

# HPLC-DAD 研究黄芪中黄酮类 化合物色谱指纹图谱

谢显珍 黄兰芳<sup>a</sup>

(常德职业技术学院医药系 湖南省常德市 415000)

<sup>a</sup>(衢州学院化学化工系 浙江省衢州市 324000)

**摘 要** 利用联用色谱建立了黄芪中黄酮类化合物色谱指纹图谱, 用相关化学计量学方法和黄芪黄酮类化合物标准谱对照, 定性鉴定出八个黄酮类化合物, 进而建立了 4 个产地黄芪中黄酮类化合物特征色谱指纹图谱, 表明不同产地同种药材间的相关性。该方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** 中药色谱指纹图谱, 联用色谱, 黄芪, 黄酮

中图分类号: O 657. 7<sup>+</sup> 2

文献标识码: A

文章编号: 1004-8138(2009)03-0559-05

## 1 引言

经过多年来的植物化学和中药药效研究, 人们越来越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。中药指纹图谱用现代先进的分析技术来分析药材的整体特性, 以更准确鉴别不同中药及识别中药本身的真伪和优劣, 是当前我国中药研究和产业界的热点问题。

黄芪是豆科黄芪属膜荚黄芪(*Astragalus membranaceus* (Fisch.) B. eg.) 或蒙古黄芪(*Astragalus membranaceus* (Fisch.) B. eg. var. *mongolicus* B. eg.) 的根, 性甘、温, 归脾、肺经, 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, 其主要活性组分为糖类、黄酮类和皂甙类化合物<sup>[1,2]</sup>, 而黄酮类化合物具有重要的生理和药理作用, 如芒柄花素(*Fomononetin*) 有抗菌和雌激素作用<sup>[3,4]</sup>。

本研究通过优化 HPLC-DAD 联用色谱分离条件, 在充分利用联用色谱提供的色谱、光谱信息的基础上, 利用一些化学计量学方法获取主要黄酮类物质的光谱, 以定性主要黄酮类组分, 进而表征和建立 4 个不同产地的黄芪中黄酮类化合物特征色谱指纹图谱。

## 2 实验部分

### 2.1 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, SB 2200 型超声波振荡仪(上海必能信超声有限公司)。

内蒙、河北、甘肃、西藏黄芪购自长沙芝林药店; 乙腈为色谱纯; 甲醇、正丁醇、磷酸均为分析纯;

常德职业技术学院资助项目(中药黄芪色谱指纹图谱的研究)

联系人, 电话: (0731) 5384730; E-mail: lf18huang@yahoo.com.cn

作者简介: 谢显珍(1964—), 女, 湖南省常德市人, 副教授, 从事分析化学教学和研究。

收稿日期: 2008-10-22; 接受日期: 2009-01-20

水为超纯水。

## 2.2 提取方法<sup>[1]</sup>

将黄芪根磨成粉末状,将 40 目的黄芪粉末在 60 °C 温度下干燥 1h。精密称取 20g 样品,加入乙醚 50mL × 2 超声脱脂 15min,弃去乙醚液;再将药材置于索氏提取器中,加入 200mL 甲醇,在水浴 (80 °C) 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。

## 2.3 高效液相色谱条件

色谱柱为 Hypersic ODS 柱 (4.4mm × 250mm, 5 $\mu$ m), 流动相为 A: 水 (含 1.5% 的 0.03 mol · L<sup>-1</sup> H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), B: 乙腈, 流速为 1.0 mL · min<sup>-1</sup>, 线性梯度洗脱, 溶剂系统见表 1, 流动相用 0.45 $\mu$ m 微孔滤膜过滤, 样品溶液用 0.25 $\mu$ m 微孔滤膜过滤, 进样量: 20 $\mu$ L。DAD 检测波长范围: 200—400nm。

# 3 结果与讨论

## 3.1 色谱条件的优化

中药指纹图谱是一种用来对不同药材种属进行鉴别,对同种药材质量是否均一及其质量优劣进行评价的工具,有必要对其特有属性进行仔细分析和整体表征,而色谱条件优化是建立特征指纹图谱的前提。

据文献<sup>[1]</sup>可提取黄芪中的黄酮类化合物,黄酮类化合物的结构与性质极为相似,为使黄酮类化合物达到较好分离,同时由于皂甙类化合物的存在,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 <sup>-1</sup> H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ) (%)	乙腈 (%)
1	0	75	25
2	5	68	32
3	10	65	35
4	20	40	60

## 3.2 黄酮类化合物定性分析

图 1 为 4 个不同产地黄芪的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,所代表的化学物质是否相同的判断造成很大的困难 (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。首先用子窗口分析法<sup>[5,6]</sup>从二维指纹图谱内蒙黄芪 (a) 中直接得到 8 个黄酮类化合物的纯紫外光谱,如图 2。将这些光谱与标准谱相对照<sup>[1]</sup>,可得内蒙黄芪中黄酮类化合物定性分析结果 (见表 2),同样方法对河北黄芪、甘肃黄芪、西藏黄芪中黄酮类化合物定性分析,结果也见表 2。

表 2 不同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
	a	b	c	d	
1	13.59	13.71	13.51	13.64	7,3-二羟基-4-甲氧基异黄酮-7-O- $\beta$ D-葡萄糖甙
2	21.47	21.58	21.38	21.53	7-羟基-4-甲氧基异黄酮-7-O- $\beta$ 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- $\beta$ 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- $\beta$ 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

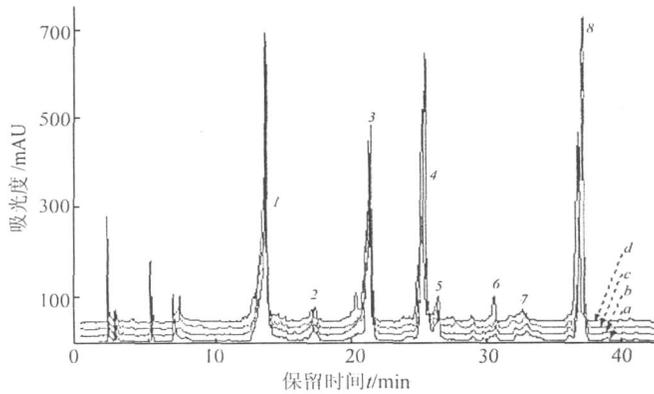


图 1 4 个不同产地黄芪的黄酮类化合物在  
波长 250nm 的液相色谱指纹图谱

a——内蒙黄芪; b——河北黄芪; c——甘肃黄芪; d——西藏黄芪。

1——7, 3 -二羟基-4 -甲氧基异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖甙;

2——7-羟基-4 -甲氧基异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖甙;

3——9, 10-二甲氧基紫檀烷-3-O-β-D-葡萄糖甙;

4——2 -羟基-3, 4 -二甲氧基异黄酮-7-O-β-D-葡萄糖甙;

5——7, 3 -二羟基-4 -甲氧基异黄酮;

6——7-羟基-4 -甲氧基异黄酮;

7——9, 10-二甲氧基紫檀烷;

8——2 -羟基-3, 4 -二甲氧基异黄酮。

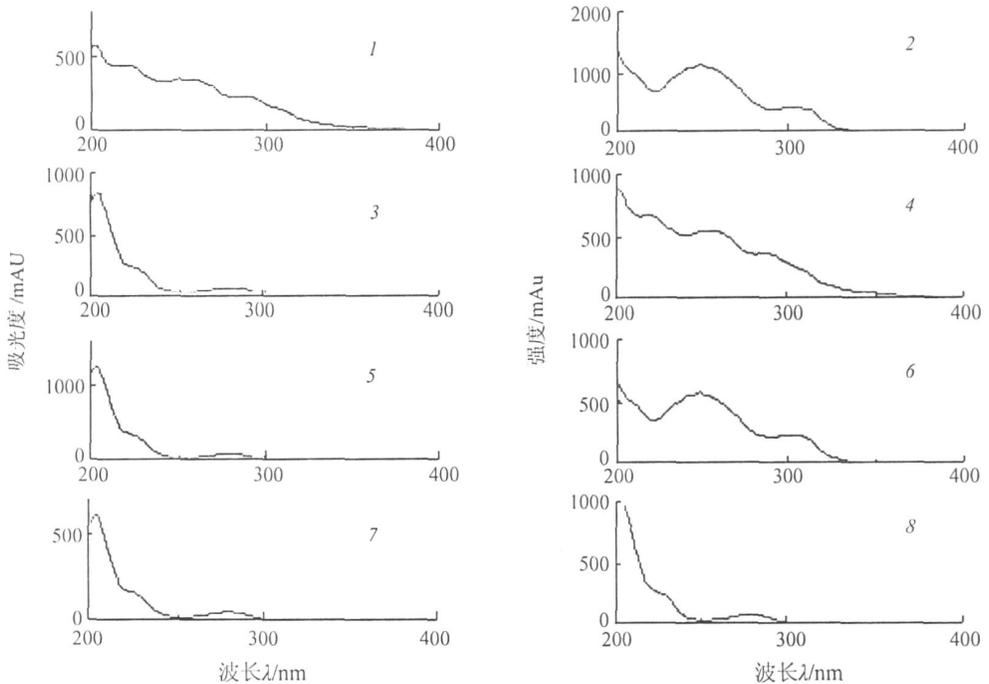


图 2 黄酮类化合物的紫外光谱图

### 3.3 指纹图谱的建立

主要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,但通过化学分离和计量学分辨很难把每个色谱指纹图谱的化学成分逐一定性,即使能够定性,但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,故有必要考察其整体性以评价各图谱的相似程度,而“中药色谱指纹图谱计算机辅助相似性评价系统(CA SE)”正是基于此而开发的<sup>[7]</sup>。图 3 是经软件处理所得的黄芪的黄酮类化合物共有模式指纹图谱,内蒙黄芪、河北黄芪、甘肃黄芪和西藏黄芪与特征指纹图谱(共有模式指纹图谱)的相似度分别为 0.9932, 0.9897, 0.9943 和 0.9847,表明不同产地同种药材间的相关性。

从指纹图谱的整体性看,它能够较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,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,还难于给出准确的定量分析,所以从这一角度来说中药色谱指纹图谱又是很模糊的。当然,最佳指纹图谱的建立,应以系统的化学成分和药理药效的定量关系研究为依托,还需要深入研究,现阶段指纹图谱的主要作用就是对药材以及中药制剂或相关产品进行真伪鉴别和质量评价。

## 4 结论

(1) 通过优化色谱分离条件,以乙腈、水和磷酸为流动相,采用梯度洗脱,建立了黄芪中黄酮类化合物色谱指纹图谱,用相关化学计量学方法和黄芪黄酮类化合物标准谱对照,定性鉴定出八个黄酮类化合物,分别是 7,3-二羟基-4-甲氧基异黄酮-7-O- $\beta$ D-葡萄糖甙、7-羟基-4-甲氧基异黄酮-7-O- $\beta$ D-葡萄糖甙、9,10-二甲氧基紫檀烷-3-O- $\beta$ D-葡萄糖甙、2-羟基-3,4-二甲氧基异黄酮-7-O- $\beta$ D-葡萄糖甙、7,3-二羟基-4-甲氧基异黄酮、7-羟基-4-甲氧基异黄酮、9,10-二甲氧基紫檀烷和 2-羟基-3,4-二甲氧基异黄酮。

(2) 用“中药色谱指纹图谱计算机辅助相似性评价系统(CA SE)”建立了黄芪中黄酮类化合物共有模式指纹图谱,内蒙黄芪、河北黄芪、甘肃黄芪和西藏黄芪与特征指纹图谱(共有模式指纹图谱)的相似度分别为 0.9932, 0.9897, 0.9943 和 0.9847,表明不同产地同种药材间的相关性。该方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。

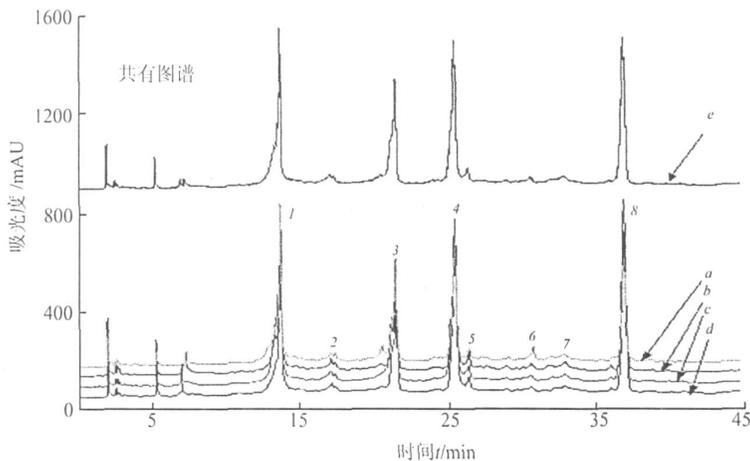


图 3 黄芪的黄酮类化合物共有模式指纹图谱

a——内蒙黄芪; b——河北黄芪; c——甘肃黄芪; d——西藏黄芪。

## 参考文献

- [1] 郑虎占, 董泽宏, 余靖主编 中药现代研究与应用[M]. 北京: 学院出版社, 1997, 3886
- [2] Hildebert W, Rudoff B, Xiao P G, Chen J M, Hans M. Huangqi[J]. *Chinese Drug Monography and Analysis*, 1997, 1(8): 1
- [3] 潘飞, 冯毓秀, 张颖 黄芪研究的概况[J]. 国外医学·植物学分册, 1995, 10(3): 110—114
- [4] 汪德清, 沈文梅, 田亚平 黄芪总黄酮对羟自由基所致哺乳动物细胞损伤的防护[J]. 中国中药杂志, 1996, 21(12): 746—748
- [5] M anne R, Shen H L, L iang Y Z Subwindow Factor Analysis[J]. *Chemom. Intell Lab Syst*, 1999, 45(1—2): 171—176
- [6] Shen H L, M anne R, Xu Q S *et al* Local Resolution of Hyphenated Chromatographic Data[J]. *Chemom. Intell Lab Syst*, 1999, 45(1—2): 323—330
- [7] 李博岩, 梁逸曾, 胡芸 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

## Study of Chromatographic Fingerprints of Flavonoids in Radix Astragali by HPLC-DAD Method

XIE Xian-Zhen HUANG Lan-Fang<sup>a</sup>

(Department of Medicine and Pharmaceutical, Changde Vocational Technical College, Changde 415000, P. R. China)

<sup>a</sup>(Department of Chemistry and Chemical Engineering, Xuzhou College, Xuzhou 324000, P. R. China)

**Abstract** High performance liquid chromatograph-diode array detection (HPLC-DAD) was applied to establish fingerprints of flavonoids in radix astragali. Qualitative analysis of flavonoids in radix astragali was completed by relative chemometric methods and standard UV spectral of flavonoids in radix astragali. Eight flavonoids were identified. Furthermore, reasonably chromatographic fingerprint of flavonoids in Radix Astragali from four different origins was established. The results showed the correlation among radix astragali from different origins. 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 of Traditional Chinese Medicines; Hyphenated Instrument; Radix Astragali; Flavonoid

## 关于赠送作者样刊和发放稿酬的通知

各有关作者:

从2007年第1期起,本刊赠送作者发表自己论文的当期刊物(样刊),均按篇赠送2本样刊,用普通印刷品邮寄给作者联系人,遗失不再补赠。若遗失或作者另有需要,请在发表之日起2个月之内汇款购买(第1期70元/本;其余40元/本,免收挂号邮寄费),逾期不再办理。

由于普通印刷品邮寄的送达时间不稳定,若作者急需,请预交特快专递费(30元/件)。

给作者发放的稿酬均邮寄给联系人,请各位联系人接到邮局通知后,务必及时到邮局领取。若2个月未领,被邮局退回,本刊不再补发。

特此通知

《光谱实验室》编辑部

汇款购买地址:北京市81信箱66分箱 刘建林,邮编:100095