括多种已知的五味子木脂素类成分，而且还有许多未知成分，这些成分之间的顺序、比值在一定范围内是固定的，并且随药材品种的不同而不同。通过这些整体信息，可以很好地区分北五味子与南五味子以及其他来源的五味子药材，判别药材的真伪与优劣。

重现性：

“重现性”是指所建立的指纹图谱，在规定的方法与条件下，不同的操作者和不同的实验室应能作出相同的指纹图谱，其误差应在允许的范围内，这样才可以保证指纹图谱的使用具有通用性和实用性，也是作为标准方法所必备的特征之一。实现指纹图谱的重现性，除在样品制备方法、分析过程、结果处理等环节规范操作外，还应建立相应的评价机构，对指纹图谱进行客观评价，并公布标准指纹图谱。

实现中药指纹图谱的三原则，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。

1.5 国外植物药指纹图谱的应用

现在已为大家所熟知的美国 FDA 允许草药保健品申报资料可以提供色谱指纹图外，对此 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。

Kathleen Finn Mendola 于 1997 年在 Nutrition Science News 的草药生产厂的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一致。

欧共体对草药质量的指南中也称，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的鲜明的指纹图谱是很有用的，譬如山楂和金丝桃。欧共体药品申请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^[6]。

国外关于植物药色谱指纹图谱的研究论文也日渐增多，

他们提出色谱指纹图谱鉴别，目的是解决成分复杂、有效成分不明的草药如何监测和证明产品批间质量的稳定。如果成分比较简单，如银杏叶^[7]中二萜内酯主要有银杏内酯（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；而银杏叶中黄酮类成分含量较高，据统计从银杏叶中分离并鉴定的黄酮类化合物共 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。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的草药，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生产前“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 [$\pm(5\% \sim 10\%)$]。德国银杏叶提取物制剂是一个很突出的例子，他们的固体剂型产品色谱指纹图谱的重现性十分好，含量测定相当稳定（浮动范围 $\pm 5\%$ ）。又如加拿大及美国的人参制剂，由于人参主根、须根、茎、叶、花中均含有皂苷类成分，其中人参皂苷 R_f 只在人参的根中出现，而在西洋参茎叶及根中均未发现此成分；人参皂苷 R_{g_2} 在人参

中发现，而在西洋参中未被发现；西洋参中 Rb_1 之后的峰明显比人参中 Rb_1 之后的峰多；人参皂苷 Rb_1 在西洋参中明显比其他峰高，而人参中 Rb_1 峰与其他峰差别较小；人参和西洋参叶中的 Rd 和总皂苷明显比根的高，人参叶中含有较多的 Rc 和 $Rg_1 + Re$ ，而西洋参叶中含有较多的人参皂苷 Rb_3 。通过对原料、标准提取物指纹图谱的分析，并控制投料，能确保最终产品的人参总皂苷含量及各种人参皂苷的组成比例稳定在一个相对固定的范围，保证人参产品的稳定性、安全性及治疗作用^[8]。

第2章 中药指纹图谱研究方法学

2.1 常用指纹图谱研究的方法与技术

研究对象的不同，指纹图谱研究的方法与技术也不同，并都随着现代科学技术的发展而发展。例如，对传统的手指指纹的鉴定，已从过去的显微鉴定发展到今天运用计算机辅助识别（如人工神经网络法）进行自动识别。随着现代分离分析技术的发展，中药指纹图谱的研究也由过去“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。

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^[9]。色谱法包括传统的薄层色谱法（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）；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 X 射线衍射法、核磁共振法（NMR）等。以上方法虽然较多，但每种方法均具有一定的适用范围。

（1）X 射线衍射法及核磁共振法

这两种方法能够给出药效物质基础的结构信息，部分信息也可能与特定化学成分直接关联。但该两种方法所使用的仪器在国内尚未普及，不适宜该方法的应用与推广。因此在中药指纹图谱研究过程中不建议采用 X 射线衍射法及核磁共振法。

（2）紫外可见分光光度法和红外光谱法

这两种方法能够给出药效物质基础的结构信息，但所给出的信息是所有化学物质结构信息的加和，不具备指纹特征，但可作为中药指纹图谱研究的辅助方法。

（3）近红外光谱法

此方法与红外光谱法原理相同，但检测时采用近红外区波长，所给出的信息是所有化学物质结构信息的加和，通过一系列样本的检测（必须预先知道样本中相关成分的含量或样本的定性归属），运用化学计量学手段，建立了样本与信息之间的数学模型。运用该模型即可对未知样本（例如新近购进的原药材或新生产的成品等）进行辨别分析（给出结果：合格与否、含量多少等）。该方法的优点是检测速度快

(通常为 1min)、操作简单、适宜过程控制等，但数据处理需掌握一定的化学计量学知识。

国家药品监督管理局要求实施中药注射剂指纹图谱技术，首先要求原药材实行 GAP，由于近红外技术在农药、化工、农业等相关领域已广泛应用，方法的成熟度较高，在中药质量控制方面应有较好的应用前景，因此应大力推广近红外技术在原药材质量控制中的应用。

(4) 薄层色谱法

薄层色谱法为传统的定性、定量分析方法，在国家“七五”、“八五”及“九五”攻关课题中已大量采用薄层色谱法进行道地药材的定性鉴定。2000 年版《中华人民共和国药典》中采用薄层色谱法进行定性鉴别，列于【鉴别】项下；采用薄层扫描法进行含量测定，列于【含量测定】项下。该方法在中药质量控制中应用极为广泛，其优点是操作简单、分析速度快、一次分析样品数量多，其缺点是重现性及精密度差。因此该方法在中药指纹图谱应用中受到限制，但可作为中药指纹图谱研究的借鉴与补充。

(5) 液相色谱法

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 (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。

(6) 气相色谱法

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气压的固体，或者沸点在 500°C 以下、相对分子质量 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化后可挥发性成分（如脂肪酸的酯）。该方法灵敏度高、分离度好、分析速度快，定量分析的精密密度优于 1%，但分析范围只局限于低沸点成分是其主要不足。该方法为中药指纹图谱研究的主要方法之一。

(7) 高效毛细管电泳法

高效毛细管电泳法是以毛细管为分离通道、以高压直流电场为驱动力的新型分离分析技术。毛细管电泳法适用于中药中带电荷的化合物（例如蛋白质、氨基酸、黄酮、生物碱）、有机酸、单糖及一些中性分子的分离分析，因此该方法可作为中药指纹图谱研究的补充。

另外，各种技术的联用，例如高效液相色谱与质谱联用（HPLC-MS）、气相色谱与质谱联用（GC-MS）、毛细管电泳与质谱联用（CE-MS）等，在指纹图谱研究过程中发挥了极其重要的作用，可对指纹图谱中的部分色谱峰在无标准物质验证的情况下，起到定性鉴别的作用。

综上所述，中药指纹图谱研究方法虽然较多，但色谱学方法应是主流方法，尤其是 TLC、HPLC 和 GC 色谱技术，已经成为大家所公认的三种常规的分析手段，是目前我们研究中药指纹图谱应优先考虑的方法。随着科学技术的发展、色谱分析仪器的完善与提高，使得无论是薄层色谱还是高效液相色谱，在克服自身固有的缺陷、发挥自身优势方面有了长足的发展，成为互相补充、相互结合的分析手段，其中 HPLC 方法随着新的高效通用型检测器的发展，如蒸发光散射检测器 ELSD、ESIMS、MS/MS 等设备的引入，使得 HPLC 的适用性与灵敏度得到显著提高，从而使复杂样品的成功分析成为可能。这些新设备新技术的应用，将使中药及其制剂指纹图谱的建立更加有效。

2.2 指纹图谱研究常用的仪器与设备

在本章第一节中介绍了指纹图谱研究的各种方法与技术，其中 TLC、HPLC 及 GC 是现阶段指纹图谱研究与应用的主要方法。下面对 TLC、HPLC 及 GC 色谱仪的构造、型号及性能作一简要介绍。

2.2.1 薄层扫描仪

(1) 薄层扫描流程