

## 色谱分析技术在中药指纹图谱研究中的应用

马丽娜<sup>1,2</sup>, 张岩<sup>1,2</sup>, 陶遵威<sup>2\*</sup>

1. 天津中医药大学, 天津 300073

2. 天津市医药科学研究所, 天津 300020

**摘要:** 中药指纹图谱技术是中药实现现代化、国际化的关键问题, 它能较全面反映中药中所含成分的种类和数量, 能更好地表明中药的内在质量, 成为中药质量标准研究的核心技术。对近年来薄层色谱、液相色谱、气相色谱、高效毛细管电泳、高速逆流色谱、微乳色谱等现代色谱分析技术在指纹图谱研究的应用作一概述, 综述了各种色谱指纹图谱的特点及其适用范围, 简要阐述了国内外中药指纹图谱研究的应用情况。

**关键词:** 中药; 色谱技术; 指纹图谱

**中图分类号:** R917      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1674 - 6376 (2012) 01 - 0058 - 05

## Application of chromatographic analysis in study on Chinese materia medica fingerprint

MA Li-na<sup>1,2</sup>, ZHANG Yan<sup>1,2</sup>, TAO Zun-wei<sup>2</sup>

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300073, China

2. Tianjin Institute of Medical and Pharmaceutical Sciences, Tianjin 300020, China

**Abstract:** Chinese materia medica (CMM) fingerprint is the key to realize the modernization and internationalization, it can comprehensively reflect the type and quantity of components in CMM and show the immanent quality of it. The application of the chromatographic analytic technologies in fingerprinting on TLC, LC, GC, HPCE, and HSCCC in recent years is summarized in this paper, and the characteristics and scope of various chromatographic fingerprint are overviewed. This paper briefly describes the application of fingerprint research on CMM both at home and abroad.

**Key words:** Chinese materia medica (CMM); chromatography technology; fingerprint

中药是中医治病的基础, 它的质量好坏直接关系到临床用药的安全。在中药的研究中, 通常是模仿西药的质量标准模式, 仅采用单一指标成分进行鉴别和含量测定, 但对于中药这一复杂体系, 尤其是复方制剂, 根本不能全面反映其质量的均一性和稳定性, 阻碍了中药的现代化和国际化。而近年来被国内广泛接受的中药指纹图谱质量控制技术解决了这一问题。最为常用的就是色谱法, 本文对色谱分析技术在中药指纹图谱中的应用做一概述。

### 1 薄层色谱指纹图谱

薄层色谱 (TLC) 法具有操作简单, 分析速度快, 结果直观性强、显著, 成本低等特点, 可同时鉴别多个样品, 具有分离和鉴别双重功能, 但也存在效能低、灵敏度差的缺点。同时其提供的信息量

有限, 对于分析成分复杂的中药及复方制剂比较困难, 可作为中药色谱指纹图谱研究的借鉴与补充。孟楣等<sup>[1]</sup>采用 TLCS 法, 以黄芪对照药材为参照, 建立新风胶囊指纹图谱, 对 3 种不同极性展开系统得到的色谱峰进行比较均得到较好的分离, 为进一步研究新风胶囊的指纹图谱奠定基础。张丽艳等<sup>[2]</sup>采用 TLC 法对 12 批贵州余庆吴茱萸药材、9 批其他不同产地吴茱萸药材及 2 种伪品进行薄层色谱比较分析, 建立了吴茱萸药材薄层色谱指纹图谱, 为评价吴茱萸药材品质优劣和 GAP 规范化种植、种植标准操作规程的制定以及质量监控提供科学依据。

近年来又出现了高效薄层色谱法 (HPTLC)、假相薄层色谱、反相薄层色谱等, 而 HPTLC 因其较

收稿日期: 2011-09-19

作者简介: 马丽娜 (1987—), 女, 山西阳泉人, 天津中医药大学在读硕士。研究方向为药物分析学。Tel: 13820662756 E-mail: malili035@163.com

\*通讯作者 陶遵威, 男, 研究员, 硕士生导师。Tel: (022)27236182 E-mail: taozunwei@yahoo.com.cn

好的分离效果得到广泛应用。Ciesla 等<sup>[3]</sup>运用多酚类成分的二进制高效薄层色谱指纹图谱可以鉴别不同的丹参品种,首次使用这种方法对丹参品种的化学成分进行研究,此种方法针对性强、重现性好、准确、稳定,还适用于寻找新的药用植物和对其他化学成分的分析。

## 2 液相色谱法

### 2.1 高效液相色谱指纹图谱

高效液相色谱法(HPLC)是现在应用最广泛的指纹图谱技术,具有分离效能高、分析速度快、重现性好、流动相选择广的特点,在中药的质量标准体系及中药有效成分研究等方面都是重要的分析手段,目前已成为中药色谱指纹图谱研究的首选方法<sup>[4]</sup>。

王欢等<sup>[5]</sup>用梯度洗脱法,对白桦药材进行了HPLC测定,建立了白桦药材中总三萜类成分的指纹图谱,标定了9个共有峰,可见不同采收期白桦总三萜类化学组成相似,其相对比例较稳定。在对不同来源瓜子金药材的HPLC指纹图谱研究中,采用高效液相色谱-二极管阵列-蒸发光散射检测方法,应用二极管阵列检测-蒸发光散射检测联用可有效互补,主成分分析可准确地对不同来源的瓜子金药材进行分类,从而作为瓜子金药材质量控制的有效方法<sup>[6]</sup>。李文博等<sup>[7]</sup>变换波长建立养血清脑颗粒HPLC指纹图谱,确定了35个共有色谱峰在药材中的归属,并用液相色谱-质谱联用(LC-MS/MS)法鉴定出部分化学成分,结果表明,制剂与药材具有良好的色谱峰相关性。

### 2.2 超高效液相色谱法

超高效液相色谱法(UPLC)是在HPLC基础上发展起来的,它通过在色谱柱上使用直径1.7 μm的小颗粒填料及其他部件的改进能够获得更高的柱效,缩短了分析时间,增加了分析的通量和峰容量,提高了灵敏度,在保证相同的分离条件下可以与HPLC进行转换,弥补了HPLC的不足。汤芳龄等<sup>[8]</sup>利用UPLC建立了小叶黑柴胡的指纹图谱,同时进行聚类分析,实验时采用1.7 μm小粒径填料填充的Waters BEH C<sub>18</sub>色谱柱,以乙腈-水为流动相梯度洗脱,对10批小叶黑柴胡进行测定,标定了28个共有峰,聚类分析将药材质量分为两大类,所用方法稳定、重复性好,可用于小叶黑柴胡的质量控制。

此外,刘卉等<sup>[9]</sup>采用UPLC指纹图谱轮廓建立了快速评价香丹注射液相似度的方法,测定了9个

不同厂家的样品和其中1个厂家的10批香丹注射液UPLC-UV指纹图谱,比较各批次香丹注射液样品的色谱图轮廓考察指纹图谱的相似度,得出采用色谱指纹图谱轮廓能够在一定程度上反映出注射液的质量变化信息,结果与采用峰面积的分析方法差异不大,为快速中药质量评价和生产工艺监控提供可靠依据。

### 2.3 二维液相色谱法

二维液相色谱(2D-LC)是将分离机制不同而相互独立的两支色谱柱串联起来组合而成,它提供了一个真正的正交分离系统,使其分辨率达到最大。2D-LC系统比一维色谱可提供更高的峰容量,更适合于分离复杂体系和痕量分析,不同分离机制的LC联用增加了系统的选择性,适用于需要选择性较高的分离分析,通过在线联用的自动化操作,大大简化了样品前处理过程,这不仅提高了分析方法的可靠性,同时缩短了分析时间,使复杂分析变得简单快捷<sup>[10-11]</sup>。郭菲等<sup>[12]</sup>采用二维液相色谱和质谱联用对中药复方葛根芩连汤中的有效成分进行分离,以CN柱作第一维色谱柱,水和甲醇梯度洗脱分离;以ODS柱作第二维色谱柱,20 mmol/L乙酸铵缓冲液和乙腈梯度洗脱分离;质谱检测采用电喷雾电离/大气压化学电离(ESI/APCI)复合离子源,正负离子扫描。实验结果表明搭建的二维液相色谱-质谱分离平台分离效果好,提高了液相色谱的峰容量和分离效率。该方法操作简便,可作为中药等复杂体系分离分析的有效手段。

## 3 气相色谱法

### 3.1 气相色谱指纹图谱

气相色谱法(GC)具有高效、高选择性、高灵敏度、进样量小、分析速度快等优点,主要应用于中药中挥发性成分的鉴定和质量控制,也可用于经裂解、衍生化等反应后的其他中药成分,如生物碱类、脂肪类、内酯类、酚类、糖类药物等,已成为分析含挥发油类药材的首选方法。杨滨等<sup>[13]</sup>对12个产地的鱼腥草挥发油成分进行GC研究,该方法重复性好,所建立的气相色谱指纹图谱可用于鱼腥草的鉴别,为其质量控制提供依据。李红梅等<sup>[14]</sup>采用水蒸气蒸馏和正己烷萃取藿香正气水,以正十七烷为参照物经毛细管气相色谱柱(含FID检测器)进行分析,建立了藿香正气水的GC指纹图谱。

GC实际应用多与质谱(MS)联用,兼有二者的优点,能实现对样品的在线分析,解决了对照

品缺乏的难题, 可以提供更丰富的化学结构信息, 将经气相分离的成分直接进入质谱仪进行测定, 同时完成待测组分的分离和鉴定, 适用于多组分混合物中未知组分的定性定量分析。王丽丽等<sup>[15]</sup>采用裂解气相色谱/质谱法(Py-GC/MS)测定了10种不同产地的铁皮石斛并结合系统聚类分析法比较了这些铁皮石斛的指纹图谱, 10种样品的指纹图谱具有相似性, 且重现性好; 采用系统聚类分析能区别不同产地的样品。还采用释放气体分析法考察了裂解温度对指纹图谱的影响, 结果表明, 0.4 mg 样品在 450 °C 下可瞬间裂解, 此法快速、简便、准确, 是药材质量控制的良好方法。刘慧等<sup>[16]</sup>采用 GC-MS 和 RRLC-Q-TOFMS 方法分别建立附子理中丸的指纹图谱, 并对色谱峰进行定性分析。并采用系统聚类分析法对指纹图谱进行分类研究。结果定性了 45 个成分, 发现不同厂家的附子理中丸存在一定差异。该方法可以为研究附子理中丸的化学成分和质量标准提供依据。

### 3.2 全二维气相色谱法

全二维气相色谱(comprehensive two-dimensional gas chromatography, GC×GC)类似于二维液相色谱, 它是将分离机制不同而又互相独立的两支色谱柱以串连的方式结合成二维气相色谱, 不同的关键部位在于调制器<sup>[17]</sup>。GC×GC 由于实现了真正的正交分离而具有峰容量大、分辨率高、灵敏度高、族分离和瓦片效应、分析时间短等优势, 是迄今为止能够提供最高分辨率的分离技术<sup>[18]</sup>。将全二维气相色谱和飞行时间质谱联用, 分析不同产地的川芎挥发油<sup>[19]</sup>。建立了川芎挥发油的 GC×GC/TOF MS 指纹图谱, 并应用偏最小二乘法-判别分析对 4 个产区的样品进行了区分, 找出了 20 种差异最大的化合物, 包括蛇床内酯、3-正丁基苯酞和丁烯基苯酞。结合抗氧化实验以及正交偏最小二乘法模型, 找出不同产区样品生化活性的差异, 结果发现, 苯酞类物质对川芎挥发油样品的生产地区差异影响最大。

### 4 高效毛细管电泳色谱法

高效毛细管电泳色谱法(HPCE)是一种高效分离分析技术, 是经典电泳技术和现代微柱分离相结合的产物。它是以高压电场为驱动力, 毛细管为分离通道, 依据样品中各组分之间电泳程度和分配行为上的差异而实现分离的液相分离技术。它具有柱效高、快速、应用模式多、样品用量少、溶剂消耗少、抗污染能力强、前处理简单甚至于不需要前

处理等特点, 适用于分离中药中的生物碱、黄酮及其苷、香豆素类、有机酸类、氨基酸类、核酸类、多肽类及蛋白质类等化合物。车磊等<sup>[20]</sup>建立了桂附地黄丸毛细管区带电泳指纹图谱(capillary electropeoresis fingerprint, CEFP), 以 50 mmol/L 硼砂为背景电解质(BGE)溶液, 采用未涂层石英毛细管(75 cm×75 μm, 有效长度 75 cm), 以色谱指纹图谱分离量指数(Rf)为目标函数优化试验条件, 选择没食子酸为参照峰, 确定了 18 个共有指纹峰, 建立了桂附地黄丸 CEFP。用系统指纹定量法对 12 批桂附地黄丸进行评价, 鉴定出 7 批质量合格, 2 批质量分数明显偏低, 3 批明显偏高, 分布比例不合格。本实验方法简便、快捷、成本低且污染小, 为全面控制桂附地黄丸制剂质量提供了新的方法。

### 5 高速逆流色谱法

高速逆流色谱(high-speed counter current chromatography, HSCCC)是新型的液-液分配色谱技术, 它利用多层螺旋管同步行星式离心运动, 在短时间内实现样品在互不相溶的两相溶剂系统中的高效分配, 从而实现样品分离。近年来随着逆流色谱技术的迅猛发展, 分析型 HSCCC 已经应用到中药指纹图谱研究中, 以此控制中药(材)的品质, 通常将螺旋管柱内径≤1 mm, 柱体积≤50 mL 的多层螺旋管行星式管离心分离仪称为分析型高速逆流色谱仪。它不使用固相载体作固定相克服了样品吸附、损失、色谱柱污染、峰型拖尾等缺点, 具有分离效率高、溶剂用量少、无吸附、样品回收率高、重现性好, 仪器价格低廉、性能可靠、分析成本低、操作简便等优点。顾铭等<sup>[21]</sup>以丹参脂溶性成分为模式物, 利用国产高速逆流色谱有效地分离纯化了 3 批样品, 分别得到 12 个洗脱组分, 不同样品中洗脱峰具有良好的对应性, 洗脱图谱可以表现出不同产地丹参的差别, 洗脱峰的保留时间的 RSD 均<3%, 表现了此方法较好的准确度, 对 HSCCC 研究指纹图谱的可行性做了初步分析。

### 6 微乳色谱法(ME)

微乳色谱是以微乳(microemulsion, ME)为流动相进行的色谱分析。微乳是由表面活性剂、助表面活性剂、油和水按适当比例自发形成的无色透明、各向同性、低黏度的热力学稳定体系。微乳的粒径通常小于 100 nm, 用于色谱流动相的微乳粒径可以小于 10 nm。微乳可以作为薄层色谱的展开剂和毛细管电泳的分离介质, 也可以作为高效液相色谱的

流动相<sup>[22]</sup>。与传统色谱相比,微乳色谱具有应用范围宽、分离效率高、稳定性和重现性良好等特点。

### 6.1 微乳薄层色谱 (METLC)

与传统薄层色谱相比, METLC 分离效果显著提高,分离的灵敏度较高,重现性和溶剂稳定性良好,可以简便、准确、高效地分离和鉴定化合物成分。崔淑芬<sup>[23]</sup>研究了 METLC 在甘草指纹图谱中的应用,与 HPLC 比较,在甘草不同种类的鉴别方面, METLC-FP 更有优势,方法更加简单,图像形象直观、经济和实用;指纹图谱应用于甘草药材的采收期确定方面,二者结果相差不大;在指纹图谱的精细应用方面, HPLC 更有优势,而 HPLC-FP 可用于评价炙甘草炮制工艺和炮制品的稳定性。

### 6.2 微乳电动色谱 (MEEKC)

MEEKC 是一种使用微乳的电驱动分离技术,具有微乳色谱和电泳的双重机制。该法分析速度快、分析效率高、样品消耗少,调节参数较多。李楠等<sup>[24]</sup>采用 MEEKC 法建立不同来源掌叶大黄的指纹图谱,使用未涂层石英毛细管柱 (75  $\mu\text{m} \times 65 \text{ cm}$ , 有效长度 55 cm), 缓冲液为 SDS-正丁醇-正辛烷-10 mmol/L 硼砂溶液 (3.3 : 6.6 : 0.8 : 89.3), 并通过添加 10%乙腈组成的 O/W 型微乳体系,分离电压 18 kV,检测波长 280 nm,本方法可作为掌叶大黄质量评价的有效手段,为 MEEKC 在中药指纹图谱研究中开辟了新的应用途径。

### 6.3 微乳液相色谱 (MELC)

与传统液相色谱相比, MELC 有机溶剂用量少,等度洗脱即可完成分离,分析成本低,对化合物的溶解能力较强,尤其擅于极性或溶解度差异较大的复杂样品分离。任晶波等<sup>[25]</sup>建立了 MELC 同时对吴茱萸中辛弗林、吴茱萸碱和吴茱萸次碱的水平进行测定,通过对表面活性剂种类及浓度、流动相酸度、添加剂等因素的考察,获得了最佳微乳体系 (3.0% SDS-6.0%正丁醇-0.6%正辛烷-1.0%甲酸-1.2%乙腈-88.2%水) 和色谱条件,并进行了方法学考察,对不同产地的 5 批样品进行分析。结果表明,本方法快速、准确,可用于对吴茱萸中 3 种成分的质量分析与监控。

此外,中药指纹图谱的分析方法还有光谱法(包括紫外光谱法、红外光谱法、近红外光谱法),波谱法(有质谱法,核磁共振法等),DNA 指纹图谱,X 射线衍射指纹图谱,分子生物学法等其他方法。随着鉴定技术和分析仪器的不断革新升级,被国际

认可作为中药质量控制的有效手段的指纹图谱趋于多样化,更加全面的被应用实施,加快了中药现代化的进程,能更好的与国际接轨。

### 参考文献

- [1] 孟 楣, 段风娥, 王晓玉, 等. 以黄芪为参照新风胶囊指纹图谱的初步研究 [J]. 中医药临床杂志, 2011, 23(6): 545-547.
- [2] 张丽艳, 罗 君, 李 健, 等. 吴茱萸药材薄层色谱指纹图谱研究 [J]. 中国实验方剂学志, 2011, 17(12): 72-75.
- [3] Ciesla L, Hajnos M, Staszek D, *et al.* Validated binary high-performance thin-layer chromatographic fingerprints of polyphenolics for distinguishing different *Salvia* species [J]. *J Chromatogr Sci*, 2010, 48(6): 421-427.
- [4] 谢培山. 中药色谱指纹图谱 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 23.
- [5] 王 欢, 李琴韵. 白桦总三萜类成分高效液相色谱指纹图谱研究 [J]. 上海中医药杂志, 2011, 45(8): 73-77.
- [6] Wang H L, Yao W F, Zhu D N, *et al.* Chemical fingerprinting by HPLC-DAD-ELSD and principal component analysis of *Polygala japonica* from different locations in China [J]. *Chin J Nat Med*, 2010, 8(5): 343-348.
- [7] 李文博, 韩建平, 高 钧, 等. 养血清脑颗粒的高效液相色谱指纹图谱研究 [J]. 分析化学, 2011, 39(3): 387-391.
- [8] 汤芳龄, 蔡光明, 袁 波, 等. 小叶黑柴胡超高效液相色谱指纹图谱研究 [J]. 中南药学, 2010, 8(3): 230-234.
- [9] 刘 卉, 姚卫峰, 张 丽, 等. 基于超高效液相色谱指纹图谱轮廓的香丹注射液相似度快速评价 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(12): 48-50.
- [10] 高 辉, 温学森, 马小军, 等. 二维液相色谱技术在药物分析中的应用 [J]. 药物分析杂志, 2007, 27(4): 616-620.
- [11] Stroink T, Mireya C O, Auke B, *et al.* On-line multidimensional liquid chromatography and capillary electrophoresis systems for peptides and proteins [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2005, 817(1): 49.
- [12] 郭 菲, 王 彦, 王刃锋, 等. 二维液相色谱-质谱联用分离中药复方葛根芩连汤中的有效成分 [J]. 色谱, 2008, 26(1): 15-21.
- [13] 杨 滨, 王若普, 王谦朋, 等. 鱼腥草中挥发油成分的气相色谱指纹图谱研究 [J]. 中国中药杂志, 2006, 31(24): 2055-2057.
- [14] 李红梅, 茹 鑫, 梁 悦, 等. 藿香正气水气相色谱指纹图谱特性研究 [J]. 中成药, 2010, 32(1): 6-10.

- [15] 王丽丽, 王 聪, 潘再法, 等. 铁皮石斛的裂解气相色谱指纹图谱及其系统聚类分析 [J]. 色谱, 2008, 26(5): 613-617.
- [16] Liu H, Su J, Yang X, *et al.* A novel approach to characterize chemical consistency of traditional Chinese medicine Fuzi Lizhong Pills by GC-MS and RRLC-Q-TOFMS [J]. *Chin J Nat Med*, 2011, 9(4): 267-273.
- [17] 丁 雪, 石力夫, 杨 璐. 新型色谱分析技术在中药指纹图谱研究中的应用 [J]. 国际药学研究杂志, 2008, 35(6): 447-450.
- [18] 邱涯琼, 路 鑫, 许国旺. 全二维气相色谱在药物分析中的应用 [J]. 药物分析杂志, 2008, 28(3): 498-505.
- [19] 王 楠, 张 艺, 李 响, 等. 全二维气相色谱/飞行时间质谱分析不同产地的川芎挥发油 [J]. 色谱, 2010, 28(4): 329-335.
- [20] 车 磊, 孙国祥, 李闰飞. 桂附地黄丸的毛细管电泳指纹图谱研究 [J]. 中南药学, 2011, 9(6): 460-463.
- [21] 顾 铭, 张贵峰, 苏志国, 等. 高速逆流色谱技术在丹参指纹图谱中的应用 [J]. 中国药品标准, 2005, 6(6): 7-12.
- [22] 张守尧, 姚育法. 微乳液相色谱法及其研究进展 [J]. 中国药师, 2009, 12(7): 884-886.
- [23] 崔淑芬. 微乳薄层色谱及其在中药甘草指纹图谱质量控制方面的应用研究 [D]. 厦门大学, 2006.
- [24] 李 楠, 潘 红, 丁绍东, 等. 微乳电动毛细管色谱在掌叶大黄指纹图谱上的应用 [J]. 2008, 27(9).
- [25] 任晶波, 戴 敏, 李 宁. 微乳液相色谱法对吴茱萸中辛弗林、吴茱萸碱与吴茱萸次碱含量的测定 [J]. 分析测试学报, 2011, 30(5): 562-565.

## · 信 息 ·

### FDA 宣布撤销阿瓦斯汀 (Avastin) 治疗乳腺癌的许可

2011年11月18日, 美国食品药品监督管理局 (FDA) 正式宣布, 因阿瓦斯汀 (Avastin), 通用名贝伐单抗 (bevacizumab) 对乳腺癌的治疗未显示出应有的临床安全性和有效性, 所以决定撤销其对该适应症的许可事项。但阿瓦斯汀仍被许可用于治疗某些结肠、肺、肾脏及脑部的癌症 (多形性胶质细胞瘤)。

阿瓦斯汀已有的治疗风险包括: 重度高血压; 出血及溶血; 心脏病或心力衰竭; 鼻、胃、肠等不同部位的穿孔现象。

FDA 表示, 11月18日的决定集中反映了 Hamburg 局长的长达 69 页的意见报告, 包括阿瓦斯汀联合抗癌药紫衫醇用于那些未曾用化疗治疗 HER2 阴性的转移性乳腺癌的患者, FDA 认为该适应症现必须从阿瓦斯汀的药品标签中去除。

Hamburg 局长表示, 撤销决定是基于多方面的资料, 其中包含提交到公共纪事的数千页文件, 来自几项临床试验的数据和 2011年6月举办的一个为期两天的听证会。

Hamburg 局长说: “撤销阿瓦斯汀的乳腺癌适应症, 这是一个非常艰难的决定。FDA 意识到患者及其家属在应对转移性乳腺癌上的难处并且亟待一个更为有效的治疗方法。但患者必须对他们所服用的药物在预治疗疾病上的安全性和有效性有足够的信任。通过评估现有研究可明确得出, 服用阿瓦斯汀治疗转移性乳腺癌的妇女有着可能危及生命的风险, 而在延迟肿瘤生长方面却欠缺证据表明阿瓦斯汀可以提供与以上风险相对等的治疗收益。同时目前也没有任何证据表明服用阿瓦斯汀可以延长患者的生命或改善生活质量。”

(本刊讯)