

中药组分的系统化学表征*

□章飞芳 张 峰 薛兴亚 徐 青 金 郁 梁鑫森**

(中国科学院大连化学物理研究所 大连 116023)

摘 要:中药的化学表征是实现中药现代化的重要环节。本文结合中药发展的现状,从组分的角度切入中药,提出了同系组分的概念,并从标准品表征,强极性组分表征,同系组分表征,多维多模式色谱分离及其联用表征和质量控制方法与技术等方面,全面阐述了进行系统化学表征研究的思路,力求实现对中药物质基础的揭示和中药产品开发过程中的全面质量控制。

关键词:中药现代化 同系组分 系统化学表征 质量控制

一、引 言

中药是中华民族的瑰宝,在传统的“整体观念,辨证论治”等中医核心理论的指导下,为人类的生存与健康做出了不可替代的贡献。而今,中药的发展不但需要继承和发扬中医药多成分、多靶点、整合调节的优势和特色,还迫切需要与现代科学技术的理论和方法结合^[1],去粗取精,改变其传统的粗放模式,最终实现中药的现代化。对此,我们开始了组分中药系统研究,即以中医药理论为基础,选择临床安全有效的方剂或中成药,制备标准同系组分,通过化学和生物学的系统表征筛选功能组分,以功能组分配伍创制物质基础基本明确、作用原理基本清楚并具有定量指纹谱质量控制标准的组分中药。而中药组分的系统化学表征,就是运用现代的分析分离技术和

方法,对中药各组分和成分进行科学有效的表征研究,从而实现对中药物质基础的阐述和中药组分的质量控制。

中药的临床有效性是以其所含的化学成分为基础的,而中药是一个典型的多成分复杂体系,所含化合物主要包括有机酸、黄酮、生物碱、皂苷、环烯醚萜等类组分,在类组分中,仍然存在较大的结构差异,如生物碱中还包括有吡咯类、吡啶类、喹啉类、吲哚类等丰富的亚类。为了更深入地开展类组分的研究,我们在研究中药材、分配组分和类组分的基础上,又引入了同系组分的概念。同系组分是指具有相同的结构骨架,不同的取代位点或取代基的一类化合物。通过同系组分化学表征规律的研究,可预测和发现未知化合物,提高同系组分研究的系统性和深入性,推进中药化学物质基础的研究进程。

尽管现代的提取、分离、制备等技术^[2]可以高通量获取一些标准品,但是鉴于中药的复杂性和一些

组稿日期:2006-04-20

修回日期:2006-06-05

* 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KGCX2-SW-213);基于现代理论和技术复方中药系统研究,负责人:梁鑫森;国家自然科学基金重点项目(20235020),负责人:梁鑫森。

** 联系人:梁鑫森,本刊编委,博士,研究员,主要从事组分中药的研究,Tel:0411-84379519,Email:liangxm@dicp.ac.cn。

[World Science and Technology/Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica] 85

强极性、微量、同系组分的存在,对中药组分实现全面的表征还有相当的难度。现代分离分析技术的发展,尤其是色谱与质谱、波谱等联用技术的发展,可以取长补短,获得其单独使用时所不具备的高效分离、高灵敏度检测和高定性能力,这都为中药的表征提供了强有力的手段。我们应继承和发展这些现代分离分析技术,并以此为手段去挖掘中药这个宝库,获得其物质基础等相关信息。

本文从中药复杂性出发,针对系统分离制备获得的各层次标准组分、标准同系组分和标准品,从多维多模式化学表征以及集成技术与方法的角度,论述当前中药组分系统化学表征研究,以期对中药现代化研究提供一些可行的研究思路和方法。

基础研究思路如图1所示:即中药组分的系统化学表征以方剂药材、标准组分、标准同系组分、标准品以及现代中成药、现代中药、组分中药为研究对象,以色谱表征(如HPLC、GC、CE等)和联用表征(如与MS、NMR等的联用)为基础,发展多维多模式色谱及其联用表征,结合光谱表征,获取表征信息数据,最终应用于中药质量控制方法与技术的发展之中。这不但有利于实现中药材的质量控制,还可以从各个层次揭示中药的物质基础,实现中药组分的定性定量测定,并在中药产品的质量控制在起到不可替代的作用。在系统化学表征的研究中,在对标准品进行研究的基础上,重点开展对强极性组分和同系组

分表征方法和技术的研究;在原有表征手段的基础上,重点发展多维多模式的色谱分离及其联用表征方法与技术;从而实现中药生产过程质量控制方法与技术的集成。

1. 标准品化学表征^[4]

标准品的化学表征也是中药组分系统化学表征的重要组成部分。标准品(化学对照品)是中药质量评价(定性、定量分析)的重要依据。中药类组分、同系组分的研究,色谱规律和质谱规律的发现以及化学成分的定性,都离不开标准品。但是目前中药标准品的资源比较匮乏,且纯度往往也不高,这在一定程度上制约了中药质量控制技术的发展。

传统的标准品的化学表征通常是建立在紫外、红外、质谱和核磁的基础上的,但是鉴于中药的复杂多样性,上述传统的方法难以满足大量标准品的化学表征的要求。我们的解决策略是:在传统的四大光谱波谱图的基础上,针对各种类组分或同系组分中的标准品,选择不同类型分离材料制备分离目标化合物,并通过不同的柱系统进行色谱分离规律和质谱断裂规律的研究,建立起以液相色谱-质谱联用技术为主,辅以光电二极管阵列检测、蒸发光散射检测等其它检测模式的较为全面的定性定量方法,并将其应用到中药目标制备组分的表征和质量控制中,形成从中药材到中药组分再到单体的多层次系统化学表征方法库。标准品化学表征的实现还有利于完

成对目标制备成分进行“标记”,建立目标制备成分的标准色谱-质谱指纹谱,实现分离与富集过程中的流向识别,为中药标准品的高效、高选择性制备,提供重要依据。

2. 强极性组分表征方法与技术

中药以其显著的临床有效性,引起了国内外学者的极大关注。人们对中药进行了大量的研究工作,对其所含有的黄酮类、萜类、生物碱类和蒽醌类等活性

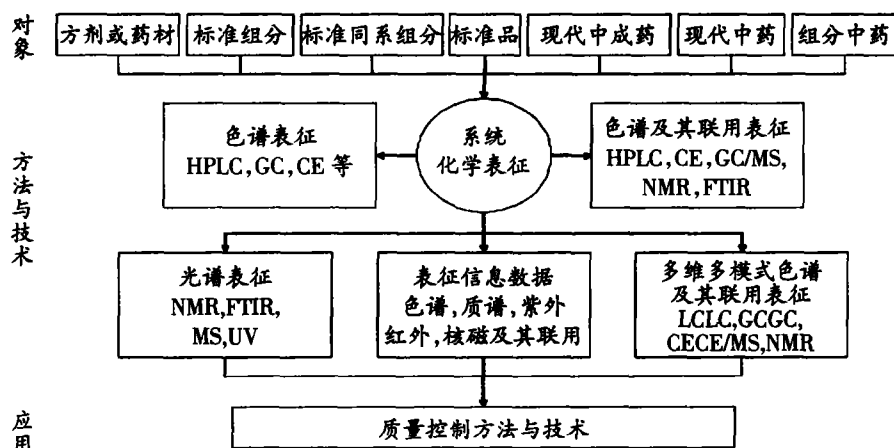


图1 中药组分的系统化学表征研究思路

成分从物质基础到药理作用都有了较为深入的研究。但是,传统的中药服用方式是以水煎法为主,其间还含有大量强极性成分,如水溶性生物碱、酚酸、糖苷、寡糖、强极性寡肽、多肽等,它们同样具有重要的生理活性,但是由于其在常规的疏水固定相(如 C_{18} 等)上保留弱,无法获得有效地分离,因此相关的研究一直较少,其物质基础仍未得到全面地揭示。所以,发展对中药强极性组分的表征方法不但可以全面揭示中药的物质基础,建立用于质量控制的指纹图谱,还可为单体制备提供依据,为活性成分的药理学筛选和新的活性先导化合物的发现提供基础。

我们采用的方案如图 2 所示:以系统分离制备平台获得的极性样品为基础,结合膜超滤技术、凝胶色谱技术等对样品进行粗分离,获取研究中必要的目标组分;通过优化亲水作用色谱的条件,包括①固定相的选择:商品化的氨基柱,甲酰胺柱,亲水作用硅胶柱等和发展新型分离材料如醇羟基柱、环糊精柱、纤维素柱等;②流动相的优化:有机相浓度的调整,缓冲盐的选择,pH 值的改变等;③检测器的配置:PDA、ELSD、MS 等,实现对极性化合物的色谱分离,获取色谱保留规律和峰形规律,准确预测中药中寡糖苷、酚酸、生物碱等成分的准确保留时间和色谱分离状况,获取“活”的色谱指纹图谱,实现目标优化,进一步为液相色谱质谱联用奠定基础。

此外,在其多级质谱表征的基础上,尝试通过已知的标准品,分别与不同浓度的碱金属离子、碱土金属离子、过渡金属离子以及 2,2'-二吡啶等不同金属螯合剂的复合,通过 ESI-MSn 直接进样,考察其碎片断裂规律。根据已知的标准品在不同金属离子作用下的碎片断裂规律,推断未知强极性组分可能的化合物结构,并确定其位置异构和立体异构。优化亲水作用色谱(HILIC)分离和金属离子作用下的质谱表征,拓展液相色谱质谱联用的应用范围,建立起强极性组分的定性定量方法,完成对该类组分的

全面表征。

在上述强极性组分表征的基础上,我们将其线性放大,应用于离线或在线的高效工业制备色谱和纯化工厂的化合物分离制备过程中,实现强极性化合物的高通量制备,促进系统分离技术的发展。

3. 同系组分表征规律研究

同系组分在结构上的相似性和多样性,在化学表征上分别体现出色谱行为和质谱裂解的规律性和特征性。因此,以同系组分为切入点,建立同系组分的分析方法,总结并验证同系组分色谱保留和质谱裂解的规律。

如图 3 所示,主要的研究内容有:1)色谱规律:根据同系组分的结构特点,对分离模式、色谱柱系统等进行系统的方法学考察,建立适用于同系组分的优化分析方法。通过几次梯度实验,准确获取色谱保留参数和色谱峰形参数规律,考察不同取代基与保留参数间的定量构效关系,实现同系未知成分的色谱保留预测,特别是同系组分中同分异构体的准确识别。2)质谱规律:系统考察离子源、检测方式、裂解能量对同系组分的响应能力、分子离子峰稳定性和断裂方式的影响,建立优化的质谱分析条件。通过对结构丰富的大量同系组分的质谱分析,系统考察同系组分中取代基和取代位点对裂解行为的影响,分析质谱碎片,研究其裂解途径,总结同系组分的质谱裂解规律,提高对同系未知成分的质谱鉴定能力。

此外,采用 HRMS、NMR、FTIR、UV 等谱学手段

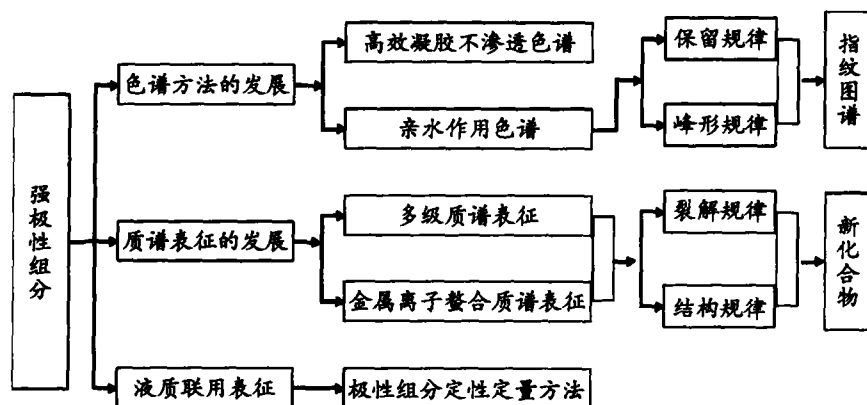


图 2 强极性组分表征方法的研究思路

进行结构表征,对同系成分进行定性,构建结构明确的同系成分库;构建包含同系组分保留参数、峰形规律参数及柱系统特征参数的色谱数据库,以期实现多维多模式色谱保留值的准确预测;构建质谱数据库,发展多级质谱模式匹配技术,为发现新的同系成分提供技术保证;最终形成同系组分表征的方法库,广泛应用于中药物质基础的研究之中。

4. 多维多模式色谱分离及其联用表征方法与技术^[10-11]

色谱技术无疑是解决复杂样品分析问题的最有力工具,单维气相色谱、液相色谱和毛细管电泳,都在复杂样品的分析中起着重要作用,且存在一定的互补性。但对于高度复杂的中药样品,单维的色谱技术往往难以满足分析的需要,大量重叠峰的存在严重制约了色谱定性、定量的准确性,对一些低丰度的微量组分的表征尤为不利。因此,发展色谱联用技术和计算机辅助解析技术是解决该瓶颈的有效方法。

针对中药这样一个复杂的黑箱体系,我们提出了中药组分研究的多维多模式色谱研究策略。多维多模式色谱分离及其联用技术的核心是多维色谱系统的构建,而多维色谱实现的关键技术是分离模式的选择以及样品在两种分离模式之间的转换。接口与控制技术是束缚该项技术应用的瓶颈。目前,尽管已发展了多种接口模式,但尚有诸多问题亟待解决。

综合考虑色谱柱系统、分析接口和柱外效应的影响,可以建立起描述在不同组合模式下的多维系统中溶质输运过程的理论模型。我们将以中药的挥发性组分、水溶性组分、脂溶性组分以及动物药的蛋白质、多肽、核酸等样品为实例,评价不同接口形式耦联的多维分离系统的分离能力,并采用分离度矩阵的模式作为总分离评价指标,以总体信息熵评价两种分离模式的正交性。我们还需发展针对不同样品体系和分离目的的多维分离系统理论研究方法。

同时,我们还将在复杂样品单维色谱分离分析的基础上,构建不同色谱分离模式组合的多维色谱,如 2D-HPLC、2D-CE、2D-UPLC/GC 以及 2D-GC 系统,并发展其优化指标,实现操作条件的优化,力求达到最佳分离效果。

另外,多维色谱分析产生的数据信号具有三维特征,即第一维、第二维的时间特征和第三维的响应值特征。多维多模式色谱分析的信号处理比单维更为复杂,这主要体现在色谱峰的识别和色谱峰的定量等问题上,因此必须借助计算机辅助技术,发展出相应的多维数据处理系统。

5. 质量控制方法与技术^[3,6]

中药现代化的内涵决定了必须有一套有效的中药质量控制方法和检测技术,可全面的反映中药所含化学成分的种类与数量、识别真伪、辨认优劣。而

建立中药作用机理与其内在质量的联系、提高药效的现代分析方法是中药现代化的重要内容,由于传统的、单一的化学、物理分析手段已不能满足这一要求,因此中药指纹图谱开始用于中药的质量控制,研究证明这是一种很有前景的中药质量和药效控制技术^[1,5,7]。由国家药品监督管理局(SDA)倡导的中药指纹图谱抓住了中药现代化的关键问题之一,对推动中药产业化和国际化具有重大作用^[8-9]。

通常所指的中药指纹图谱(fingerprinting)是以系统的化学成分研究

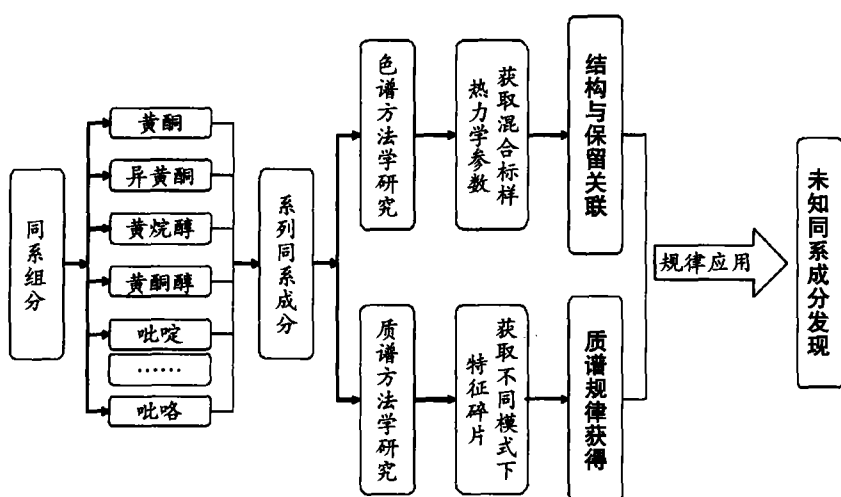


图3 同系组分表征规律研究思路

和药理学研究为基础,采用一定的分析手段将中药的特性和有效成分以图谱的形式描绘出来的方法。其3个基本特征是系统性、特征性和稳定性。中药系统化学表征的平台赋予了它新的涵义,如图4所示:我们把中药组分研究中的中药指纹谱按其功能分为:指标成分指纹谱(以几个中药特征化学成分定量为指标的特征指纹图谱);半定量指纹谱(中药化学成分中相对或绝对含量50%以上已知的特征指纹图谱);定量指纹谱(中药化学成分中相对或绝对含量90%以上已知的特征指纹图谱)。

此外,我们还将引入中药生物指纹图谱,进一步提升中药组分的质量监控技术。中药生物指纹图谱则包括中药材DNA指纹图谱和正在研究中的中药基因组学指纹图谱、中药蛋白组学指纹图谱和中药代谢组学指纹图谱等。

二、结 语

中药组分的系统化学表征是中药现代化的关键组成部分。构建系统化学表征的技术平台是实现系统化学表征的前提和保障,系统化学信息平台是实现系统化学表征的强有力手段。该平台需满足药材

质量控制与评价、提取过程和提取组分的质量控制与评价、同系组分的系统化学表征、强极性组分的系统化学表征、微量成分的化学表征、标准组分以及标准品的化学表征与多柱多模式化学表征的基础研究的需求,同时为中药组分数据库的建立提供丰富信息资源。

在中药组分的系统化学表征以及产品的质量监控过程中,必然产生海量的表征信息。如何将这些信息进行归纳整理,使之形成相应的表征信息数据库,并通过相应的数据处理系统,快速获取需要的信息,这是中药信息数据系统的所要解决的首要问题。

根据以上研究思路,本课题组已建立了中药组分的系统化学表征平台,包括HPLC、UPLC、GC、HPLC/MS、GC/MS等多模式色谱及其联用表征系统,中药化学信息平台;并发展了标准组分化学表征系统方法,包括标准组分的色谱表征方法,HPLC/MS联用表征方法,质量控制方法以及多维色谱联用表征方法。

中药组分系统化学表征平台的建立和正常运行,必将全面地推进中药物质基础的深入认识,有力地促进中药组分系统制备技术的发展,并在中药质量控制中起到不可替代的作用。

参考文献

- 1 梁鑫淼,徐青.中药药效组分的指纹图谱分析思路与方法,中国天然药物,2003,(1):57~60.
- 2 卢艳花.中药有效成分提取分离技术,化学工业出版社,2005.
- 3 韩利文,侯晋军,梁泰刚,李青山.中药质量控制现代化的地位和作用,世界科学技术-中医药现代化,2005,7(2):54~56.
- 4 Bauer, R., Quality criteria and phytopharmaceutical: Can acceptable drug standards be achieved? Drug Information Journal, 1998,32:101~110.
- 5 Lazarowich, N., Use of fingerprinting and marker compounds for identification and standardization of botanical drugs: Strategies for applying pharmaceutical HPLC analysis to herbal products. Drug Information Journal, 1998,32:497~512.
- 6 Yang L.W., Wu D.H., Tang X., Peng W., Wang X. R., Mab Y., Su W.W., Fingerprint quality control of

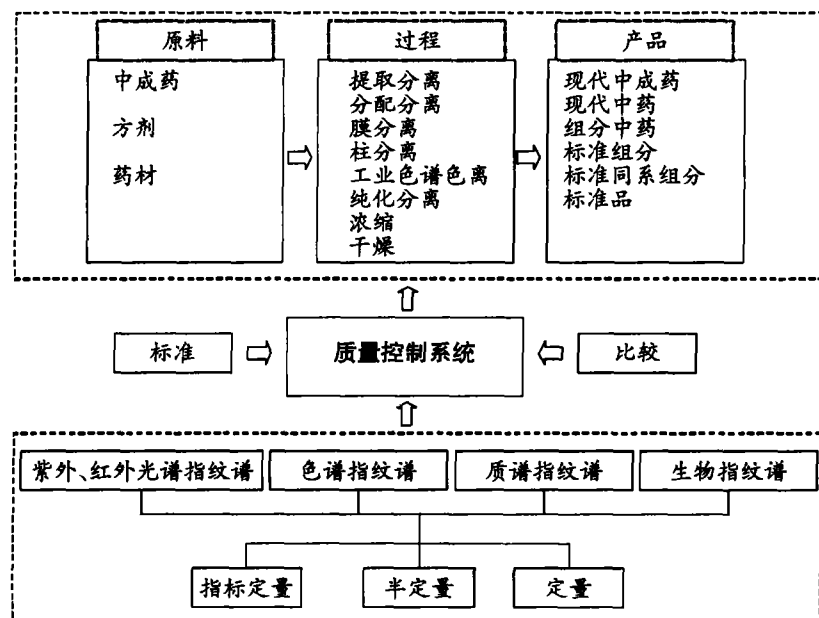


图4 中药质量控制方法与技术

- Tianjihuang by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection. *Journal of Chromatography A*, 2005,1070:35~4.
- 7 Xie P., Chenb S., Liang Y.Z., Wang X.H., Tian R.T., Upton R., Chromatographic fingerprint analysis—a rational approach for quality assessment of traditional Chinese herbal medicine. *Journal of Chromatography A*, 2006,1112:171~180.
 - 8 Yan S.K., Xin W.F., Luo G.A., Wang Y.M., Cheng Y.Y., An approach to develop two-dimensional fingerprint for the quality control of Qingkailing injection by high-performance liquid chromatography with diode array detection. *Journal of Chromatography A*, 2005,1090:90~97.
 - 9 谢培山. 色谱指纹图谱分析是中草药质量控制的可行策略, 中药新药与临床药理, 2001,12(3):141~151.
 - 10 罗国安, 王义明. 多维多息特征谱及其应用, 中成药, 2000,22(6):395~397.
 - 11 梁鑫森. 智能多模式多柱色谱系统及其联用技术, 色谱, 1995,13(5):307~309.
 - 12 肖红斌, 梁鑫森, 卢佩章, 陈志坚. 中药复方分析新方法及其应用, 科学通报, 1999,44(6):588~596.

The Systemic chemical characterization of multi-components of Traditional Chinese Medicine

Zhang Feifang, Zhang Feng, Xue Xingya, Xu Qing, Jin Yu, Liang Xinmiao

(Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Sciences, Dalian 116023)

The chemical characterization of Traditional Chinese Medicine (TCM) is an important tache in the realization of its modernization. The concept of "homologue components" was brought forward to enrich the theory of multi-components Chinese medicine (MCCM) on the basis of development status of TCM. The design of the study on systemic chemical characterization was expatiated across-the-board from the following aspects: the characterization of standard samples, the characterization of high polar multi-components, the characterization of "homologue components", the separation and characterization with multi-dimension and multi-mode chromatography combined their hyphenated techniques and the methods and techniques of quality controlling. The systemic technique were applied in order to thoroughly make clear of chemical constitutions of TCM and to build up the strict quality controlling system during the production of TCM

Keyword: Modernization of TCM, homologue components, systemic chemical characterization, quality controlling

(责任编辑:王 瑀, 责任编审:柳 莎, 张志华, 责任译审:熊艳艳)

(Continued from page 32)

(IEF) in the separation and identification of proteins of Edible Bird's Nest (EBN). Methods: SDS-PAGE was performed with samples including Indonesia EBN, EBN from Huaiji of Guangdong Province and three impure EBN samples which were added with gelatin, white fungus or pork skin respectively. IEF was also performed with Indonesia EBN. Results: On SDS-PAGE patterns, there were obvious differences between Indonesia EBN and Huiji EBN, and clear proteins stripes of three impure EBN were visualized. On IEF pattern, clear proteins stripes which focus on the acidic end were visualized. Conclusions: SDS-PAGE can be used in identification of EBN and IEF can be used to produce characteristic pattern of EBN by separating proteins.

Keywords Edible bird's nest; SDS-polyacrylamide gel electrophoresis; Isoelectrofocusing; Electrophoresis

(责任编辑:左 向, 责任编审:张志华, 责任译审:凌仰之)