

甘草饮片中抗氧化活性成分的快速筛选及鉴定^Δ

化敏^{1*},周倩^{2#},蒋海强¹,戴衍朋²,石典花²,王平²,张乐林²,周建永²(1.山东中医药大学药学院,济南250355;2.山东省中医药研究院,济南250014)

中图分类号 R932 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2021)02-0176-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2021.02.09

摘要 目的:建立在线检测甘草饮片中抗氧化活性成分的方法,并对其进行鉴定。方法:通过检测1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)清除率来评价甘草饮片的抗氧化活性;采用在线高效液相色谱-紫外-1,1-二苯基-2-三硝基苯肼法(HPLC-UV-DPPH)筛选甘草饮片中抗氧化活性成分;采用高效液相色谱-飞行时间高分辨质谱法(HPLC-TOF/MS)获取质谱数据并采用Qualitative Analyst B 06.00 Build 6.0.633.0软件进行分析,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,结合参考相关文献初步鉴定抗氧化活性成分,并进行验证。结果:8批甘草饮片的DPPH清除率为55.71%~60.17%,均可筛选出7种抗氧化活性成分,经鉴定分别为阿佛洛莫生、8-异戊烯基柚皮素、黄羽扇豆魏特酮、半甘草异黄酮B、3',4'-二甲氧基-3-羟基-6-甲基黄酮、甘草宁E和甘草宁H。经验证,在线反应产生的倒峰峰面积与饮片的DPPH清除率呈正相关。结论:所建方法简单、准确,可用于快速筛选并鉴定甘草饮片的抗氧化活性成分,倒峰峰面积可用于评价甘草饮片的抗氧化活性成分大小。

关键词 甘草;抗氧化活性成分;在线高效液相色谱-紫外-1,1-二苯基-2-三硝基苯肼法;高效液相色谱-飞行时间高分辨质谱法;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼;结构鉴定

Rapid Screening and Identification of Antioxidant Active Components in *Glycyrrhiza uralensis* Decoction Pieces

HUA Min¹, ZHOU Qian², JIANG Haiqiang¹, DAI Yanpeng², SHI Dianhua², WANG Ping², ZHANG Lelin², ZHOU Jianyong²(1. College of Pharmacy, Shandong University of TCM, Jinan 250355, China; 2. Shandong Academy of TCM, Jinan 250014, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To establish a method for online detection of antioxidant active components in *Glycyrrhiza uralensis* decoction pieces, and to identify it. METHODS: The free radical scavenging rate of 1, 1-diphenyl-2-trinitrobenzene hydrazine (DPPH) was determined to evaluate the antioxidant activity of *G. uralensis* decoction pieces. HPLC-UV-DPPH method was used to

- 配伍中的应用[J].中草药,2016,47(4):533-539.
- [18] 赖昌生,张蕙纓.苦味中药性能及功效特点分析[J].河南中医,2015,35(1):166-170.
- [19] 杨金禄,朱惠兰,李萍.社区卫生服务中心心脑血管疾病患者活血化瘀中成药应用现状分析[J].临床合理用药杂志,2020,13(4):18-19.
- [20] 高佳明,吕明,解微微,等.中医药心脑血管疾病同治的方剂用药规律分析[J].中国中药杂志,2019,44(1):193-198.
- [21] 郭会霞,王青,曾方兴,等.牛膝的临床应用及其用量[J].长春中医药大学学报,2020,36(1):26-28.
- [22] 段好磊.牛膝古今配伍应用规律研究[D].济南:山东中医药大学,2012.
- [23] 高卫辉,吴芬芬,段小青,等.杜仲-牛膝药对干预去卵巢骨质疏松大鼠雌二醇和骨密度的影响实验研究[J].中兽药,2016,14(8):820-823.
- [24] 孙凯,魏戎,朱立国,等.“杜仲-牛膝”药对治疗腰痛机制的网络药理学探讨[J].中药新药与临床药理,2019,30(8):935-942.
- [25] 蔡明财.基于“四时五脏阴阳”理论探讨温阳补肾法在新加坡的适用性[D].北京:北京中医药大学,2018.
- [26] 张俊锴,肖斌,许啸.独活寄生汤联合针刺治疗腰椎间盘突出症的临床效果[J].世界中医药,2020,15(7):1067-1070.
- [27] 肖强,郭子龙,许宁宁.加味独活寄生汤联合塞来昔布治疗膝骨性关节炎的效果[J].中国医药导报,2020,17(11):149-152.
- [28] 吴嘉玲.影响都市人群体质健康因素的关联性分析[C]//温莎:智能信息技术应用学会会议论文集,2016:5.
- (收稿日期:2020-09-30 修回日期:2020-12-16)
(编辑:邹丽娟)

^Δ 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81603299);山东省自然科学基金计划(No.ZR2013HQ029, No.ZR2020KH021);山东省重大科技创新工程项目(No.2018CXGC1310);山东省重点研发计划(No.2016GSF202004)

* 硕士研究生。研究方向:中药饮片质量评价及炮制规范化。电话:0531-82949803。E-mail:huamlkh@163.com

通信作者:副研究员,硕士生导师,博士。研究方向:中药饮片质量评价及炮制规范化。电话:0531-82949803。E-mail:zhouqian0126@126.com

screen the antioxidant active components of *G. uralensis* decoction pieces. HPLC-TOF/MS was used to obtain mass spectrum data and Qualitative Analyst B 06.00 Build 6.0.633.0 software was used to analyze data. Through contrast analysis of UV absorption spectrum, online chromatogram, mass spectrum information of *G. uralensis* and the retention time of each compound, accurate molecular weight, antioxidant active components were identified by referring to relevant literature. Validation test was also conducted. RESULTS: DPPH free radical scavenging rate in 8 batches of *G. uralensis* decoction pieces ranged 55.71% -60.17%. Seven antioxidative active compounds, including avolomotor, 8-isopentenyl naringin, yellow lupulin weitone, isoflavone B, 3', 4'-dimethoxy-3-hydroxy-6-methyl flavone, glycyrrhizin E and glycyrrhizin H, could be screened from *G. uralensis* decoction pieces. After validation, the peak area of inverted peak generated by online reaction was positively correlated with DPPH free radical scavenging rate. CONCLUSIONS: Established method is simple and accurate, and can be used to quickly screen and identify the main antioxidant components of *G. uralensis* decoction pieces; the peak area of inverted peak can be used to evaluate the antioxidant active components of *G. uralensis* decoction pieces.

KEYWORDS *Glycyrrhiza uralensis*; Antioxidant active component; Online HPLC-UV-DPPH; HPLC-TOF/MS; 1, 1-diphenyl-2-trinitrobenzene hydrazine; Structural identification

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,主要分布于我国东北、华北、甘肃、新疆等地^[1]。甘草具有补脾益气、清热解毒、祛痰止咳、缓急止痛、调和诸药的功效,除可用于治疗脾胃虚弱、倦怠乏力、心悸气短、咳嗽痰多、脘腹、四肢挛急疼痛等症外,还可用于缓解药物毒性和烈性^[2]。现代药理研究表明,甘草具有较强的抗氧化活性,其作为一种天然的抗氧化剂,已在食品、化妆品等多个领域中得到了广泛应用^[3-4];同时,甘草的抗炎、杀菌、抗衰老等药理活性均与其抗氧化性活性密切相关^[5-7],因此筛选甘草的抗氧化活性成分可为该药药效作用物质基础研究提供数据支持。

有研究发现,甘草中的抗氧化活性成分主要包括黄酮^[8]、多糖^[9]和三萜^[10]等多种化合物,但具体的抗氧化成分组成尚不明确。目前,甘草化学成分的研究方法主要有气质联用技术(GC-MS)、高效液相色谱法(HPLC)、HPLC指纹图谱和液质联用技术(LC-MS)等^[11-13],这些方法虽然可以得到丰富的化学成分信息,但均未明确成分与药效的关系,因此无法对甘草饮片的质量和药效进行评价。

随着科学技术的进步,中药活性成分辨识技术得到了一定的发展,形成了以药物基本特性为基础的色谱分离和在线监测技术^[14-15]。自由基是指物质分子在光或热等外界条件影响下因共价键均裂所形成的含有不成对电子的原子、分子或基团。生物体内自由基的产生和清除及氧化损伤与心血管疾病的发生发展密切相关^[16]。1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)是一种常见的自由基,常用来监测物质的抗氧化活性^[17-18]。鉴于此,本研究采用高效液相色谱-紫外-1, 1-二苯基-2-三硝基苯肼法(HPLC-UV-DPPH)对甘草提取物清除DPPH的活性进行在线检测和评价,以快速筛选甘草饮片中的抗氧化活性成分;同时,结合高效液相色谱-飞行时间高分辨质谱法(HPLC-TOF/MS)对筛选出的抗氧化活性成分进行初

步鉴定,旨在为甘草抗氧化物质基础的研究提供依据。

1 材料

1.1 仪器

Agilent 1260型HPLC仪(含在线脱气机、四元泵、自动进样器、柱温箱)和Agilent 6230 TOF LC/MS型四级杆飞行时间质谱仪(含电喷雾离子源、Mass Hunter Data Acquisition B.06.01在线工作站、Qualitative Analysis B 06.00 Build 6.0.633.0离线分析软件)均购自美国Agilent公司;ACQUITY H-Class型HPLC仪(包括四元溶剂管理器、样品管理器、二极管阵列检测器、Empower 7.20.00.00色谱工作站)购自美国Waters公司;xMark型酶标仪购自南京德铁实验设备有限公司;XS205DU型万分之一电子天平购自瑞士Mettler Toledo公司;KQ-300VED型三频数控超声波清洗器购自昆山市超声仪器有限公司;DHG-9146型电热恒温鼓风干燥箱购自上海精宏实验设备有限公司。

1.2 药品与试剂

实验用药品和试剂有:DPPH标准品(合肥博美生物科技有限公司,批号464RB,纯度 $\geq 97\%$)等;乙腈为色谱纯,甲醇、甲酸、无水乙醇、石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯、正丁醇等为分析纯,水为超纯水。

8批甘草饮片(编号S1~S8)经山东省中医药研究院孙立立研究员鉴定为豆科植物甘草 *G. uralensis* Fisch.的干燥根和根茎,样本保存于本实验室,其来源信息见表1。

表1 8批甘草饮片样品来源信息

Tab 1 Sample source information of 8 batches of *G. uralensis* decoction pieces

编号	产地	来源	批号
S1	甘肃	甘肃中天金丹药业有限公司	1805012
S2	甘肃	亳州中强中药饮片有限公司	180601
S3	甘肃	上海梅家坞茶业有限公司	180903
S4	内蒙	北京同仁堂(安国)中药饮片有限责任公司	1807052
S5	内蒙	河北凯达药业有限公司	20180801
S6	山西	成都市齐安堂商贸有限公司	181002
S7	内蒙	济南历山药店	1901005
S8	新疆	济南海洲药房	180501

2 方法与结果

2.1 甘草饮片 DPPH 清除率的检测

2.1.1 供试品溶液的制备 取甘草饮片(编号 S6),粉碎,过 60 目筛,取约 0.25 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,精密加入甲醇 25 mL,密塞,称定质量,超声(功率 250 W,频率 40 kHz,下同)处理 30 min,放冷,再次称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,取续滤液,即得。

2.1.2 DPPH 甲醇溶液的制备 取 DPPH 标准品适量,精密称定,加甲醇制成浓度为 0.266 3 μmol/mL 的 DPPH 甲醇溶液,置于 4 °C 冰箱中保存,备用。

2.1.3 半数抑制浓度(IC₅₀)的测定 取“2.1.1”项下供试品溶液适量,加甲醇稀释,制成质量浓度分别为 10.00、2.00、1.00、0.80、0.40、0.20、0.10、0.04 mg/mL(以生药量计)的样品溶液。分别取上述不同质量浓度的样品溶液 2 mL,置于 EP 管中,加入“2.1.2”项下 DPPH 甲醇溶液 2 mL,摇匀,置于暗处反应 30 min,使用酶标仪于 517 nm 波长处测定样品溶液与 DPPH 甲醇溶液混合液的吸光度(A_i);同时,测定空白对照溶液(甲醇)的吸光度(A₀)、样品溶液与甲醇混合液(等体积混合,于暗处反应 30 min)的吸光度(A_j),每样品重复测定 3 次,求平均值,计算 DPPH 清除率和 IC₅₀。DPPH 清除率(%) = $(1 - \frac{A_i - A_j}{A_0}) \times 100\%$ ^[19]。结果,上述各质量浓度供试品溶液的 DPPH 清除率分别为 98.38%、74.36%、62.55%、51.71%、50.95%、45.07%、44.88%、44.74%, IC₅₀ 为 0.24 mg/mL。

2.1.4 甘草饮片 DPPH 清除率的检测 按“2.1.3”项下 IC₅₀ 结果,分别称取 8 批甘草饮片粉末,约 0.25 g,精密称定,按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液,精密量取 0.6 mL,置于 25 mL 量瓶中,加甲醇定容,按“2.1.3”项下方法测定吸光度并计算 DPPH 清除率,结果见表 2。由表 2 可知,8 批甘草饮片的 DPPH 清除率为 55.71%~60.17%,其中 S8 样品的 DPPH 清除率最高,S7 样品最低。

表 2 甘草饮片的 DPPH 清除率结果

Tab 2 DPPH free radical scavenging rate of *G. uralensis* decoction pieces

编号	清除率, %	编号	清除率, %
S1	56.47	S5	58.83
S2	57.40	S6	58.32
S3	59.88	S7	55.71
S4	58.13	S8	60.17

2.2 甘草抗氧化活性成分的筛选与鉴定

2.2.1 供试品溶液的制备 取甘草饮片粉碎,过 60 目筛,取约 0.75 g,精密称定,置于具塞锥形瓶中,加甲醇 15 mL,密塞,超声处理 30 min,放冷,再次称定质量,用甲醇补足减失的质量,摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过,

取续滤液,置于 4 °C 冰箱中保存,备用。

2.2.2 DPPH 甲醇溶液的制备 按“2.1.2”项下方法制备浓度为 80 μmol/L 的 DPPH 甲醇溶液,置于 4 °C 冰箱中保存,备用。

2.2.3 HPLC-UV-DPPH 的色谱条件 以 Agilent Eclipse XDB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) 为色谱柱;以乙腈(A)-0.2% 甲酸水溶液(B)为流动相,梯度洗脱(0~10 min, 15% A→25% A; 10~20.3 min, 25% A→30% A; 20.3~70 min, 30% A→70% A; 70~75 min, 70% A→15% A);检测波长为 254 nm;柱温为 30 °C;流速为 0.8 mL/min;进样量为 10 μL。柱后自由基分析系统的流动相为 80 μmol/L DPPH 甲醇溶液;流速为 0.8 mL/min;检测波长为 517 nm;柱后温度为 30 °C。

2.2.4 HPLC-TOF/MS 的色谱与质谱条件 以 Agilent Eclipse XDB-C₁₈(250 mm×4.6 mm, 5 μm) 为色谱柱;以乙腈(A)-0.2% 甲酸水溶液(B)为流动相,梯度洗脱(0~10 min, 15% A→25% A; 10~20.3 min, 25% A→30% A; 20.3~70 min, 30% A→70% A; 70~75 min, 70% A→15% A);检测波长为 254 nm;柱温为 30 °C;流速为 0.8 mL/min;进样量为 2 μL。质谱条件为三通分流至 0.27 mL/min;离子源为电喷雾离子源;离子模式为正离子模式;全扫描范围为 *m/z* 100~1 000;毛细管电压为 4 000 V;干燥气体积流量为 8 L/min;温度为 350 °C;裂解电压为 300 V;锥孔电压为 65 V;雾化气压力为 30 psi。

2.2.5 数据分析 采用 Qualitative Analyst B 06.00 Build 6.0.633.0 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,同时参考相关文献^[20-25],对可能存在抗氧化活性的成分进行鉴定。

2.2.6 抗氧化活性成分的检测与鉴定结果 取“2.2.1”项下供试品溶液适量,按“2.2.3”“2.2.4”项下条件进样分析,记录色谱图。结果,甘草饮片在线鉴别出 7 种抗氧化活性成分,经鉴定分别为阿佛洛莫生、8-异戊烯基柚皮素、黄羽扇豆魏特酮、半甘草异黄酮 B、3', 4'-二甲氧基-3-羟基-6-甲基黄酮、甘草宁 E、甘草宁 H。甘草饮片的高效液相色谱图见图 1(图中,峰 1~7 分别对应上述化合物,后图同),DPPH 自由基在线图谱见图 2,甘草饮片的总离子流图见图 3,甘草饮片质谱图所对应的色谱图见图 4,其抗氧化活性成分的结构式见图 5,其质谱鉴定结果见表 3。

2.3 裂解规律及特征分析

化合物 1:保留时间为 49.542 min(以图 4 为例,下同),在正离子模式下出现准分子离子峰 *m/z* 299.092 6 [M+H]⁺,推断可能的分子式为 C₁₇H₁₄O₅。进一步进行碎片扫描,发现主要碎片 *m/z* 284.332 2,推测可能为准分子离子脱掉 1 分子 CH₃ 所得;同时,还存在 *m/z* 132.101 5

[C₉H₈O]的中性分子以及 m/z 136.112 2 的[M+H- OCH₃-C₉H₈O]⁺的碎片离子。根据以上信息并参考相关文献^[20-21],推测该化合物为阿佛洛莫生。

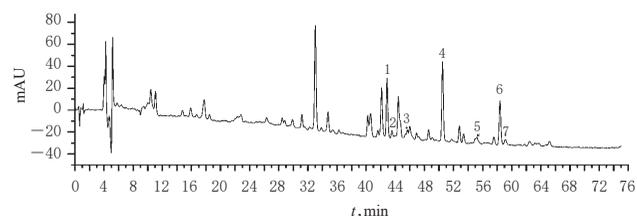


图1 甘草饮片的高效液相色谱图(编号S1)

Fig 1 HPLC chromatogram of *G. uralensis* decoction pieces

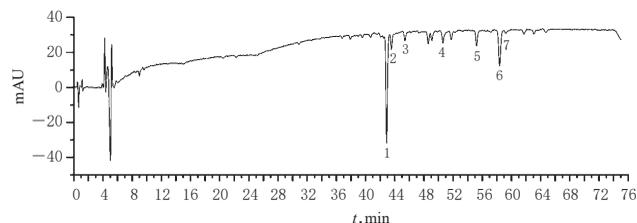


图2 DPPH自由基在线图谱(编号S1)

Fig 2 Online chromatogram of DPPH free radical scavenging

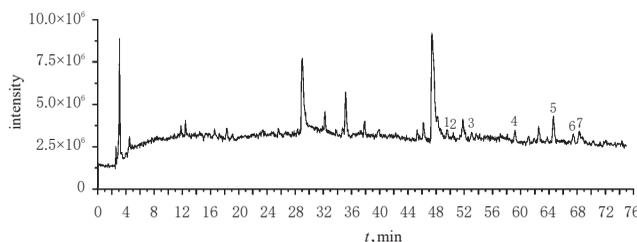


图3 甘草饮片的总离子流图(编号S1)

Fig 3 Total ion flow diagram of *G. uralensis* decoction pieces

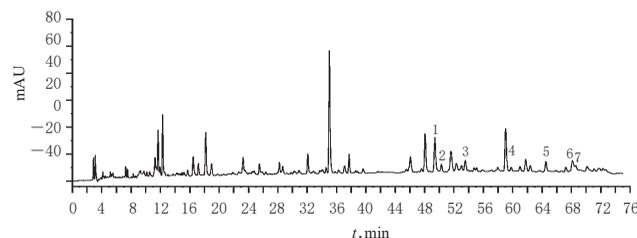


图4 甘草饮片质谱图所对应的色谱图(编号S1)

Fig 4 Chromatogram of *G. uralensis* decoction pieces by mass spectrometry

化合物2:保留时间为50.450 min,在正离子模式下出现准分子离子峰 m/z 341.139 5[M+H]⁺,推断可能的分子式为C₂₀H₂₀O₅。进一步进行碎片扫描,发现主要碎片 m/z 285.076 1,推测可能为准分子离子通过质谱裂解丢失 m/z 56.013 1的碎片峰,提示有异戊烯基结构存在。根据以上信息并参考相关文献^[21-22],推测该化合物为8-异戊烯基柚皮素。

化合物3:保留时间为53.173 min,在正离子模式下

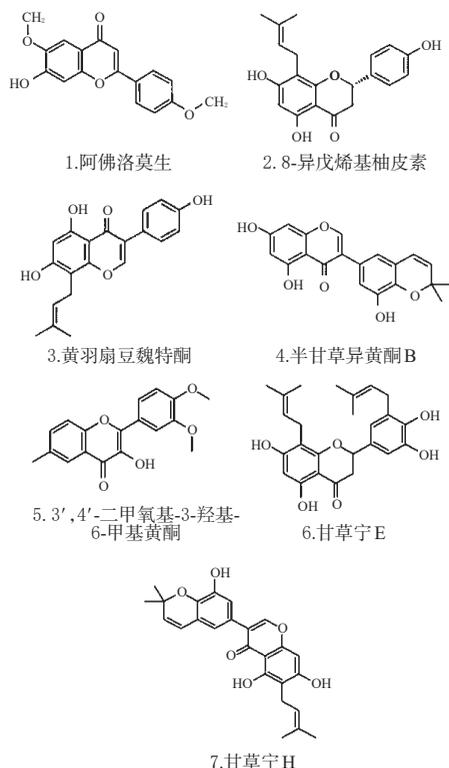


图5 甘草饮片中抗氧化活性成分的结构式

Fig 5 Structural formula of antioxidant active components in *G. uralensis* decoction pieces

表3 甘草饮片中7种抗氧化活性成分的质谱鉴定结果

Tab 3 Mass spectrum identification results of 7 antioxidant active components in *G. uralensis* decoction pieces

成分	保留时间, min	[M+H] ⁺	分子式	相对分子质量	碎片离子	化合物归属
1	49.542	299.092 6	C ₁₇ H ₁₄ O ₅	298.084 1	284.332 2, 136.112 2, 132.101 5	阿佛洛莫生 ^[20-21]
2	50.450	341.139 5	C ₂₀ H ₂₀ O ₅	340.110 3	285.076 1	8-异戊烯基柚皮素 ^[21-22]
3	53.173	339.124 5	C ₂₀ H ₁₈ O ₅	338.115 4	147.090 0, 119.082 7	黄羽扇豆魏特酮 ^[23]
4	59.224	353.104 8	C ₂₀ H ₁₆ O ₆	352.094 7	375.082 7, 257.570 8	半甘草异黄酮B ^[24]
5	64.620	313.105 8	C ₁₈ H ₁₆ O ₅	312.099 8	270.315 0	3',4'-二甲氧基-3-羟基-6-甲基黄酮 ^[25]
6	67.494	425.196 8	C ₂₃ H ₂₀ O ₆	424.188 6	407.184 4, 369.167 6, 313.106 5	甘草宁E ^[25]
7	68.755	421.163 9	C ₂₃ H ₂₀ O ₆	420.157 3	365.101 0	甘草宁H ^[21-22]

出现准分子离子峰 m/z 339.124 5[M+H]⁺,推测可能的分子式为C₂₀H₁₈O₅。进一步进行碎片扫描,发现主要碎片离子 m/z 147.090 0[M+H-C₁₁H₁₂O₃]⁺及 m/z 119.082 7[M+H-C₁₂H₁₂O₄]⁺。根据以上信息并参考相关文献^[23],同时结合化合物极性,推测该化合物为黄羽扇豆魏特酮。

化合物4:保留时间为59.224 min,在正离子模式下出现准分子离子峰 m/z 353.104 8[M+H]⁺、 m/z 375.082 7[M+Na]⁺,推测可能的分子式为C₂₀H₁₆O₆。进一步进行碎片扫描,发现主要碎片 m/z 257.570 8[M+H-C₃O-CO]⁺。根据以上信息并参考相关文献^[24],同时结合裂解规律,推测该化合物为半甘草异黄酮B。

化合物5:保留时间为64.620 min,在正离子模式下出现准分子离子峰 m/z 313.105 8[M+H]⁺,推测可能的分

子式为 $C_{18}H_{16}O_5$ 。进一步进行碎片扫描,发现主要碎片离子 m/z 270.315 0 为准分子离子失去甲基后又失去CO中性分子所得。根据以上信息并参考相关文献^[25],同时结合化合物极性,推测该化合物可能为3',4'-二甲氧基-3-羟基-6-甲基黄酮。

化合物6:保留时间为67.494 min,在正离子模式下出现准分子离子峰 m/z 425.196 8[M+H]⁺,推测可能的分子式为 $C_{25}H_{28}O_6$ 。进一步进行碎片扫描,发现准分子离子失去1分子H₂O产生碎片离子 m/z 407.184 4,同时存在碎片离子 m/z 369.167 6和 m/z 313.106 5,判断可能有两个异戊烯基。根据以上信息并参考相关文献^[23],推测该化合物为甘草宁E。

化合物7:保留时间为68.755 min,在正离子模式下出现准分子离子峰 m/z 421.163 9[M+H]⁺,推测可能的分子式为 $C_{25}H_{24}O_6$ 。进一步进行碎片扫描,发现在 m/z 365.101 0处出现碎片离子,提示可能含有异戊烯基或准分子离子失去两分子CO所致,结合文献^[22]可知[M+H-2CO]⁻为异黄酮的特征离子峰。根据以上信息并参考相关文献^[21-22],推测该化合物为甘草宁H。

2.4 抗氧化活性成分检测方法的验证

取8批甘草饮片,按“2.2.1”项下方法制备供试品溶液,再按“2.2.3”项下条件进样分析,采用《中药色谱指纹图谱相似度评价系统(2012版)》生成8批甘草饮片的HPLC叠加特征图谱。结果,8批甘草饮片均可检测出7种抗氧化活性成分。同时,结合表2中不同产地甘草饮片的DPPH清除率结果,发现在线反应产生的倒峰峰面积与饮片的DPPH清除率呈正相关,提示可用倒峰峰面积初步评价抗氧化活性成分的大小,详见图6、图7、表4。

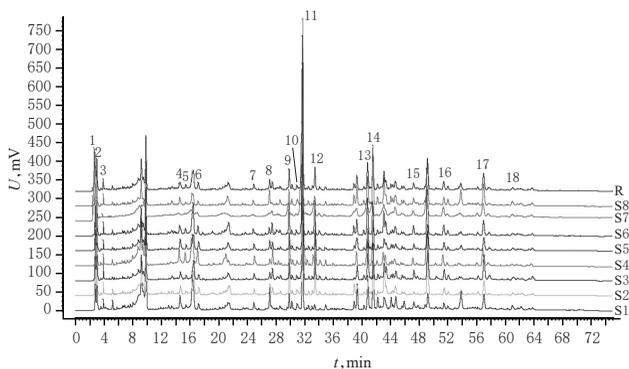


图6 8批甘草饮片的HPLC叠加特征图谱

Fig 6 HPLC superimposed characteristic chromatograms of 8 batches of *G. uralensis* decoction pieces

3 讨论

在中药现代化研究领域,抗氧化中药的研究占重要地位,已有针对清热类、补益类中药等抗氧化活性的系列研究报道^[26-28],以及对中药中所含抗氧化活性成分的研究^[29]。甘草作为临床应用较广泛的中药之一,具

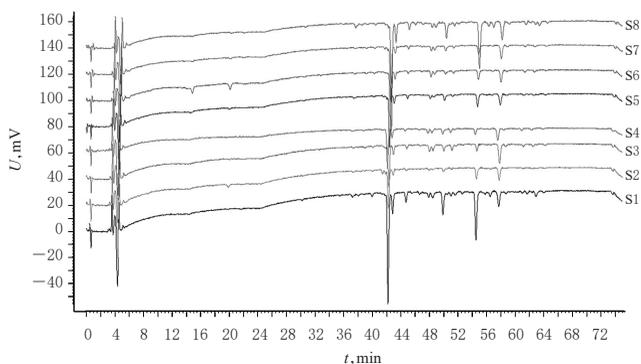


图7 DPPH自由基在线叠加图谱

Fig 7 DPPH free radical scavenging online superimposed chromatograms

表4 DPPH清除率与在线叠加图谱倒峰峰面积

Tab 4 DPPH free radical scavenging rate and peak area of inverted peak by online superimposed chromatogram

编号	DPPH清除率, %	倒峰峰面积	编号	DPPH清除率, %	倒峰峰面积
S1	56.47	1 080.680 7	S5	58.83	1 194.762 9
S2	57.40	1 086.539 5	S6	58.32	1 209.884 6
S3	59.88	2 669.642 6	S7	55.71	943.357 7
S4	58.13	1 167.146 4	S8	60.17	2 732.242 4

有抗氧化活性,且多种药理活性与抗氧化活性密切相关^[16,30]。目前,关于甘草抗氧化活性的研究较少,也尚无甘草抗氧化活性成分的相关研究。中药的质量控制需以药效成分的辨识和确认为基础,只有科学合理的药效成分研究才是保证中药安全有效的前提^[31]。因此,本研究以提升饮片质量标准为目标,借助“中药活性成分色谱辨识”技术,建立了甘草饮片的HPLC-UV-DPPH在线检测方法,以用于甘草抗氧化活性成分的快速筛选。结果,甘草饮片中共筛选出7种抗氧化活性成分,经HPLC-TOF/MS法鉴定分别为阿佛洛莫生、8-异戊烯基柚皮素、黄羽扇豆魏特酮、半甘草异黄酮B、3',4'-二甲氧基-3-羟基-6-甲基黄酮、甘草宁E和甘草宁H。其中,阿佛洛莫生、8-异戊烯基柚皮素和半甘草异黄酮B已有抗氧化活性的相关报道^[32-34],而黄羽扇豆魏特酮、3',4'-二甲氧基-3-羟基-6-甲基黄酮、甘草宁E和甘草宁H未见报道。DPPH是一种稳定的以氮为中心的自由基,在517 nm波长处具有特征吸收,以DPPH甲醇溶液为流动相,在517 nm波长下可得到平整的基线;当样品中存在可与自由基反应的成分时,其可与DPPH反应,通过DPPH中的单电子配对而使其吸收逐渐消失,在色谱图上表现为负峰,利用该原理可进行抗氧化活性成分的在线筛选。本研究中的8批甘草饮片的7种抗氧化活性成分在其出现的对应时间处均表现为倒峰,且倒峰的峰面积与甘草饮片的DPPH清除率呈正相关,提示可通过比较倒峰峰面积来评价甘草饮片的抗氧化活性。

综上所述,所建方法简单、准确,可用于快速筛选并鉴定甘草饮片的抗氧化活性成分,倒峰峰面积可用于评

价甘草饮片的抗氧化活性成分大小,为进一步完善甘草饮片质量评价标准和抗氧化物质基础研究提供了数据支持。

参考文献

[1] 高晓娟,赵丹,赵建军,等.甘草的本草考证[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(2):193-198.

[2] 张耀峰.甘草及其活性成分的药理活性研究进展[J].中医临床研究,2019,11(9):141-142.

[3] 赵翮,陈复生,李红良.甘草中天然抗氧化剂的提取工艺研究[J].食品科技,2003(2):50-52.

[4] 曹思瑶.基于天然药物-甘草有效成分的功能性化妆品的研制[D].长春:长春中医药大学,2019.

[5] 李松.甘草酸对人胶质瘤U251细胞的作用及其机制的研究[D].广州:南方医科大学,2014.

[6] 赵凡凡.甘草对D-gal诱导的大鼠抗衰老作用及基于牛磺酸通路的靶标代谢组学研究[D].太原:山西大学,2018.

[7] 张泽生,史坤,杨超慧,等.甘草多糖免疫调节作用的研究[J].现代生物医学进展,2008,8(10):1835-1837.

[8] 贾世亮,武雪玲,李筱筱,等.甘草中黄酮类物质的功能研究进展[J].北京联合大学学报,2016,30(4):67-73.

[9] ZHANG CH, YU Y, LIANG YZ, et al. Purification, partial characterization and antioxidant activity of polysaccharides from *Glycyrrhiza uralensis*[J]. *Int J Biol Macromol*, 2015. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2015.05.060.

[10] 杨豆,张卫波.甘草化学成分及药理作用研究[J].湖南饲料,2017(3):21-23.

[11] 周倩,王亮,戴衍朋,等.基于GC-MS分析蜜炙对甘草中挥发性成分的影响[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(17):87-90.

[12] 张浩.HPLC法测定甘草中甘草苷和甘草酸含量[J/OL].临床医药文献电子杂志,2020,7(48):10、21.

[13] 周燕,王明奎,廖循,等.甘草化学成分的高效液相色谱-串联质谱分析[J].分析化学,2004,32(2):174-178.

[14] 裴世春,朱俊义,夏广清,等.刺拐棒天然成分的抗氧化活性[J].食品工业,2019,40(3):172-175.

[15] 赵康宏,严思恩,何英杰,等. HPLC-Q-TOF-MS法分析百合中酚类化合物[J].中成药,2019,41(6):1445-1450.

[16] 张玉锦,洪小茜.活性氧与心血管疾病关系的研究[J].医学综述,2002,8(4):212-213.

[17] 李向荣.抗氧化剂和自由基与血清白蛋白相互作用的微量热和谱学研究[D].新乡:河南师范大学,2014.

[18] 胡晓慧,代向东,李来来,等.生甘草与炙甘草的抗氧化能力比较研究[J].天津中医药大学学报,2016,35(2):114-117.

[19] 郭振宇,张毅,张正锋,等.星点设计-响应面法优化川党参产地加工炮制一体化工艺研究[J].中药新药与临床药理,2019,30(11):1385-1390.

[20] 丁丽娜,邱亦亦,束彤,等.超高效液相色谱-质谱联用技术解析沙棘果超临界CO₂萃取物中黄酮类天然产物结构[J].食品科学,2019,40(18):273-280.

[21] 王艳萍,薛兴亚,张秀莉,等. HPLC/ESI-MS法鉴定半枝莲乙酸乙酯组分中黄酮苷元类化合物[J].质谱学报,2009,30(3):129-138.

[22] 高昊.异戊烯基黄酮电喷雾多级质谱研究[C]//中国有机质谱学第十二届全国学术大会论文集.北京:中国质谱学会,2003:45-46.

[23] 周卿意骏,卿志星,蔡萍,等.基于HPLC-Q-TOF-MS/MS技术的银黄清肺胶囊体外物质基础研究[J].中草药,2016,47(20):3586-3593.

[24] 张宁,高霞,周宇,等. UPLC-Q-TOF-MS/MS快速分析杏贝止咳颗粒化学成分[J].中国中药杂志,2018,43(22):4439-4449.

[25] 郑国帅,赵鑫,范国荣.黄酮醇糖苷及其结构类似物的质谱裂解规律研究[J].药学服务与研究,2015,15(3):196-200.

[26] 郭晶.基于抗氧化活性的厚朴有效组分的研究[D].上海:华东理工大学,2012.

[27] 邢冬梅,刘洁丽,邓淑芳,等.当归挥发油抗氧化谱效关系研究[J].化学世界,2020,61(4):280-286.

[28] 余刘勤,贾爱梅,宋永砚.柴胡皂苷抗炎、抗氧化和降脂研究进展[J].中国动脉硬化杂志,2020,28(1):87-92.

[29] 段宙位,李维国,窦志浩,等.沉香叶黄酮类化合物的提取及其抗氧化活性[J].食品科学,2015,36(6):45-50.

[30] 邢燕,历飞,林大勇,等.甘草次酸通过PI3K-AKT途径抑制H₂O₂所致大鼠心肌细胞氧化损伤[J].现代生物医学进展,2018,18(6):1044-1049.

[31] 李想,李冀.甘草提取物活性成分药理作用研究进展[J].江苏中医药,2019,51(5):81-86.

[32] 孙备.膜荚黄芪根中的抗氧化成分[J].国外医学(中医中药分册),1998,20(4):54.

[33] 李隽,崔承彬,蔡兵,等.啤酒花黄酮的研究进展[J].中草药,2008,39(7):1110-1114.

[34] 赵森铭,李慧晓,张志超,等.甘草水提后药渣的化学成分及抗氧化活性研究[J].广东药科大学学报,2019,35(5):614-618.

(收稿日期:2020-09-16 修回日期:2020-12-06)

(编辑:陈宏)

《中国药房》杂志——中国科技论文统计源期刊,欢迎投稿、订阅