

· 综述 ·

中药指纹图谱研究概况

杨义芳¹,蔡定建²

(1. 江西省药物研究所,江西 南昌 330029; 2. 南方冶金学院,江西 赣州 341000)

摘要:为促进中药指纹图谱的研究,通过对文献资料的归纳、分析,综合评述由色谱等方法建立的指纹图谱应用数学手段进行判别,实现以科学、客观、公正、实用的方法对中药及其制剂进行真伪优劣评价。中药指纹图谱在中药的种植、药材的真伪鉴别、中药生产、新药研究、中成药的质量控制及其研究诸方面将起到重要的作用。
关键词: 中药;指纹图谱;多维多息特征谱
中图分类号: R282 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253- 2670(2003) 06-附 2- 04

Survey in study on fingerprint spectrum of Chinese materia medica

YANG Yi-fang¹, CAI Ding-jian²

(1. Jiangxi Institute of Materia Medica, Nanchang 330029, China;
2. Southern Institute of Metallurgy, Ganzhou 341000, China)

Key words Chinese materia medica; fingerprint spectrum; characteristic fingerprint of multi-dimension and multi data

对于中医理论指导下的中药,尤其是复方制剂是一个复杂的“黑箱”体系,哪些成分与疗效有关往往还不太清楚。仅分析单一的、少量的或浓度高的成分,不一定真正代表中药中有疗效的物质组份。单味和复方中药的特点是物质组份复杂、多变(如单味药用量和产地、采收时间都能引起组份的变化),任何一种活性成分均不能反应中医用药所体现的整体疗效,分析的越细,目标越缩小,离中药的整体疗效的距离就越远^[1,2]。所以,宏观地综合分析将成为必然的趋势。事实上这也是在人类进入系统科学时代以后,人们的科学认识观念更新,综合分析 with 整体分析成为分析化学发展的必然反映,这在生命科学中表现得最为突出^[2]。建立指纹图谱(fingerprint spectrum)则可以解决上面无法解决的问题。首先要确定中药微量活性成分和/或未知活性成分,进而解决化学成分和药效的相关性,才可建立一个高水平中成药质量标准。2000年我国中药指纹图谱技术全面启动,正试图达到这一目标。发达国家已认可了指纹图谱对中草药的适用性^[2],所以这又是中药实现国际化的关键技术。国家药品监督管理局于去年首先要求对中药注射剂进行指纹图谱研究。

1 中药指纹图谱标准的作用及意义

- 1.1 作用:表达产品质量的稳定性、均一性;通过指纹图谱的特异性,能有效鉴别样品的真伪或产地;有利于启发引导对所含成分进行分析,对有效成分进行研究;有利于不良反应因果关系分析;中药指纹图谱对中药种植 GAP实施起到重要的影响。
- 1.2 意义:是中药质量标准的一个飞跃;实现全过程监控中药及其制剂的生产;对中药新药的概念有了新的突破性认

识;将推进中医药方剂和配伍规律研究工作进入分子水平;加快中药走向世界的步伐;保证药品安全有效。

2 测定方法

技术上实现中药指纹图谱,需要结合现代分析技术手段。针对中药指纹图谱的研究所涉及的方法种类繁多,主要采用色谱方法分离特征成分,采用 UV, IR, NMR, MS等光谱、波谱方法鉴定化合物的结构,提高指纹图谱的可信度。主要包括 TLC、HP-TLC、TLCS, HPLC, HPLC-DAD, HPLC-ELSD, HPLC-MS, HPLC-DAD-MS-MS, HPCE, HPCE-ELSD, HPCE-DAD-MS-MS, HSCCC, GC, GC-MS, IR, UV 导数光谱, NMR, X-射线衍射以及 DNA 探针和生物色谱技术等,其中,色谱方法是主流方法,尤其是 TLC、HPLC 和 GC 色谱技术。

3 中药指纹图谱研究近况

- 3.1 薄层色谱指纹图谱(TLC fingerprint spectrum)和高效薄层色谱指纹图谱(HPTLC fingerprint spectrum)^[4-6]:谢培山等早在 1987年就报道了人参类药材 HPTLC 指纹色谱图像分析,对人参、西洋参、三七在优化的规范操作条件下得到的薄层色谱荧光彩色图像,可以在同板上形象地比较各个样品的异同。此后,他们又采用 TLC 建立了黄连的指纹图谱,结果显示,各原小檗碱型生物碱均为灵敏度很高的亮黄色荧光斑点是其特点;其次,表小檗碱及黄连碱的有无或多少则构成相互的区别。
- 3.2 气相色谱指纹图谱(GC fingerprint spectrum):毛细管气相色谱所包含的大量特征成分数据,犹如人类的指纹,具有特征代表性,故可称中药挥发性成分毛细管气相色谱为指

* 收稿日期: 2001-09-29

纹谱,以茵陈挥发油毛细管 GC指纹谱为例。将所有样本色谱归一化分析结果加和后求得平均谱。选择平均谱中相对含量较高的 8个成分为代表,不同来源的茵陈样品绝大多数特征相似。以各样本指纹谱与平均谱的离差平方和及典型成分的含量为各样本的两特征量,按欧氏距离以最短距离方法进行系统聚类。结果表明,除新疆样本冷蒿 *Artemisia frigida* Willd. 之外,其他样本间的差异较小,指纹谱聚类识别与生药鉴定结果一致。

洪筱坤等对柴胡属植物挥发油的气相色谱指纹图谱进行研究,首次提出了各种色谱峰的相对保留值和相对峰面积的指纹图。该指纹谱具有下列特点^[7]: (1)将色谱图转换成稳定而易于比较的数据表,也就是实现了图谱的数据化。(2)由于以相对保留值作为各色谱峰的峰位,大大减少了各种操作因素对色谱相对保留值的影响,降低了色谱峰峰位变化的波动性,提高了样品间的可比性。(3)提高了色谱图中色谱峰的利用率,即可以根据研究的需要对各色谱峰作出取舍。(4)由于实现了数据化,导致了电脑操作的可能性,即可编制适宜的计算机软件。(5)解决了缺乏对照品的难题,即使在没有标准品的情况下,仍然可以对各种中药样品作出可信的鉴定。这在目前尚未弄清哪些是有效成分之前,以及缺乏相应的各种标准品的情况下,为检测和保证中药的质量,上述方法是可信而可行的。

为了使上述指纹图谱在应用中更为可靠、可信、可行,设计制定了一系列参数作为评判判断标准,使两者比较更趋量化。例如重叠率,这是一个量化的定性参数,这反映了待鉴药材与标准药材所含组份方面的相似程度; n 强峰列出了峰面积值居前的 n 个色谱峰, n 值由总峰数的多少而定,使比较鉴定更具量化的概念。

在檀香木挥发油的 GC分析研究中,从指纹图中清楚地显示出,同一品种印度产的檀香木明显优于印尼檀香,两者指纹图谱有一定的相似性,即它们的重叠率在 60%左右,但主成分 α -檀香酸和 β -檀香酸的含量都有较大的差异。同产地,同品种的檀香,它们的重叠率在 70%以上,上述两种主成分,在 8强峰中均位列前 3之中。在麝香醚提取物的分析中建立了进口麝香的指纹图谱,并通过麝香酮、胆固醇和 11个雄酮激素标准品的核对分析,确定了优质麝香的指纹特征。采用 GC指纹色谱图将高良姜挥发油与同属近缘品种草豆蔻根茎及距花山姜根茎挥发油的色谱图相比,可以明确地相互区分^[2]。将 GC指纹图谱用于中成药麝香保心丸,鉴定了冰片、麝香、苏合香和桂皮。

3.3 高效液相色谱指纹图 (HPLC fingerprint spectrum): 张聪等对中国红参和高丽红参进行了 HPLC指纹图谱比较研究^[8]。它们相互间的色谱重叠率在 63%以上,即使 3个高丽红参样品,它们之间的重叠率仅为 63%~66%。从各样品的 8强峰来看,有 8个样的相对面积总和在 53%以上,表明国产红参和进口高丽红参的品质十分接近。用反相 HPLC鉴定 21个地榆样品及 2个地榆混用品,建立了地榆样品的 HPLC指纹谱^[9]。同种地榆重叠率大于 70%,而同属不同种

的重叠率为 40%~70%,重叠率小于 40%可考虑为混淆品。综合考察 6个共有强峰的出现率及其有强峰 RA总和、10强峰 RA总和,可以从量的角度衡量地榆质量的优劣。通过比较指纹谱、重叠率、10强峰和特征指纹值等参数,可从质和量的角度区别地榆样品的属和种,并科学、全面地评估其内在质量的优劣。不同生产厂家的银杏叶提取物 EGb761的 HPLC指纹图谱图形、图貌基本符合,但因个体差异或选用原料叶及生产工艺的不同而存在差异^[10]。此外,还有人进行 19种大黄样品 HPLC指纹谱的比较分析。

3.4 高效液相色谱-二极管阵列检测器指纹图谱 (HPLC-DAD fingerprint spectrum): 从小青龙颗粒剂 HPLC-DAD 三维指纹图谱可以看出不同来源的制剂色谱的整体图形、图貌有极其相似之处,但也可看出有的商品的指纹图谱的细辛成分的一组峰峰值特别低,明显是由于工艺造成细辛挥发性成分损失所致^[2]。

3.5 指纹对比分析复方中物质组份的变化^[11]: 采用 RP-HPLC-DAD 研究黄芪或当归用量变化时,当归补血汤 (DBT)中物质组份的质变(物质组份的增加或减少)引起指纹的变化。当黄芪用量变化时,DBT中黄芪和当归的物质组份共存时浓度的变化,为这些物质组份间发生反应,产生新的物质提供了条件,黄芪和当归都没有物质组份存在,而复方中都出现了新的色谱峰。当归含量变化时,4个配比的 DBT样品与两个单味药对比基本上没有物质组份的消失或增加。

3.6 ¹HNM R指纹法 (¹HNM R fingerprints of TCHMs)鉴定植物中药^[3]: 通过选择适当的提取分离程序,获得植物中药代表性化学成分的总提取物是该理论的核心,将这种总提取物称为植物中药特征总提取物 (general characteristic extracts of traditional Chinese herbal medicines, GCEs of TCHMs)。植物中药特征总提取物的组成可用多种检测手段予以表征,而其 ¹HNM R图谱不仅有高度的重现性和特征性,更主要是易于解析和进一步分析研究。在规范的提取分离程序下,植物中药特征总提取物的 ¹HNM R图谱与植物品种间存在严格对应关系,非常适应于植物中药品种鉴别和化学分类研究,将这种图谱称为植物中药 ¹HNM R指纹图谱。通过植物中药 ¹HNM R指纹图谱分析,可以达到快速准确鉴别多种植物中药的目的。通过对各不同来源的同种植物中药特征总提取物的收率计算,可初步对其作出品质评价^[11,13]。

同种、同科属不同种及同科不同属植物中药特征总提取物的 ¹HNM R不仅有很好的重复性,而且还有高度的特征性^[11,12]。对不同来源的苦皮藤的 ¹HNM R指纹图谱进行解析^[14],指纹图有很好的重现性和高度的特征性,苦皮藤根皮的 ¹HNM R指纹图可用于其基原鉴定,并主要显示了 3个化合物的特征共振信号,经过对指纹图谱的解析,这些特征性化学成分均可弄清,且大部分与有效成分一致。通过对 25类不同科属 36种植物中药的 152个不同来源样品及部分中药伪品的考察,实验结果充分证实了 ¹HNM R指纹法理论的正确及方法的可行性和优点。所以,植物中药的 ¹HNM R指纹

图可作为植物中药深入研究的重要参考资料。

3.7 多维多息特征谱 (characteristic fingerprint of multi-dimension and multi-data): 中药多维多息特征谱主要应用在中药分析鉴定以及确定中药中微量活性成分和/或未知活性成分^[15]。所谓多维,即采用多种分析仪器联用模式。目前最常用的是高效液相色谱(或毛细管电泳)-二极管阵列检测器-质谱/质谱联用方式(HPLC或CE-DAD-MS-MS)所得的多维指纹图谱。这里包括了HPLC或CE所得的色谱峰图(各个成分的保留时间);二极管阵列检测器所得的在线紫外光谱图(online UV图);一级质谱图(各个成分的质量)和二级质谱图(某成分的特征碎片)。所谓多息,即特征谱应努力做到包括化学和药效两方面的信息。化学信息即上面提到的多维谱图。如何使其也能包含药效信息,可采用有效部位的概念来解决这个问题。建立多维多息特征谱的最大优点在于能较系统、较完整地解决中药及其制剂面临的保证药效和质量的难题。而且为解决中药研究中缺乏标准品的难题提供了一条可行之路。

对于中药复方来说,单单用HPLC指纹图谱来表征,困难很大。目前国内具有HPLC-MS-MS仪器的单位较少,建立多维多息特征谱的可行之路只有两条:一是有条件的单位建立多维多息特征谱后,将其简化成HPLC指纹图谱(一维多息特征谱),供日常鉴定、质控之用;二是一般单位建立起HPLC指纹谱后,再进行HPLC-DAD-MS-MS化学特征谱的研究,并开展化学成分和药效相关性研究,从而做到基本讲清有效成分、基本讲清药效作用,使原有较简单的HPLC指纹图谱增添更多深刻的化学和药效内容。

3.8 毛细管电泳指纹图谱(capillary electrophoresis fingerprint spectrum): 采用毛细管电泳的方法,建立10种十大功劳属植物的毛细管电泳指纹图谱,计算电泳图中每一个标记峰的有效电泳淌度和校正峰面积百分比,以对该种进行表征,测定结果显示,该属植物的电泳图有一定相似性,它们均含有小檗碱、巴马汀、药根碱,且含量较高,可作为十大功劳属植物的特征之一,用于属的鉴定。用这种方法可以进行不同种植物的鉴定以及真伪优劣的鉴别。

3.9 生物色谱指纹图^[16]: 现代分子生物学的发展,逐步阐明了体内神经介质、酶、受体在生命活动中所起的调节作用。分子生物色谱是把生物体内活性物质如酶、受体、传输蛋白等固定于色谱填料中,利用中药中活性成分与它们的相互作用,将色谱分离与分子生物医学二者的新成果紧密结合起来,建立有效成分指纹分析质量控制方法,并为组合中药的研究提供有效分子的结构信息。对于有效成分尚未清楚的中药,由于分子生物色谱以生物活性分子间广谱的相互作用为基础,也可利用其指纹分析法进行快速的质量监控。

3.10 DNA指纹图谱: 中药(不含矿物质)“种属”的多样性是由于其基因多态性产生的结果,而基因多态性可在分子水平上检测,它比在形态、组成和化学水平上检测更能代表中药变异类型的遗传标记。在DNA分子水平,任意引物聚合酶链式反应(AP-PCR)的DNA指纹方法在中药材人参和西

洋参、甘草、龟板和鳖甲、苦地胆、淫羊藿等中药鉴别方法获得成功。对独活的DNA指纹鉴别研究中,采用AP-PCR方法,3种独活样品与同属植物大活与拐芹当归DNA指纹图谱清晰,同时,方法具有可重现性^[17]。

4 加强分析与数学判别法综合研究

由于中药化学成分的复杂性、多样性决定了中药质量界线的明确性,使得同类中药的鉴别不易判别,而使用传统的方法判别已存在困难。因此,由色谱等方法建立的指纹图谱提供的大量信息,应用数学手段进行数据重组、分类,运用数学拟合方法和数学检验方法进行判别,最终实现以科学、客观、公正、实用的方式对中药及其制剂进行真伪优劣评价。其中聚类分析及判断分析的方法具有明显的应用前景。

5 研究与实施中药指纹图谱的几个关键问题^[2,3]

原料药材质量的提高和稳定是制剂指纹图谱能否成功建立的首要问题;生产工艺的规范和优化是研究实施指纹图谱的另一个重要环节;需解决中药及其制剂代表性化学成分的选定和代表性化学成分的表征方法;指纹图谱试验方法学严格验证是图谱达到专属稳定的保障;指纹图谱的辨认和判断,中药制剂指纹图谱具有一定的模糊特点,是0(NO)和1(Yes)之间的模糊地带,需要建立一套完整的数学拟合方法即相似判断标准。

6 结语

综上所述,中药指纹图谱的研究充分吸取了色谱学、波谱学、基因芯片技术、现代分子生物学技术、化学、数学、计算机科学等领域内的研究成果和成就。在中药的GAP种植、药材道地以及鉴别药材的真伪优劣、中药炮制研究、中医药方剂及其配伍的研究、中药活性成分的分析、化学成分与量效关系的研究、生产工艺规范与优化、中药及其制剂的生产全过程质量监控、产品质量的稳定性、均一性等方面将会起到重要的作用。指纹图谱在中药分析中的应用,必将加快中药走向世界的步伐。

References

- [1] Zhang Z Z, Liang X M, Zhang Q, *et al.* Study of unified analytical method of compatibleness for traditional Chinese medicines I. Separation, recognition of characteristic components and fingerprint analysis for single and complex medicines [J]. *Chin J Chromatog* (色谱), 2001, 19(3): 239-242.
- [2] Xie P S. On the feasibility of application of chromatographic fingerprint identification to herbal medication [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中成药), 2000, 22(6): 391-394.
- [3] Zhao T Z, Liang X T, Qin H L. Identification of traditional Chinese herbal medicine by ¹H NMR fingerprints [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2000, 31(11): 868-870.
- [4] Xie P S, Yan Y Z. HPTLC fingerprint identification of ginseng [J]. *J High Resol Chromatogr Chromatogr Comm*, 1987, 10(11): 607-610.
- [5] Xie P S, Yan Y Z. Application of HPTLC fingerprint analysis to stability evaluation of ginseng preparations [J]. *J Planar Chromatogr Mod TLC*, 1988, 1(3): 258.
- [6] Xie P S, Yan Y Z. Optimization of the TLC of protoberberine alkaloids and fingerprint evaluation of the *Coptidis Rhizoma* [J]. *J Planar Chromatogr Mod TLC*, 1992, 5(5): 302-307.
- [7] Hong X K, Wang Z H, Guo J X, *et al.* The fingerprint spec-

- trum analysis of GC relative retention values for essential oil of 19 species of *Bupleurum genus* [J]. *Acta Pharm Sin* (药 学 学 报), 1988, 23(11): 839-845.
- [8] Zhang C, Wang Z H, Jin D Z. Comparative study on HPLC-FPS of Chinese red ginseng and Korean ginseng [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中 成 药), 2001, 23(3): 160-163.
- [9] Wang X H, Fan G P, An R. *et al.* HPLC-FPS comparative study on plants of Diyu [J]. *Chin Pharm J* (中 国 药 学 杂 志), 1997, 32(Suppl): 30-33.
- [10] Hasler A, Sticher O. Identification and determination of the flavonoids from *Ginkgo biloba* by high-performance liquid chromatography [J]. *J Chromatogr*, 1992, 605: 41-48.
- [11] Qin H L, Zhao T Z. Studies on identification of traditional Chinese herbal medicines by ¹HNM R [J]. *Acta Pharm Sin* (药 学 学 报), 1999, 34(1): 58-62.
- [12] Qin H L, Zhao T Z, Yuan W M, *et al.* Assignments of the ¹HNM R fingerprints of the roots of *Polygonum cuspidatum*, *Polygonum multiflorum*, *Rheum plamatum* and *Rheum tanguticum* [J]. *Acta Pharm Sin* (药 学 学 报), 1999, 34(11): 828-834.
- [13] Qin H L, Shang Y J, Zhao W, *et al.* Identification of Chinese goldthread (*Coptis chinensis*) by ¹HNM R [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中 草 药), 2000, 31(1): 48-50.
- [14] Qin H L, Zhao T Z, Shang Y J, *et al.* Assignments of ¹HNM R fingerprint of the root bark of *Celastrus angulatus* [J]. *Acta Pharm Sin* (药 学 学 报), 2001, 36(6): 462-466.
- [15] Luo G A, Wang Y M, Cao J. The characteristic fingerprint of multi-dimensional and multi-data and its application [J]. *Chin Tradit Pat Med* (中 成 药), 2000, 22(6): 395-397.
- [16] Zou H F, Wang H L. Separation differentiation and screening of active constituents in traditional Chinese drugs by bi chromatography [J]. *World Sci Tech- Mod Tradit Chin Med* (世界科学技术·中 药 现 代 化), 2000, 2(2): 9-13.
- [17] Li S P, Li P, Dong T X, *et al.* Application and prospects of biological chip techniques in identification of traditional Chinese medicinal materials [J]. *World Sci Tech- Mod Tradit Chin Med* (世界科学技术·中 药 现 代 化), 2000, 2(3): 15-18.

石斛属植物化学成分研究进展

张光浓,毕志明,王峥涛*,徐珞珊,徐国钧
(中国药科大学 生药学研究室,江苏 南京 210038)

摘 要: 石斛为珍贵中药材,应用历史悠久。现代药理研究表明石斛具有抗肿瘤、抗衰老及扩张血管等作用,其活性成分引起国内外的关注。该属植物的化学成分主要有生物碱、菲类、联苕类、苁酮、香豆素、倍半萜、多糖及挥发油。重点对近 15 年来该属植物的主要活性成分进行了较系统的综述,为从石斛属植物中开发利用有药用价值的天然产物提供参考。

关键词: 石斛属;生物碱;菲类;联苕类

中图分类号: R284.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)06-附 5-04

Advances in studies on chemical constituents from plants of *Dendrobium* Sw.

ZHANG Guang-nong, BI Zhi-ming, WANG Zheng-tao, XU Luo-shan, XU Guo-jun
(Department of Pharmacognosy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China)

Key words *Dendrobium* Sw.; alkaloids; phenanthrenes; bibenzyls

石斛属 (*Dendrobium* Sw.) 是兰科植物中一个较大的属,全世界约 1 100 种,广泛分布于亚洲、欧洲和大洋洲等地。我国有 74 种 2 变种,分布于秦岭以南诸地区,尤其以云南南部为多。在我国传统医学中,石斛为常用贵重药材,药用历史悠久,具有滋阴清热、生津益胃、润肺止咳等功能,用于热病伤津、口干烦渴、病后虚热等多种病症。现代药理学研究表明,石斛具有抗肿瘤、抗衰老、增强人体免疫力和扩张血管等作用^[1]。《中华人民共和国药典》2000 年版收载石斛为美花石斛 (环草石斛,为药典收载名,下同) *Dendrobium loddigesii* Rolfe 流苏石斛 (马鞭石斛) *D. fimbriatum* Hook. (*D. fimbriatum* var. *oculatum* Hook.) 束花石斛 (黄草石斛) *D. chrysanthum* Wall. ex Lindl.、铁皮石斛 *D. officinale*

Kimura et Migo (*D. candidum* Wall. ex Lindl.) 和石斛 (金钗石斛) *D. nobile* Lindl. 的新鲜或干燥茎。

几十年来,中外学者对多种石斛属植物的化学成分进行了研究,发现该属植物所含的化学成分类型多样,除生物碱外,还有菲类、联苕类、苁酮类、倍半萜类、香豆素、多糖、甾体及挥发油等。为了更好地保护资源及合理开发利用石斛属植物,本文对其化学成分作一综述。限于篇幅,本文在已有综述^[1]基础上重点介绍菲类、联苕类、苁酮类、香豆素类、倍半萜类化合物。

1 生物碱

生物碱是最早从石斛属植物中分离得到的化合物。1932 年,铃木秀干等首次从金钗石斛中分离得到生物碱——石斛

* 收稿日期: 2002-09-02

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30171144)

* 通讯作者 Tel (025) 5391246