

中兽药生产关键技术 与检测方法研究

杨 志 强

中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所

中国农业科学院中兽医研究所

中国农业科学院兽医临床研究中心

内 容

- 一、中兽药特点与潜在优势
- 二、中兽药筛选技术
- 三、中兽药提取分离技术
- 四、中兽药生产关键技术研究
- 五、中药质量标准与检验

一、中兽药特点与潜在优势

1 中兽医医药的特点

学科特点：经验学科

《黄帝内经》：循经守数，按循医事
守数据治，无失俞理

系统研究特点：整体观

天地人三才合一

符合/生物-心理-社会-环境-综合医学模式

中药相互关系（“七情”）；药物和病证关系，“君臣佐使”、“生克制化”



治疗特点：治未病

《黄帝内经》：“圣人不治已病治未病，不治已乱治未乱，此之谓也。夫病已成而后药之，乱已成而后治之，譬犹渴而穿井，斗而铸锥，不亦晚乎？”

来源及属性特点：植物药、动物药、矿物药等，具有较高的安全性

药物作用特点：多靶点作用

复杂组分，很难寻找到一一对应的因果关系，适合疾病的复杂性，抗原难以产生抗药性。

抗感染的有效性：间接、直接抑杀、免疫增强

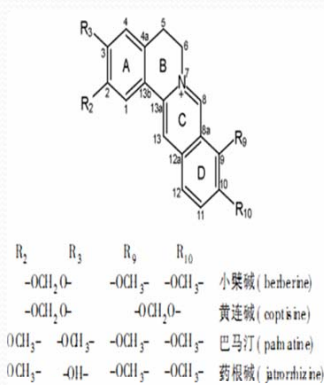
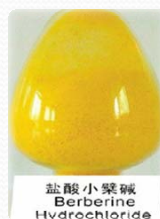


2 中兽药作为新药创制的源泉

- **创新药物的前提**: 发现有生物活性的先导化合物, 是影响创新药物周期的决定性因素。
- **先导化合物的来源**: 有多种途径, 从天然产物中寻找有活性的化合物作先导物创制新药是世界药学工作者公认的有效途径之一。
- **国际发展趋势**: 有生物活性的植物天然产物作为合成的先导化合物要比直接作为商品更有希望。

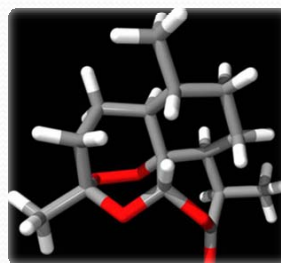
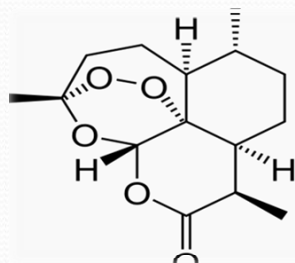
黄连素(berberine)

学名小檗碱, 为毛茛科植物黄连 (*Coptis chinensis* Franch.)、三角叶黄连 (*Coptis deltoidea* C. Y. Cheng et Hsiao) 和云连 (*Coptis teeta* Wall.) 的干燥根茎主要生物碱。抗菌谱广, 体外对多种革兰阳性及阴性菌均具抑菌作用, 其中对溶血性链球菌、金葡菌、霍乱弧菌。脑膜炎球菌、志贺痢疾杆菌、伤寒杆菌、白喉杆菌等有较强的抑制作用, 低浓度时抑菌, 高浓度时杀菌。对流感病毒、阿米巴原虫、钩端螺旋体、某些皮肤真菌也有一定抑制作用。



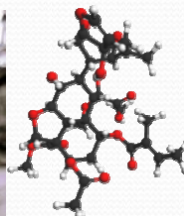
青蒿素 (arteannuin)

从中药黄花蒿(*Artemisa annua*)中提取的一种抗疟有效成分，具有抗白血病和免疫调节功能。主要用于间日疟、恶性疟的症状控制，以及耐氯喹虫株的治疗，也可用以治疗凶险型恶性疟，如脑型、黄疸型等。亦可用以治疗系统性红斑狼疮与盘状红斑狼疮。



印楝素 (azadirachtin)

从印楝(*Azadirachta indica* A.Juss)中分离，属于四环三萜类，分为印楝素-A，-B，-C，-D，-E，-F，-G，-I共8种，印楝素-A就是通常所指的印楝素。可防治200多种农、林、仓储和卫生害虫，是世界公认的广谱、高效、低毒、易降解、无残留的杀虫剂。2013年全世界已有近20个国家对印楝树进行研究、开发和利用。2013年已知印楝素制剂对400余种昆虫表现不同的生物活性。1985年以印楝素为主要成分的第一个商品药剂Margosan-O在美国获准登记，现已有许多印楝制剂投入商业化生产，如曲Azatin、Turlex、Align、Neemrich、Neemix、Neemgaurd、Nemol、NeMcidine、Margocidedcd ok、Ackook、RD-9(Repelin)、Neemark及中国研制的0.3%印楝素乳油。这些商品绝大多数是杀虫剂。美国还开发出以印楝素为主成分的杀菌剂。



- 1%儿茶素可湿性粉剂由豆科植物儿茶树的去皮枝干研制而成，对黄瓜黑星病和番茄灰霉病防效较好；
- 以苦参为原料研制的苦参碱乳油、苦参碱水剂等产品可以防治粮食、果树 蔬菜等作物的多种真菌性病害如纹枯病、黑星病、轮纹病、灰霉病、霜霉病、疫病等；
- 我国曾以大蒜素(三硫二丙烯)分子结构为模板 衍生合成了类似物乙蒜素(硫代乙磺酸乙酯) 并成功研制出杀菌剂402, 该杀菌剂高效广谱, 可广泛抑制粮油、棉花、蔬菜、果树、花卉、药材等作物的多种致病菌；



- 孟昭礼等从银杏中分离出抑菌活性物质并进行仿生合成开发出农用杀菌剂“绿帝”和“银泰”；
- 日本从抗稻瘟病的水稻植株中分离出一种含丙二酸叉结构的杀菌化合物，并以此为先导化合物开发出杀菌剂稻瘟灵，主要用于防治稻瘟病，对叶蝉也有一定活性；
- 世纪80年代 德国巴斯夫公司科研人员在肉桂酸衍生物二甲氧基肉桂酸甲酯的基础上成功研制出杀菌剂烯酰吗啉，之后我国的刘长令在此基础上研制出活性尤其是治疗活性明显优于烯酰吗啉的新杀菌剂氟吗啉 (flumorph) ……

中兽药是新兽药创制的源泉

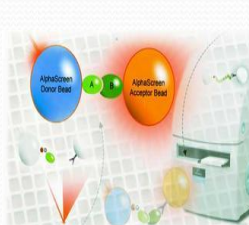
二、中兽药筛选技术

1 原始药物筛选-神农尝百草

2 现代药物筛选技术和方法

高通量筛选:以药物发现的基本规律为基础,采用分子和细胞水平药物筛选模型,应用多学科的理论知识,集多种先进技术于一体,形成了快速高效大规模的药物筛选体系。

超高通量药物筛选技术:建立在近年发展起来的生物芯片技术基础之上,一次筛选可以使每种化合物对数以千或万计的靶点进行筛选,真正实现了一药多筛。



3 高通量药物筛选技术在中兽药研究中的应用

范围: 中药活性成分研究与发现

中药作用机理研究

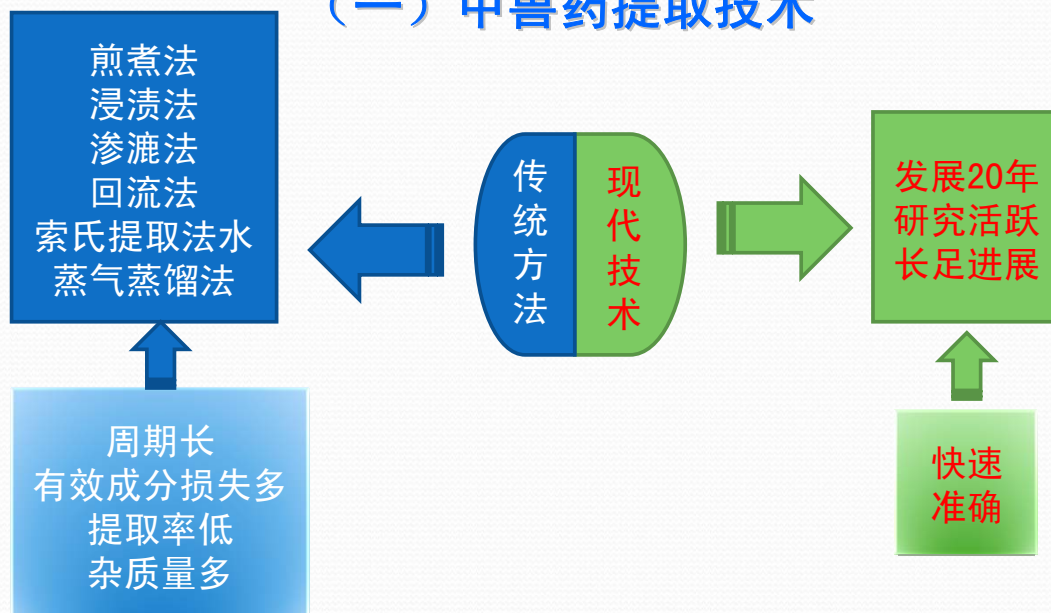
中药复方研究

中药分类研究

中药大规模筛选

三、中兽药提取分离技术

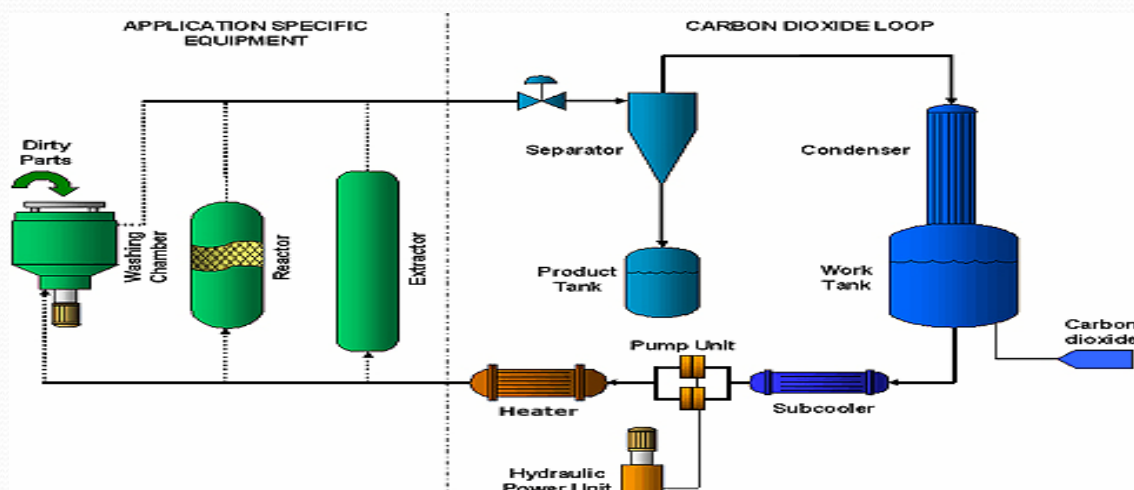
(一) 中兽药提取技术



1 超临界流体萃取 (supercritical fluid extraction, SFE)

原理: 流体在超临界状态下具有密度大、黏度低、表面张力小、溶解能力强、传质系数大等特点。因此, 以超临界流体作为中药材中有效成分的高效溶解媒介或萃取剂, 进行提取分离具有多方面的优势。

条件: 萃取剂: CO_2 ; 压力: 8~40 MPa ; 温度: 30~70 $^{\circ}\text{C}$



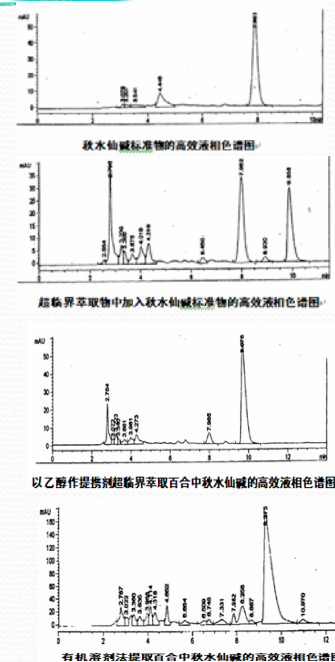
- 优势:** (1) 室温, 防止热敏性药物成分的氧化和分解;
 (2) 无溶剂残留;
 (3) 速度快、效率高, 杂质少、有效成分高度富集;
 (4) 有抗氧化灭菌作用, 利于提高提取物的质量;
 (5) 步骤少、流程短、操作参数易于控制;
 (6) 系统密闭, 减少易挥发组分的损失, 收率高。

应用: 萜类和挥发油、生物碱、黄酮类、醌及其衍生物、糖及其苷类、苯丙素类等。

百合中秋水仙碱: 经超临界二氧化碳流体萃取—高效液相色谱法测定, 含量为0.049%, 杂质成分较少, 有利于后处理; 经有机溶剂提取含量为0.0458%, 产物中组分较多, 后处理困难较多。

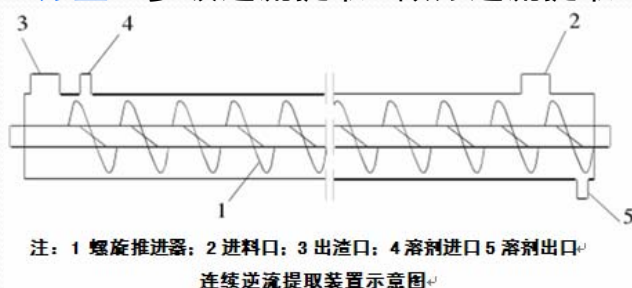
(李谷才等.超临界流体萃取百合中的秋水仙碱.2003)

GMP工业化300Lx2超临界流体萃取装置



2 连续逆流萃(提)取(continuous countercurrent extraction, CCE)

- 溶剂:** 水、乙醇、醋酸乙酯、三氯甲烷、石油醚等。
- 原理:** 使萃取剂与药材在设备内接触并呈逆向流动, 任意一个截面上的传质推动力(即药材中有效成分浓度与萃取剂中有效成分的浓度差)都是最大的。
- 分型:** 多级逆流提取 微分逆流提取。



- **优势:**操作简单, 提取速度快, 收率高, 无反混现象, 连续运行, 传质浓度梯度相对稳定等
- **应用:**

脱脂豆粕中提取大豆异黄酮		
	单级提取法	连续逆流提取法
乙醇浓度 (%)	60	60
提取温度(°C)	70	70
液固比	20	10
提取时间 (min)	180	104
提取率 (%)	86.85	99.2

王松等.连续逆流法提取大豆异黄酮的研究.食品科学. **2005.08(19)**

3 微波萃取(microwave-assisted extraction,MAE)

- 微波提取最早于1986 年由Ganzler 等用微波炉从土壤中萃取分离有机化合物, 之后迅速扩展到包括植物药提取等众多领域。
- 特点: 萃取时间短、提取率高、萃取溶剂用量少、能耗低、工艺控制参数少。
- 方式: 发散式(封闭式) 和聚焦式(开放式)。



- 应用：提取多糖类、黄酮类、挥发油、生物碱、苷类等

微波萃取法提取桑叶和桑白皮的黄酮类成分			
		传统醇提法	微波提取法
乙醇浓度 (%)		70	70
提取温度(℃)		70	60
液固比		12	12
提取时间 (min)		240	20
黄酮含量 (%)	桑叶	1.85	2.87
	桑白皮	0.241	0.371

陈菁菁等. 微波萃取法提取桑叶和桑白皮的黄酮类成分. 中药材. 2006. 29(10)

4 超声提取(ultrasound-assisted extraction, UAE)

原理：超声作用可使坚硬的固体药材细胞壁破碎, 加速胞内物质的释放、扩散及溶解, 有效成分在被破碎瞬间活性保持不变。超声萃取利用超声波的空化作用、热效应和机械作用等对药材有效成分进行提取。

类型：超声浴式系统 超声探针式系统

特点：速度快、溶剂用量少、提取率高、不影响有效成分活性、不改变提取有效成分的化学结构等。



用途：单味中药材有效成分的提取和少量复方药材成分提取，包括：生物碱、多糖、苷类、黄酮类、醌类、挥发油类、蒽类、氨基酸类等

远志总皂苷的超声提取		
	热回流提取	超声提取
乙醇浓度（%）	75	75
提取温度(℃)	60	
液固比	1:25	1:25
提取时间（h）	4	1
总皂甙含量（%）	1.51	1.63

梁戈亮.远志总皂苷的超声提取工艺及动力学研究.2008

5 酶法提取(enzymatic treatment extraction, ETE)

酶类：纤维素酶、果胶酶、木瓜蛋白酶、复合酶等

特点：提取条件温和, 无需外加能量, 减少热敏性组分分解; 提取率高(提高50% 的量级), 提取速度较快; 可提取出无效成分, 提高提取物质量; 节约提取溶剂

用途：提取中药化学成分包括多糖、苷类、黄酮类、生物碱等

酶法提取山楂叶中总黄酮		
方法	水提法	酶提法 (纤维素酶和果胶酶)
pH	6.8	4.4
提取温度(℃)	90	90
提取时间（min）	90	90
总黄酮得率（%）	1.495	1.743

王晓等.酶法提取山楂叶中总黄酮的研究.工艺技术. 2002.2（3）

6 常温超高压提取 (ultra-high pressure extraction, UHPE)

原理：常温下100~ 1 000 MPa 的流体静压力作用于预处理药材(即升压阶段, 一般几分钟) , 保压一段时间(即保压阶段, 一般几分钟) , 使细胞内外压力达到平衡, 然后迅速卸压(即卸压阶段, 一般几秒钟) 使细胞内外渗透压力差突然增大, 胞内有效成分穿过细胞的各种膜, 转移到细胞外的提取液中, 达到提取的目的。

特点：提取效率高、提取时间短、提取温度低、杂质量。

应用：西洋参、五味子、川乌及草乌、水飞蓟、甘草、大花紫薇、刺五加、丹参、桑叶、黄芪、山楂、朝鲜淫羊藿、蜂胶、灵芝孢子等的提取获得了良好效果。

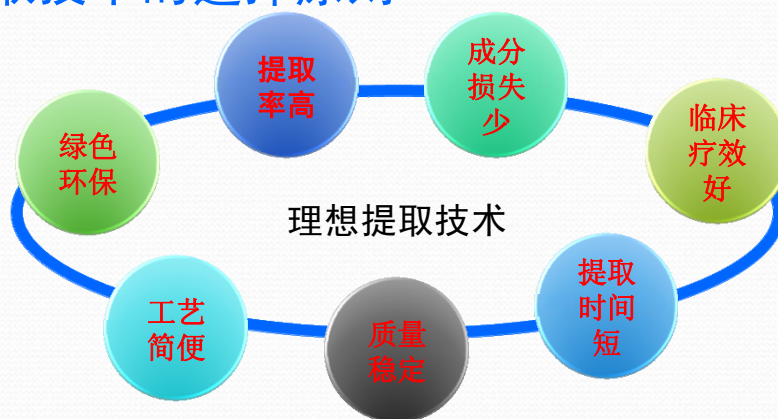
常温超高压提取人参总皂苷		
方法	条件	人参总皂苷含量（%）
蒸馏水回流	蒸馏水，4h	4.98
乙醇回流	50%乙醇，6h	5.75
乙醇回流-超声	50%乙醇，250 W,50 Hz,恒温,超声30 min	5.89
常温超高压	50%乙醇,加压200MPa,保压1 min	7.33
超临界CO2萃取	30 MPa,萃取温度40e, 95%乙醇为携带剂,携带剂含量为3%,萃取时间410 h, CO2流速2 L/min	2.32

陈瑞战等. 常温超高压提取人参总皂苷. 化工学报. 2005. 56 (5期).

7 其它提取方法

- 半液泛法提取(flooding extraction, FE)
- 仿生提取法(semi-bionic extraction, SBE)
- 压榨提取(press extraction, PE)
- 组织破碎提取法(smashing tissue extraction, STE)
- 免加热提取(heating-free extraction, HFE)
- 空气爆破提取(air explosion extraction, AEE)

8 提取技术的选择原则



成熟度：（1）连续逆流、压榨、微波和超声提取成熟度较高, 已工业应用；
（2）超临界萃取、组织破碎提取成熟度次之；
（3）半仿生、酶法、免加热、常温超高压提取尚处于研究阶段；
（4）液泛提取和空气爆破提取研究较少。

应用前景： 常温物理提取前景较好

（二）中兽药分离纯化技术

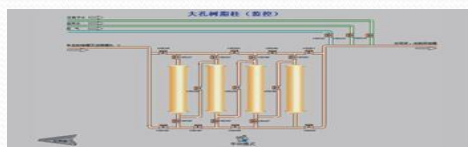
1 层析分离法（Chromatographic separation）

1.1大孔树脂吸附分离技术(Macro reticular Resin Attraction Separation)

原理:采用特殊的吸附剂,利用其吸附性和筛选性相结合,从中药复方煎液中有选择的吸附其中有效成分,去除无效成分。

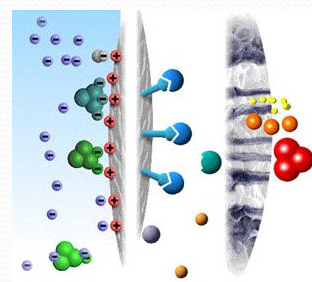
特点: 吸附容量大速度快、选择性好、易于解吸附、机械强度高、再生处理简单、不污染环境等,特别适用于从水溶液中分离低极性或非极性化合物。

应用: 分离纯化三七叶皂中的总皂甙,所得三七皂甙含量达95%以上,提取率6%以上; 人参总皂甙的人参皂苷含量为60.1%。



1.2凝胶层析技术（Gel chromatography）

原理: 交联葡聚糖LH-20(Sephadex LH-20)和交联葡聚糖LH-60(Sephadex LH-60)是凝胶过滤介质经过羟丙基改性后的适合中小分子药物分离纯化的介质,其分离机理是分子筛效应,即被分离物质的分子质量不同,能够渗入凝胶颗粒内部的程度不同,它们在凝胶柱中层析时被洗脱下来的速度也不同,从而实现不同分子质量物质的分离。



特点: 操作简单,分离效果好, 安全, 负载量高,非特异性吸附少。

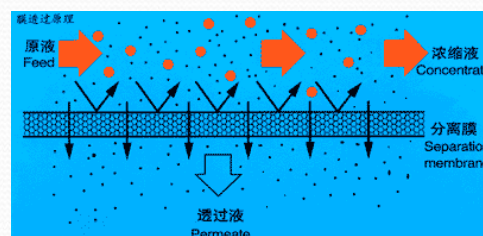
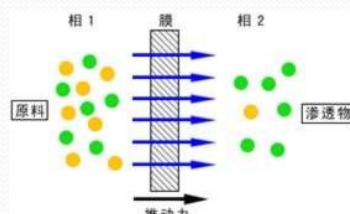
应用：西洋参不同部位中黄酮的分离； 栀子黄色素桔梗总皂苷纯化。

张海华等（2013）以桔梗为原料研究了桔梗总皂苷纯化的最佳分离条件。以桔梗皂苷纯化率为指标确定凝胶层析分离桔梗皂苷最佳工艺条件为: 乙醇体积分数 70%，凝胶体积与上样量比为 1：4，流速为 1 mL/min，洗脱剂用量与上样量为 1：1。在经过纯化的分离条件下进行实验，桔梗总皂苷的纯化率达到了 38%。



2 膜分离技术（ Membrane separation ）

原理：使用膜技术(半透膜、超滤膜、微孔滤膜、反渗透膜等)可以在原生物体系环境下实现物质分离,可以高效浓缩富集产物,有效去除杂质。



特点：有效膜面积大,分离效率高,滤速快,不易形成表面浓度极化现象,无相态变化,能耗小,可在常温下进行操作,对分离热敏性、保味性的药物更为适用。

应用：

六味地黄汤中分离活性多糖：得到相对分子量为30000左右的活性多糖组分, 工艺简单,生产周期短。

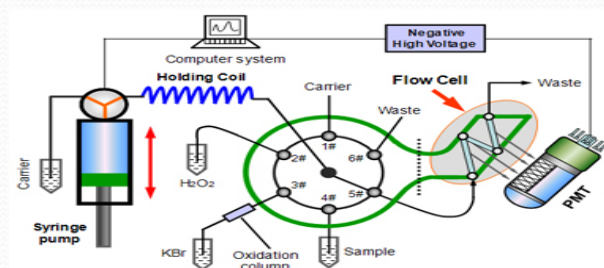
银杏叶中黄酮类化合物的提取：使用超滤技术对粗提的产品进行精制, 确定了最佳的提取条件:乙醇水溶液体积分数50%、提取温度80℃、料液质量体积比1 g:10 mL、提取时间2 h.提取物中黄酮质量分数达到5.96%,超滤后的产品中黄酮质量分数达到33.99%. 更多还原。



3 双水相萃取法 (Aqueous Two Phase Extraction, ATPE)

原理：为一种较新的固—液分离方法，利用被提取物在不同的两相系统间分配行为的差异来进行分离。

特点：较高的选择性和专一性 。



双水相体系直接萃取牛血清白蛋白

应用:

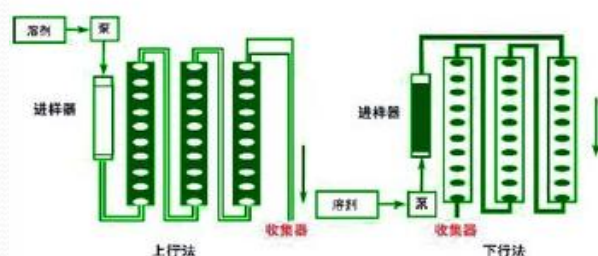
赵爱丽等（2008）利用聚乙二醇(PEG) / K_2HPO_4 - H_2O 双水相体系对黄芩苷进行分离纯化,结果表明双水相中PEG的分子量、PEG浓度、 K_2HPO_4 浓度、pH值及温度等因素都对双水相体系的相比、分配系数及黄芩苷的收率有一定影响,在最佳分离条件下,黄芩苷最大的分配系数可达29.8,最大收率98.6%。黄芩苷大部分被分配在PEG相(上相)中。

霍清（2006）对葛根素在双水相体系中的分配特性进行了研究。聚乙二醇(PEG) / $(NH_4)_2SO_4$ 双水相体系时,最大的分配系数可达148.2,最大收率99.09%。采用丙酮/ K_2HPO_4 双水相体系时,最大的分配系数可达36.7143,最大收率99.55%,葛根素大部分被分配在丙酮相(上相)中。

王志辉等（2008）研究葛根素在乙醇/硫酸铵两水相体系中的分配特性及其影响因素,在其最佳萃取条件时,最大的分配系数可达16.30,回收率94.33%,葛根素分配在上相。

4 高速逆流色谱分离法 (High-speed Counter-current Chromatography, HSCCC)

原理: 不用任何固定载体或支撑体的液—液分配色谱技术



特点: 分离效率高,产品纯度高,不存在载体对样品的吸附和污染,制备量大,溶剂消耗少。

应用: 在生物碱、黄酮、蒽醌、香豆素、萜类等成分的分离中都得到了较好的应用。

对甘草总黄酮样品采用高速逆流色谱法进行分离纯化:两相两相溶剂系统:正己烷—乙酸乙酯—甲醇—水(1:2:1:1),上相为固定相,下相为流动相,主机顺时针方向旋转,转速850r/min,流动相流速3.0ml/min, 样品浓度:20mg/ml,检测波长260nm,实验结果显示,通过一次分离(耗时200min),可从400mg甘草粗提物中得到甘草黄酮醇26mg,甘草素8mg,芒柄花素12mg,甘草异黄酮甲10mg,产物纯度分别为96.3%,95.7%,96.5%和96.8%。



5 高速离心分离法(Ultracentrifuge)

原理: 利用混合液密度差来分离料液,比较适合于分离含难于沉降过滤的细微粒或絮状物的悬浮液。

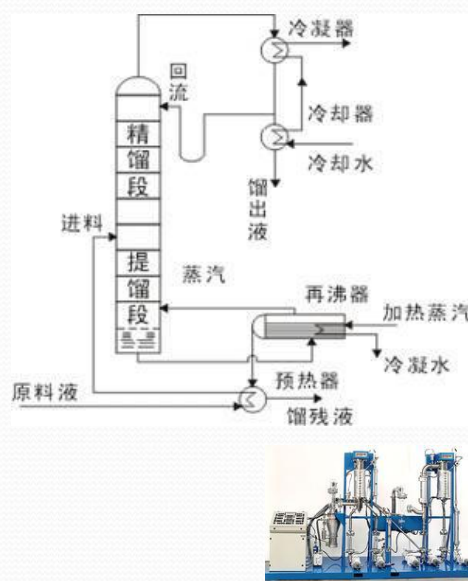
特点: 分离过程中能有效地防止中药中有效成分的损失,最大限度地保存药物的活性成分,且还可缩短工艺流程,降低成本。

应用: 采用高速离心法制备中药口服液,离心速度为 $16000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 和传统的水醇法比较,简单、省时,药液澄明度好,久置出现的沉淀少,具有广泛生理活性的多糖类成分基本上得以保留。



6 分子精馏(Molecular Distillation)和短程精馏(Short-path Distillation)

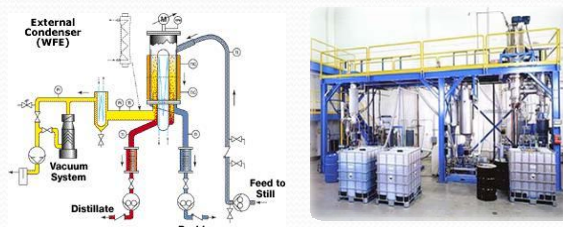
原理： 在高真空条件下进行的精馏技术, 分子蒸发的距离和分子运动的自由程相近, 因此分子精馏可以用于分离沸点相近、且分子量较高的高沸点或热稳定性差的物质。



应用： 这两种方法在我国尚属起步阶段。特别适合于油溶性中药有效成分分离与纯化, 如玫瑰油、藿香油、桉叶油、山苍子油等。

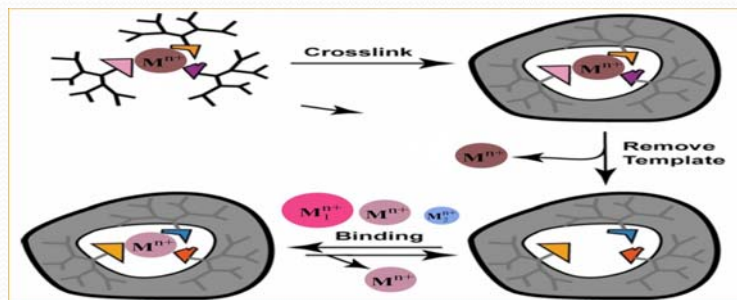
应用分子精馏和短程精馏法分离纯化维生素D, 收率达70%以上。

陈慧等(2009年)利用分子蒸馏提纯广藿香挥发油的最佳蒸发温度为65℃, 广藿香挥发油的质量分数和提取率分别达到40.71%和76.55%。分子蒸馏法比传统的水蒸气蒸馏法所得产物中有效成分质量分数和转移率要高, 在广藿香挥发油提纯的工业化生产方面有很好的应用前景。



7 分子印迹分离技术(Molecular Imprinting,MI)

原理：以待分离的化合物为印迹分子(也称模板、底物),制备对该类分子有选择性识别功能的高分子聚合物—分子印迹聚合物,然后以这种分子印迹聚合物(Molecular Imprinting Polymer,MIP)为固定相来进行色谱分离。



分子印迹过程示意图

特点：分子识别性强,选择性高,制得的MIP有高度的交联性,固定相不易变形,有良好的机械性能和较长的使用寿命。

应用：(1)药物分离和手性拆分；

(2)中草药有效成分的分离提取；

(3)利用分子印迹聚合物具有从复杂样品中选择性地吸附模板分子或与其结构相近的类似结构的化合物的能力，可以用于天然产物中相似结构活性组分的分离与提取。

谢健春等（2001年）将黄酮化合物奎皮素作为模板制备MIP,并将此MIP用于银杏叶提取液的分离,可制得了山奈酚和奎皮素。

贺湘凌等（2003年）采用环糊精分子印迹聚合物分离纯化葛根素,并将其与传统的分离纯化方法进行了比较,用这种方法可将葛根素一步分离纯化到98%,收率达80%以上,而传统的方法进行分离纯化则需要6步,且收率仅为10%左右。

四、中兽药生产关键技术研究

现代中兽药要求：

三效：高效、长效、速效

三小：剂量小、毒性小、副作用小

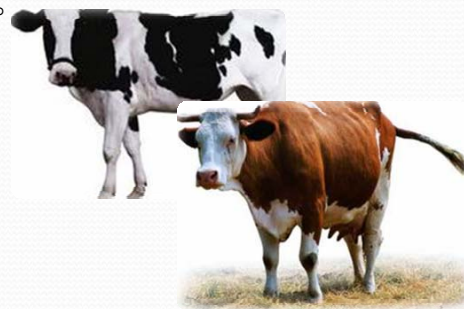
五方便：方便贮存、方便运输、方便携带、方便服用、方便生产



中兽药改革的方向

1、防治奶牛繁殖病中兽药新制剂关键技术

- 目前影响奶牛健康的主要疾病以繁殖障碍相关性疾病为主（总淘汰率60-90%）；抗生素、化学药物残留和耐药菌污染导致经济损失巨大。
- 该类疾病的防治对中兽药需求越来越大，中兽药品种占奶牛临床用药种类的37%。然而，多数中兽药科技含量低，研发和生产关键技术缺乏，限制了中兽药在奶牛疾病防治中的应用。有必要加大研发力度，解决共性关键技术问题，促进成果转化，支撑疾病防治。
- 热点：
 - （1）防治胎衣不下中兽药酞剂
 - （2）防治子宫内膜炎中兽药栓剂
 - （3）防治乳房炎中兽药分散片剂



2、益气扶正中兽药生产关键技术研究

- 提取具有免疫增强作用的中药有效成分或有效部位，研制成注射剂或可溶性粉；分析其与疫苗共用后的免疫增强效果、以及对粘膜免疫性能改善和对细胞免疫、神经内分泌免疫等的影响；破解益气扶正中兽药研发关键技术难点。
- 热点：
 - （1）中兽药疫苗稀释剂
 - （2）中兽药粘膜免疫增强剂
 - （3）抗感染中兽药有效成分（部位）复方制剂

3、防治猪牛腹泻中兽药生产关键技术研究

- 针对给养猪、养牛业造成巨大经济损失的腹泻病防治需求，依据中兽医辨证论治理论依据，围绕相关中兽药新制剂研发与生产关键技术，确定该类药物规模化生产关键技术参数。
- 热点：
 - （1）防治猪胃肠炎型腹泻中兽药复方
 - （2）防治仔猪泻痢中兽药颗粒
 - （3）防治犊牛湿热下痢中兽药复方新制剂



4、防治畜禽卫气分证中兽药生产关键技术研究

- 以经验方剂为基础，针对病毒和细菌引起上呼吸道感染卫气分证，开展防治该类病的中兽药新制剂关键技术研究。
- 热点：
 - （1）防治畜禽卫气分证中兽药口服液和注射液
 - （2）防治畜禽卫分证中兽药复方新制剂
 - （3）防治畜禽气喘病中兽药饮水剂



5、蒙藏兽药制剂制备关键技术研究与应用

- 对具有明显临床疗效的蒙兽药和藏兽药经方或验方，分别进行有效成分、药理毒理分析，阐述其对放牧动物胃肠道病或寄生虫病的药效作用，研制成水针剂、口服液、粉针剂或超微粉。
- 热点：
 - （1）蒙兽药制剂制备关键技术
 - （2）藏兽药制剂制备关键技术
 - （3）蒙藏兽药有效成分分析及药效评价



6、中兽药生物转化新制剂生产关键技术研究与应用

- 针对鸡、猪和牛消化不良、生长迟缓和免疫力低下等疾病，开展中兽药生物转化技术研究。
- 热点：（1）中兽药发酵颗粒新制剂
（2）中兽药发酵全成分提取新制剂

五、中药质量标准与检验

1 中兽药质量标准

药品标准是国家对药品的质量规格和检验方法所做的技术规定，具有权威性、科学性、进展性的特点，中兽药质量标准和质量控制经历了从无到有、从粗放到完善的发展过程。在动物性食品安全问题越来越受到关注的今天，对中兽药相关方面的研究渐多，开展针对中兽药质量标准的研究是中兽药研究的重要内容。

1.1 我国中兽药质量控制标准



《中国药典》迄今已出版 9 部，《中国兽药典》也出版了 4 部，均有专卷收载中药材与其制剂的质量标准及检验方法，现今与 2010 版一起发行的还有首次编制的《兽药使用指南（中药卷）》。

《中国兽药典》2010 年版（二部）体例更趋完善、收载品种更加丰富、标准表述更为规范、对安全性和质量可控性要求更高，逐步形成了方法科学、结构合理、技术先进、原则明确、内容规范的中兽药质量标准体系。虽然，《中国兽药典》（二部）与《中国药典》（一部）收载的内容上（生产工艺、功能与主治、鉴别、含量测定等项目）还是有差距，但是两者发展的趋势是一致的。



1.2 国外的中药质量控制标准

日本

制定生药的药典(JP)标准较早，其明治时期公布的初版药典(1886)中就对生药药材设定了行政性的规格，JP 在以后的各版修订中都增加收载新的生药，并根据技术的进步和实际的需要修改已收载品的记载内容。鉴别方面建立薄层色谱等方法较 CP 为早，在纯度检查等方面也建立了较为全面的标准，但重金属、有毒元素和农药残留量的限量检查落后于欧美药典。日本药局方編集委员会、美国药典委员会、欧洲药典委员会共同协调并制定了推荐的卫生物限度和检查方法，日本于 2007—2010 年开始执行。



欧洲

欧洲很多国家在历史上也有着植物药使用的传统，第5版欧洲药典(EP)及其5个非累积增补本中共收录有植物药及植物提取物的专论208个。最新版本EP6与前一版比，各部分进行了适当的修改。植物药各论中，通用方法外来物质取消了对常规草药品种(1433)的对外来物质2% m/m的常规限度；性状部分删除了鉴别A和B(显微和显微描述)；杂质部分出现“其他可检测的杂质”时，其表述做了适当修改。EP对植物药检查农药种类扩展十分迅速，禁用农药品种不断增加，通过多种检查项目共同使用来确保植物药及植物药产品的质量达到一定的标准，以保证药物的安全性。



美国

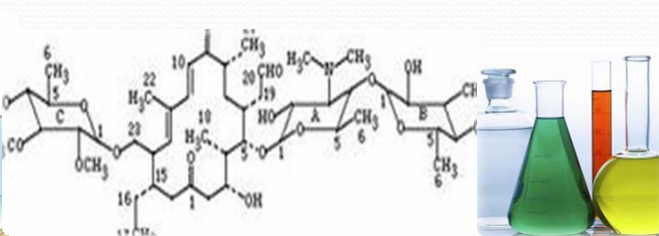
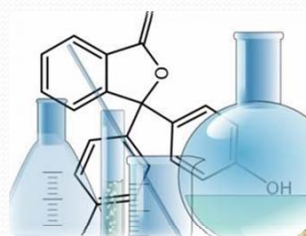
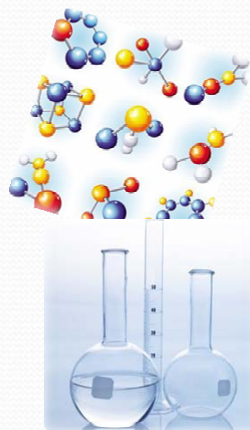
《美国药典》(USP/NF)从1926年第10版起就在附录中陆续记载了对植物药品的多项检测方法，并从第24版开始用较大篇幅增加了对淀粉含量、黄曲霉毒素和残留农药的测定规定。自2008年开始，中美正式签订了药典工作方面的《合作谅解备忘录》，目前已经确定穿心莲、积雪草、肉桂、青蒿、灵芝收入美国膳食补充剂的法典中。

高静等通过比较植物基原相同的10种生药来比较4种药典(及CP、JP、EP、USP/NF)的质量标准，整体来看，美国药典对于植物药的质量标准和安全性要求最高，检查项目全面、细致，作比较的多数植物药建立了重金属及有害元素、农药残留及微生物限量的检查，相关指标也最严格。



1.3 质量标准分析技术

中兽药质量标准的发展经历了由宏观至微观、由形态至成分的不断深入的发展过程，发展至今天包括外观形态经验鉴别、显微鉴别、理化鉴别、薄层鉴别乃至和仪器分析等方法为一体的综合质量控制体系。

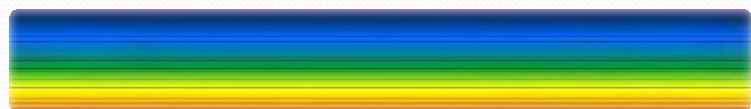


2010年版《中国药典》(一部)附录在2005年版药典的基础上新增离子色谱法、核磁共振波谱法、拉曼光谱法指导原则等现代仪器分析技术，中药品种中新增了液相色谱—质谱联用、DNA分子鉴定、薄层—生物自显影技术等方法。

从使用的各种分析方法看，HPLC的适用范围广，具有高效、快速、灵敏、重现性好等特点，已成为中兽药质量标准定量检测中的首选。

中兽药质量标准主要检测方法的演变：1978版兽药规范收载显微鉴别、薄层层析法；1990年版收载薄层色谱(TLC)鉴别，用分光光度法做含量测定；2000年版收载对照药材的TLC鉴别，用TLC和HPLC做含量测定；2005版大幅度增加TLC鉴别方法；2010年版大幅度增加TLC、HPLC方法、增加了指纹图谱的测定。

中药质量标准控制分析技术，在经典的分析技术的基础上发展新的技术，其必将克服传统方法的缺陷，将成为集药理学、植物学、分析化学、分子生物学、药理学、数学、物理、计算机、信息处理等多学科于一体，分析过程趋于自动化，分析的结果更具科学性。



1.3 规范与国际接轨的中兽医药质量标准

打基础

研究测定中兽医的多项指标，建立中药数据库、多项指标综合评价系统、中药材质量鉴别方法等

制定标准

药效学、安全性评价、生产工艺、质量标准、制剂技术、临床研究等

三效：高效、速效、长效

三小：剂量小、毒性小、副作用小

三方便：便于生产、服用和储存、携带及运输

发展方向：中药复方精致、浓缩、微量化和最佳化



1.4 现行的中兽药质量标准待改善的方面

- (1) 单一指标成分或少数指标成分的含量测定
- (2) 对照品缺乏，检测定性多，定量少
- (3) 收载内容有限 收藏的品种有限
- (4) 对中兽药安全性的研究不够
- (5) 质量标准的待完善

2 中药检验



2.1 中药检验中的科学思维方式

中药检验是药品检验所重要工作环节之一，由于中药受地理环境、气候、土壤等自然条件的影响，不同产地生长的中药在外形特征、内部结构及化学成分方面都存在一定的差异，其检验过程相比中成药和西药的检验要复杂得多，实际工作中，按标准检验的结果往往还不能做出肯定或者否定的结论，需要经过分析、类比、综合评判等思维过程才能得出正确的结果。中药检验思维是一种辩证思维，在实际工作中常常运用求同思维和求异思维两种。



(1) 中药检验中的求同思维

求同思维就是一种顺向思维方式，根据已有的物态特性、原理向着一个方向推导，从而达到解决问题的目的。以某种中药所具有的内、外表待征和这类中药所具有共同属性为依据，进行分类比较，找出其个别属性。但是，在同批商品药材中，往往有较大的个体差异，同种药材不同来源的品种，它们的显微结构、细胞内含物往往是相同的，差别仅在内含物的数量和所占的比例上。

例如：

不同来源的牡丹皮，有牡丹（*paeonia suffuticosa* Andr.）、茂汶牡丹（*P.thalictrumifolia*C.HoetS.Y.Chen）、野牡丹（*P.delavayi*Franch.）和四川牡丹（*P.szechuanica* Fang），其韧皮部的宽度分别占皮宽的 $\frac{1}{2}$ ， $\frac{4}{5}$ ， $\frac{2}{5}$ 和 $\frac{3}{5}$ 。

黄柏和川黄柏的鉴定，关黄柏的木栓细胞呈现方形，川黄柏的木栓细胞呈长方形。



(2) 中药检验中的求异思维

求异思维是一种逆向思维方式，根据原有的物态特性、原理推导不能达到的解决问题的目的，而必须从相反或者从各个不同方向提出多种设想，探求中药形态特点及其他辅助检验中有价值的信息，寻找更有效的解决问题的途径。常运用于中药的掺伪鉴别和不同科属的中药鉴定。

例如：

在山药检测中，往往同批商品中混有外表极相似的不同科或同科其他植物的根茎，如木薯、薯蓣科的植物等，从外表看很难定性。

但大戟科木薯（*Manihot esculenta* Crantz）的根茎显微鉴别有成束或单根散离的木纤维，另一类为薯蓣科的两种植物，它们均含有针晶束，其中一种有单个或成群的石细胞，且胞腔内含有草酸钙方晶，另一种无草酸钙主晶。选用参薯

（*Dioscorea alata* L.）类比，结果表明，参薯有含方晶的石细胞。选用一种已鉴定过的标准山药进行对照观察，结果表明，既无木纤维又无石细胞的是山药。



2.2 中药检验的分析技术-中药指纹图谱

中药样本经光谱或色谱等现代分析技术得到的中药各组分群体特征的图谱或图象。是在“四大鉴别法”的基础上，通过紫外、红外、气相、高效液相、核磁共振、扫描电子显微镜、计算机图像分析、电泳技术、同功酶分析法、分子生物学技术、X射线衍射技术、聚类分析技术等现代分析测试手段，得到能较全面表征中药化学成分的组成与含量特性的图谱。

不要求呈现在图谱中的每一个组分的化学结构都清楚，也不要求每一个组分都精确定量，但要求图谱信息尽可能清晰、丰富，并具备“指纹”特征。在已经确认该品种安全有效的前提下，凭借实用的指纹图谱既可确认产品的真伪，同时又能判断质量的稳定与否。



- 美国 FDA在1996年制定的《FDA关于植物制品的指南(试行)》中,对植物药品的临床化学、生产和控制部分,要求对植物原料、植物药中间品和植物药产品提供相应的指纹图谱(Fingerprint)。2000年,美国FDA允许草药保健品申报资料可以提供色谱指纹图鉴别资料。
- 英国草药典、印度草药典以及加拿大药用及芳香植物学会、德国药用植物学会也接受色谱指纹图谱。
- WHO在1996年草药评价指导原则中规定:“如果不可能鉴别有效成分,则鉴别1种或几种特征成分(如色谱指纹图谱)以保证制剂和产品质量的一致”。
- 欧共体在草药质量指南的注释中提到“草药的质量稳定性单靠测定已知的有效成分是不够的,因为草药及其制剂是以其整体作为有效物质。因此,应该通过色谱指纹图谱显示其所含的各种成分在草药及其制剂中是稳定的,其含量比例能保持恒定。
- 中国国家药品监督管理部门也于2000年发布了《中药注射剂的指纹图谱研究的技术要求(暂行)》,明确要求对新申报的中药注射剂和已上市的中药注射剂实行指纹图谱标准。

(1) 薄层色谱法(TLC)

快速、经济、可靠、操作简单、适应范围广、重现性较好,用固定波长对薄层展开的各斑点作薄层扫描的扫描图谱比目测的层析图谱更为客观准确。

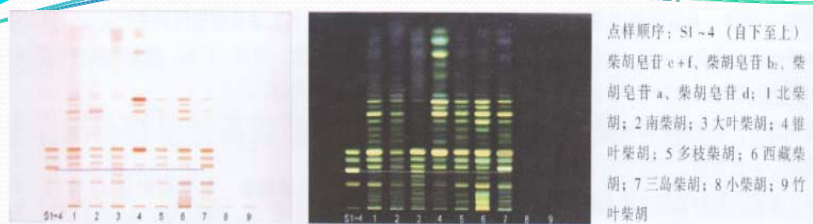


图1 不同品种柴胡药材典型薄层色谱图(左, 可见光; 右, 蓝紫[366nm])

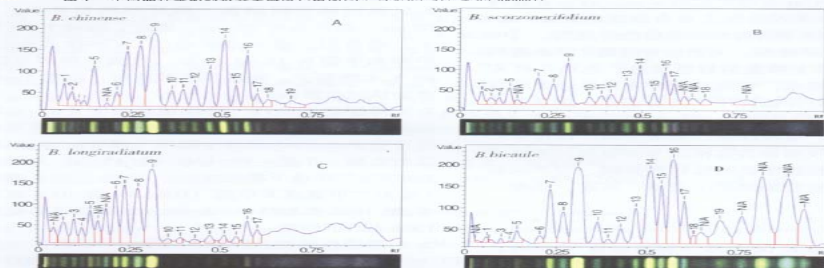


图2 不同品种柴胡代表性样本 HPLC 指纹图谱(样品: A. 北柴胡; B. 南柴胡; C. 大叶柴胡; D. 锥叶柴胡。色谱峰: 5. 柴胡皂苷 c+f; 8. 柴胡皂苷 a; 9. 柴胡皂苷 d)

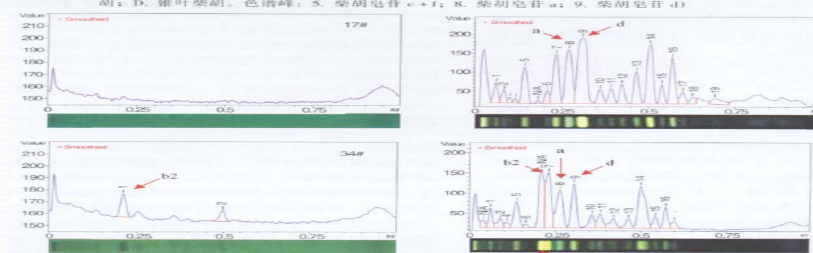


图4 柴胡皂苷-d 降解为-b₂的薄层色谱图(上: 柴胡皂苷 d 未分解; 下: 柴胡皂苷-d 已分解为-b₂)
 左: 荧光猝灭色谱(254 nm), 示柴胡皂苷 b₂ 有紫外吸收, 易于鉴别; 右: 荧光色谱(366 nm)

以柴胡正品北柴胡为基础建立柴胡皂苷高效薄层荧光色谱指纹图谱, 并对同属品种南柴胡、锥叶柴胡、多枝柴胡、三岛柴胡、西藏柴胡等的指纹图谱进行比较分析。结果表明分离效果好, 可明显区分各种品系的柴胡。

(2) 高效液相色谱法(HPLC)

分离效能高, 分析速度快, 已广为普及并用于中药的鉴别与定量分析。在构建HPLC特征指纹图谱时, 需要考虑的参数有色谱峰相对保留时间、相对保留面积、重叠率、n强峰、特征峰群或特征指纹峰检出率等。

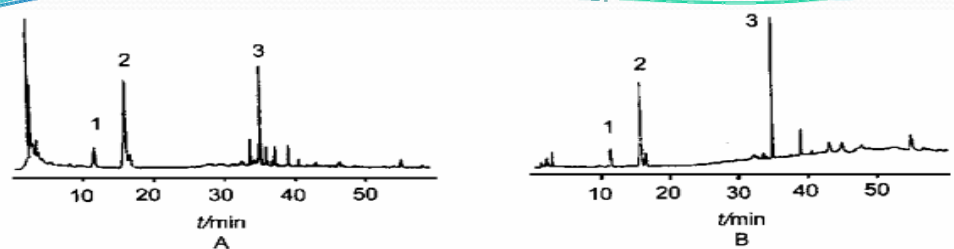


图 1 三七药材及三七总皂苷指纹图谱

A. 三七药材 B. 三七总皂苷 1. 三七皂苷 R_1 2. 人参皂苷 R_{g1} 3. 人参皂苷 R_{h1}

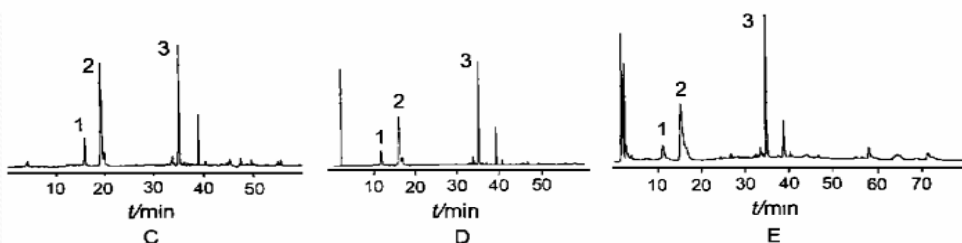


图 2 三七注射液及浓缩颗粒剂指纹图谱

C. 血栓通注射液 D. 血栓通注射液 E. 三七浓缩颗粒剂 1. 三七皂苷 R_1 2. 人参皂苷 R_{g1} 3. 人参皂苷 R_{h1}

应用 HPLC, Polaris C18 A 分析柱, 乙腈-水梯度洗脱, 流速 1.5 ml min^{-1} , 检测波长 203 nm , 对三七药材、提取物及市售主含三七成分的注射液进行指纹图谱研究, 结果色谱图对三七药材、提取物及市售主含三七成分的注射液中各皂苷类成分均得到很好分离, 可作为三七药材、提取物及含三七主成分注射液具有专属性的指纹图谱。

HPLC 法测定中兽药中土霉素, 方法准确可靠, 适用于中兽药散剂中非法添加土霉素的等化学药品的检测。

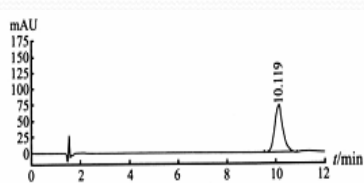


图 1 土霉素对照品溶液色谱图

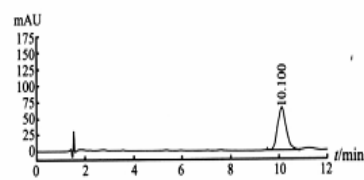


图 2 清肺散阳性添加样品溶液色谱图

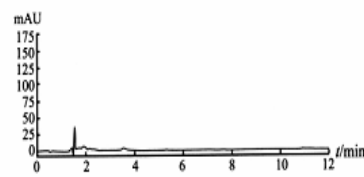


图 3 清肺散阴性样品溶液色谱图

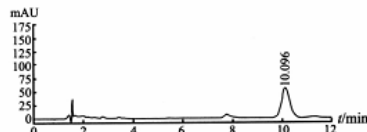


图 4 白龙散阳性添加样品溶液色谱图

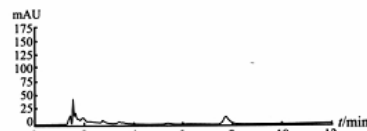


图 5 白龙散阴性样品溶液色谱图

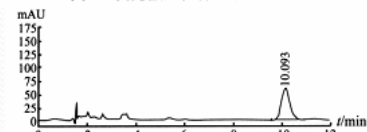


图 6 白头翁散阳性添加样品溶液色谱图

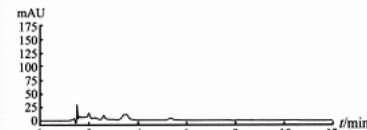


图 7 白头翁散阴性样品溶液色谱图

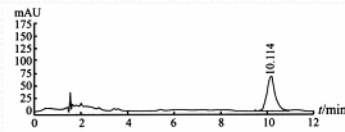


图 8 苍术香连散阳性添加样品溶液色谱图

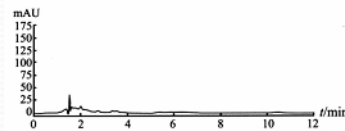


图 9 苍术香连散阴性样品溶液色谱图



图 10 止痛散阳性添加样品溶液色谱图



图 11 止痛散阴性样品溶液色谱图

(3) 气相色谱法(GC)

以气体为流动相, 分离效能高, 灵敏度高, 用量少, 分析速度快, 对于一些具有挥发性成分的中药的鉴别, GC能发挥独特的作用。气-质联用技术更增强了其定性功能, 不仅能区分不同中药中挥发性成分的差别, 还可阐明被检成分的结构。GC和GC/MS用于中药指纹图谱研究时, 含挥发性成分中药取样的代表性、合理性对实验结果的稳定性影响尤为显著。

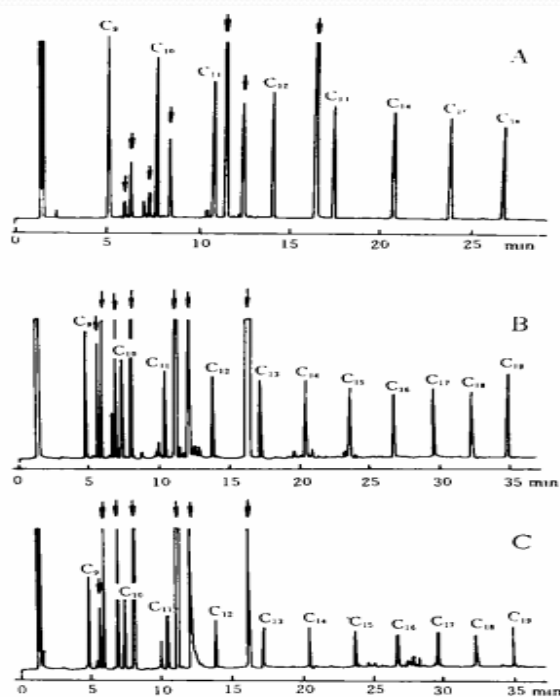
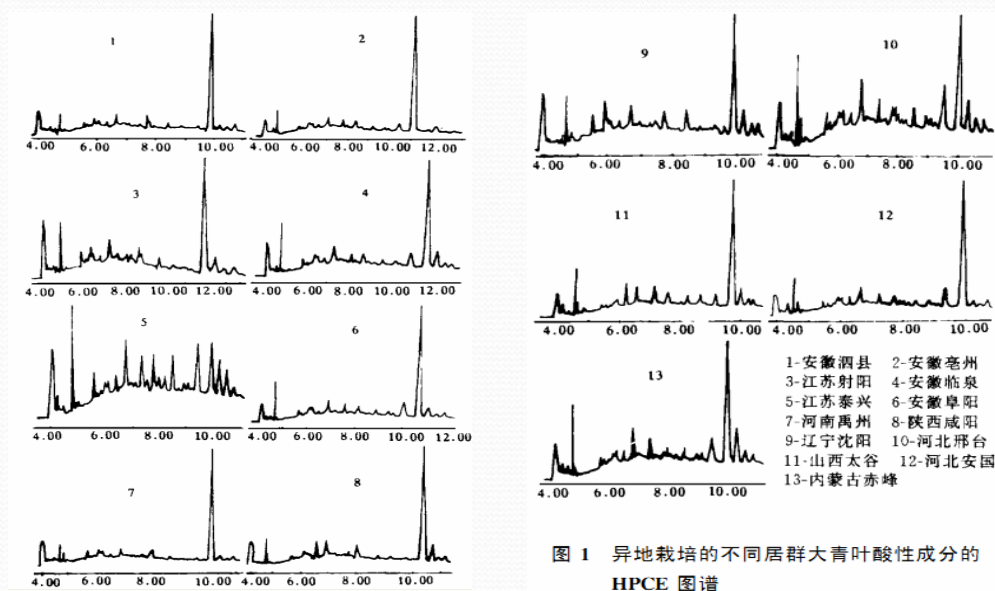


图1 阳春砂(A)、绿壳砂(B)和进口缩砂(C)的气相色谱图
C_n为碳原子数的正构烷烃 ↓为所选的主要成分

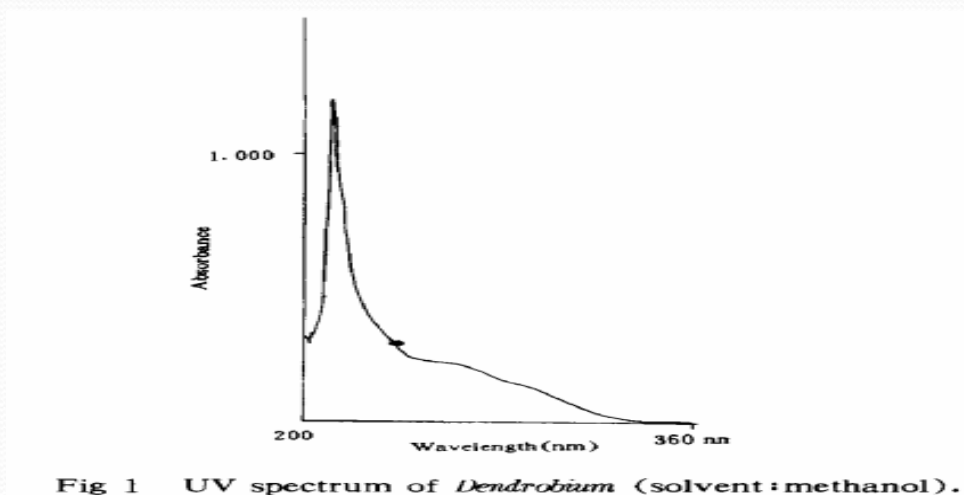
凌大奎等用规范化的色谱分离条件测定了6种常用中药砂仁、当归、苍术、柴胡、藁本和香附的挥发油成分GC保留指数(GCRI), 从中选择若干代表性成分的GCRI值组成各自GCRI谱, 并利用GC/MS和GC/FTIR对各主要成分作出了定性鉴别。

王寅等以HPCE法对不同属群大青叶药材的理化特征差异进行研究,结果表明异地栽培的不同属群大青叶药材酸性提取部位的化学成分及含量有显著差别,依据电泳图谱中特征峰的迁移时间和峰面积,能有效地鉴别不同属群大青叶药材。



(4) 紫外光谱法(UV)

依据中药中一些含有不饱和结构的成分对紫外光有吸收而进行鉴别。由于不同中药所含成分的不饱和程度有差异,因而导致紫外吸收曲线的形态、峰位、峰强有差异,因而可用于鉴别。许多中药含有不饱和成分,紫外光谱法又具操作简单、快速、重现性好、用量少等特点,故目前应用十分广泛。但是,在用紫外光谱鉴别中药时,一些亲缘关系较近的药材,由于成分相差不大,用常规紫外光谱法难以达到鉴别的目的,此时可采用多溶剂紫外光谱法,即分别检测数种不同极性溶剂提取液的紫外吸收,通过综合比较其图谱的差异,亦可获得较好的鉴别效果。



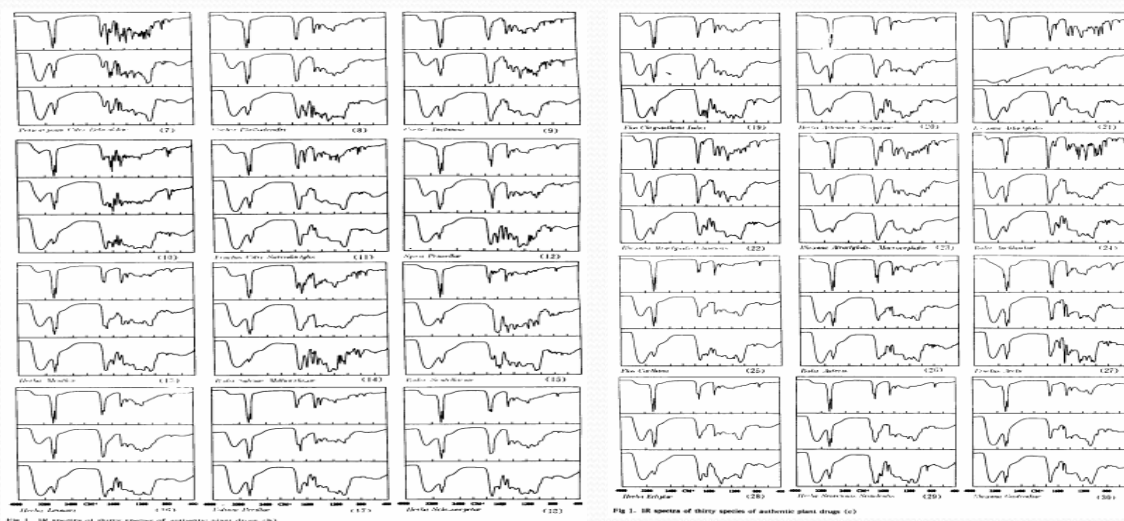
石斛氯仿浸出液典型的紫外光谱图

张亮等不经分离直接测定32种石斛药材粉末氯仿浸出液的UV光谱,运用主成分分析法进行综合分析,获得了较好效果。

(5) 红外光谱法(IR)

对整个化合物分子的鉴别,比单纯的发能团的化学定性鉴别专一性更强。中药材的红外光谱是混合物中各组分红外光谱的叠加,中药中各种化学成分只要在质和量的方面相对稳定,并且样品处理方法按统一要求进行,则其红外光谱也应该是相对稳定的。因此,不用分清混合物红外光谱各主要吸收峰的归属,只要在 $4\,000\sim 400\text{ cm}^{-1}$ 范围内比较光谱的差异即可。这种差异表现在三个方面:一是在某一波数处鉴别的双方只有一方有明显的差异;二是在某一波数内,鉴别双方的光谱中,吸收峰的形状和强度都有明显的差异;三是“指纹区”的面貌不同。

田进国等分别用石油醚、乙醚、水提取灵芝、苦地干、罂粟壳等30种药材对照品, 并分别测定其提取物的红外光谱。这30种药材对照品均具有独特的红外光谱特征, 根据其光谱特征可以准确地加以鉴别。



袁卫梅等对天麻、肉桂和牡丹皮的¹H NMR指纹图谱进行了研究, 分别显示了其主要成分的特征共振信号, 可作为这三种中药的相对标准图谱, 分别作为鉴别其品种的参照。

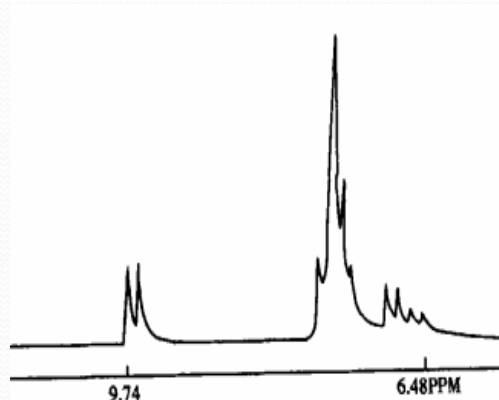


图1 肉桂的¹H NMR 指纹图(59.75MHz,溶剂:CDCl₃)

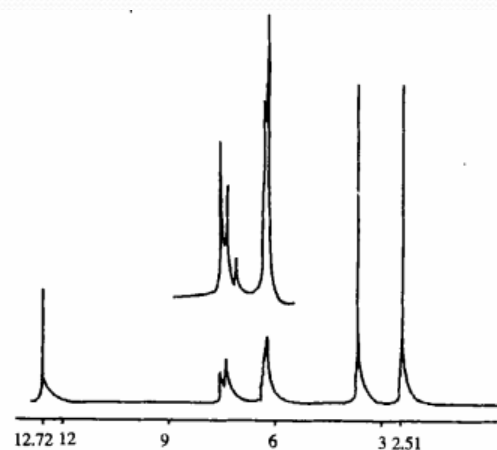
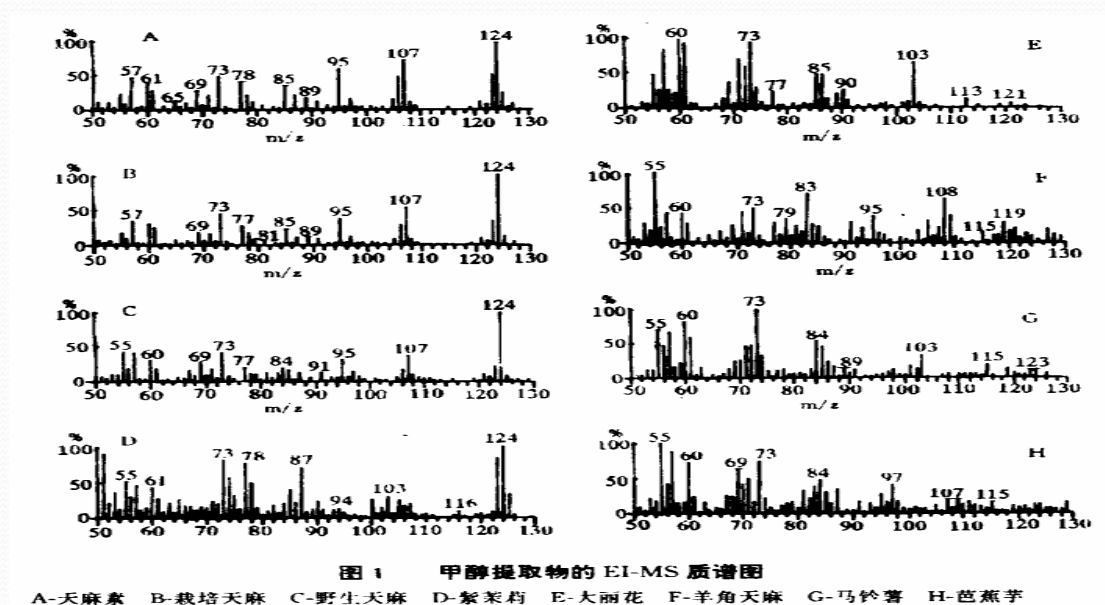


图2 牡丹皮的¹H NMR 指纹图(59.75MHz,溶剂:CDCl₃)

(6) 质谱法 (MS)

灵敏、精确,常与其它检测方法联用。串联质谱 (MS-MS)可直接用于粉末药材或成药的分析鉴定,是一种新的质谱技术。等离子体质谱 (ICP-MS)可建立中药同位素示踪方法学及质谱-质谱指纹图谱方法学,进行地道药材的判别与选择。气质联用 (GC-MS)法兼备气相色谱与质谱的优点,是最近运用较多的方法,有很好的发展趋势。

梁惠玲等对中药天麻及其伪品进行EI-MS分析,获得了满意的鉴别效果。



(7) X射线衍射法

X射线衍射法是研究物质的物相和晶体结构的主要方法。当对某一物质进行衍射分析时,该物质被X射线照射而产生不同程度的衍射现象,物质的组成、晶型、分子内成键方式、分子构型、构象等将决定物质产生特有的衍射光谱。如果该物质是一混合物,则所得衍射图是各组分衍射效应的叠加。只要混合物的组成恒定,其衍射图就可作为该混合物的特征谱图。由于衍射法获得的图谱信息量大,指纹性强,稳定可靠,因此可作为该物质定性鉴别的可靠依据。该方法的优点是样品量小,测试后不易破坏样品,操作简单,可用指纹信息多(衍射图、D值、相对强度等),结果稳定,客观,图谱指纹性强,还可直接给出物质结构,对于结晶度较好的矿物类药和部分动、植物类药的鉴别分析特别适宜。

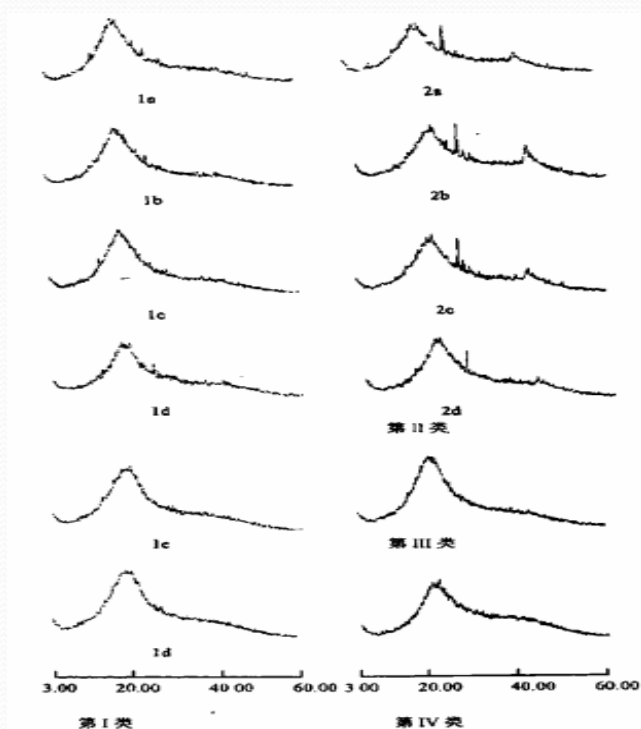


图 1 第 I 类~第 IV 类蛇床子 X 衍射 Fourier 谱

周俊国等对12个不同产地的蛇床子样品进行了粉末X射线衍射分析建立了蛇床子的特征图谱,认为该法可用于种内不同产地样品的鉴别。

(8) DNA指纹图谱

利用聚合酶链反应(PCR)从不同生物样品中人工合成DNA片断,而DNA片断的大小、数目可因不同的生物而异,故称之为“DNA指纹图谱”。具有重复性好,灵敏度高的优点。由于DNA分子标记直接分析的是生物基因型而非表型,所以鉴别结果不受环境因素、样品形态(原品、粉末或片状)和材料来源的影响,可为中药品种鉴别提供更加准确可靠的手段。其中主要包括有随机扩增的DNA多态性(RAPD)和任意引物扩增的PCR(AP-PCR)等方法。

- 日本的Ozeki等分离人参属3种植物的基因组DNA,通过RAPD分析发现,人参的新鲜根毛组织和干燥药材产生相同的RAPD指纹图,并且认为RAPD不仅可用于人参与其它药材的鉴别,还可以鉴定某些人参制剂中的药材品种;
- 曾明等用RAPD技术对葛属6种植物进行分析,探讨了葛属药用植物间的亲缘关系,并为分类和鉴别提供了依据;
- 颜辉娥等采用AP-PCR鉴别商品人参及其制品也较为成功。

结语

传承不泥古 发展不离宗

我国作为中兽医医药的发源地,具备最完善的理论、最丰富的经验,随着中国加入WTO及全球经济一体化的发展,中药国际化面临着有史以来最好的机遇,同时也面临着如何更好更快到地走向世界的问题。因此,必须加强与世界各国的文化交流,增加中药的科技投入,质量标准等方面与世界接轨,从而推进我国传统中医药在国际社会确立合法地位,再现往日辉煌。



谢谢!

