



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 111751465 A

(43) 申请公布日 2020.10.09

(21) 申请号 202010581039.2

G01N 30/86 (2006.01)

(22) 申请日 2020.06.23

(71) 申请人 山东省中医药研究院

地址 250014 山东省济南市历下区燕子山
西路7号

(72) 发明人 周倩 戴衍朋 周蒙 蒋海强
化敏

(74) 专利代理机构 济南泉城专利商标事务所
37218

代理人 李桂存

(51) Int. Cl.

G01N 30/02 (2006.01)

G01N 30/06 (2006.01)

G01N 30/34 (2006.01)

G01N 30/72 (2006.01)

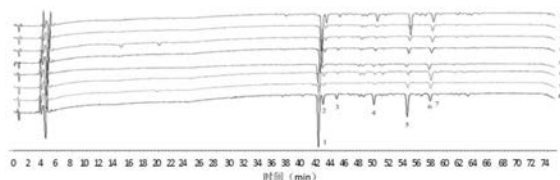
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

甘草抗氧化活性成分的快速定量筛选方法
及其应用

(57) 摘要

本发明涉及一种甘草抗氧化活性成分的快速定量筛选方法及其应用,属于中药质量评价和控制技术领域。针对现阶段甘草药效的质量控制存在的问题,利用其抗氧化活性,建立了其活性成分的快速筛选及各成分抗氧化活性的快速定量测定方法,该方法分析化学成分的同时,同时可快速筛查中药甘草中的抗氧化活性成分、并对各成分的抗氧化活性做出量化评价,研究优化了甘草的质量评价方法,实现了质量评价与药效关联,可更真实的反应饮片质量,研究也可为甘草抗氧化物质基础的研究提供一定的数据支持。



1. 一种甘草抗氧化活性成分的快速定量筛选方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 供试品溶液的制备:将干燥的甘草粉碎,过60目筛,加入甲醇,甘草与甲醇的比例为1g:20mL,超声处理,滤液过0.45 μm 微孔滤膜;

(2) Vc对照品溶液的制备:取 L(+)-抗坏血酸标准品,配置储备液,置4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,备用;

(3) HPLC-UV-DPPH在线系统:

HPLC系统色谱条件:4.6 \times 250 mm,5 μm 的 XDB-C₁₈色谱柱,柱温30 $^{\circ}\text{C}$;流动相乙腈(A)-0.2 %甲酸水溶液(B)梯度洗脱,检测器波长为254 nm;

柱后自由基分析系统色谱条件:流动相为DPPH-甲醇溶液,检测波长517 nm,柱后温度30 $^{\circ}\text{C}$;

(4) 质谱条件:流动相采用三通分流;电喷雾正离子模式;全扫描范围m/z 100~1000;毛细管电压4000 V;通入干燥气体,温度350 $^{\circ}\text{C}$;裂解电压300 V;锥孔电压65 V,雾化气压力30 psi;

(5) 得到甘草特征图谱,得到甘草抗氧化活性成分及各活性成分的抗氧化活性。

2. 根据权利要求1所述的快速定量筛选方法,其特征在于,所述的步骤(4)中梯度洗脱的条件为:0~10 min,15 %~25 %A;10~20.3 min,25%~30 %A;20.3~70 min,30%~70 %A;70~75 min,70%~15 %A。

3. 根据权利要求1所述的快速定量筛选方法,其特征在于,所述的步骤(3)中储备液的浓度为0.05mg \cdot mL⁻¹。

4. 采用权利要求1所述的快速定量筛选方法评价甘草质量的应用。

甘草抗氧化活性成分的快速定量筛选方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种甘草抗氧化活性成分的快速定量筛选方法及其应用,属于中药质量评价和控制技术领域。

背景技术

[0002] 甘草为豆科植物甘草 *Glycyrrhiza uralensis* Fisch.、胀果甘草 *Glycyrrhiza inflata* Bat. 或光果甘草 *Glycyrrhiza glabra* L. 的干燥根和根茎,主要分布于东北、华北、甘肃、新疆等地。甘草具有补脾益气,清热解毒,祛痰止咳,缓急止痛,调和诸药之功效,临床常用于脾胃虚弱,倦怠乏力,心悸气短,咳嗽痰多,脘腹、四肢挛急疼痛等症,同时可缓解药物毒性和烈性。现代药理学研究表明,甘草具有较强的抗氧化活性,其作为一种天然的抗氧化剂目前已在多个领域得到广泛应用。且其抗炎、杀菌、抗衰老等多种药理活性均与其抗氧化性活性密切相关。现已报道的甘草中抗氧化活性成分包括黄酮、多糖和三萜等多类化合物。

[0003] 目前对于甘草化学成分分析包括GC-MS、HPLC含量测定、HPLC指纹图谱和HPLC-MS技术等等,可以得到越来越丰富的成分信息,但是由于甘草药效物质基础尚不明确,其质量控制的指标成分往往与药效并无关联,因此指标成分含量高低并不能真正代表其质量优劣。

发明内容

[0004] 本发明针对现阶段甘草质量评价方法和评价指标与药效缺乏相关性的问题,利用其抗氧化活性,建立了活性成分的快速筛选方法,该方法分析化学成分的同时,同时可快速筛查甘草饮片中的抗氧化活性成分、并对各成分的抗氧化活性做出量化评价,研究优化了甘草的质量评价方法,实现了质量评价与药效关联,可更真实的反应饮片质量,研究也可为甘草抗氧化物质基础的研究提供一定的数据支持。

[0005] 一种甘草抗氧化活性成分的快速定量筛选方法,包括以下步骤:

(1) 供试品溶液的制备:将干燥的甘草饮片粉碎,过60目筛,加入甲醇,甘草与甲醇的比例为1g:20mL,超声处理,滤液过0.45 μm 微孔滤膜;

(2) Vc对照品溶液的制备:取 L(+)-抗坏血酸标准品,配置储备液,置4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,备用;

(3) HPLC-UV-DPPH在线系统:

HPLC系统色谱条件:4.6 \times 250 mm,5 μm 的 XDB-C₁₈色谱柱,柱温30 $^{\circ}\text{C}$;流动相乙腈(A)-0.2%甲酸水溶液(B)梯度洗脱,检测器波长为254 nm;

柱后自由基分析系统色谱条件:流动相为DPPH-甲醇溶液,检测波长517 nm,柱后温度30 $^{\circ}\text{C}$;

(4) 质谱条件:流动相采用三通分流;电喷雾正离子模式;全扫描范围m/z 100~1000;毛细管电压4000 V;通入干燥气体,温度350 $^{\circ}\text{C}$;裂解电压300 V;锥孔电压65 V,雾化气压

力30 psi;

(5) 得到甘草特征图谱,得到甘草抗氧化活性成分及各活性成分的抗氧化活性。

[0006] 所述的步骤(4)中梯度洗脱的条件为:0~10 min,15%~25%A;10~20.3 min,25%~30%A;20.3~70 min,30%~70%A;70~75 min,70%~15%A。

[0007] 所述的步骤(3)中储备液的浓度为 $0.05\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

[0008] 上述快速定量筛选方法用于甘草饮片质量的控制和评价。

[0009] 柱后分析系统得到的甘草效应图谱,可筛选得到甘草抗氧化活性成分(图谱中表现为倒峰);根据效应图谱各倒峰峰面积,可直观客观比较不同批次间甘草的抗氧化活性的差别;根据质谱信息,对抗氧化活性成分进行鉴别,可明确抗氧化活性成分组成;结合对照品Vc的峰面积、进样浓度和DPPH清除率,可同时计算各抗氧化活性成分的DPPH清除率。

[0010] 本发明的有益效果

1、快速检测出甘草的多种抗氧化活性成分

采用本发明的方法实现了对甘草饮片中抗氧化活性成分的快速筛选,结合HPLC-TOF/MS对筛选所获得抗氧化成分做出鉴别,明确甘草中7种抗氧化活性化合物,分别是阿佛洛莫生、8-异戊烯基柚皮素、黄羽扇豆魏特酮、半甘草异黄酮B、3',4'-Dimethoxy-3-hydroxy-6-methylflavone、甘草宁E及甘草宁H。

[0011] 2、建立了甘草及其炮制品炙甘草饮片化学成分和抗氧化活性相关联的二维图谱,一方面可得到丰富的化学成分信息(图2),并可同步筛选明确甘草中抗氧化活性成分(图3中的倒峰),由图3可见,8批甘草样品中上述7个抗氧化活性成分在其出现的对应时间将表现为倒峰,证明该方法可用于甘草抗氧化活性成分的筛选。在线效应图谱倒峰原理决定了倒峰面积与所检测样品的抗氧化性具有相关性(表2所检测不同批次甘草的DPPH清除率和图3检测的各批次甘草倒峰的峰面积呈正相关,可证明此观点),因此本方法可同时直观的对不同批次甘草饮片的抗氧化活性差异做出评价。

[0012] 3、以Vc作为对照,关联在线图谱的峰面积以及VC的DPPH清除率,根据甘草样品中各色谱峰峰面积, $C_{Vc}/A_{Vc}=C_{\text{待测成分}}/A_{\text{待测成分}}$,可计算得到所测甘草样品中各成分所相当的Vc的浓度,结合Vc在该浓度下的DPPH清除率,可分别换算得到该条件下检测到所有活性成分的DPPH清除率结果。

[0013] 4、本法省时省力,一次分析,可同时完成对甘草饮片中成分组成的分析,抗氧化活性成分的筛选、饮片整体抗氧化活性的评价,以及饮片中各活性成分的DPPH清除率的测定。在一定程度上克服了现有质量评价方法与药效不相关的问题。多批饮片检测结果表明,该方法稳定性好,可作为甘草新的质量评价方法进行推广应用。

附图说明

[0014] 图1为实施例1Vc抗氧化效应图谱;

图2为实施例1得到的甘草指纹图谱;

图3为实施例1得到的甘草抗氧化效应指纹图谱(1-7分别为阿佛洛莫生、8-异戊烯基柚皮素、黄羽扇豆魏特酮、半甘草异黄酮B、3',4'-Dimethoxy-3-hydroxy-6-methylflavone、甘草宁E及甘草宁H);

图4为实施例1甘草质谱总离子流图;

图5为对比例2测得的甘草HPLC图谱。

具体实施方式

[0015] 实施例1

供试品溶液的制备 取不同产地甘草样品粉末各0.75 g,精密称定重量,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇15 mL,密塞,超声处理30 min,滤过,滤液过0.45 μm微孔滤膜,置于4 °C冰箱中保存,备用。

[0016] DPPH溶液的制备 精密称定DPPH标准品,加甲醇至刻度,配置成浓度为80 μmol · L⁻¹的DPPH甲醇溶液,置于4 °C冰箱中保存待用。

[0017] Vc对照品溶液的制备:取 L(+)-抗坏血酸标准品适量,精密称定重量,加蒸馏水配置成浓度为0.05mg · mL⁻¹的储备液,置4°C冰箱保存,备用。

[0018] HPLC-UV-DPPH在线系统 色谱条件 HPLC系统色谱条件:Agilent Eclipse XDB-C₁₈ 色谱柱(4.6×250 mm,5μm),柱温30 °C,流速0.8 mL · min⁻¹,进样量10 μL。流动相乙腈(A)-0.2 %甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0~10 min,15 %~25 %A;10~20.3 min,25%~30 %A;20.3~70 min,30%~70 %A;70~75 min,70%~15 %A),检测器波长为254 nm。

[0019] 柱后自由基分析系统色谱条件:流动相为80 μmol · L⁻¹DPPH-甲醇溶液,0.8 mL · min⁻¹,检测波长517 nm,柱后温度30 °C。

[0020] 质谱条件:流动相采用三通分流至0.27 mL · min⁻¹;电喷雾正离子模式;全扫描范围m/z 100~1000;毛细管电压4000 V;干燥气体积流量8 L · min⁻¹,温度350 °C;裂解电压300 V;锥孔电压65 V,雾化气压力30 psi。

[0021] 利用ESI-TOF/MS系统自带的软件Qualitative Analyst B06.00分析软件对HPLC-TOF/MS 所得数据进行分析。通过对比分析甘草的紫外吸收光谱、在线图谱、质谱信息及化合物的保留时间、精确分子量,参考相关文献,共鉴别出活性物质7种。(图3中1-7号分别为阿佛洛莫生、8-异戊烯基柚皮素、黄羽扇豆魏特酮、半甘草异黄酮B、3',4'-Dimethoxy-3-hydroxy-6-methylflavone、甘草宁E及甘草宁H)

以甘草1为例,各成分的DPPH清除率计算结果见表1:

表1 生甘草7个抗氧化活性成分DPPH清除率测定结果

成分序号	生甘草	炙甘草
1	15.35%	13.88%
2	9.50%	9.63%
3	9.64%	6.51%
4	8.38%	5.71%
5	9.80%	9.32%
6	12.94%	10.99%
7	4.74%	1.51%

[0022] 对比例1

甘草饮片DPPH清除率

1 供试品溶液的制备

取甘草粉末(过60目筛)约0.25 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇25 mL,密塞,称定重量,超声处理(功率250W,频率40kHz)30 min,放冷,再称定重量,用甲醇补足减失的重量,摇匀,滤过,取续滤液,即得。

[0023] 2 DPPH溶液的制备

取DPPH标准品适量,精密称定,加甲醇制成每1 mL含DPPH 0.2663 μmol 的溶液,即得,置于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存待用。

[0024] 3 甘草溶液半抑制浓度的确定

取供试品溶液,将其稀释成溶度分别为10.00 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,2.00 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,1.00 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,0.80 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,0.40 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,0.20 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,0.10 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$,0.04 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的样品溶液,备用。分别取2 mL不同浓度的稀释液于EP管中,再加入2 mL $2.663 \times 10^{-1} \mu\text{mol} \cdot \text{mL}^{-1}$ DPPH \cdot 的甲醇溶液,摇匀后置于暗处反应30 min,使用酶标仪测量其在517 nm处吸光度为 A_i ;同时设置空白对照组 A_0 (甲醇溶液代替样品稀释液)及样品本底组 A_j (甲醇溶液代替DPPH \cdot 溶液),以上实验重复三次,求其平均值,计算DPPH \cdot 清除率及半抑制溶度(IC_{50})。按该方法测定在药物浓度($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)为10.00,2.00,1.00,0.80,0.40,0.20,0.10,0.04时的DPPH \cdot 清除率分别为98.38%,74.36%,62.55%,51.71%,50.95%,45.07%,44.88%,44.74%; $\text{IC}_{50}=0.00024 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

$$[0025] \quad \text{DPPH} \cdot \text{清除率}(\%) = \left(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}\right) \times 100\%。$$

[0026] 4 甘草DPPH \cdot 清除率测定

分别称取不同批次甘草约0.25 g,精密称定,置具塞锥形瓶中,精密加入25 mL甲醇溶液,密塞,超声处理30 min,放冷,滤过,取续滤液,备用。精密量取不同产地甘草药材提取液0.6 mL置25 mL量瓶中,加甲醇定容至刻度。按照“3”方法测定其在517 nm处的吸光度,依据所得的 IC_{50} 结果,计算对DPPH的清除率。

[0027] 表2 生、炙甘草DPPH清除率测定结果

序号	DPPH 清除率 (%)	序号	DPPH 清除率 (%)
1	56.47	5	58.83
2	57.40	6	58.32
3	59.88	7	55.71
4	58.13	8	60.17

对比例1方法,通过酶标仪测定不同批次甘草样品的DPPH清除率而对样品的抗氧化活性进行评价。该方法一方面操作过程较为繁琐,另外,该方法仅得到饮片总的抗氧化活性评价结果,无法明确甘草成分组成、抗氧化活性成分信息和各个活性成分的抗氧化活性情况。

[0028] 对比例2

供试品溶液的制备 将干燥的甘草饮片粉碎,过60目筛,取不同产地甘草样品各0.75 g,精密称定重量,置具塞锥形瓶中,精密加入甲醇15 mL,密塞,超声处理30 min,滤过,滤液

过0.45 μm 微孔滤膜,置于4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存,备用。

[0029] 色谱条件:Agilent Eclipse XDB-C₁₈色谱柱(4.6 \times 250 mm,5 μm),柱温30 $^{\circ}\text{C}$,流速0.8 mL \cdot min⁻¹,进样量10 μL 。流动相乙腈(A)-0.2 %甲酸水溶液(B)梯度洗脱(0~10 min, 15 %~25 %A;10~20.3 min,25%~30 %A;20.3~70 min,30%~70 %A;70~75 min,70%~15 %A),检测器波长为254 nm。检测结果见图5。

[0030] 对比例2 是采用HPLC指纹图谱方法对甘草饮片进行质量评价,该方法检测成分虽多,却无法明确哪些为是否为药效成分以及活性大小,不能克服现有质量评价方法与药效相关性不强的缺陷,也就无法真实评定饮片质量的好坏优劣。

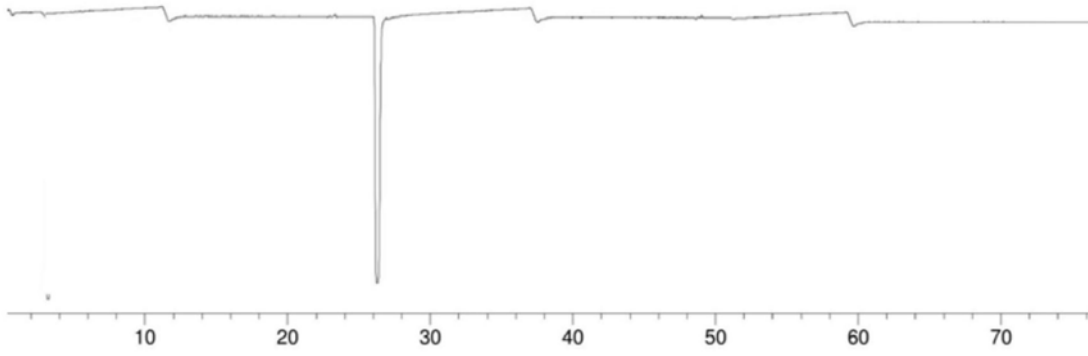


图1

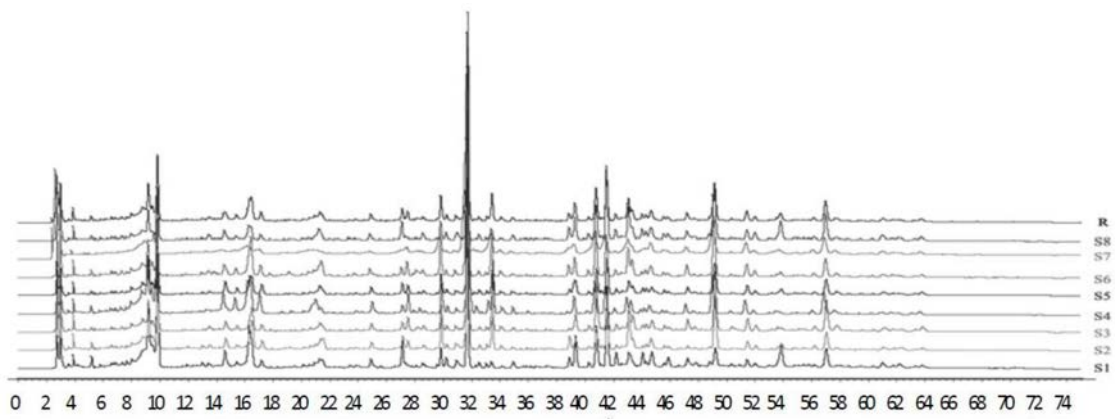


图2

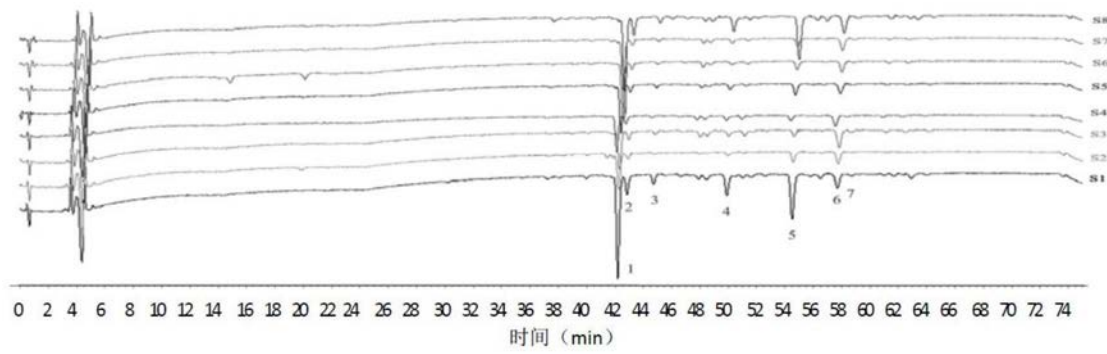


图3

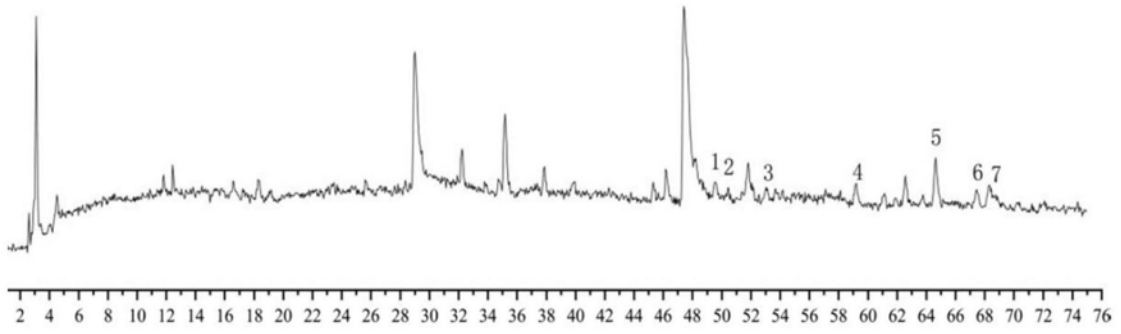


图4

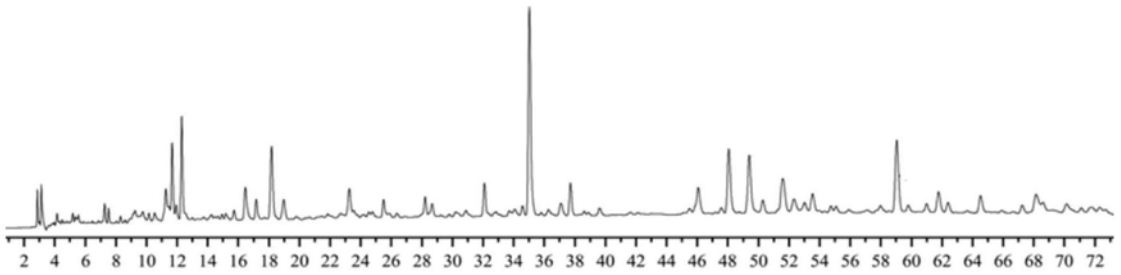


图5