

• 专论 •

中药指纹图谱的研究现状

湖北省药品检验所(武汉 430064) 聂 晶*

中国药品生物制品检定所 田颂九 王国荣

摘 要 综述了中药薄层色谱指纹图谱、高效液相色谱指纹图谱、气相色谱指纹图谱、高效毛细管电泳指纹图谱、紫外光谱指纹图谱、红外光谱指纹图谱、核磁共振指纹图谱、质谱指纹图谱、X-射线衍射指纹图谱和 DNA 指纹图谱方面的研究现状。

关键词 中药 指纹图谱 指纹鉴定

The Development of Fingerprinting Research on TCM

Hubei Institute for Drug Control (Wuhan 430064) Nie Jing

National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products Tian Songjiu and Wang Guorong

Abstract Research on fingerprinting of TCM, though massive and burdensome, may afford a positive influence on the identification and quality control of TCM. Thus, the development of fingerprintings of TCM on TLC, HPLC, GC, HPCE, UV, IR, NMR, MS spectra, X-ray diffraction and DNA molecular markers *etc.* were reviewed.

Key words TCM fingerprintings identification of fingerprintings

人们在“回归自然”的热潮中,重新引起对传统药物的极大重视。中药是我国人民在数千年治疗疾病过程中积累起来的宝贵财富。中药生产和质量的规范化和现代化是走向世界的重要前提。中药作用的特点是多成分的整体性。在其质量控制方面,除单一成分外,有效部位的测定已引起人们的重视和兴趣。最近,国家药品监督管理局也召集专家来研究中药注射剂成分的指纹鉴定,以便更好地控制产品质量。

1 中药指纹图谱

1.1 薄层色谱(TLC)指纹图谱:TLC 具有快速、经济、可靠、操作简单、适用范围广、重现性好等优点,为国内外学者最快接受和广为使用。用固定波长对薄层展开的各斑点作薄层扫描的扫描图谱比目测的层析图谱更为客观准确,因而具有更好的指纹鉴别意义。林明美等^[1]对柴胡 10 个品种近 40 个样品进行了薄层指纹分析。将柴胡根中的挥发油、己烷提取物及甲醇提取物,分别进行薄层层析及薄层扫描。结果发现,皂苷 d、a、c 为柴胡属植物的特征性成分。不同品种的柴胡,凡药材来源、外形区别显著者,其指纹图谱差异也显著,因此可根据图谱去推断药材的

品种。颜玉贞等^[2]用经过优化的溶剂系统在双槽展开箱中用硅胶薄层板作两次展开,对黄连所含原小檗碱型生物碱进行薄层色谱分离,在控制条件下得到的商品黄连样品 TLC 中可检出包括微量生物碱在内的 9~11 个斑点,其荧光及紫外扫描图可作为黄连药材的指纹图谱,以此确定不同黄连样品中主要生物碱的分布。苏薇薇等^[3]对 10 个不同产地的黄芩样品,将乙醇、乙酸乙酯、乙醚提取液分别进行了聚酰胺薄膜分析,从中提取反映样品间差异的数量化特征,用聚类分析的方法对黄芩进行鉴别分类,结果准确。

1.2 高效液相色谱(HPLC)指纹图谱:HPLC 由于具有分离效能高、分析速度快等优点,近期已广为普及用于中药的定量分析。在中药的定性鉴别中亦能发挥很好的作用。洪筱坤等^[4]对 3 种正品大黄的 9 个样品进行 HPLC 分析,将相对保留值 α 和相对峰面积 A_r 两者结合起来,建立了大黄样品的 HPLC-相对保留值指纹图谱,反映了该中药的化学组成及其含量分布状况,其特征可作为鉴别中药的依据。乔延江等^[5]测定了不同种类、不同产地的 62 个蟾酥样品的 HPLC 图谱,从 16 个色谱峰中选取

* Address: Nie Jing, Hubei Institute for Drug Control, Wuhan

聂 晶 1991 年毕业于中国药科大学中药专业,主管药师,现在中国药品生物制品检定所师从田颂九研究员等攻读在职研究生硕士学位,主要研究方向为乌头、洋金花等毒性中药材的分析。

9 个有代表性的色谱峰,应用三层反向传播 (BP) 神经网络方法进行特征提取,可直接进行化学模式识别。中药指纹图谱还应用于中药复方的研究。张亮等^[6]采用 RP-HPLC 法对六味地黄丸缺味药模拟方的浸出物进行指纹分析,选取 9 个色谱峰的峰面积与内标峰面积之比值作为样本特征变量,通过贝叶斯 (Bayers) 法和 PRIMA (Pattern Recognition by Independent Multicategory Analysis) 法对六味地黄丸 3 种缺味药进行准确识别。

1.3 气相色谱 (GC) 指纹图谱:GC 具有高效、高选择性、高灵敏度、用量少和分析速度快等优点。凌大奎等^[7]用规范化的色谱分离条件测定了 6 种常用中药砂仁、当归、苍术、柴胡、藁本和香附的挥发油成分的 GC 保留指数 (GCRI),从中选择若干代表性成分 GCRI 值组成各自的 GCRI 谱,并利用 GC-MS 和 GC-傅立叶变换红外光谱 (FTIR) 对各主要成分作出了定性鉴别。实验测得的 GCRI 值重现性好,3 个实验室所测 Kovats 保留指数的 $RSD < 1.0\%$ 。Kovats 保留指数被认为是鉴定化学成分的气相最佳保留参数。研究表明,GCRI 可作为中药鉴别的依据,而各成分含量可以用以评价其质量之优劣。叶崇义等^[8]采用程序升温毛细管 GC 法,分析挥发油成分,建立了术类药材 GCRI 指纹谱。潘晞陵等^[9]通过对一组术类药材的色谱指数——组分百分比浓度数据的分析,得到了不同的动态聚类图,由此确定出计算相似系数的标准公式及阈值,并应用此公式及阈值讨论了另两种术类药材的种源归属,对中药材鉴定和分类具有一定的指导意义。房杏春等^[10]应用裂解-高分辨气相色谱,获得中药山药药材的 56 张色谱图,并从中选取 15 个特征峰作为分类指标,应用主成分分析法进行分类识别,有效地区分了山药样品中药典规定正品和非正品,结果与生药方法一致。GC-MS 联用,不仅具有 GC 的高分离效能,而且兼备了 MS 鉴定的高灵敏性和准确性,是研究物质分子的有效手段。苏薇薇^[11]对 45 个细辛样品进行了 GC-MS 分析,并从样品挥发油组分总离子流图中获取不同种细辛样品化学本质差异的数量化分类特征,经过 PRIMA 法处理,实现了计算机对 3 种细辛的鉴别分类,结果与实际相符。张亮等^[12]在样品气相色谱分离较完全的条件下,依据一定原则,分别将雷公藤和昆明山海棠样品的成分质谱叠加,形成总质谱图。用总质谱表征每一样品,用模式识别的方法对雷公藤去皮根和根皮进行了分类,并对同属植物昆明山海棠作了定性预报。

对于中药复方制剂,冯毅凡等^[13]对华佗再造丸及其主要药味的石油醚提取液进行了气相色谱分析,获取了其气相色谱指纹特征,以此作为华佗再造丸及其原料药真伪鉴别的依据。在此基础上,进一步采用特征指标均值偏移度法对华佗再造丸的质量进行了评价。

1.4 高效毛细管电泳 (HPCE) 指纹图谱:HPCE 技术在药材鉴定中的应用是近年发展起来的方法。胡平等^[14]提取菟丝子种子植物蛋白用 HPCE 法进行生药鉴定。根据其电泳图谱,可有效地鉴别菟丝子的来源。张朝晖等^[15]对 12 种海马、海龙类药材采用 HPCE 图谱鉴别研究表明,其种间区别明显。作者认为 HPCE 具分析速度快、分辨力强、重现性好等特点,为动物类药材的鉴定提供了新的分析手段。

1.5 紫外光谱 (UV) 指纹图谱:由于不同中药所含成分的不饱和程度有差异,因而导致其紫外吸收曲线的形态、峰位、峰强度亦有差异以此达到鉴别的目的。导数光谱可消除样品中一些无关吸收,排除原图谱中的某些干扰,从而达到较好的鉴别效果。张亮等^[16]不经分离直接测定 32 种石斛药材粉末氯仿浸出液的 UV 光谱。运用主成分分析法 (PCA) 进行综合分析,获得满意结果。作者认为 UV 光谱仅反映了部分具有紫外吸收化学成分的行为,全面评价还需结合 IR、色谱/MS 等各种技术。王秀坤等^[17]采用反映总化学成分的苦参药材甲醇提取液紫外光谱数据,分别运用主成分分析法和非线性映射,以及自适应共振理论网络 (ART2) 模型,对 40 份苦参药材质量进行了化学模式识别研究,并同时结合红外光谱数据运用自适应共振理论网络 (ART1) 模型进行了主成分分析。

1.6 红外光谱 (IR) 指纹图谱:IR 是对整个化合物的鉴别,比单纯的官能团的化学定性鉴别专一性更强。中药材的红外光谱是混合物中各组分红外光谱的叠加。中药中各种化学成分只要在质和量的方面相对稳定,并且样品处理方法按统一要求进行,则其红外光谱也应该是相对稳定的。利用上述原理,不用将混合物的红外光谱各主要吸收峰归属,只要在 $4000 \sim 400 \text{ cm}^{-1}$ 范围内比较光谱的差异即可。这种差异可以表现在 3 个方面:一是在某一波数处鉴别的双方只有一方有明显的差异;二是在某一波数内,鉴别双方的光谱中,吸收峰的形状与强度都有明显的差异;三是“指纹区”面貌不同。据此原理,田进国等^[18]分别用石油醚、乙醚、水提取灵芝、苦地丁、罂粟壳等 30 种药材对照品,并分别测定其提取

物的红外光谱。这 30 种药材对照品均具有独特的红外光谱特征,根据其光谱特征可以准确地加以鉴别。姜大成等^[19]将 16 组 54 种动物药材,每种样品制备 5 张红外光谱图,即粉末、50% 乙醇、丙酮、氯仿、石油醚 5 种不同处理条件。结果表明,绝大多数动物药材红外光谱鉴别特征明显,稳定性、重现性较好,可作为药材鉴别依据。张亮等^[20]应用误差反向传播学习算法(BP 算法)对中药材雷公藤和昆明山海棠浸出物的红外光谱进行分类鉴别。分类结果与 SIMCA (Soft Independent Modelling of Class Analogy) 法基本一致。作者认为由于浸出物的红外光谱是所有成分的红外光谱叠加而成,是药材整体的本质的反映,理论上讲以它进行分类识别研究比色谱方法更有意义。

1.7 核磁共振(NMR)指纹图谱:¹HNMR 指纹法鉴定植物类中药是根据对鉴定方法的要求、¹HNMR 图谱的特点和两个假设建立起来的。对鉴定方法的要求是可靠、灵敏、简便、价廉。¹HNMR 图谱具有单一性、全面性、定量性、易辨性的特点。假设是以一定的程序可获取植物类中药的特征性化学成分(或化学成分组)的总提取物,同时这些特征的化学成分的含量是相对固定的。因此,在规范的提取分离程序下,植物类中药的¹HNMR 图与植物品种间存在严格的对应关系,没有混淆的余地。据此原理,秦海林等^[21~23]对人参、天麻、黄连、虎杖、何首乌和掌叶大黄、唐古特大黄分别选择适当的提取分离工艺,制备其特征总提取物,在 NMR 波谱仪上测定中药的¹HNMR 指纹图;对特征总提取物进一步分离,得到单体化合物后,通过结构鉴定和 NMR 研究,以对指纹图中的各特征谱线进行归属。结果表明,所研究的各种植物中药的¹HNMR 指纹图均有高度的特征性和重现性,同一品种不同产地的样品的¹HNMR 指纹图有很好的一致性;人参、天麻、黄连等多数植物中药特征总提取物的¹HNMR 指纹图主要显示了其活性成分的特征共振峰。作者认为,样品之间由于成分含量不同造成 UV 和 IR 图谱间的差别是不可避免的。加之提取物难免残留少量溶剂,残留溶剂的吸收峰也会对图谱产生干扰。而在¹HNMR 谱中混合物相对成分的变化对相对标准图谱不产生影响。因此,3 种光谱法中,NMR 信息量最多,重现性最好。

1.8 质谱(MS)指纹图谱:将中药提取液置质谱仪中进行电子轰击电离,可获得提取液中化学成分的 EI-MS 图,不同中药提取液所含成分不同,所得质谱图显示的分子离子峰及进一步的裂解碎片峰亦

不一致,可资鉴别。鉴于天麻中的主要化学成分为对-羟基苯醇的衍生物,其 EI-MS 图具指纹性强的特征。但质谱法对提取液中主要成分的含量要求较高,实验费用亦较大,能否作为常用的检测方法尚待继续探索。

1.9 X-射线衍射指纹图谱:X 射线衍射法是研究物质的物相和晶体结构的主要方法。如果该物质是一混合物,则所得衍射图是各组分衍射效应的叠加。X 射线衍射分析法具有快速简便、图谱稳定可靠、指纹性强并能立即得知样品组分的特点。吕扬等^[24]选择常用中药材茜草类、贝母类、山药类三组样品,应用 X 射线粉末衍射法进行图谱分析,获得了可用于标识中药材的衍射图形几何拓扑规律与图谱特征标记峰。周俊国等^[25]对 12 个不同产地的蛇床子样品进行了粉末 X 射线衍射分析。作者将不同产地的蛇床子粉末衍射图谱中的特征标记峰与衍射整体模糊图形相结合,建立了蛇床子的特征图谱,并阐明了其与同属植物兴安蛇床、碱蛇床的区别,认为该法可用于种内不同产地样品的鉴别。王树春等^[26]采用 X 射线 Fourier 谱分析法识别比较熊胆与伪品、天然熊胆与引流熊胆汁干燥品之差异,并给出熊胆、引流熊胆的 Fourier 标准图谱及特征标记峰,结果表明 X 射线 Fourier 谱分析法在动物类药材的鉴定与伪品识别中的广阔前景。

1.10 DNA 指纹图谱:现代分子生物学研究发现,中药材(不含矿物药)所依赖的生物资源——“物种”的多样性是由于其基因多态性的结果。而基因多态性可在分子水平上检测,它比形态、组织和化学水平上检测更能代表其变异类的遗传标记。利用聚合酶链反应(PCR)从不同生物样品中人工合成 DNA 片段,而这种 DNA 片段的大小、数目可因不同的生物而异,故称之为“DNA 指纹图谱”。这种 DNA 指纹技术具有重复性好、灵敏度高的优点。由于 DNA 分子标记直接分析的是生物的基因型而非表现型。所以鉴别结果不受环境因素、样品形态(原品、粉状或片状)和材料来源的影响,因此可为中药品种鉴别提供更加准确可靠的手段。其中主要包括有随机扩增产的 DNA 多态性(RAPD)和任意引物扩增产的 PCR(AP-PCR)等。

香港中文大学在 1994 年初首次报道利用 AP-PCR 指纹图谱技术鉴定出商品人参和西洋参。日本东京大学 Ozeki 等^[27]分离人参属 3 种植物的基因组 DNA,通过 RAPD 分析,结果发现人参的新鲜根毛组织和干燥药材产生相同的 RAPD 指纹图;且认

为 RAPD 标记不仅可用于人参与其它药材的鉴别,而且可以鉴定某些人参制剂中的药材品种。对不同产地西洋参和不同来源苦地丁由 AP-PCR 和 RAPD 产生的同一品种 DNA 指纹图谱几乎一致^[28,29],说明 PCR 方法在中药品种鉴别上的稳定性和重现性。RAPD 标记所需样品基因组 DNA 的量仅为 10 ng,是 AP-PCR 标记的十分之一左右,且 RAPD 引物已商品化生产。因此,它可以在不知道特异 DNA 序列的情况下检测 DNA 的多态性,尤其在目前绝大多数动、植物中药材 DNA 序列尚不清楚的情况下,RAPD 标记比其它分子标记在中药品种研究方面更具有广阔的应用前景。

2 小结

中药走向世界,质量保证是一个重要的方面。由于中药来源复杂,涉及不同种和掺伪,即便是同种正品也会因生长地域、采集时间、加工甚至贮存条件不同引起成分组成和含量的变化。同时仪器分析的规范性、重现性也至关重要,以及方法的代表性、普遍性问题也需认真对待。结合不同的分析手段,与计算机技术联用,建立不同品种中药材的标准图谱库和数据库,是一项大量而细致的工作,这将对中药品种鉴定和质量控制起到积极的作用。

参考文献

- 1 林明美,罗 燕. 药物分析杂志,1987,7(1):13

- 2 颜玉贞,林巧玲,谢培山. 中国中药杂志,1993,18(6):329
- 3 苏薇薇. 中国中药杂志,1991,16(10):579
- 4 洪筱坤,王智华,李 旭. 中国中药杂志,1993,18(11):650
- 5 乔延江,吴 刚,王 玺,等. 分析化学,1995,23(6):630
- 6 张 亮,刘展鹏,杨 春. 中国中药杂志,2000,25(1):29
- 7 凌大奎,朱永新,王 维,等. 药物分析杂志,1995,15(4):13
- 8 叶崇义,吴祥才,荣有富,等. 药物分析杂志,1994,14(6):13
- 9 潘晔陵,汪 炜,叶崇义. 中国药科大学学报,1994,25(6):348
- 10 Fan Xingchun, Yin Xia, Xiang Bingren, *et al.* J China Pharm Univer, 1990,21(2):91
- 11 苏薇薇. 中药材,1999,22(6):279
- 12 张 亮,张正行,盛龙生,等. 中国药科大学学报,1993,24(2):82
- 13 冯毅凡,苏薇薇,吴 忠,等. 中药材,1999,77(7):373
- 14 胡 平,罗国安,王如骥,等. 药学报,1997,32(7):549
- 15 张朝晖,范国荣,徐国钧,等. 中国中药杂志,1998,23(5):259
- 16 张 亮,马国祥,张正行,等. 药学报,1994,29(4):290
- 17 王秀坤,李家实,魏璐雪,等. 中国中药杂志,1996,21(4):198;21(7):391
- 18 田进国,娄红祥,任 健,等. 中国药科大学学报,1996,27(1):24
- 19 姜大成,张 洁,邓明鲁. 中草药,1999,30(2):137
- 20 张 亮,蓝要武,朝 英,等. 药学报,1995,30(2):127
- 21 秦海林,赵天增. 药学报,1999,34(1):58
- 22 秦海林,尚玉俊,赵 伟,等. 中草药,2000,31(1):48
- 23 秦海林,赵天增,袁卫梅,等. 药学报,1999,34(11):828
- 24 吕 扬,郑启泰,吴 楠,等. 药学报,1997,32(3):193
- 25 周俊国,蔡金娜,吕 扬,等. 中草药,1998,30(12):59
- 26 王树春,吕 扬,吴 楠,等. 中草药,2000,31(3):214
- 27 Ozeki Y, Wake H, Yoshimatsu K, *et al.* Natural Med,1996,50:24
- 28 Shaw P C, But P P H. Planta Med,1995,61:466
- 29 曹 晖,毕培曦,邵鹏柱. 中药材,1996,19:608

(2000-06-12 收稿)

欢迎订阅《中国药学年鉴》

《中国药学年鉴》(1999 年卷)已于 2000 年 8 月出版。本卷是该年鉴创刊以来出版的第 16 卷,每册定价 85 元。

1999 年卷年鉴中主要内容:一、刊载了反映我国药理学领域各学科的最新研究进展的专论 16 篇,介绍药学科科研机构 10 个,药学科获奖成果 148 项。介绍了我国药品专利概况及国家自然科学基金批准资助的药理学项目。二、介绍了我国药理学教育方面的高等教育、中等教育及成人药理学教育的概况,刊载了我国各科研院所,各高校攻读学位研究生毕业论文题录及部分高等药学院校简介。三、刊载了有关国家医药管理职能机构调整情况及管理和改革动态、医药工业、医药商业、中药的概况和医药行业改革开放 20 年简况,达标企业名录和企业简介。四、反映了我国医院药理学工作的进展与动态,临床药理学实践(包括用药调查、药物新用途、药物不良反应、临床药物监测、药物相互作用),医院新制剂,医院中药工作,医院药理学部,药剂科简介等。五、介绍我国药品监督管理机构改革及药品监督管理工作概况,新药审批管理,麻醉药品、精神药品、放射性药品、进口药品的管理,药品检验及省市药政动态。六、刊载本年度药理学图书出版书目,药学期刊、图书简介。七、介绍我国药学界知名专家、教授。八、介绍中国药学会、药理学学会工作概况及各省学会学术活动。九、1997 年、1998 年重要药理学记事。十、附录中介绍了香港中医药、台湾省药事活动和 1998 年全国执业药师及 1998 年全国执业中医师资格考试试题及答案。最后设有本年鉴第 1~16 卷的企事业单位索引,和药理学人物的索引,1999 年卷的药名索引。

本年鉴可供医药科研、教学、生产、经营管理的各层次工作人员及其他读者参考使用。

本书为 16 开精装本,约 72 万字,欢迎单位及个人订阅,书款信汇、邮汇均可。另还有部分余书供配套。银行汇款,户头:中国药科大学(29),开户行:中国银行南京城北办;帐号:04403020517000140,本编辑部地址:江苏南京市童家巷 24 号,中国药科大学内(29 号信箱),邮政编码,210009,电话:(025)3271478

(中国药学年鉴编辑部供稿)