

植物药HPTLC定性鉴别的方法学验证



瑞士卡玛实验室主任Dr. E. Reich*

介绍

自从FDA食品补充剂的现行生产质量管理规范（cGMP）在美国颁布实施以来，对于合适的测试方法的需求大增。由于基于植物来源的原料都是复杂的混合物，其所体现出天然的波动性对植物药成分的分析构成挑战。故对定性鉴别的专属性要求其必须能够区分出样品中是否含有错误的植物种属成分。

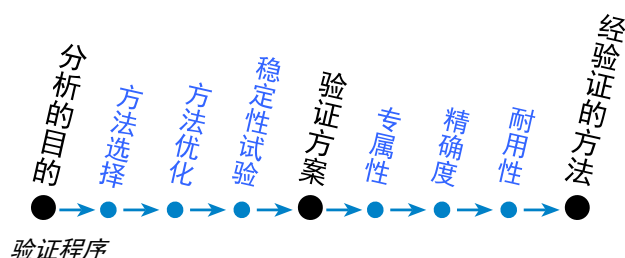
HPTLC为执行可靠的鉴别提供了有力保证。因为其能够提供彩色的色谱指纹图谱信息，可被可视化并以数字图像存储。为了充分利用这一源自HPTLC技术本身的独一无二的优势，必须确保获得可重现的结果和图像。

如果选用合适的仪器设备、执行标准化的HPTLC操作规程，以及按照下述准则来进行方法开发和验证[1]，就可以获得重现性的有效提高。

验证步骤及其组成

基于清晰定义的分析目的，确效过程开始于方法的开发、选择以及优化[2]阶段。接下来是在验证方案中详细说明的一系列的稳定性评价试验。在验证试验中获得的数据需要进行评估，并与验证方案的验收标准进行比较。如果所有要求都被满足，则该方法即

可视为有效。



方法选择

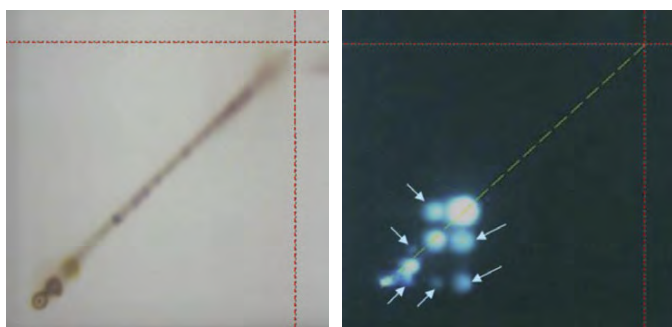
选择一个合适方法的准则由分析目标所决定，但也要考虑安全因素、时间要求和易用性等方面。

方法优化

在优化过程中，将现有TLC方法迁移到HPTLC方法中，并应执行标准化的方法学流程。还需要用经鉴定的已知掺伪品药材进行比对，以确保该方法具有足够的专属性。

稳定性

待分析物质在薄层板上、溶液中、色谱展开时以及图谱成像和扫描过程中的稳定性需要进行研究。色谱展开时样品的稳定性可借助二维色谱展开进行考察。步骤为首先将 1份对照药材的供试品溶液在薄层板的右下角进行点状点样，色谱展开，干燥。再将薄层板顺时针旋转90°，进行第二次展开。如果样品在色谱展开过程中是稳定的，那么所有的成分都应该分布在位于点样原点和2次展开的溶剂前沿交点之间的连线上。任何偏离这条直线的成分分布都提示组分在展开过程中产生了变化，说明这一产生次生产物的方法需要进行改进。如果需要对指纹图谱进行衍生化以便观察，那么结果的稳定性也必须进行多次验证（譬如超过1 h以上）。



考察刺五加 (Eleuthero, 左) 和当归 (Angelica spp.) 在色谱展开时的稳定性

验证方案

验证方案对于合理构建、管理和归档验证过程是一个关键工具。通常包含下列方面：

- 1 待验证方法的目标
- 2 通常可接受标准
- 3 人员
- 4 方法的详细描述
- 5 验证
 - 5.1 实验材料
 - 5.2 稳定性
 - 5.3 专属性
 - 5.4 精密度
 - 5.4.1 重复性 (Repeatability)
 - 5.4.2 中间精密度
 - 5.4.3 重现性 (Reproducibility, 可选)
- 5.5 耐用性 (Robustness)
- 6 结果、发布、签名

专属性

如果可能，收集来自不同产地的经鉴定的目标种属的植物样本，并和已知的掺伪品进行同板的色谱分离。以基于数字图像的方式，对每一个指纹图谱的成分条带序列（数目、颜色、浓度和位置）通过肉眼判别的方式进行评价。如果经鉴定的样品和对照药材一致，并且和任何掺伪品的相似度均很低，那么这个方法就具有专属性。

精密度

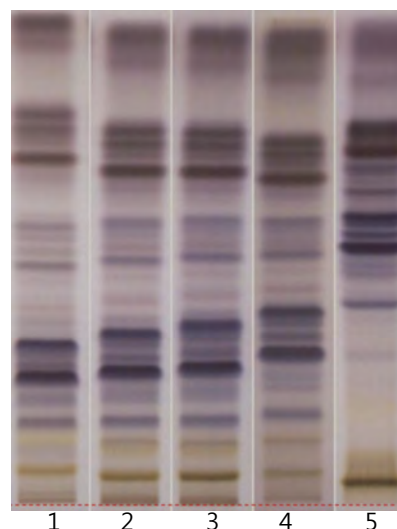
HPTLC指纹图谱定性鉴别的精密度要求所分离成分

斑点的位置 (hR_f 值) 的相对精确。我们推荐考察3个不同的层面：重复性、中间精密度和可重现性。如果同一薄层板上3个标记化合物的斑点 R_f 值的变化 ΔhR_f 小于1，重复性中的 ΔhR_f 小于2，以及中间精密度和可重现性中的 ΔhR_f 小于5，那么该精密度是可以接受的[1]。

编者注：推荐采用CAMAG自动色谱展开仪 (ADC2) 来控制薄层板活性。

耐用性

在方法学开发的过程中，许多实验参数的耐用性就已经得到了考察。由于HPTLC的结果通常被环境的相对湿度所影响，因此为了方法结果符合预期，对于方法适用的相对湿度范围的判定显得尤为重要。



对获得自不同相对湿度的蝴蝶亚 (Hoodia gordonii) HPTLC指纹图谱的比较 (1: 3% RH, 2: 33% RH, 3: 47% RH, 4: 54% RH, 5: 75% RH)

- [1] E. Reich, A. Schibli, A. DeBatt, J AOAC INT 91 (2008) 13
- [2] E. Reich, A. Schibli, High-performance thin-layer chromatography for the analysis of medicinal plants, Thieme Medical Publishers Inc., New York, 2007.

进一步资料可向作者联系获取：

* Dr. Eike Reich, CAMAG Laboratory, Sonnenmattstr. 11, 4132 Muttenz, Switzerland. eike.reich@camag.com