

黄芪中黄酮类化合物色谱指纹图谱的光谱相关色谱分析

谢建伟 黄兰芳 贺云彪^a 胡伟 王玉林

(衢州学院化学与制药工程系 浙江省衢州市九华北大道 78 号 324000)

^a(湖南省常德市药品检验所 湖南省常德市 415000)

摘 要 用色谱与光谱联用技术, 将光谱信息与色谱信息相结合, 对黄芪中黄酮类化合物进行光谱相关色谱方法分析, 判断中药黄芪不同色谱指纹图谱中的相关性组分, 进而表征和建立 4 个产地黄芪中黄酮类化合物特征色谱指纹图谱。该法能用于不同产地中药黄芪的真伪和优劣的鉴别, 为以后黄芪活性化合物的定性、定量关系研究及质量控制提供基础。

关键词 色谱指纹图谱; 光谱相关色谱; 黄芪; 黄酮

中图分类号: O657.7

文献标识码: A

文章编号: 1004-8138(2010)02-0553-05

1 引言

经过多年来的研究, 人们已认识到中药的药效不是来自单一的活性化学成分, 而是多种活性成分之间的协同效应。因此任何单一的活性化学成分或指标成分都难以评价中药的真伪和优劣, 而色谱指纹图谱技术是公认的有效控制中草药质量的方法^[1]。黄芪是豆科黄芪属膜荚黄芪 [*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge.] 或蒙古黄芪 [*Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongolicus* Bge.] 的根, 具有益胃固表、利水消肿、脱毒生肌、补中益气、行血、生血、摄血等功效^[2], 其主要活性组分为糖类、黄酮类和皂甙类化合物^[3,4], 黄酮类化合物具有重要的生理和药理作用, 如有抑制脂质过氧化、维持血中一氧化氮浓度和保护缺血再灌注损伤等作用^[5-7], 因而研究黄酮类成分指纹图谱, 能很好的体现黄酮类成分的整体表征, 对其质量控制方法有实际意义。

本文通过优化高效液相色谱-光二极管阵列检测器 (HPLC-DAD) 联用色谱分离条件, 利用直观推导式演进特征投影 (HEL P) 法获取主要的黄酮类物质的光谱, 再通过相关色谱方法判断不同的黄芪色谱指纹图谱中的相关组分, 进而表征和建立 4 个产地的黄芪中黄酮类化合物特征色谱指纹图谱。

2 理论部分^[8]

设任意组分 i 的光谱 s_i 与组分 j 的光谱 s_j , 其相关系数可计算为,

$$r(i, j) = \frac{(s_i - \bar{s}_i)^T \cdot (s_j - \bar{s}_j)}{(s_i - \bar{s}_i) \cdot (s_j - \bar{s}_j)} \quad (1)$$

$-1 \leq r(i, j) \leq 1$, r 越大, 表示光谱 s_i 和 s_j 越相似。当 $r = 1$ 时, 2 个组分就是同一化学物质。实际上, 因噪声和测量误差等影响因素的存在, r 值不可能等于 1, 只能接近于 1。表示 Frobenius 范

联系人, 电话: 86-570-8026668; Email: lfl@huang@yahoo.com.cn

作者简介: 黄兰芳 (1963—), 男, 湖南省常德市人, 博士, 教授, 主要从事药物分析研究工作。

谢建伟 (1968—), 男, 浙江省衢州市人, 副教授, 主要从事药物化学教学和研究工作。

收稿日期: 2009-06-15; 接受日期: 2009-09-04

数, T 为矩阵或向量的转置。

在实际运算中为求得组分纯物质的光谱 s 与其他组分光谱的相关系数, 用其他组分所在的二维色谱指纹图谱所包含的光谱 x_j ($j = 1, \dots, m$, m 为最大保留色谱, 即每一个保留时间点所对应的光谱) 代替计算。这样, 就得到的式 (2):

$$r(s, j) = \frac{(s - \bar{s})^T \cdot (x_j - \bar{x}_j)}{(s - \bar{s}) \cdot (x_j - \bar{x}_j)} \quad (j = 1, 2, \dots, m) \quad (2)$$

将相关系数 $r(s, j)$ 对色谱保留时间作图就得到该目标物质的光谱相关色谱曲线。如果相关色谱曲线的值在一定的区域内会很接近 1, 那么它所对应的色谱流出组分与目标物质高度相关, 从而实现了色谱指纹图谱与目标物质的相关分析。

3 实验部分

3.1 仪器与试剂

HP1100 型高效液相色谱/二极管阵列联用仪 (HPLC-DAD, 美国 Agilent 公司); 250mL 索氏提取器; SB2200 型超声波振荡仪 (上海必得信超声波有限公司)。

内蒙、河北、甘肃、西藏黄芪购自长沙老百姓大药房; 乙腈为色谱纯; 甲醇、正丁醇、磷酸均为分析纯。实验用水为超纯水。

3.2 提取方法

将黄芪根磨成粉末状, 将 40 目的黄芪粉末在 60℃ 温度下干燥 1h。准确称取 20g 样品, 加入乙醚 50mL 超声脱脂 15min, 弃去乙醚液。再将药材置于索氏提取器中, 加 200mL 甲醇, 水浴 (80℃) 提取 3 0h, 过滤并真空干燥, 残留物溶解于 25mL 热水中。分别用 10mL 和 5mL 正丁醇饱和液萃取 2 次, 合并有机相, 减压蒸发后, 用 15mL 甲醇溶解。

3.3 色谱条件

色谱柱为 Hypersil ODS 柱 (4.4mm × 250mm, 5μm), 流动相为 A: 水 (含 1.5% 的 0.03 mol · L⁻¹ H₃PO₄), B: 乙腈, 流速为 1.0mL · min⁻¹, 线性梯度洗脱, 溶剂系统见表 1, 流动相用 0.45μm 微孔滤膜过滤。样品溶液用 0.25μm 微孔滤膜过滤, 进样量: 20μL。DAD 检测波长范围: 200—400nm。

4 结果与讨论

4.1 色谱条件的优化

由于黄酮类化合物的结构与性质极为相似, 同时因皂甙类化合物的影响, 若使黄酮类化合物达到较好分离, 优化色谱条件是必要的。实验结果表明以乙腈、水和磷酸为流动相, 梯度洗脱为佳, 结果如表 1。

表 1 溶剂系统

步骤	时间 (min)	水 (1.5% 0.03mol · L ⁻¹ H ₃ PO ₄) (%)	乙腈 (%)
1	0	75	25
2	5	68	32
3	10	65	35
4	20	40	60
5	45	40	60

4.2 黄酮类化合物定性分析

图 1 为 4 个不同产地黄芪中黄酮类化合物的色谱指纹图谱, 从图 1 可以看出, 它们的形态非常相似而又不完全相同。然而, 由于重叠色谱峰, 色谱保留时间的漂移, 以及色谱背景的影响, 都会给

不同提取物中是否有相同的化学成分的判断造成困难(见图 2), 然而采用相关化学计量学方法能解决此类复杂问题。首先用直观推导式演进特征投影(HEL P)^[9]从二维指纹图谱 *a* 中直接得到 8 个黄酮类化合物的光谱, 将这些光谱与标准谱相对照^[3], 可得内蒙黄芪中黄酮类化合物定性分析结果(见表 2)。

4 3 组分相关色谱分析

组分的光谱固然可用于表征中药指纹图谱以鉴别不同的药材, 但若通过化学分离和计量学分辨, 将每个色谱指纹图谱的化学成分逐一定性, 这样不仅消耗大量的人力、物力, 也不宜于及时分析样本。为简洁起见, 本文采用光谱相关色谱方法在不必完全获取每个化合物光谱的情况下分析不同指纹图谱的相关组分。

表 2 4 产地黄芪中黄酮类化合物的定性结果

峰号	保留时间(min)				化合物
	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>c</i>	<i>d</i>	
1	13 59	13 71	13 51	13 64	7, 3'-二羟基-4'-甲氧基异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖甙
2	17 24	17 32	17 17	17 27	7-羟基-4'-甲氧基异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖甙
3	21 47	21 58	21 38	21 53	9, 10-二甲氧基紫檀烷-3-O-β-D-葡萄糖甙
4	25 54	25 63	25 48	25 59	2'-羟基-3', 4'-二甲氧基异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖甙
5	25 89	26 02	25 81	25 94	7, 3'-二羟基-4'-甲氧基异黄酮
6	30 65	30 74	30 57	30 71	7-羟基-4'-甲氧基异黄酮
7	32 94	33 06	33 86	32 97	9, 10-二甲氧基紫檀烷
8	37 09	37 22	36 96	37 02	2'-羟基-3', 4'-二甲氧基异黄酮

按照式(2)计算指纹图谱 *b*, *c*, *d* 的每一色谱保留时间对应的光谱与指纹图谱 *a* 的 2'-羟基-3', 4'-二甲氧基异黄酮(组分 8)的相关系数。以相关系数 *r* 对保留时间 *t* 作图, 得一光谱相关色谱曲线, 图 2*a* 为图 1 中曲线 *b* 与 2'-羟基-3', 4'-二甲氧基异黄酮的相关系数曲线。从该曲线图中可以看出, 只有 *k* 与 7-羟基-4'-甲氧基异黄酮相对应的相关系数最大(接近于 1), 它们光谱高度相关, 是同一化学物质。依此方法分别判断其他指纹图谱中与指纹图谱 *a* 对应的黄酮类化合物, 结果如表 2。

4 4 黄酮类化合物指纹图谱的分析

由“中药色谱指纹图谱计算机辅助相似性评价系统(CASE)”^[8]直接计算 4 个指纹图谱与它们共有的特征组分即黄酮类化合物(图 1*e*)的相关系数, 结果列于表 3 中, 显然第 4 个指纹图

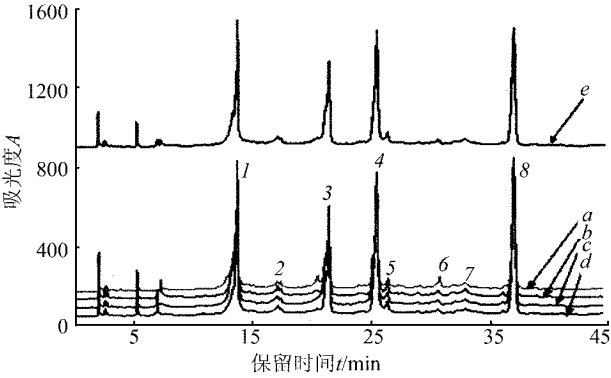


图 1 4 个不同产地黄芪的黄酮类化合物在波长 250nm 的液相色谱指纹图谱
a——内蒙黄芪; *b*——河北黄芪;
c——甘肃黄芪; *d*——西藏黄芪; *e*——共有模式。

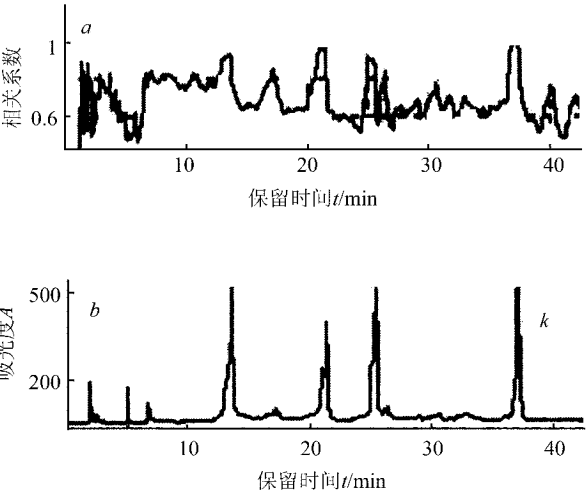


图 2*a* 内蒙黄芪中样本组分 8 与河北黄芪样本组分 *k* 的光谱相关色谱曲线
图 2*b* 河北黄芪样本的高效液相色谱指纹谱图, *k* 为目标组分

谱对应的值较小。如果简单的用这个指标来评价该药材的质量, 会错误的断定该药材是不合格的。为避免类似的错误发生, 我们采用局部最小二乘方法^[10]。它是将整个指纹图谱按照相关组分所在的峰簇划分为诸多的色谱峰簇, 再分别对这些相关的峰簇色谱流出时间进行最小二乘校正。图 3aa、3bb、3cc 与 3dd 分别是用局部最小二乘方法校正指纹图谱 1a、1b、1c 与 1d 对应的流出时间所得的曲线, 图 3ee 为它们的共有特征组分黄酮类化合物。再由“中药色谱指纹图谱计算机辅助相似性评价系统(CA SE)”计算它们的相关系数, 结果也列于表 3 中。可见, 经过局部最小二乘方法处理色谱指纹图谱, 第 4 个黄芪指纹图谱的相关系数由 0.7280 提高到 0.9847, 使得黄芪的黄酮类化合物特征谱的表征更合理, 药材的质量品质评价更准确。

表 3 4 个产地黄芪中黄酮类化合物指纹图谱与其共有模式的相关系数

产地	内蒙	河北	甘肃	西藏
* 相关系数	0.9754	0.9850	0.9522	0.7280
[†] 相关系数	0.9932	0.9897	0.9943	0.9847

* 相关系数: 未校正时的相关系数; [†] 相关系数: 校正后的相关系数。

5 结论

中药色谱指纹图谱是一种综合的、可量化的色谱鉴定手段。借以鉴别真伪、评价原料药材, 半成品和成品质量均一性和稳定性。从其综合和整体性能看, 它准确且又可量化地对药材进行真伪鉴别和质量评价, 而从细节上看, 对中药色谱指纹图谱, 由于不可能获得所有化学成分的标样, 并且还有很多化合物可能本身就是未知化合物, 一时难于给出准确的定性、定量说明, 所以从这一角度来说, 中药色谱指纹图谱又是很模糊的。通过相关色谱方法分析和用局部最小二乘方法校正, 由此而建立的黄芪中黄酮类化合物色谱指纹图谱, 能用于不同产地中药黄芪的真伪和优劣的鉴别, 为以后黄芪的活性化合物的定性、定量关系研究及质量控制提供基础。

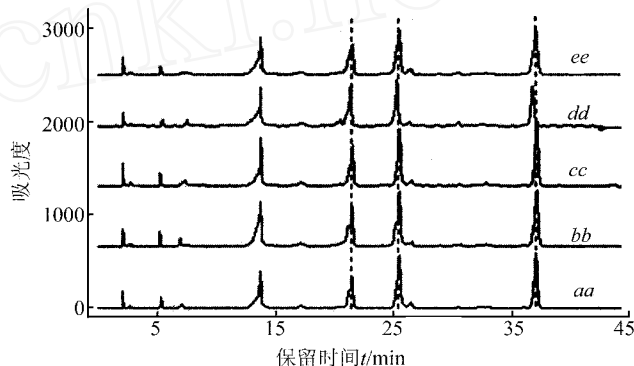


图 3 局部最小二乘校正方法处理后的不同产地黄芪黄酮类化合物的色谱指纹图谱

aa——内蒙黄芪; bb——河北黄芪; cc——甘肃黄芪;
dd——西藏黄芪; ee——共有模式。

参考文献

- [1] 王龙星, 肖红斌, 梁鑫淼等. 一种评价中药色谱指纹谱相似性的新方法: 向量夹角法[J]. 药学学报, 2002, 37(9): 713—717.
- [2] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005. 213.
- [3] Wagner H, Bauer R, Peigen X *et al* Radix Astragali-Huangqi[J]. *Chinese Drug Monography and Analysis*, 1997, 1(8): 1—17.
- [4] 杨丙平, 郝东方, 苏兰. 膜荚黄芪的化学成分研究[J]. 中国药物化学杂志, 2008, 18(6): 457—460.
- [5] 汪德清, 田亚平, 向兰. 黄芪总黄酮生物学活性作用的化学成分基础研究[J]. 军医进修学院学报, 2006, 27(1): 13—15.
- [6] 季旭明, 王伟庆, 刘琳. 黄芪功效研究简述[J]. 山东中医药大学学报, 1998, 22(3): 224—226.
- [7] 刘晋华, 陈静然, 尤光甫. 黄芪对心肌保护作用的药理学研究进展[J]. 中成药, 2002, 24(8): 623—625.
- [8] 李博岩, 梁逸曾, 谢培山等. 光谱相关光谱及其在中药色谱指纹图谱分析中的应用[J]. 分析化学, 2003, 31(7): 799—803.
- [9] Liang Y Z, Kvalheim O M, Keller H R. Heuristic Evolving Latent Projections: Resolving Two-Way Multicomponent Data[J]. *Anal Chem.*, 1992, 64(5): 946—953.
- [10] 李博岩, 梁逸曾, 胡芸等. 中药色谱指纹图谱组分保留时间漂移的校准[J]. 分析化学, 2004, 32(3): 313—316.

Analysis of Chromatographic Fingerprints of Flavonoids in Radix Astragali by Spectral Correlation Chromatography Method

XIE Jian-Wei HUANG Lan-Fang HE Yun-Biao^a HU Wei WANG Yu-Lin

(Department of Chemistry and Pharmaceutical, Quzhou College, Quzhou, Zhejiang 324000, P. R. China)

^a(Changde Institute for Drug Control, Changde, Hunan 415000, P. R. China)

Abstract The spectra and chromatography information of flavonoids in radix astragali were obtained from hyphenated instruments and analyzed with spectral correlative chromatography. The correlative components of complicated traditional medicine radix astragali in different chromatographic fingerprints was obtained. The characteristic fingerprint of flavonoids in radix astragali was established. The method can be used for identification of radix astragali and provide foundation for the study of active compound in radix astragali and for quality control of radix astragali.

Key words Chromatographic Fingerprints; Spectral Correlation Chromatography; Radix Astragali; Flavonoid

欢迎您投稿“高效、保质”的中文核心期刊 《光谱实验室》

这是您的发明、发现获得“优先权”的可靠保障!

发表周期多数(50% - 75%)为 5—9 个月,

少数(20% - 45%)为 1—5 个月,极少数(0- 7%)为 15—30 天

及时发表科技论文,是尽早实现其社会效益的前提,也是作者创造性劳动得到尊重、为在世界上取得“优先权”的可靠保障,因为发明、发现的“优先权”通常是以出版时间为准的。因此,本刊把尽快发表作者的论文,视为自己的神圣职责。

确保论文质量是论文早日发表的条件。作者发表论文总是要反映自己在工作有所发明、有所发现和有所创造的成绩,而不是去暴露自身的“缺欠”和“毛病”;换言之,作者发表论文总是要为自己“争光”,而不是让自己“蒙羞”。因此,作者投稿之前,除了自己要反复检查外,一定要多请您周围的同事、专家挑“毛病”,把“毛病”消灭在投稿之前,再投本刊才能发表得快。如果本刊挑出毛病,再请作者修改,反复“折腾”,不仅消耗双方精力,而且必然延长发表时间。保证质量的基本要求就是论文要做到“齐、清、定”。“齐”即全稿包括表、图和照片等齐全;“清”即文字图片打印(书写)清楚,不得有模糊不清的文字、图片和数字,段落要分明,便于排版和校对;“定”即做到稿件内容完整,在编辑过程中无须增删修改。

来稿请用 Word 排版,用电子邮件发到本部电子信箱(E-mail: gpsys@263.net)。

本刊收到作者来稿后,都会在 3 日(遇公休日顺延)内发出“收稿通知”。因此,作者发送稿件后 7 日以上都没有消息,一定要及时来电查询。

一篇论文出版,常常需要反复沟通“作者→编辑部→审者→编辑部→作者”之间的联系,其中与作者的联系是最重要的一环,一旦脱节,必然中断编辑过程。因此作者来稿时,务必将联系人的正确的姓名和详细地址、办公室电话、手机号码、传真号码和电子信箱等(通讯方式要尽可能全)告诉编辑部,以便能与您及时联系。否则,由此而产生的不良后果由作者自己负责。

本刊发表论文的宗旨是学术交流,而不是应付“评职称”、“拿文凭”等。

《光谱实验室》编辑部