

成;ATPS以酸性糖为主,含质量分数为33.02%半乳糖醛酸,中性糖部分主要由鼠李糖、阿拉伯糖和半乳糖组成。两种茶多糖相对分子质量均小于 3×10^4 ,溶解性较好,黏度不大。动物实验表明,NTPS、ATPS都能抑制四氧嘧啶糖尿病小鼠血糖的升高,具有降血糖功能,但两者表现出的剂量效应,给药后的质量变化均不相同,这可能与两者的单糖组成、已糖醛酸质量分数及其形成的空间结构、电荷效应不同有关,关于其降血糖的机制、多糖的构效靶点还得进一步研究。NTPS、ATPS的进一步分离和纯化、结构鉴定,多糖的构效关系的探讨正在进行中。

References:

- [1] Kishi T, Koshi M, Usui S, et al. Antidiabetic effect of an acidic polysaccharide (TAP) from *Tremella aurantia* and its degradation product [J]. *Biol Pharm Bull*, 2001, 24(12): 1400-1403.
- [2] Xu Z H, Zhou S W. Progress of plant polysaccharides and its hypoglycemic effects [J]. *West China J Pharm Sci* (华西药科学杂志), 2001, 16(5): 365-366.
- [3] Wu S Q, Li D Y. Research development of plant polysaccharides with hypoglycemic activity [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1992, 23(10): 549-554.
- [4] Isiguki K, Takakuwa T, Takeo T, et al. Anti-diabetics mellitus effect of water-soluble tea polysaccharide [A]. *The Organizing Committee of ISTS* [C]. Shizuka (Japan): 1992.
- [5] Tadakazu T, Tomoki U, Hitoshi K, et al. The chemical properties and functional effects of polysaccharides dissolved in green tea infusion [J]. *Nippon Shokuhin Kagaku Kaishi*, 1998, 45(4): 270-272.
- [6] Ryan E A, Imes S, Wallace C, et al. Herbal tea in the treatment of diabetes mellitus [J]. *Clin Invest Med*, 2000, 23(5): 311-317.
- [7] Chen H X, Xie B J. The preventive and curative effects on diabetic mice of tea polysaccharides [J]. *Nutr J* (营养学报), 2002, 24(1): 85-86.
- [8] Li B Q, Zhang H L. Extraction of tea polysaccharides from low-grade tea and their hypoglycemic effects [J]. *Tea Sci* (茶叶科学), 1996, 16(1): 67-72.
- [9] Wang Y F, Jun Z Y. Study on decolorizing of tea polysaccharides [J]. *Food Ferment Ind* (食品与发酵工业), 2004, 30(12): 61-66.
- [10] Zhang W J. *Biochemistry Research Technology of Glycoconjugates* (糖复合物生化研究技术) [M]. Hangzhou: Zhejiang University Publishing House, 1998.
- [11] Dai J, Lu J, Liu W Y, et al. HPGPC determination of molecular weights of polysaccharides components of *Siwei glossy ganoderma* [J]. *Chin J Pharm Anal* (药物分析杂志), 2003, 23(3): 204-206.
- [12] Zhejiang University Tea Research Institute. *Quality and Physico-chemistry Analyse of Tea* (茶叶品质理化分析) [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1989.
- [13] Wang J Z, Fan M. *Protein Technology Manual* (蛋白质技术手册) [M]. Beijing: Science and Technology Publishing House, 2002.

当归补血汤中组分的变化及归属分析

王亚丽^{1,2}, 梁逸曾^{1*}, 李博岩¹, 胡芸¹, 胡黔楠¹

(1. 中南大学 中药现代化研究中心, 湖南 长沙 410083; 2. 甘肃中医学院 科研中心, 甘肃 兰州 730000)

摘要:目的 利用HPLC-DAD提供的色谱和光谱信息,对相同实验条件下提取的当归补血汤及其单味药当归、黄芪的色谱指纹图谱流出组分进行对比分析,实现了当归补血汤与其单味药中各组分的归属分析。方法 结合光谱相关色谱方法,比较了复方与组成该复方的单味药中各组分的异同,实现了对组分的归属分析。结果 当归补血汤色谱指纹图谱中的18个色谱峰,10个组分来源于当归,11个组分来源于黄芪,其中5个组分为当归和黄芪的共有组分,2个组分为新物质。结论 本方法方便、快捷,可对中药复方及组成该复方的单味药成分的色谱指纹图谱进行快速比较分析。并为复方药理药效的比较研究奠定了基础。

关键词: 中药色谱指纹图谱; 当归补血汤; 光谱相关色谱; 归属分析

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2005)10-1457-04

Relative adscription of components between complex and single herb in Danggui Buxue Decoction

WANG Ya-li^{1,2}, LIANG Yi-zeng¹, LI Bo-yan¹, HU Yun¹, HU Qian-nan¹

(1. Research Center of Modernization of Chinese Herbal Medicines, Central South University, Changsha 410083, China;

收稿日期: 2005-01-12

基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目(20235020, 20175036); 甘肃省攻关课题(GS022-A43-138)

作者简介: 王亚丽(1963-), 女, 甘肃中医学院工作, 副教授, 中南大学在读博士研究生, 从事分析化学和中药现代化的教学及科研工作。

* 通讯作者 梁逸曾 Tel: (0731)8822841 Fax: (0731)8825637 E-mail: yizeng_liang@263.net

2. Research Center of Science and Technology, Gansu College of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China)

Key words: chromatographic fingerprints of Chinese materia medica; Danggui Buxue Decoction (DBD); spectral correlation chromatography; relative adscription analysis

中药材的组分十分复杂,虽然对其中的部分化学成分已有一定的研究,但大部分的化学成分还未知,要对所有组分进行一一定性分析几乎不可能。因此,在组分不完全清楚的条件下,怎样有效地对复方及其单味药的化学成分进行比较研究,找到两者在化学成分上的异同对中药复方的研究具有十分重要的意义。

中药色谱指纹图谱技术的提出和应用^[1,2]为解决这一问题提供了一个很好的方法。HPLC 或 GC 具有分离复杂样品的功能,因此成为建立中药化学特征指纹图谱的首选工具。用高效液相色谱-二极管阵列(HPLC-DAD)联用仪器,将色谱的分离能力和光谱的定性鉴定能力相结合,对相应化学组分进行双重定性,有可能解决此问题^[3,4]。本实验充分利用联用色谱提供的色谱、光谱信息,并结合光谱相关色谱方法^[5~7],对相同实验条件下提取的当归补血汤及其单味药的色谱图谱流出组分进行对比分析,为研究当归补血汤及其单味药中各组分的归属和变化提供理论依据。

1 理论部分

相同的化学物质具有相同的光谱或波谱。在相同的实验条件下,尽管所得的复方和单味药的色谱曲线中,相同组分的保留时间可能存在漂移,但它们的光谱(或质谱)应基本相同。基于复方和单味药两个不同的色谱曲线(指纹图谱),通过对所有不同流出时间点的光谱进行相关计算,可得一个类似色谱的光谱相关系数曲线,本实验称之为光谱相关色谱。即可方便判断出复方和单味药的相同组分和不同组分。

对任意两个物质纯光谱 s_i 和 s_j , 其相关系数可由下式计算。

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

式中 $-1 \leq r(i, j) \leq 1$, r 越大, 表示组分 i 的光谱 s_i 与组分 j 的光谱 s_j 越相似。当 $r=1$ 且保留时间相近时, 复方和单味药的色谱曲线中的两个组分应为同一化学物质。实际上, 由于噪声和测量误差等影响因素的存在, r 最大值不可能等于 1, 只能接近于 1。其中 $\| \cdot \|$ 表示 Frobenius 范数, 上角标 T 为向量的转置, $\bar{s}$ 表示光谱矢量的均值。

设某一样本化学色谱指纹图谱的某一组分纯物质的光谱为 s , 为得到相对另一色谱指纹图谱中该

物质的光谱相关色谱, 可通过对另一个样本的联用色谱指纹图谱所包含的所有光谱, 即其每一个保留时间点所对应的光谱, 记为 $x_j (j=1, 2, \dots, m)$, m 为最大色谱保留时间点, 来计算它们与该目标物质光谱的相似系数。这样, 所得到的将是相对于该目标纯物质的光谱相关色谱。在实际的运算中, 将式(1)改写为:

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

将相关系数 $r(s, x_j)$ 对色谱保留时间作图即得到该目标物质与这一样本色谱指纹图谱的光谱相关色谱曲线。如果目标物质存在于该样本中, 则相关色谱曲线在一定的区域内的光谱相关系数很接近 1, 它所对应的色谱流出组分与目标物质相关, 结合色谱保留时间信息, 从而实现在相同的实验条件下所得的色谱指纹图谱中单味药与复方目标物质的相对归属分析。

2 实验部分

2.1 仪器与试剂: 惠普 1100 系列高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司); G1315A 型地极管阵列检测器; 恒温水浴锅(W201B, 上海申生科技有限公司), 旋转蒸发器(AAAR-201 型, 上海申生科技有限公司), 循环水式真空泵[SHZ-D(Ⅱ), 巩义市英峪予华仪器厂]。当归 *Radix Angelica Sinensis* (RAS) 由甘肃岷县当归 GAP 实验园区提供, 黄芪 *Radix Astragali* (RA) 购自长沙九芝堂药店, 经湖南省中医药研究院中药研究所鉴定。甲醇为色谱纯(江苏汉邦科技有限公司), 乙醇为分析纯(湖南宁乡花明楼试剂厂), 水为二次去离子水, 其余试剂为分析纯。

2.2 供试品溶液的制备: 将生药当归、黄芪、当归补血汤(当归-黄芪 1:5)用天平各称取 6.0 g(过 40 目筛), 分别用 95%乙醇 150 mL 浸泡过夜。水浴回流提取 4 h, 滤过, 药渣中再加入 95%乙醇 50 mL 进行热回流提取 40 min, 两次滤液合并, 真空抽滤 2 次, 滤液在真空旋转蒸发器中(水浴 40 °C)浓缩至干, 移入 50 mL 量瓶中, 用甲醇定容后, 置于 4 °C 冰箱中保存。

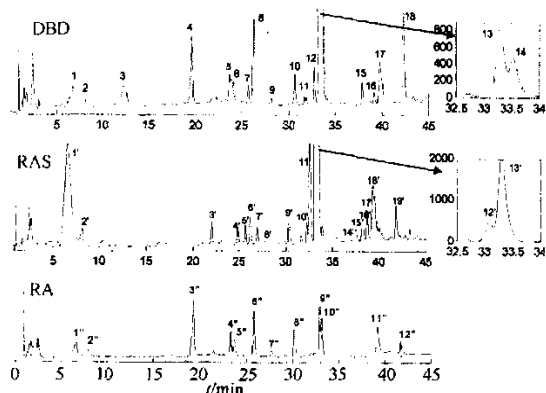
2.3 色谱检测条件: Hypersil ODS 柱(250 mm × 4.6 mm, 4.5 μm, Agilent 公司), 室温为 25 °C, 体积流量: 1.0 mL/min; 扫描波长范围: 190~400 nm, 扫

描时间间隔:0.402 s/次。色谱洗脱条件为:流动相组成为 A(H₂O),B(CH₃OH);洗脱剂 B 在 0~10 min 为 1%~25%,在 10~20 min 为 25%~50%,在 20~30 min 为 50%~70%,在 30~50 min 为 70%~90%。当归补血汤和黄芪供试品溶液的进样量为 20 μ L,当归为 10 μ L。

3 结果与讨论

当归补血汤是当归和黄芪按 1:5 的比例组成的复方,复方中的成分是单味药的简单加和,还是有新的组分生成,不能仅从色谱保留时间来判断,因为不同的中药,组成的物质群不同,即使色谱条件完全相同,其中相同的组分其色谱保留时间也会不同,可能有以下几种原因:第一,中药成分复杂,即使完全相同的组分,在不同的物质群中,由于组分之间的相互作用、组分与固定相之间的相互作用以及组分的浓度不同,导致色谱保留时间漂移;第二,由于仪器的系统误差及一些不可控实验因素的影响,导致色谱漂移。

现根据 HPLC-DAD 所得到的当归补血汤及其组成单味药当归和黄芪的色谱指纹图谱的色谱和光谱数据,并结合光谱相关色谱方法对复方及单味药的组分归属进行分析,图 1 为复方及单味药在 296 nm 处的色谱指纹图谱,现以图 1 中保留时间为 30~31 min 的色谱峰为例对复方及其组成单味药的组分进行归属分析。



DBD-当归补血汤 RAS-当归 RA-黄芪

DBD-Danggui Buxue Decoction RAS-Radix Angelica Sinensis

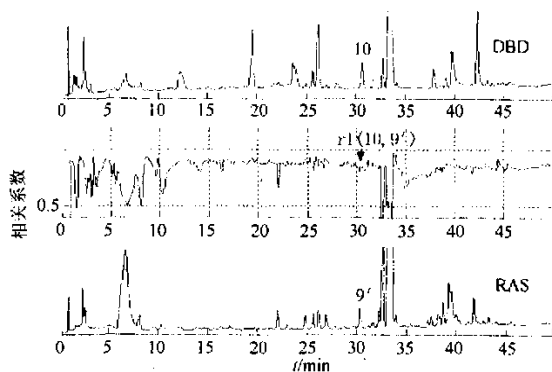
RA-Radix Astragali

图 1 当归补血汤复方、当归、黄芪在 296 nm 波长下的色谱指纹图谱

Fig. 1 Fingerprint of DBD, RAS, and RA at wavelength 296 nm

在图 1 中,30~31 min 保留时间段当归补血汤的色谱峰 10 与当归 9' 和黄芪 8'' 的色谱峰的保留时

间非常接近,为确定补血汤的色谱峰 10 对应的组分是来源于当归 9' 还是黄芪 8'', 首先,经色谱峰纯度检验^[7,8],确认补血汤的色谱峰 10 为纯组分,其光谱记为 s_{10} ,然后根据公式(2)分别计算当归和黄芪中的每一色谱保留时间对应的光谱与 s_{10} 的相关系数 r 。通过相关系数 r 对保留时间 t 作图,得到光谱相关色谱曲线(图 2 和图 3)。当归补血汤的色谱峰 10 对应于当归 9' 的组分和黄芪 8'' 的相关系数分别为 $r_1(10, 9') = 0.804 5$, $r_2(10, 8'') = 0.999 8$, 见(图 2 和 3)。说明黄芪色谱指纹图谱的组分 8'' 与当归补血汤的组分 10 的光谱十分相似,而当归组分 9' 与当归补血汤的组分 10 的光谱相关性差,最大点也只有 0.804 5,不可能为同一物质。这样,通过光谱相关色谱,找到了当归补血汤色谱指纹图中组分 10 在黄芪色谱指纹图谱中的对应组分 8'', 从而实现了复方与单味药的对应归属分析。值得提出的是,光谱是物质定性分析的重要依据,进一步比较组分 10、9' 和 8'' 的光谱曲线(图 4),组分 10 和 8'' 的光谱曲线极为相似,而组分 10 和 9' 的光谱相差较大,这进一步说明了当归补血汤的色谱峰 10 与黄芪的色谱峰 8'' 代表的是同一物质。



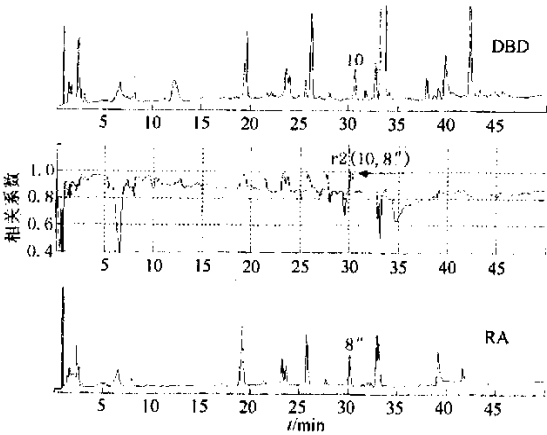
$r_1(10, 9')$ -组分 10 与 9' 的光谱相关系数

$r_1(10, 9')$ -Correlation coefficient of component 10 and 9'

图 2 当归补血汤复方与当归在 296 nm 波长下的色谱指纹图谱和当归补血汤组分 10 与当归各组分的光谱相关色谱曲线

Fig. 2 Fingerprint of DBD and RAS at wavelength 296 nm and correlative chromatogram of component 10 of DBD vs those of RAS

根据以上的分析方法,对复方当归补血汤色谱指纹图谱中的浓度较高的主要组分与单味当归和黄芪色谱指纹图谱中的组分进行了归属分析,分析结果见表 1。在图 1 标出的当归补血汤的 18 个色谱峰中,10 个组分来源于当归,11 个组分来源于黄芪,其



$r_2(10, 8'')$ -组分 10 与 8'' 的光谱相关系数
 $r_2(10, 8'')$ -Correlation coefficient of component 10 and 8''
图 3 当归补血汤复方与黄芪在 296 nm 波长下的色谱指纹图谱和当归补血汤组分 10 与黄芪各组分的光谱相关色谱曲线
Fig. 3 Fingerprint of DBD and RA at wavelength 296 nm and correlative chromatogram of component 10 in DBD vs those of RA

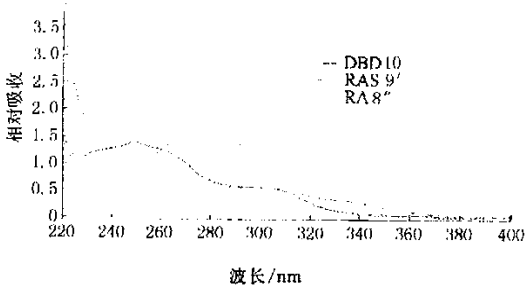


图 4 当归补血汤组分 10、当归组分 9'、
黄芪组分 8'' 的光谱曲线
Fig. 4 Spectral curve of component 10 in DBD, 9' in RAS, and 8'' in RA

表 1 当归补血汤、当归、黄芪各组分的归属分析结果

Table 1 Adsorption analysis of each component in DBD, RAS, and RA

峰标号/保留时间(min)			备 注
当归补血汤	当 归	黄 芪	
1/6.76		1"/6.60	
2/8.24	2'/8.10		
3/12.28			新物质
4/19.57		3"/19.27	
5/23.64		4"/23.30	
6/24.04	4'/24.80	5"/23.71	
7/25.64			新物质
8/26.20		6"/25.80	
9/28.10		7"/27.75	
10/30.65		8"/30.19	
11/31.77	10'/32.19		
12/32.72	11'/32.50		
13/33.28	12'/33.07	9"/32.93	
14/33.53	13'/33.30	10"/33.17	
15/37.88	15'/37.48		
16/39.10	17'/38.68		
17/39.75	18'/39.27	11"/39.17	
18/42.27	19'/41.73	12"/41.69	

References:

[1] Xie P S. *Chromatographic Fingerprinting of Traditional Chinese Medicine* (中药色谱指纹图谱研究) [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2005.
[2] Xie P S. A feasible strategy for applying chromatography fingerprint to assess quality of Chinese herbal medicine [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol* (中药新药与临床药理), 2001, 12(3): 141.
[3] Gong F, Liang Y Z, Xu Q S, et al. Gas chromatography-mass spectrometry and chemometric resolution applied to determination of essential oils in *Cortex Cinnamomi* [J]. *J Chromatogr A*, 2001, (909): 237-247.
[4] Li X N, Cui H, Song Y Q, et al. Analysis of the volatile fraction of *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. with GC/MS and chemometric resolution [J]. *Phytochem Anal*, 2003, 14 (1): 23-33.
[5] Li B Y, Hu Y, Liang Y Z, et al. Spectral correlative chromatography and its application to analysis of chromatographic fingerprints of herbal medicines [J]. *Sep Sci*, 2004, 27(7-8): 581-588.
[6] Liang Y Z, Kvalheim O M, White M R. Grey and black multicomponent systems-A classification of mixture problems and methods for their quantitative analysis [J]. *Chemometr Intell Lab Syst Lab*, 1993, 18: 235-250.
[7] Liang Y Z. *White, Gray and Black Multicomponent Systems and Their Chemometric Algorithms* (白灰黑复杂多组分分析体系及其化学计量学算法) [M]. Changsha: Hunan Science and Technology Publishing House, 1996.

中 5 个组分为当归和黄芪的共有组分, 2 个组分为新物质。
本实验利用联用色谱仪器并结合光谱相关色谱方法简便、快捷地对复方及组成其单味药的化学成分进行比较研究, 得到其组分归属。单味药组成复方后, 有新物质生成, 同时单味药中的一些组分在复方中检测不到或消失, 可能是在复方的组成中生成了其他物质。本研究为以后当归补血汤的药理药效研究奠定了基础。