

# 黄酮化合物色谱保留时间与其三维结构的关系研究<sup>\*</sup>

张燕玲 艾路 王耘 乔延江

(北京中医药大学中药学院 北京 100102)

**摘要:** 利用比较分子相似性指数分析 (CoMSIA) 方法, 结合黄酮类化合物含有较多羟基、易形成较强分子内氢键的特点, 建立了黄酮类化合物色谱保留时间与其三维结构的关系模型, 以探讨黄酮类化合物色谱保留时间预测的新方法。模型交叉验证相关系数  $q^2$  值为 0.705, 非交叉验证相关系数  $r^2$  为 0.981, 表明模型具有较好的预测能力。该研究结果对进一步开展黄酮类化合物液相色谱保留参数与三维结构关系的研究提供了思路和方法。

**关键词:** 液相色谱; 定量结构-保留相关关系 (QSRR); 比较分子相似性指数分析 (CoMSIA)

## Relationship Between 3D Quantitative Structure and Retention Parameters of Chromatography of Flavonoid

ZHANG Yan-ling, GUO Yi-ran, WANG Yun, et al

Beijing University of Chinese Medicine, Beijing, 100102

**ABSTRACT:** The retention time of liquid chromatography is one of the parameters which are important to study compound properties. The reversed phase HPLC retention time is able to represent the oil-water partition coefficient of a compound which is a significant guidance to predict the activity of the compound. The CoMSIA (Comparative Similarity Indices Analysis) method is applied to study the three-dimensional quantitative structure-retention relationship (QSRR) between the retention time of flavones on a reverse chromatographic column and the molecular characters of them. Most flavones have a characteristic component: hydroxyl, which is easy to form relatively strong intramolecular hydrogen bond that weakens the molecule polarity. So the electrostatic field energy, steric field energy of the compounds and also the field energy of hydrogen bond donor and acceptor have been taken account of in the CoMSIA molecule field computation. Then Partial Least Square (PLS) method is exploited to analyze the relationship between the fields and retention time, and finally a CoMSIA model is built. The cross-validated correlation coefficient  $q^2$  of the model is 0.705 and the non cross-validated correlation coefficient  $r^2$  is 0.981, so the predictive ability of the model is considerable. The results of this paper can be applied to direct the further study of the relationship between three-dimensional structure and retention time of liquid chromatography.

**Key Words:** Liquid chromatography; Quantitative Structure-Retention Relationship; Comparative Similarity Indices Analysis

## 1 引言

黄酮类化合物是广泛存在于自然界的一大类多酚类化合物, 类型多样, 是中药中重要的有效成分, 具有多方面的生物活性。对该类化合物的结构和性质关系的深入研究, 可以更好地了解黄酮类化合物的生物活性, 并推测代谢过程中结构修饰对活性的影响。

液相色谱保留时间是研究化合物性质的重要参数之一, 其中反相 HPLC 的保留时间可以代表化合物的油/水分配系数, 可用以预测化合物活性。定量结构-保留相关关系 (Quantitative Structure Retention Relationship, QSRR) 是对有机物的结构与色谱保留值之间的定量关系进行研究, 可以更加充分地利用样品的分析数据、样品保留行为解释色谱分离机制、预测保留值, 预测化合物的理化性质和生物活性<sup>[1]</sup>。

本文通过比较分子相似性指数分析 (Comparative Similarity

Indices Analysis, CoMSIA) 方法进行黄酮类化合物在反相色谱柱上保留时间与化合物结构分子特征之间的三维结构-保留定量相关关系的研究, 探讨了三维定量构效关系方法在黄酮类化合物组分保留时间预测中的应用, 建立了黄酮类化合物的 3D-QSRR 模型。

## 2 方法

### 2.1 化合物的选择

文献<sup>[2]</sup>报道了黄酮类化合物在反相 HPLC 色谱柱 (Dikama 钻石 ODS C<sub>18</sub> 色谱柱, 流动相组成: A(甲醇): B(0.15% 磷酸二氢钾 + 0.01mM 磷酸缓冲液), 流速为 1mL/min) 上的色谱保留时间 (见表 1)。本文以此为基础进行三维结构与保留时间相关性研究。任选其中三个分子为测试集, 其余为训练集, 用于模型计算。

\* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 30472180)

作者简介: 张燕玲, 女, 26 岁, 在读博士, 主要研究方向: 中药信息学

参加国家自然科学基金“973”重大课题, 国家博士后基金等 7 项, 已发表论文 8 篇

联系人简介: 乔延江, 教授, 博士生导师, 从事中药信息学研究, Tel: 010-64721271, E-mail: yjqiao@263.net

(收稿日期: 2006-02-13 接受日期: 2006-03-11)

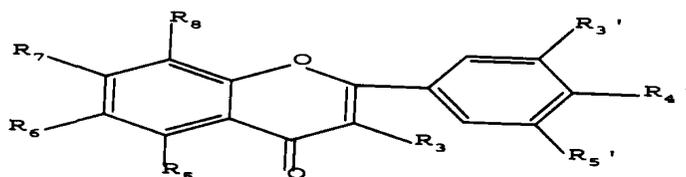


表1 黄酮化合物的结构与其在HPLC色谱柱上的色谱保留时间<sup>[2]</sup>

Table1. The structures and retention time of the compounds

Compound	R3	R5	R6	R7	R8	R2'	R3'	R4	Retention time
Chrysin	H	OH	H	OH	H		H	H	21.914
Apigenin	H	OH	H	OH	H		H	OH	10.960
Baicalein	H	OH	OH	OH	H		H	H	11.628
Scutellarein	H	OH	OH	OH	H		H	OH	6.091
Luteolin	H	OH	H	OH	H		OH	OH	7.891
Galangin	OH	OH	H	OH	H		H	H	24.061
Kaempferol	OH	OH	H	OH	H		H	OH	10.229
Quercetin	OH	OH	H	OH	H		OH	OH	6.801
Morin	OH	OH	H	OH	H	OH	H	OH	5.635
Wogonin	H	OH	H	OH	OCH <sub>3</sub>		H	H	18.77
Acacetin	H	OH	H	OH	H		H	OCH <sub>3</sub>	25.734
Kaempferide	OH	OH	H	OH	H		H	OCH <sub>3</sub>	27.487
Tamarixetin	OH	OH	H	OH	H		OH	OCH <sub>3</sub>	10.228
Tangeretin	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>		H	OCH <sub>3</sub>	30.909
Isovitexin	H	OH	Glc- c	OH	H		H	OH	3.489
Baicalin	H	OH	OH	A	H		H	H	5.256
DXG	H	OH	H	B	H		OH	OCH <sub>3</sub>	3.749
LG	H	OH	H	Glc- c	H		OH	OH	3.62
DG	H	OH	H	Glc-	H		OH	OCH <sub>3</sub>	3.747
Isoquercitrin	Glc-	OH	H	OH	H		OH	OH	3.913
Quercitrin	Rha-	OH	H	OH	H		OH	OH	4.568

Glc- c: glucose-

Glc- : glucose- O-

A: Glucuronic acid

B: xylopyranosyl- glc-

DXG: diosmetin- 7- O- β- D- xylopyranosyl- (1- 6)- β- D- glucopyranoside

LG: luteolin- 7- O- glucoside

DG: diosmetin- 7- O- β- glucopyranoside

## 2.2 计算方法

本文利用 CoMSIA 方法研究黄酮类化合物的定量结构-保留相关关系, CoMSIA 方法是在比较分子力场分析(Comparative Molecular Field Analysis, CoMFA)方法基础上发展起来的建立化合物结构与其性质之间相互关系的计算方法,对5类物化性质(立体场、静电场、疏水场、氢键给体场和氢键受体场)进行评价。由于能够对氢键给体场和氢键受体场进行分析,此方法较 CoMFA 方法更适用于含有较多氢键给体和氢键受体的分子模拟。CoMSIA 方法采用具有物化特性且与距离有关的高斯类型函数分别计算各力场能,避免了 CoMFA 方法中因定义分子表面附近网格点上能量阈值而造成的结果差异,从而更合理地揭示各力场分布与活性的相关性。

由于黄酮类化合物多含有羟基,易形成较强的分子内氢键,使分子极性减小。因此 CoMSIA 分子场计算时不仅考虑了化合物的静电场能、立体场能,同时还考虑了化合物的氢键给体和受体场能。

本文所有工作均在 SGI O2 工作站上,基于 Sybyl 6.6 分子模拟系统下完成,计算过程中若无特别指明,所用参数均为软件中的默认值。

### 2.2.1 构象分析和分子叠合

应用 Systematic Search 方法,以 10 度为间隔搜寻该类化合物的低能构象,并将最低能量构象默认为优势构象<sup>[3]</sup>(当多个构象同时具有最低能量时,选择出现概率最大的那个构象作为化合物可能的优势构象)。对已优化的该类化合物加载了 Gasteiger-Huckel 电荷<sup>[4]</sup>,用于 CoMSIA 模型计算。

所采用的叠合母核为黄酮分子骨架。对训练集分子进行分子叠合,用于化合物 CoMSIA 模型计算。

### 2.2.2 构效关系的建立

根据叠加结果,在叠合好的分子周围定义分子场的空间范围,在定义的空间中按照 0.02nm 的步长均匀划分格点;在每个格点上用探针离子(sp<sup>3</sup>杂化的碳原子,原子半径为 0.1nm,带一个正电荷)来评价格点上的分子场特征,在计算分子

中采用不同的分子场势能函数。

应用偏最小二乘(Partial Least Square, PLS)方法建立化合物的色谱保留时间和分子场特征之间的关系<sup>[5,6]</sup>。静电场能,立体场能,氢键给体场和受体场能的势能值,以及文献中测得的保留时间值都用于模型 PLS 计算。

### 3 实验结果

#### 3.1 分子叠合

化合物分子结构的叠合图见图 1。

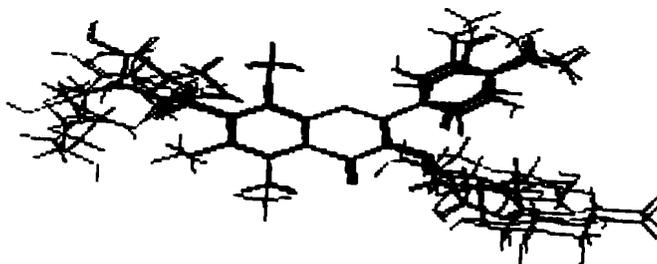


图 1 黄酮化合物分子叠合图

Fig. 1 The aligned compounds of flavones

#### 3.2 QSRR 模型建立

所建立的模型为立体场、静电场、氢键给体场及氢键受体场等势图形式,以便于分析、预测。如图 2 所示,左图为 CoMSIA 立体场和静电场等势图,右图为 CoMSIA 氢键给体场和氢键受体场等势图。

在立体场和静电场等势图中,绿色(Green)区域表示在该区域引入体积较大的基团将有利于提高化合物色谱保留时间,而黄色(Yellow)区域则表明该区域附近不宜引入体积较大

的取代基,否则会降低化合物的保留时间;红色(Red)区域表示引入负电性基团使化合物保留时间将提高,蓝色(Blue)区域则表示引入正电性基团有助于提高化合物保留时间。

在氢键给体场和氢键受体场等势图中,蓝绿色(Cyan)区域表示在该区域引入越多的氢键给体,越有利于提高化合物保留时间,红紫色(Magenta)区域表示在该区域引入越多的氢键受体,越有利于提高化合物保留时间。

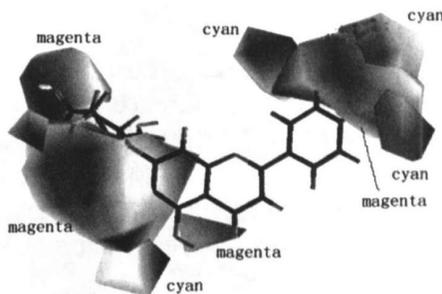
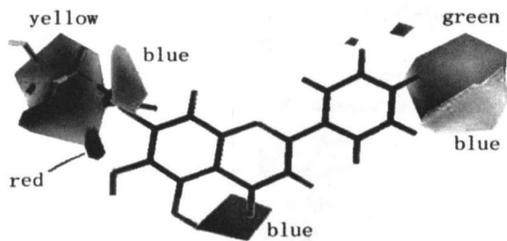


图 2 黄酮化合物 CoMFA 分子场等势图

Fig. 2 The contour plots of CoMFA of the flavones

模型中 PLS 计算中交叉验证方法结果如表 2。

表 2 CoMSIA 模型分析结果

Table 2 Results of CoMSIA analyses

$q^2$	$r^2$	F	Standard error
0.705	0.981	148.492	1.442

模型中分子场对所建结构-保留时间相关关系的贡献分别如表 3 所示。

表 3 分子场对构建模型的贡献

Table 3 contribute of molecular fields to model constructing

steric	electrostatic	hydrogen bond acceptor	hydrogen bond donor
0.106	0.264	0.200	0.430

模型对测试集分子的预测值与实验值见表 4,保留时间预测值与实验测定值的相关图见图 3。

表 4 CoMSIA 模型对测试集分子预测结果

Table 4 Results of CoMSIA analyses in testing sets

Test compound	Actual	Predicted	error
Isoquercitrin	3.913	3.70706	0.20594
baicalin	5.256	4.28807	0.96793
baicalein	11.628	12.4039	- 0.7759

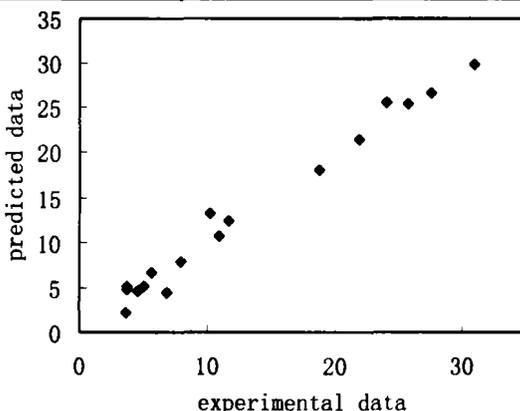


图 3 黄酮化合物实验值与模型预测值相关图

Fig. 3 Comparison of experimental with predicted value of the flavones

## 4 讨论

通常交叉验证相关系数  $q_2 > 0.5$  即表明由相应的变量所建立的模型具有较好的预测能力<sup>[7]</sup>, 本模型  $q_2$  值为 0.705, 表明该模型具有较好的预测能力。

从图 3 中可以看出: 在此 CoMSIA 模型中, 取代基处于 4 位时, 取代基体积越大, 正电性越大, 有利于提高化合物保留时间值; 取代基位于 7 位时, 取代基体积越小, 越则利于提高化合物保留时间值。取代基位于 4'、7 位时, 取代基正电性越大, 越有利于提高化合物保留时间。此外, 从表 3 中可以看出, 立体场的贡献比静电场的贡献大, 所以立体场对保留时间的影响程度比静电场要大。

例如化合物 DG 和化合物 LG, 前者 7 位取代基的体积比后者的小, 前者 4 位取代基体积及正电性皆比后者的大, 因此前者比后者保留时间较长。化合物 Acacetin 和化合物 Apigenin, 前者 4 位取代基为甲氧基, 比后者的 4 位取代基羟基正电性大, 因此前者比后者保留时间长。

氢键给体位于 3'、4'、6、7 位时, 有利于提高化合物保留时间。氢键受体位于 3'、4'、4、5、6、7 位时, 有利于提高化合物保留时间。黄酮化合物多含有羟基, 可以形成分子内氢键, 降低化合物极性, 延长化合物色谱保留时间。

## 5 结论

本文通过对黄酮类化合物在 HPLC 色谱柱上的保留时间和三维结构的 QSRR 研究, 结合黄酮类化合物富含羟基、易形成分子内氢键的特点, 建立了较好的三维结构-保留时间的 CoMSIA 模型, 探讨了黄酮化合物色谱保留时间预测的新方法。通过此实验, 可以指导对同类未知成分的保留时间进行预测, 并提供相关的结构类别信息, 为进一步通过 QSRR 方法指导同类化合物保留时间预测提供了依据。

(上接第 18 页)

药有效组分可能不透过血脑屏障却发挥良好的临床疗效。脑微血管内皮细胞是血脑屏障的主要基础结构, 是药物直接作用的靶细胞, 既是效应器, 又具有强大的分泌功能。药物是否直接改善内皮细胞功能而调节微血管机制, 或是通过内皮细胞介导而发挥影响神经细胞功能都亟待探知。首先以脑微血管内皮细胞为切入点, 探索药物对内皮细胞的作用机制, 进而研究内皮的分泌情况及其活性物质介导而影响神经细胞功能的作用机制, 阐明中药在可能不透过血脑屏障的情况下发挥疗效的另一作用途径, 无疑会为治疗脑系疾病的药物研究提供新思路。

### 参考文献

[1] Koo HJ, Lee S, Shin KH, Kim BC, Lim CJ, Par. Geniposide, an anti-angiogenic compound from the fruits of *Gardenia jasminoides*[J]. *Planta Med*, 2004, 70(5): 467- 469

### References

- [1] Kaliszan, Roman, Quantitative Structure- Retention Relationships, *Anal. Chem.*, 1992, 64(11): 619- 631
- [2] Tian Xiaojuan, Ph. D. Thesis, Peking University School of Pharmaceutical Sciences, 2005: 56- 57. [田晓娟. 北京大学药学院博士学位论文, 2005: 56- 57]
- [3] Gu Yan, Chen Minbo, Dong Xicheng, Chen Haifeng, Zeng Baoshan, Feng Chuanli, Yu Biao, Hui Yongzhen. 3D- QSAR Studies of Saponins. *Acta Chimica Sinica (化学学报)*, 2000, 58(12): 1534- 1539. [谷妍, 陈敏伯, 董喜城, 陈海峰, 曾宝珊, 冯传莉, 俞飙, 惠永正. 皂甙的三维定量构效关系研究. *化学学报 (Huaxue Xuebao)*, 2000, 58(12): 1534- 1539]
- [4] Zou Xiajuan, Lai Luhua, Jin Guiyu, Huang Guiqin. Studies on the 3D- QSAR of Nover 1- aryl- 1, 4- dihydro- 3- acylhydrazinocarbonyl- 6- methyl- 4- pyridazinones. *Acta Physico- Chimica Sinica*, 2002, 18(6): 513- 516. [邹霞娟, 来鲁华, 金桂玉, 黄桂琴. 新型含哒嗪酮基腈类化合物的 3D- QSAR 研究. *物理化学学报 (Wuli Huaxue Xuebao)*, 2002, 18(6): 513- 516]
- [5] Liu Zhongjie, Liu Shuqian. The Latest Research Development of Three Dimensional Quantitative Structure- activity Relationship. *Journal of HeBei University of Science and Technology*, 1999, 20(1): 17- 21. [刘仲杰, 刘叔倩. 三维定量构效关系最新研究进展. *河北科技大学学报 (Hebei Keji Daxue Xuebao)*, 1999, 20(1): 17- 21]
- [6] Hou Tingjun, Xu Xiaojie. Recent Progress in Comparative Molecular Field Analysis. *Progress in Chemistry*, 2001, 13(6): 436- 440. [侯廷军, 徐俊杰. 比较分子场分析方法研究的最新进展. *化学进展 (Huaxue Jinzhan)*, 2001, 13(6): 436- 440]
- [7] Wan Shengbiao, Yi Xiang, Guo Zongnu. Three Dimensional Quantitative Structure- Activity Relationship of Farnesyl Protein Transferase Inhibitors. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2001, 36(6): 423- 426. [万升标, 易翔, 郭宗儒. 1- 咪唑基苯并二氮杂卓类法呢基蛋白转移酶抑制剂的三维定量构效关系研究. *药学报 (Yaoxue Xuebao)*, 2001, 36(6): 423- 426]

- [2] Suzuki Y, Kondo K, Ikeda Y, Umemura K. Antithrombotic effect of geniposide and genipin in the mouse thrombosis model[J]. *Planta Med*, 2001, 67(9): 807- 810
- [3] Kuo WH, Wang CJ, Young SC, et al. Differential induction of the expression of GST subunits by geniposide in rat hepatocytes[J]. *Pharmacology*, 2004, 70(1): 15- 22
- [4] LeeMJ, HsuJD, WangCJ. Inhibition of 12- O- tetradecanoylphorbol- 13- acetate- caused tumor promotion in benzo[a] pyrene- initiated CD- 1 mouse skin by geniposide[J]. *Anticancer Res*, 1995, 15(2): 411- 416
- [5] 王根发, 王文安, 周永炜等. 三七皂苷对脑缺血对大鼠再灌注损伤的保护作用[J]. *中国临床康复*, 2002, (09), P42- 43
- [6] 高永红, 王永炎, 肖盛元等. 清开灵有效组分透过模拟血脑屏障的研究[J]. *北京中医药大学学报*, 2005, (02), P38- 40
- [7] 曹进, 徐燕, 张永知等. 清开灵注射液指标成分的体内样品分析[J]. *中医药学刊*, 2003, (11), P186- 187+ 190