

现代分析技术在中药质量评价中的应用

南洋 徐鹏 丁宏 刘莉莉 董辉 马薇薇

【摘要】 中药在世界各地得到广泛使用,西方国家也逐渐选择中药作为辅助治疗的药物。然而,中药存在成分不明确等质量和安全问题,阻碍了中药在国际社会医疗保健中的应用与普及,这正是前沿的分析技术急需解决的关键问题,确保可重复识别和检验中药所含的化学成分。近年来技术先进的分析仪器不断研发,灵敏度和精确度得到明显的提高,可采用更高分辨率仪器分析多组分混合物,推动中药的质量控制标准朝着标准化方向进行。本文主要综述分析技术在中药材及其提取物质量监控和鉴定上的最新应用。

【关键词】 分析仪器; 中药材; 色谱指纹图谱; 超高速液相; 液质联用; 气质联用; 多组分

【中图分类号】 R284.1 **【文献标识码】** A doi:10.3969/j.issn.1674-1749.2015.11.043

The Review on analysis technique in the evaluation of quality of traditional Chinese medicine NAN Yang, XU Peng, DING Hong et al. College of pharmacy, Heilongjiang university of Chinese medicine, Haerbin 150040, China

Corresponding author: MA Wei-wei, E-mail: mawei-wei@163.com

【Abstract】 Traditional Chinese medicine (TCM) is widely used in all over the world, and more

基金项目: 2014 年哈尔滨应用技术与开发项目(2014RFQXJ1162), 2013 年度黑龙江中医药大学科研基金面上项目(201307, 201316)

作者单位: 150040 哈尔滨, 黑龙江中医药大学药学院(南洋、刘莉莉、董辉、马薇薇); 辽宁中医药大学针灸推拿学院(徐鹏); 山西仟源制药股份有限公司(丁宏)

作者简介: 南洋(1983-), 女, 硕士, 讲师。研究方向: 药物代谢与质量研究。E-mail: nancy_you530@sina.com

通讯作者: 马薇薇(1980-), 女, 博士, 副教授。研究方向: 药用植物资源开发利用。E-mail: mawei_wei@

163.com

and more western countries choose TCM as complementary therapy drugs. However, the quality, the safety and the unclear composition are important problems which as a hinder in the popularization and application of Chinese medicine in the international community health care area. These are the key problems to be resolved in the frontier of analysis technology. Repeatable identification chemical composition of TCM could be ensured. With improvements in engineering advanced analytical instruments in recent years, the sensitivity and accuracy have been improved obviously, which make the multicomponent mixture analyzed at a higher resolution, and promote the quality control of TCM toward standardization direction. This paper discusses the application of main analytical techniques in TCM, TCM formula and its extract on quality monitoring and evaluation.

【Key Words】 Analytical instrumentation; Chinese herbal medicine; Chromatographic fingerprinting; Ultra-performance liquid chromatography; Liquid chromatography coupled to mass spectrometry; Gas Chromatograph coupled to Mass Spectrometry; Multi-component mixture

在现代回归自然的理念引导下,中药以实际的疗效、丰富的资源、广泛的分布引起了全世界的关注^[1],但对于中医理论的认同仍然有很大的障碍。与西药的质量评价相比,中药成分过于复杂,给中药质量监控带来了极大的不便。中药的传统剂型是汤剂、膏剂、散剂或丸剂,由于近代制剂技术的发展,片剂、栓剂、注射剂等各种剂型不断出现。然而经过配伍组方到形成中成药的过程中,药物所含的大量活性成分和它们的相对浓度会受到一系列因素的影响,包括药材种类、基源和生产工艺等^[2-5]。这种内在化学成分多样性、可变性给分中药质量控制方法带来了多重的挑战。近几年来分析仪器得到长足发展,在灵敏度的设计上取得了迅速进展,给含有多组分混合物的中药以及中药制剂的分析提供了更高的分辨率。现在主要的分析技术包括超高效液相色谱(ultra performance liquid chromatography, UPLC)、二维液相色谱(two-dimensional liquid chromatography, 2DLC)、气相色谱(gas chromatography, GC)、质谱(mass spectrometry, MS)可以单独应用,但通常串联起来使用,对中药的质量控制作用增强,因此本文运用具体例子阐明新的关键分析技术在分析和鉴别中药方面中的应用。

1 色谱分离技术

1.1 超高效液相色谱

UPLC 液体色谱系统可以运行在 6000 ~ 15000 psi 的压力范围内,相比于使用较大粒径柱的高效液相分辨率明显增加。UPLC 最近被证明是在快速色谱分离技术发展过程中的最有前景的技术之一。在实验中,与传统高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)相比,UPLC 运用更少量的溶剂和较少的时间,特别是 UPLC 超高的分析

速度极大提高大批量样品的分析效率。有文献报道 UPLC 相比于 HPLC 有明显的优势:峰容量是其 2 倍,速度是 10 倍,灵敏度增加 3 ~ 5 倍^[6]。运用更高的柱压,采用 2 μm 微粒填充柱使其有更高的速度流过固定相,在提高分辨率的同时减少分析时间。由于 UPLC 需要更小填充颗粒的液相色谱技术,通过减小颗粒粒径来提高通过速度,但是柱压明显升高。总的来说,UPLC 显示出更高的分离效能,高水平的系统稳定性,并将其与高度敏感的检测方法相结合。UPLC 较 HPLC 更加简便迅速,既达到了分析的高通量,得到更高的分析灵敏度,又大大提高了分析速度,减少了有机溶剂的消耗^[7]。它是在 HPLC 之后使用更加广泛、高效的分析技术。UPLC 以其高分辨率已经完全用于大黄中鞣质和蒽醌类成分的水解后溶出量的快速定量分析^[8]。同样,运用 UPLC 可快速地同时测定丹参中五种脂溶性成分的含量^[9]。色谱指纹图谱在多组分化学分析,特别是中药的化学成分分析中成为重要标准,其中超高效液相色谱法已成功地应用于评价不同产地苍耳子的研究^[10]。

1.2 二维液相色谱仪

“峰重叠”是液相色谱误差来源的重要因素。由于受到分析技术的限制,相近保留时间化学成分的分​​离问题制约了复杂样品中的色谱峰识别,这一问题在中药或是方剂的分析中更为显著。峰重叠虽然可采用连续不断的多元检测方法,但这是一个非常繁琐并且代价很高的解决问题的方案。然而二维、多维分离技术的出现在分析复杂的样品过程中提供了巨大的帮助,可以作为更有效的方法去解决复杂的问题。在色谱技术中,现应用这种方法主要包括二维气相色谱、二维液相色谱和各种串联质谱来解决多组分峰重叠的问题。全面的二维液

相色谱分离是采用多重分离模式和利用所有可用的分辨率,在每一维进行分离组分,这种方法可以显著增强色谱峰的容量,提供良好的灵敏度和强大的分辨率,如果同时结合其他探测器分析复杂的中药时,可展现更多的优势,尤其是质谱检测器^[11]。二维、多维系统利用不同的分离原理可使样品采用不同维度达到充分的分离。通过充分利用样品成分的理化特性,在每一个维度上都尽量达到较好的分离效果,在整体上有效降低了样品的复杂程度^[12]。

2 串联色谱技术

质谱是用于识别从天然产物中提取的未知的化合物时的检测器。各种质谱仪已经与串联技术相结合应用于大量的研究中。一般来说,根据质谱各自的分析仪器的准确性和灵敏度的区分,可分为高分辨率质谱和低分辨率质谱。低分辨率质谱已成为中药首选的分析仪器,其优点在于容易操作,成本较低且体积较小。高分辨率质谱允许识别目标化合物的质核比可以达到低于 5 ppm 的质量误差,当检测值达到低于 1 ppm 时,可以从测得的质量数判定其唯一元素组成。串联色谱主要有 LC/MS 及 GC/MS,它允许在中药样品中同时进行多成分检测,而且一次进样可以获得母离子和碎片离子的信息,通过比较保留时间、分子量和碎片等信息,可用于中药检测和目标化合物的识别。

2.1 液相色谱-质谱联用(LC-MS)

2.1.1 液相色谱-离子阱质谱(LC-IT-MS) 离子阱质谱仪是先把离子聚集到阱内,通过低能量碰撞诱导解离,获得碎片信息,其具有多级质谱功能,对于解析化合物结构更有优势。高效液相色谱法结合 IT-MS(离子阱质谱)在结构解析、碎片的解离行为、母离子的裂解途径和结构鉴定上优势明显,例如可以快速鉴定复方毛冬青冲剂中三萜皂苷活性成分,在复方毛冬青冲剂中鉴定出 1 种三萜酸和 8 种三萜皂苷成分,并推测了其它 3 种可能的三萜皂苷化学成分^[13]。这种多功能的离子阱质谱同样被应用于酸枣仁汤中化学成分的分析,共鉴定了酸枣仁汤中 48 个化合物,并对化合物的药材来源进行了归属,首次报道了方剂中的 31 个化合物^[14]。

2.1.2 三重四级杆液质联用 三重四级杆液质联用技术可以运用选择离子检测(selected reaction monitoring, SRM)和多反应监测(multiple reaction

monitoring, MRM)两种模式。在 MRM 模式,色谱分离的优化更加简单,并且母离子和子离子监测可提高检测的特异性和识别已知分子。重要的是,这种三重质谱既有传统的三重四级杆的 MS/MS 扫描、线性离子阱功能,根据质量数进行全扫描分析还可以获得 MS³的数据^[15]。三重四级杆线性离子阱质谱仪(Triple quadrupole trap mass spectrometer, QTrap)在离子阱模式下, QTRAP 的 MS/MS 质谱图的灵敏度比常规的三重四级杆高出二个数量级以上,同时还将两者的扫描功能巧妙的结合起来,实现“串联四级杆-线性离子阱”的迅速切换。三重四级杆液质联用仪(liquid chromatography-triple quadrupole trap mass spectrometer, LC-QTrap-MS)已成功定量和定性识别出一系列中药及有效成分(例如北沙参),运用 LC-QTRAP-MS 特有的灵敏度和特异性可研究出北沙参中 15 种化学成分^[16]。

2.1.3 液相色谱-线性离子阱静电场轨道阱组合式质谱联用(LC-LTQ-Orbitrap-MS) 线性离子阱静电场轨道阱质谱仪(linear ion trap/orbitrap mass spectrometry, LTQ Orbitrap MS)组合轨道阱与线性离子阱,是最新的联用仪器,具有所有传统的 MS 扫描功能和较高的捕获能力(利用线性离子阱)和高精密度的质量测定(使用的轨道阱),但数据采集速率相对缓慢。采用液相色谱-线性离子阱/静电场轨道阱组合式质谱联用(liquid chromatography-linear ion trap/orbitrap high resolution mass spectrometry, LC-LTQ-Orbitrap-MS)对三七化学成分进行定性及定量分析,共鉴定分析了 43 个成分,并首次从三七中检测到新型的三七皂苷母核和乙酰取代皂苷成分^[17]。又如运用 LC-LTQ-Orbitrap-MS 分别建立黄芪、三七谱数据库,对复方三芪口服液化学成分进行分离,根据分子和质谱碎片信息,从复方三芪口服液中分析鉴定了 39 个成分^[18]。

2.2 气相色谱-串联质谱(GC-MS)

GC-MS/MS 具有高灵敏度和强抗干扰能力,是分析、鉴定具有挥发性成分的首选仪器。快速测定方法用于挥发油的分析,如对白豆蔻的指纹图谱分析^[19]。利用 GC-MS 技术分析桂枝茯苓丸脂溶性成分的指纹图谱研究。利用 GC-MS 发现二妙丸中 5 个未见报道的挥发油成分:2-羟基-5-甲基苯乙酮、4,4-dimethyl-3-(3-methylbut-3-enylidene)-2-methylenebicyclo[4.1.0]heptane; β-没药醇(β-bisabolol);长叶醛(folic acid);泪杉醇(manool)^[20]。

2.3 二维液相色谱串联质谱(2DLC-MS)

中药化学成分复杂,有的类别差异较大,仅用一种分离手段不能达到区分的要求,2DLC 将不同的分离方法联用,提高对中药成分的分离能力,增加色谱的峰容量,建立了用阳离子交换色谱与反相加压毛细管电色谱结合的二维分离平台,采用三种分离原理分析了中药材黄柏^[21]。

2.4 联合在线鉴定技术

在线分离技术是鉴定中药关键成分及复杂结构的强大工具,对于进一步鉴定带电粒子的结构,MS 都可以应用。联合在线的高效液相串联电子喷雾多级质谱(high performance liquid chromatography-electrospray ionization source/mass spectrometryⁿ, HPLC-ESI/MSⁿ)和离线的傅立叶变换离子回旋共振质谱法(fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry, FTICR-MS)技术能够快速地对中成药进行鉴定。例如陈娟娟等^[22]运用液质联用技术在线快速识别与分析了药用植物通光藤中 18 个聚氧孕烷糖苷化合物,通过傅立叶变换离子 FTICR-MS 离线确定这些化合物的准确元素组成。

3 结语与展望

综上所述,本文探讨了 UPLC、2DLC、GC、LC-MS 等多种分析技术的特点和原理,根据其不同特性,采用这些技术手段作为基础分析方法,可以识别和鉴别中药材真伪,分离、鉴定中药成分,并发现其潜在的毒性。所有这一切都还需要研究者继续努力朝着中药产品标准化、规范化、安全、有效的目标努力,突破中药多成分的阻碍,利用液相和质谱两大技术提高中药的质量鉴定标准,为全球人类的健康提供药材。

参 考 文 献

- [1] 夏建飞,梁琼麟,罗国安.现代中药分析新进展[J].中国科学,2010,40(6):641-650.
- [2] 赵晓莉,张新庄,狄留庆,等.中药复方制剂物质基础研究思路及方法探讨[J].世界科学技术(中医药现代化),2009,11(4):488-492.
- [3] 容穗华,林海,高妮.白术炮制工艺及炮制原理的研究[J].中国中药杂志,2011,43(2):1001.
- [4] 王阶,郭丽丽,郑军,等.中药有效组分配伍干预缺血性心肌重塑的研究[J].中国中药杂志,2008,33(11):1287-1290.
- [5] 高璐,郑洪新,陈道敬,等.淫羊藿苷、补骨脂素、齐墩果酸、二苯乙烯苷正交配伍调控 Bmp2、Smad1、4 诱导 BMSCs 成骨分化的影响[J].世界科学技术-中医药现代化,2014,16(5):1094-1102.
- [6] D. Wilson, J. K. Nicholson, J. Castro-Perez, et al. High resolution "ultra performance" liquid chromatography coupled to oa-TOF mass spectrometry as a tool for differential metabolic pathway profiling in functional genomic studies [J]. J. Proteome Res, 2005, (4), 591-598.
- [7] 张敏娟,黄秀梅,姜世贤. HPLC 和 UPLC 法测定复方黄连素片中吴茱萸碱、吴茱萸次碱含量的方法比较[J]. 药物分析杂志,2012,32(11):2077-2081.
- [8] 周灿平,王伽伯,肖小河,等. UPLC 法测定熟地黄鞣质和蒽醌类成分在不同介质中的溶出差异[J]. 中华中医药杂志,2010,25(11):1788-1792.
- [9] 武为宝,唐军. UPLC 法测定丹参中 5 种脂溶性成分的含量[J]. 药物分析杂志,2009,29(5):827-829.
- [10] 洪燕,韩燕全,夏伦祝. 不同产地苍耳子 UPLC 指纹图谱研究[J]. 中国中药杂志,2013,11(38):1766-1771.
- [11] S. R. Groskreutz, M. M. Swenson, L. B. Secor, et al. Selective comprehensive multidimensional separation for resolution enhancement in high performance liquid chromatography. Part II: applications [J]. Journal of Chromatography, 2012, (1228): 41-50.
- [12] 张罗敷,胡晓芳,徐学敏. 多维液相色谱分离技术在复杂蛋白质组学样品鉴定中的应用[J]. 现代生物医学进展,2013,13(1):161-166.
- [13] 杨运云,郭鹏然,陈怡禄,等. 高效液相色谱-质谱法快速鉴定复方毛冬青冲剂中三萜皂苷活性成分[J]. 分析化学,2009,10(10):1523-1527.
- [14] 朱云祥,陈璐琳,龚婧如,等. LC-QTOF-MS 与 LC-IT-MS 分析酸枣仁汤的化学成分[J]. 中国中药杂志,2014,39(3):457-465.
- [15] GUAN Tian-Ye, LIANG Yan, LI Chun-Zhu, et al. Recent Development in Liquid Chromatography/Mass Spectrometry and Allied Topics for Traditional Chinese Medicine Research [J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2011, 9(5):385-400.
- [16] 杨维,冯超,郑旭光,等. 液质联用同时测定北沙参中 15 种主要化学成分[J]. 药用植物化学与中药有效成分分析研讨会论文集(上),2008,12(5):315-327.
- [17] 徐文,丘小惠,张靖,等. 超高压液相/电喷雾-LTQ-Orbitrap 质谱联用技术分析三七根中皂苷类成分[J]. 药学报,2012,47(6):773-778.
- [18] 吴惠勤,黄晓兰,林晓珊,等. 白豆蔻挥发油 GC-MS 指纹图谱研究[J]. 中药材,2009,29(8):788-792.
- [19] 耿放,葛亚南,方衡. 桂枝茯苓丸脂溶性成分 GC-MS 指纹图谱研究[J]. 药物分析杂志,2014,34(1):174-177.
- [20] 王思寰,潘超,蒋受军,等. 二妙丸中挥发油化学成分的 GC-MS 分析[J]. 中南药学,2014,12(7):680-683.
- [21] WU Y, Wang y, Gu x, et al. Two-dimensional strong cation-exchange liquid chromatography/reversed-phase pressurized capillary electrochromatography for separation of complex samples [J]. Journal of Separation Science, 2011, 34(9):1027-1034.
- [22] Chen J, Li X, Sun C, et al. Identification of polyoxypregnane glycosides from the stems of Marsdenia tenacissima by high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry [J]. Talanta, 2008, 77(1):152-159.

(收稿日期: 2015-06-11)

(本文编辑: 董历华)