

中药分析技术领域研究前沿及发展趋势

王书芳,程翼宇

(浙江大学药学院,浙江 杭州 310058)

[摘要] 中药分析技术的发展推动了中药物质基础、中药药效物质及其作用机制、中药质量控制、中药体内过程及药代动力学、中药制药过程质量控制等领域的创新研究工作。

[关键词] 现代仪器分析;中药分析技术

[中图分类号] R 284 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1008-9292(2012)01-0001-05

中药化学物质组成十分复杂,中药产品药效物质及其作用机制不明确是制约中药产业发展的瓶颈。现代仪器分析技术的快速发展不仅为中药研究提供了机遇和新的方法,而且为实现中药现代化开辟了技术途径,推动了中药研究领域的学术创新和技术跨越式发展。

1 中药物质基础研究领域

辨析中药化学物质组成是中药现代化研究的基础,也是研究中药药效物质及其作用机制的主要切入点。中药物质基础研究的传统方法是采用提取、萃取、柱层析或制备型液相色谱等手段获得中药所含的单体化合物,进而用核磁共振或红外光谱等仪器鉴定化合物的结构。然而,这类分离分析方法耗时耗力、效率低下,当中药成分微量时难以得到足量化合物用于鉴定结构,而中药,特别是中药方剂往往含有近百种甚至几百种以上的微量成分。因此,色谱-质谱联用及液相色谱-核磁共振联用(LC-NMR)等快速鉴定方法应运而生,其为辨析复杂中药的化学物质基础提供了先进手段。中药物质基础研究的新技术还有二维色谱和扩散排序核磁共振法。

1.1 色谱-质谱联用技术 常用的色-质联用技术包括气相色谱-质谱联用(GC-MS)和液相色谱-质谱联用(LC-MS),其特点是将色谱高效分离能力与质谱的结构鉴定能力相结合,可快速分辨中药化学物质。GC-MS 从上世纪 60 年

代发展至今,技术方法相当成熟,NIST 质谱库已收录了147 000余种化合物的质谱图。根据GC-MS 分析数据可从库中搜索匹配相应的化合物结构,该技术常用于定性分析中药的挥发性成分或经衍生化后可挥发的成分;近年出现的气相色谱-飞行时间质谱联用(GC-TOF-MS)技术,能提供化合物的准确分子量,使结构鉴定结果更加可靠。LC-MS 分析技术始于上世纪70年代,常用于中药的不挥发性或热不稳定成分分析,其分离效率虽比GC低,但适用对象更广,是目前发展最为迅速的色谱-质谱联用分析方法。这类技术的发展趋势是液相色谱与复合型质谱联用,如四级杆-飞行时间质谱(Q-TOF-MS)^[1]、四级杆-线性离子阱质谱(Qtrap-MS)^[2]、离子阱-飞行时间质谱(IT-TOF-MS)^[3]、线性离子阱-静电场轨道阱质谱(LTQ-Orbitrap-MS)^[4]、线性离子阱-傅立叶变换-离子回旋共振质谱(LTQ-FT-ICR-MS)等。这些复合型质谱将不同类型的质谱串联起来,以提高分辨率、检测灵敏度及质量测定准确度等,或者增强其定量能力,在一台质谱仪上实现定量和定性分析。超高效液相色谱(UPLC/UHPLC)或

收稿日期:2011-12-10 修回日期:2011-12-20

作者简介:王书芳(1974-),女,博士,副研究员,研究方向为中药质量控制。

通讯作者:程翼宇(1958-),男,博士,教授,研究方向为现代中药科技发展战略;E-mail:chengyy@zju.edu.cn

快速分离液相色谱(RRLC)是近年发展起来的新技术,比普通 HPLC 的分离效率和检测灵敏度更高,分析速度更快,其较低的流速使得质谱离子化效率提高、基质效应降低,与质谱联用优势明显^[3]。

1.2 二维色谱技术 对于化学组成复杂、类别差异大的中药,仅用一种分离方法往往不易分离。二维色谱将两种不同的分离方法联用,以提高其分离力、增加色谱的峰容量。Wu 等^[5]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。

1.3 LC-NMR 和 LC-NMR-MS 技术 在确定化合物结构的定性分析方法中,核磁共振谱(NMR)是最强的化学结构鉴定技术之一,但是其灵敏度较低,实现 LC-NMR 定性分析的难度较大,不仅 LC 洗脱液对 NMR 测定有影响,而且 LC 流速快,与 NMR 测定所需时间难以匹配。而傅立叶变换核磁共振仪和脉冲序列的发展为解决上述问题提供了可能。由于 NMR 对¹³C 的灵敏度很低,目前的 LC-NMR 只能作¹H NMR,一般通过检测与¹³C 相连的¹H 来检测¹³C,这样一部分重要的化合物结构信息会由此缺损。另外,采用溶剂信号抑制技术虽可抑制溶剂信号,但若待测化合物的信号恰好与溶剂峰重叠,则将导致部分结构信息丢失;并且在此条件下测得的化合物的化学位移与在标准氘代试剂下测定的化学位移有一定的偏差。

尽管 LC-NMR 目前仍有较大问题需要克服,但它是中药物质基础研究领域技术发展的前沿方向,现已出现商品化 LC-NMR 和 LC-NMR-MS 仪器。采用 LC-NMR^[6] 和 LC-NMR-MS^[7] 对中草药化学成分进行分离鉴定已见报道。为解决 LC-NMR 灵敏度低的缺点,可采用在线固相萃取(SPE)装置使得待测成分得到浓集,多次进样后能获得足够的样品量。Clarkson 等人^[8]使用 HPLC-SPE-NMR 研究了植物 *Kanahia laniflora* 中的黄酮类和强心苷类成分。

1.4 扩散排序核磁共振技术(DOSY) 该技术是利用混合物溶液中不同化学成分一般具有不同扩散系数的物理特性,用核磁共振脉冲梯度场法不分离分析混合物中化学成分结构^[9]。

该技术省时省力,尤其适用于定性分析在分离过程中易发生变化的化学成分。

2 中药质量分析研究领域

2.1 中药有效成分分析技术检测 中药有效成分常使用 GC、LC、毛细管电泳(CE)等色谱分离法,配以紫外(UV)、蒸发光散射(ELSD)、质谱、脉冲安培(PAD)、荧光(FLD)、氮化学发光(CLND)^[10]或电雾式(CAD)^[11]等不同的检测器,其中 UV、ELSD 及 MS 检测器应用较多;MS、PAD、FLD 和 CLND 为高灵敏度检测器,而 MS、ELSD 和 CAD 为通用型检测器,特别适用于检测无紫外吸收或紫外吸收较弱的化合物。美国 ESA 公司于 2003 年推出的 CAD 检测器,灵敏度是 ELSD 的 10 倍左右,且线性范围宽,在中药分析中有很好的应用前景。

定量核磁共振(qNMR)具有无需对照品,样品预处理简单,定量准确等特点。在某些中药成分的测定中有着独特优势^[12]。

2.2 中药指纹图谱分析技术 化学指纹图谱能表征中药复杂成分的整体特征,已被 WHO、美国 FDA 和我国 SFDA 等药品监管机构采纳并用于植物药或中药质量检验,许多研究者将其用于中药质量控制。目前,化学指纹图谱研究以 HPLC 为主,GC 和 CE 等其它指纹图谱研究报道较少。当中药化学物质组成十分复杂,含有多类理化性质差异较大的成分时,使用单一化学指纹图谱难以涵盖中药物质体系的整体化学信息。LC、GC 和 CE 所检测的化学成分不同,分析信息可互补。为全面表征中药化学组成,多源指纹图谱分析技术成为发展方向。多源色谱指纹图谱一般采用不同的检测器同时检测有紫外吸收和无紫外吸收成分,如 LC-UV-ELSD、LC-UV-MS 等。LC 指纹图谱与多指标成分含量测定相结合的定量指纹图谱能更准确的表达中药整体信息^[13]。此外,中药谱效关系研究^[14]为制定基于药效的中药产品质量标准提供了新思路。

2.3 中药有毒有害成分分析技术 中药在种植、贮存和制造过程中会受到农药、重金属和真菌毒素等有毒有害物质污染,因此急需建立快速、灵敏、专属的检测方法来监管。检测中药

中有害残留物属痕量或超痕量分析,对仪器分析技术要求很高。目前主要采用 GC-MS 或 LC-MS 检测中药有毒有害成分,毛细管电泳-质谱联用(CE-MS)检测法也有少量报道。由于中药基质复杂,样品预处理是检测有害残留物的关键步骤之一,研究适合于不同类型中药基质的样品预处理方法十分重要^[15]。在 2010 版《中国药典》中,真菌毒素的检测方法为 LC-FLD,但已有越来越多的报道使用 LC-MS^[16]。LC-MS 专属性高、假阳性率低,今后可能会取代 LC-FLD 法。检测重金属的常用方法包括分光光度法、原子吸收光谱法、原子发射光谱法、荧光分析法等,但大多只能单个元素测定。新的电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS)可同时测定多个成分,且检出限更低^[17]。

随着龙胆泻肝丸、关木通等个别中药药害事件的发生,中药安全性越来越受到公众关注,中药毒性成分检测已成为中药质量控制技术研究的重要方面^[18]。

3 中药药效物质及其作用机制研究领域

3.1 中药药效物质筛选技术 生物色谱法出现于 20 世纪 80 年代中后期,它将药效成分的分离与筛选相结合,克服了中药分离分析的盲目性。亲和超滤是近年来发展的一种筛选技术,具有亲和层析的高选择性和超滤处理样本快速等优点,Choi 等^[19]将超滤筛选与 LC-MS 检测结合,可快速筛选出作用于 QR-2 的活性物质。Yasuda^[20]将 SIRT6 酶结合在磁珠上,用于从葫芦巴提取物中筛选治疗低血糖及衰老相关疾病的活性物质。

3.2 中药作用机制的组学分析技术 中药的组学研究包括基因组学、蛋白质组学及代谢组学等。基因芯片^[21]是最主流的组学分析技术,常用的蛋白质组学分析有二维电泳(2-DE)、荧光差异二维电泳技术(DIGE)、蛋白质芯片和 LC-MS 技术等,代谢组学分析包括 NMR^[22]、GC-MS^[23]、LC-MS 以及 CE-MS 等技术。UPLC-Q-TOF-MS^[24]因其性能优越,得到了研究者的青睐。

4 中药体内过程及药代动力学研究领域

中药体内过程分析及药代动力学研究对于

阐明中药作用机制及指导中药临床合理用药有十分重要的意义。由于中药药效成分往往含量很低,体内浓度甚微,基质复杂,导致中药体内分析难度很大,要求分析方法具有较高的灵敏度及选择性。LC-MS/MS 可通过选择反应检测(SRM)或多反应检测(MRM)等模式消除背景干扰,提高灵敏度,是中药体内分析的最主要技术^[25-26]。

5 中药制药过程质量控制研究领域

过程分析技术(PAT)由美国政府 FDA 倡导。该技术是通过对整个制药过程进行分析,深刻了解制药过程原理,实施制药过程质量控制,建立科学严格的药品质量保障体系。近红外光谱是医药工业最为常用的在线检测设备,也是 PAT 在中药制药产业应用研究的热点。近红外光谱已用于鉴别药材来源^[27]、测定中药的主要成分含量^[28],以及在线检测中药生产过程的质量指标^[29]等。

6 总结与展望

以{主题=(“chinese medicine” or (herb * not herbicide) or botanical) AND 出版类型=(Article)}进行搜索,近 5 年关于中药或植物药研究的 SCI 收录文献量为 34 240 篇,年平均增幅约为 500 篇,表明中药及天然药物已吸引越来越多的研究者;对论文作者所在国的统计发现,美国、中国和德国是该领域发表论文数量的前三强,美国最多,中国紧随其后。中药分析方面的大部分论文采用 HPLC 方法,而 LC-MS 已成为主流技术;CE 虽在分离效率和分析速度上有诸多优势,但在中药分析中应用仍较少;UPLC/RRLC 作为一种新技术尚未推广普及。

在未来若干年,聚焦于中药质量检验、中药药效物质基础、现代中药创制等重点应用领域,中药分析技术将得到创新发展,其主要趋势为:在中药质量检验方面,LC-复合型质谱联用技术将得到更多应用,多源化学指纹图谱研究将取得新突破;中药药效物质基础研究方面涌现出一些新的筛选-分析集成技术,高分辨核磁共振技术得到有效应用;组学分析技术与网络药理学及多元药理学相结合,可望揭示中药多组分

多靶点整合调节机制,并为创制基于网络调节的多靶点新药提供技术手段。

References:

- [1] CHENG X, WAN J, LI P, et al. Ultrasonic/microwave assisted extraction and diagnostic ion filtering strategy by liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry for rapid characterization of flavonoids in *Spatholobus suberectus* [J]. **Journal of Chromatography A**, 2011, 1218(34):5774-5786.
- [2] SHEN Y, HAN C, JIANG Y, et al. Rapid quantification of four major bioactive alkaloids in *Corydalis decumbens* (Thunb.) Pers. by pressurised liquid extraction combined with liquid chromatography-triple quadrupole linear ion trap mass spectrometry [J]. **Talanta**, 2011, 84(4):1026-1031.
- [3] CAO G, ZHANG C, ZHANG Y, et al. Global detection and identification of components from crude and processed traditional Chinese medicine by liquid chromatography connected with hybrid ion trap and time-of-flight-mass spectrometry [J]. **Journal of Separation Science**, 2011, 34(15):1845-1852.
- [4] PENG J B, JIA H M, LIU Y T, et al. Qualitative and quantitative characterization of chemical constituents in Xin-Ke-Shu preparations by liquid chromatography coupled with a LTQ Orbitrap mass spectrometer [J]. **J Pharm Biomed Anal**, 2011, 55(5):984-995.
- [5] 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.
- [6] DIAS D A, URBAN S. Phytochemical studies of the southern Australian marine alga, *Laurencia elata* [J]. **Phytochemistry**, 2011, 72(16):2081-2089.
- [7] KANG S W, Kim C Y, SONG D G, et al. Rapid identification of furanocoumarins in *Angelica dahurica* using the online LC-MMR-MS and their nitric oxide inhibitory activity in RAW 264.7 cells [J]. **Phytochemical Analysis**, 2010, 21(4):322-327.
- [8] CLARKSON C, STAERK D, HANSEN S H, et al. Hyphenation of solid-phase extraction with liquid chromatography and nuclear magnetic resonance: application of HPLC-DAD-SPE-NMR to identification of constituents of *Kanahia laniflora* [J]. **Analytical Chemistry**, 2005, 77(11):3547-3553.
- [9] VAYSSE J, BALAYSSAC S, GILARD V, et al. Analysis of adulterated herbal medicines and dietary supplements marketed for weight loss by DOSY ¹H-NMR [J]. **Food Additives and Contaminants: Part A**, 2010, 27(7):903-916.
- [10] SUN J, GUO H, SEMIN D, et al. Direct separation and detection of biogenic amines by ion-pair liquid chromatography with chemiluminescent nitrogen detector [J]. **Journal of Chromatography A**, 2011, 1218(29):4689-4697.
- [11] BAI C C, HAN S Y, CHAI X Y, et al. Sensitive determination of saponins in radix et rhizoma notoginseng by charged aerosol detector coupled with HPLC [J]. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, 2009, 32(2):242-260.
- [12] LIU N Q, CHOI Y H, VERPOORTE R, et al. Comparative quantitative analysis of artemisinin by chromatography and qNMR [J]. **Phytochemical Analysis**, 2010, 21(5):451-456.
- [13] YANG D, AN T Q, JIANG X, et al. Development of a novel method combining HPLC fingerprint and multi-ingredients quantitative analysis for quality evaluation of traditional chinese medicine preparation [J]. **Talanta**, 2011, 85(2):885-890.
- [14] BOYLE S P, DOOLAN P J, ANDREWS C E, et al. Evaluation of quality control strategies in *Scutellaria* herbal medicines [J]. **Journal of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, 2011, 54(5):951-957.
- [15] LI X, WANG L, WANG Z, et al. Ultrasonic nebulization extraction coupled with headspace hollow fiber microextraction of pesticides from root of *Panax ginseng* C. A. Mey [J]. **Journal of Separation Science**, 2011, 34(13):1582-1589.
- [16] HAN Z, ZHENG Y, LUAN L, et al. An ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of aflatoxins B1, B2, G1, G2, M1 and

- M2 in traditional Chinese medicines [J]. **Analytica Chimica Acta**, 2010, 664 (2): 165-171.
- [17] KOU X M, XU M, GU Y Z. Determination of trace heavy metal elements in cortex phellodendri chinensis by ICP-MS after microwave-assisted digestion [J]. **Spectroscopy and Spectral Analysis**, 2007, 27(6): 1197-1200.
- [18] HEATON J, WHILEY L, HONG Y, et al. Evaluation of Chinese medicinal herbs fingerprinting by HPLC-DAD for the detection of toxic aristolochic acids [J]. **Journal of Separation Science**, 2011, 34(10): 1111-1115.
- [19] CHOI Y, JERMIHOV K, NAM S, et al. Screening natural products for inhibitors of quinone reductase-2 using ultrafiltration LC-MS [J]. **Analytical Chemistry**, 2011, 83(3): 1048-1052.
- [20] YASUDA M, WILSON D R, FUGMANN S D, et al. Synthesis and characterization of SIRT6 protein coated magnetic beads; identification of a novel inhibitor of SIRT6 deacetylase from medicinal plant extracts [J]. **Analytical Chemistry**, 2011, 83(19): 7400-7407.
- [21] WEN Z, WANG Z, WANG S, et al. Discovery of molecular mechanisms of traditional Chinese medicinal formula Si-Wu-Tang using gene expression microarray and connectivity map [J]. **PLoS ONE**, 2011, 6(3): e18278.
- [22] ZHOU Y, LU L, LI Z, et al. Antidepressant-like effects of the fractions of Xiaoyaosan on rat model of chronic unpredictable mild stress [J]. **Journal of Ethnopharmacology**, 2011, 137(1): 236-244.
- [23] LI X, LUO X, LU X, et al. Metabolomics study of diabetic retinopathy using gas chromatography-mass spectrometry: a comparison of stages and subtypes diagnosed by Western and Chinese medicine [J]. **Molecular Biosystems**, 2011, 7(7): 2228-2237.
- [24] LIU S, LU F, WANG X, et al. Metabolomic study of a rat fever model induced with 2,4-dinitrophenol and the therapeutic effects of a crude drug derived from coptis chinensis [J]. **American Journal of Chinese Medicine**, 2011, 39(1): 95-109.
- [25] XIA Y, WEI G, SI D, et al. Quantitation of ursolic acid in human plasma by ultra performance liquid chromatography tandem mass spectrometry and its pharmacokinetic study [J]. **Journal of Chromatography B**, 2011, 879(2): 219-224.
- [26] ZHENG X, XU L, LIANG Y, et al. Quantitative determination and pharmacokinetic study of solamargine in rat plasma by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 2011, 55(5): 1157-1162.
- [27] LAI Y, NI Y, KOKOT S. Discrimination of Rhizoma Corydalis from two sources by near-infrared spectroscopy supported by the wavelet transform and least-squares support vector machine methods [J]. **Vibrational Spectroscopy**, 2011, 56(2): 154-160.
- [28] LAU C C, CHAN C O, CHAU F T, et al. Rapid analysis of Radix puerariae by near-infrared spectroscopy [J]. **Journal of Chromatography A**, 2009, 1216(11): 2130-2135.
- [29] HUANG H, QU H. In-line monitoring of alcohol precipitation by near-infrared spectroscopy in conjunction with multivariate batch modeling [J]. **Analytica Chimica Acta**, 2011, 707 (1-2): 47-56.

[责任编辑 黄晓花]