

## · 综述 ·

## 中药指纹图谱研究的有关技术要点探讨

李 克,王曙东

(南京军区南京总医院,江苏 南京 210002)

**摘 要:** 简要介绍了中药指纹图谱的原理,提出了在进行中药指纹图谱研究时,选择中药材来源、样品处理方法、检测技术及参照物的原则和注意事项。探讨了用高效液相色谱技术制备中药指纹图谱的有关技术要点问题,样品洗脱应尽可能选用等度或线性梯度洗脱,检测器的选择应尽可能采用二极管阵列检测器,以方便地选定适合于指纹图谱检测的最佳检测波长。指纹图谱相似度评价软件的引入,不仅可大大降低人工计算指纹图谱相似度的工作强度,而且减少了人为判断的随意性和主观性,提高了中药指纹图谱量化评判的客观标准。

**关键词:** 中药;指纹图谱;高效液相色谱;中药现代化

中图分类号: R28 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)11-附 8-03

## Key technology of fingerprint spectrum analysis on Chinese materia medica

LI Ke, WANG Shu-dong

(Nanjing General Hospital of Nanjing Military Region, Nanjing 210002, China)

**Key words** Chinese materia medica (CMM); fingerprint spectrum; HPLC; modernization of CMM

长期以来中药在生产、使用中显现出的不足严重地阻碍了中药成为能持续增长的行业,其中最为重要的原因是中药及其制剂生产质量标准缺乏,且与临床存在着不对应性。这极大地限制了中药被国际市场的认同和采用。随着我国成功加入 WTO,中医药面临着前所未有的发展机遇和挑战。作为具有我国自主知识产权的中药产品,如何能被世界所认同和接受,是一个摆在我们面前亟待解决的问题。实现中药现代化已成为国家的中药政策,我国在制订医药科技“十五”计划和 2015 年发展规划时,提出要重点解决中药材质量规范化问题,按照现代药理学理论制订新的质量标准,其中加强中药品质评价的现代化和标准化是重要的内容之一<sup>[1,2]</sup>。2000 年 8 月国家药品监督管理局决定首先以建立中药注射剂指纹图谱为突破口,提高中药的质量标准水平,以逐步实现中药材、中成药质量标准的现代化。

中药指纹图谱是指中药材经适当处理后,采用一定的分析手段和仪器检测得到的,能够标示该中药及其制剂中的各种组份群体特性的共有峰的图谱。通过指纹图谱整体特征峰的相对保留时间及含量或比例的制定和比对,达到有效地控制中药材及中药产品质量,保证产品质量的相对稳定。与以往的中药质量检测相比,中药指纹图谱引入了可以进行量化评判的客观标准,虽然它不能代替某一部分的含量测定,但由于它综合反映了某一特定药材各主要组份的含有情况,以及彼此相对含量的内在质量状况,因此,它比测定任何单一或某几个成分所提供的信息都丰富和有用得多。尤其适用于对有效成分不完全明确或不需要完全弄明确的情况下,对中

药材及中药产品的质量控制,目前已成为国际公认的控制中药或天然药物质量的最有效手段<sup>[3]</sup>。

实施中药指纹图谱难免会有一个提高、完善的过程。从技术上说,中药指纹图谱的建立是完全可行的,但在实际应用中,还要解决许多面临的问题。主要有以下几个方面。

## 1 中药材来源及样品处理

对制作指纹图谱的动、植物药材必须做到固定品种、药用部位、产地、采收期、产地加工和炮制方法。对矿物药应固定产地和炮制、加工方法,这是制定合格指纹图谱的先决条件。对供试样品的取样应注意样品的代表性与均匀性,以保持实验室取样与实际生产应用药材一致。除此之外,还必须组方和用量固定,生产工艺稳定。

## 2 检测方法

作为一张合格的指纹图谱必须具有特征明显、专属性强、重现性好的特点,而且要求做到操作和应用方便。即图谱中反映的化学成分信息应具有唯一性和充分性。其反映的综合结果能特征地区分 2 种中药或制剂彼此间的“相似”程度,以达到识别真伪与优劣的目的。同时,选择建立的实验方法和条件应易于推广执行。在不同的实验室和不同的操作者之间,应用相同的检测方法测定同一品种、同一样品,所得到的指纹图谱其整体特征应有较高的相似度。有些方法虽然作为指纹图谱研究是可行的<sup>[4]</sup>,但还应兼顾考虑目前生产企业和中等水平的分析实验室,以及省级以上的法定检验机构的实验条件和仪器设备情况,以便一旦药品监督管理部门将指纹图谱批准成为质量标准的内容后,可实际推广执行。目前最

\* 收稿日期: 2003-02-18

作者简介: 李克(1955-),男,山东章丘人,硕士,教授,主要从事药物分析及临床生化研究,在国内外已发表研究论文 50 余篇,参编专著 3 本,获得国家教委和军队科技成果奖励 11 项。

常采用的制备中药指纹图谱的检测方法有两类:光谱法和色谱法。光谱方法如紫外光谱和红外光谱在实际应用中能提供识别的信息较少,往往当同类化合物其取代基团发生变化时,对应的光谱却难以体现出来<sup>[5]</sup>。因此,采用光谱法制备的指纹图谱专一性不强,认可程度低,建议尽量不要采用。色谱法最大特点在于可进行复杂组份的成分分离,特别是新的高效、通用检测器的发展和引入,使得采用色谱法检测可得到足够多的图谱识别信息,是目前制备指纹图谱的主流方法。尤其是薄层色谱(TLC)、气相色谱(GC)和高效液相色谱(HPLC)技术已成为3种公认常用的指纹图谱分析手段。其中特别又以HPLC分离效率高、分析速度快、样品适应性强、检测器种类多、灵敏度高、稳定性、重复性好而备受推崇,成为制备指纹图谱的首选方法<sup>[6-8]</sup>。

2.1 参照物的选择:以色谱法制备得到的特征指纹图谱识别信息,主要是色谱峰的相对保留时间和相对峰面积比值。因此,在图谱测定中必须选择合适的参照物,以起到辨认和评价色谱指纹图谱特征的指引作用。常用的参照物可采用对照品或内标物。采用内标物作为参照物时,要求其化学性质应适合于与供试品相同或相似的色谱分离检测条件。这在实际分析中往往难以满足,尤其较复杂的指纹图谱往往难以选择到保留时间合适的内标物插入图谱中。因此,在实际应用中一般尽量选择容易获取的,一个以上注射剂中的主要活性成分或指标成分作为参照物,以考察指纹图谱的稳定程度和重现性,并有助于色谱的辨认。同时,也可初步了解图谱中各色谱峰成分的性质。

2.2 高效液相色谱系统及试验条件选择:高效液相色谱法是目前制备中药指纹图谱最为广泛使用的方法。但由于色谱指纹图谱测定与药物含量测定相比有其特殊性,因此,不宜简单套用含量测定用的实验条件进行色谱指纹图谱测定。应通过比较试验,选取相对简便易行的实验方法和条件,获取足以代表品种特征的指纹图谱。以满足指纹图谱专属性、重现性和普遍适用性的要求。

2.2.1 色谱指纹图谱一次进样记录时间一般为60 min,有时甚至需要记录更长时间。因此,要求实验使用的高效液相色谱仪器系统,尤其是高压恒流泵和检测器应具有良好的稳定性和可靠性,以减少漂移。同时,应有特别的措施保证仪器系统的清洗和维护。

2.2.2 制备指纹图谱使用的液相色谱柱应在对3个以上不同厂家生产的色谱柱进行试验比较的基础上,选定色谱柱的规格及来源。选择中应注意色谱柱生产厂家的规模、质量稳定性以及柱填料的普及性。尽量选择常用品牌及规格的填料装填的色谱柱,以满足指纹图谱检测,尤其是生产质量控制过程指纹图谱检测的长期需求。试验过程中色谱柱应尽可能采用柱温箱恒温环境,以减少气候及实验室温度变化对指纹图谱测定的影响。同时,在使用中,应有可靠的方法进行柱效评价,并适时进行校验,以防止因柱效下降导致指纹图谱相似程度降低。

2.2.3 对样品洗脱应尽可能选用等度洗脱,如确需梯度洗

脱时,宜采用线性梯度洗脱,尽量避免复杂的多阶程序洗脱条件,并应测定和报告仪器的梯度滞后时间。

2.2.4 检测器的选择应尽可能采用常见的紫外-可见光检测器,对检测波长的选择应注意考虑适合指纹图谱测定的整体要求,一般可在几个不同的检测波长条件下试验选择,而不应只简单套用含量测定下的检测波长。因为含量测定的检测波长常常只是针对某一特定的待测组份而定,不一定适合指纹图谱的要求。在条件许可时尽可能采用二极管阵列检测器,以方便获取不同波长下得到的色谱图,从而选定适合于指纹图谱检测的最佳检测波长。对某些成分复杂的品种而言,当在一个检测波长下制备得到的色谱指纹图谱不能全面综合反映该品种指纹图谱特征时,可采用在几个不同波长条件下,制备由几张指纹图谱构成的一套色谱指纹图谱。

### 3 评价指标

指纹图谱的评价指标是以供试品指纹图谱与该品种对照用指纹图谱(共有模式)之间的相似性来衡量的,这种相似性比较可以用“相似度”表达。根据国家药品监督管理局颁布的《中药注射剂指纹图谱实验研究技术指南》规定:指纹图谱相似度可以借助国家药典委员会推荐的“中药计算机辅助相似度评价软件”计算。一般情况下当成品相似度计算结果在0.9~1.0(90%~100%)时视为符合要求。指纹图谱相似度评价软件的引入不仅大大降低了人工计算指纹图谱相似度的工作强度,而且减少了人工判断的随意性和主观性,提高了中药指纹图谱量化评判的客观标准。但在实际应用中应注意,只有用色谱工作站记录处理的指纹图谱才具备了用评价软件计算的基础。而用记录仪或积分仪等设备记录处理的色谱图数据,评价软件一般无法处理。此外,还应注意选用的色谱工作站谱图记录处理的格式必须与评价软件相兼容,否则指纹图谱相似度评价软件也不能作计算评估。目前,国家药典委员会推荐的“中药计算机辅助相似度评价软件”数据格式可与沃特斯(Waters)、岛津(Shimadzu)以及安捷伦(Agilent)等仪器厂家生产的色谱工作站数据格式直接兼容。

### 4 结语

中药指纹图谱的谱图处理鉴别是借用了法医学的指纹鉴别概念,但又不同于法医鉴定意义上的人体指纹识别。中药提取物的指纹图谱不是绝对的唯一性,而更强调的是同一药材在相同的条件下个体之间的相似性。由于中药指纹图谱能较全面地反映所含成分的相对关系,较好地体现中药成分的复杂性和相关性,从而更好地评价、控制中药质量。因此,中药指纹图谱必将成为中药质量评价的发展趋势。规范、标准的中药指纹图谱的实施和推广,将会促进实现中药现代化的进程<sup>[9]</sup>。

### References

- [1] Liu M Y, Yuan Y J, Zhu S B. Progress of modernization in TCM [J]. *Chin Tradit Herd Drugs* (中草药), 2002, 33(3): 193-196.
- [2] Zheng H Z, Dong Z H, She J. *Modern Study of Traditional Chinese Medicine* (中药现代研究与应用) [M]. Vol VI. Beijing: Xueyuan Press, 1997.
- [3] Ren D Q. Significance and action of quality control technolo-

- gy employing the fingerprint of Chinese materia medica [J]. *J Tradit Med Mater (中草药)*, 2001, 24: 235-239.
- [4] Qin H L, Shang Y J, Zhao W, *et al.* Identification of chinese gold thread (*Coptis chinensis*) [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2000, 31(1): 48-50.
- [5] 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): 391-395.
- [6] Liu L J, Zhang Q B, Zhang S J. Study on HPLC-FPS analysis of *Radix Acanthopanax Sentiocosi* and comparative study on its different sources [J]. *Chin Tradit Pat Med (中成药)*, 2001, 23(11): 781-783.
- [7] Jia X B, Shi Y F, Chen Y, *et al.* Study on HPLC fingerprint of compound Renshen Injection [J]. *Chin Tradit Pat Med (中成药)*, 2002, 24(4): 243-245.
- [8] Zhou X Y, Zhang L X, Zhang L, *et al.* Study on HPLC fingerprint analysis of *Flax Carthami* [J]. *Chin Tradit Pat Med (中成药)*, 2002, 24(5): 325-327.
- [9] Li K, Wang S D, Song B S. Fingerprint of Chinese materia medica and its effects on development of Chinese materia medica [J]. *Chin Tradit Herb Drugs (中草药)*, 2002, 33(11): 961-963.

## 海绵动物的生物活性产物及其药理作用

巫志峰, 许东晖\*, 梅雪婷, 许实波

(中山大学药学院 药物药理研究室, 广东 广州 510275)

**摘要:** 概括来源于海洋海绵动物中新发现的 36 种生物活性次生代谢产物, 阐述其化学成分及药理作用的研究进展。其化学成分具有生物碱、甾醇、萜类、大环内酯、肽类等。经药效评价且有抗菌、抗病毒、抗肿瘤以及心血管活性等药理作用。这些具明显药理作用的生理活性化合物, 作为新药先导化合物进行研究开发, 具有良好的应用前景。

**关键词:** 海绵动物; 生物活性产物; 先导化合物

中图分类号: R282.74

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2003)11-附 10-06

### Pharmacological effects of bioactive products from animal of marine sponge

WU Zhi-feng, XU Dong-hui, MEI Xue-ting, XU Shi-bo

(Section of Drugs and Pharmacology, College of Pharmacy, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

**Key words** animal of marine sponge; bioactive products; leading compounds

海绵 (marine sponge) 属于多孔动物门 (Porifera), 是最原始的低等多细胞海洋动物, 全世界约有 10 000~15 000 种, 我国也有 5 000 种左右<sup>[1]</sup>。海绵的固着生活方式, 缺乏有效的物理性防御, 由此产生的海绵化合物, 具有显著的生物活性, 包括抗菌、抗肿瘤 (细胞毒性)、抗真菌、抗病毒 (甚至抗 HIV)、抗炎、心血管等活性, 尤其是细胞毒性化合物超过 10%, 显著高于其他海洋动物 (2%), 陆生植物 (<1%) 或微生物 (<1%)。据 1997-2000 年 CA 收录关于海绵研究的 684 篇论文中, 活性物质研究的论文占总数的 41.7%, 发现抗肿瘤活性的报道占 52.6%, 有 150 篇之多, 涉及到的活性物质约 307 种; 抗 HIV 活性物质的研究论文累计 8 篇, 发现了 15 种具有体外抗 HIV 活性的天然物质<sup>[1]</sup>。

本文通过 Medline 联机检索查新后, 选取了具研究代表性, 并有进一步研究或开发价值的新化合物 36 种, 分别阐明其来源、化学成分和药理作用, 系统地概括具生物活性的海绵天然产物的研究进展和学术动态, 这对于研究开发新药具有学术意义。

#### 1 氟化硅酸钾 ( $K_2SiF_6$ )

从穆氏软海绵 *Halichondria moorei* 中分离所得。经 X 光和原子吸收光谱分析, 发现其体内有大量的氟化物, 确定该海绵抗炎成分为  $K_2SiF_6$ 。在不同海域分别采集到两批这种海绵进行定性分析表明: 该海绵干品的氟含量为 11.5% 和 9.75%, 换算成  $K_2SiF_6$  分别为 22.2% 与 18.7%; 按湿品计算, 两批海绵平均含  $K_2SiF_6$  为 6%。有很好的消炎作用, 新西兰海岸的毛利人, 自古以来用这种海绵外敷伤口。

#### 2 二倍半萜烯类化合物 (manoalide, MLD)

二倍半萜烯类物质 manoalide (MLD) 采自栖息于太平洋西加罗林群岛附近水深 20~35 m 处的海绵 *Luffariella variabilis*, 分子式为  $C_{25}H_{36}O_6$ , 为不定形固体物。结构新颖, 与已知的镇痛药如吗啡、内啡肽、水杨酸盐及吲哚美辛等结构上无相关性。MLD 对磷脂酶 A 磷脂酶 C 鸟氨酸脱羧酶及醛糖还原酶等多种酶具有抑制作用, 对细胞膜上  $Ca^{2+}$  通道有阻滞作用, 对环氧酶 (COX) 与脂氧酶有双重抑制作用, 是一种具有重要开发研究价值的海洋天然产物。

##### 2.1 抗炎作用

2.1.1 对磷脂酶的抑制作用: 体外实验证明, MLD 具有显

\* 收稿日期: 2003-03-11

基金项目: 国家海洋 863 课题资助 (2001 AA624080)

作者简介: 巫志峰, 中山大学药学院天然产物药理学研究方向硕士生

\* 通讯作者 Tel (020) 84113651 E-mail Lsdl@zsu.edu.cn