

新胃乃安片中4种异黄酮成分的同时鉴别及抗氧化活性的初步筛选

梁小银, 严 萍, 詹若挺, 陈蔚文

(广州中医药大学中药资源科学与工程研究中心、岭南中药资源教育部重点实验室(广州中医药大学)、国家中成药技术研究中心南药研发实验室, 广东 广州, 510006)

[摘要] 目的: 建立新胃乃安片中芒柄花素、毛蕊异黄酮、芒柄花苷及毛蕊异黄酮苷4种异黄酮成分的同时鉴别方法, 并对其抗氧化活性进行初步筛选研究。方法: 采用薄层色谱-生物自显影技术, 以甲苯-乙酸乙酯-甲醇(20:20:9)为展开剂对上述4种成分进行分离鉴别, 以清除2,2-二苯基-1-苦肟基(DPPH)自由基能力对鉴定成分进行抗氧化活性筛选。结果: 薄层色谱特征明显, 在同一薄层板上能同时鉴别芒柄花素、毛蕊异黄酮、芒柄花苷及毛蕊异黄酮苷4种成分, 其中筛选出毛蕊异黄酮和毛蕊异黄酮苷具有清除DPPH自由基的活性。结论: 建立的方法操作简单, 重现性好, 可为新胃乃安片的质量控制及药效物质研究奠定基础。

[关键词] 新胃乃安片; 芒柄花素; 毛蕊异黄酮; 芒柄花苷; 毛蕊异黄酮苷; 实验研究

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **DOI:** 10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2018.07.080

Simultaneous identification of four isoflavones in Xinweinaian tablets and preliminary screening for antioxidant activities

LIANG Xiao-yin, YAN Ping, ZHAN Ruo-ting, CHEN Wei-wen

(Ministry of Education Key Laboratory of Chinese Medicinal Resource from Lingnan, Research Center of Chinese Herbal Resource Science and Engineering & Joint Laboratory of National Engineering Research Center for the Pharmaceutics of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, Guangdong, China)

Abstract: Objective: To investigate the method for the simultaneous identification of formononetin, calycosin, ononin, and calycosin-7-glucoside in Xinweinaian tablets and perform preliminary screening for antioxidant activities. Methods: With toluene-ethyl acetate-methanol(20:20:9) as the developing solvent, thin-layer chromatography-bioautography was performed for the isolation and identification of these four constituents, and their antioxidant activities were screened based on the ability to scavenge free radicals of 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl-hydrate(DPPH). Results: There were significant features on thin-layer chromatography, and the simultaneous identification of formononetin, calycosin, ononin, and calycosin-7-glucoside was realized on the same thin-layer plate. Calycosin and calycosin-7-glucoside were found to have the activity to scavenge DPPH free radicals. Conclusion: The method established is simple and has good repeatability, and therefore, it lays a foundation for the quality control of Xinweinaian tablets and studies on effective constituents.

Key words: Xinweinaian tablet; formononetin; calycosin; ononin; calycosin-7-glucoside; experimental study

新胃乃安片主要由黄芪、红参、三七、人工牛黄等组成, 是胃乃安胶囊二次开发的新剂型, 具有补气健脾、活血止痛的功效, 主要用于胃及十二指肠溃疡、慢性胃炎等消化道黏膜损伤性疾病^[1-2]。方中黄芪为君药, 在整个制剂药疗效中发挥着重要的作用, 异黄酮类成分是其药效成分之一, 有关研究表明黄芪异黄酮类成分具有抗氧化、清除自由基的作用^[3-4]。目前对黄芪异黄酮类成分的质量控制主要以芒

柄花素、毛蕊异黄酮、芒柄花苷及毛蕊异黄酮苷等4种成分的研究居多, 但大多数是以含量测定为主^[5-6], 而对这4种成分同时进行薄层鉴别的研究较少^[7]。本文以芒柄花素、毛蕊异黄酮、芒柄花苷及毛蕊异黄酮苷为研究对象, 建立一套有效的同时鉴别这4种成分的薄层鉴别方法, 为新胃乃安片及更多含有黄芪的制剂的质量控制提供参考, 并在其基础上采用薄层生物自显影技术, 以DPPH自由基为显色剂,

基金项目: 粤港关键领域重点突破招标项目(编号: GDDRC2007ZY002)

第一作者: 梁小银, 女, 医学硕士, 主管中药师, 研究方向: 现代创新中药开发与研究

通讯作者: 严萍, 女, 副研究员, 硕士研究生导师, 研究方向: 中药质量评价与研究, E-mail: ycyyp22@163.com

初步筛选新胃乃安片中具有抗氧化活性的成分, 为该制剂的药效物质研究奠定基础。

1 仪器与材料

TLC 色谱数码成像系统(瑞士 CAMAG); KQ-700DE 型超声波清洗器(功率 700W, 频率 40KHz, 昆山市超声仪器有限公司); 自制薄层板(硅胶 GF254, 青岛海洋化工厂分厂生产, 厚度为 0.5mm); Merck 预制板(硅胶 GF254, 德国默克公司生产); 青岛预制板(硅胶 GF254, 青岛海洋化工厂分厂生产); 烟台预制板(硅胶 GF254, 硅胶 GF254, 烟台市化学工业研究所生产)。甲醇、2,2-二苯基-1-苦肟基自由基(DPPH)等试剂均为分析纯。黄芪对照药材(膜荚黄芪, 批号: 121462-201003), 来源于中国药品生物制品检定所; 芒柄花素对照品(批号: 100525, 含量 > 98%), 毛蕊异黄酮对照品(批号: 100618, 含量 > 98%), 芒柄花苷对照品(批号: 110930, 含量 > 98%), 毛蕊异黄酮苷对照品(批号: 111007, 含量 > 98%), 以上对照物质均来源于上海融禾医药科技发展有限公司。新胃乃安片中试样品(共 3 批: 20101002、20110301、20110302)与黄芪阴性样品均由广州白云山中一药业有限公司生产。

2 方法与结果

2.1 4种异黄酮成分 TLC 定性鉴别 取研细的供试品 2g, 加 50mL 甲醇超声(功率 280W, 频率 40kHz) 30min, 滤过, 滤液蒸干, 残渣加 20mL 水溶解, 用乙酸乙酯振摇提取 3 次, 每次 30mL, 合并乙酸乙酯液, 水浴蒸干, 加 1mL 甲醇溶解, 即得供试品溶液。取黄芪对照药材 2g, 加 50mL 甲醇, 同供试品溶液制备方法制备, 残渣加 0.5mL 甲醇溶解, 作为黄芪对照药材溶液。另取芒柄花素、毛蕊异黄酮、芒柄花苷及毛蕊异黄酮苷对照品各 1mg, 分别加甲醇制成浓度为 1mg/mL 的溶液, 作为对照品溶液。再取相当量的黄芪阴性样品, 同供试品溶液制备方法制得黄芪阴性对照溶液。照薄层色谱法(《中国药典》2015 版第四部 0502) 试验, 吸取上述供试品、对照药材及阴性对照溶液各 8 μ L、对照品溶液各 2 μ L, 分别点于同一硅胶 GF254 薄层板上, 以展开剂甲苯-乙酸乙酯-甲醇(20:20:9)展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯(254nm)下检视。结果见图 1。3 批供试品色谱在与对照药材和对照品色谱相应的位置上, 显相同颜色的荧光斑点, 黄芪阴性对照均无干扰。

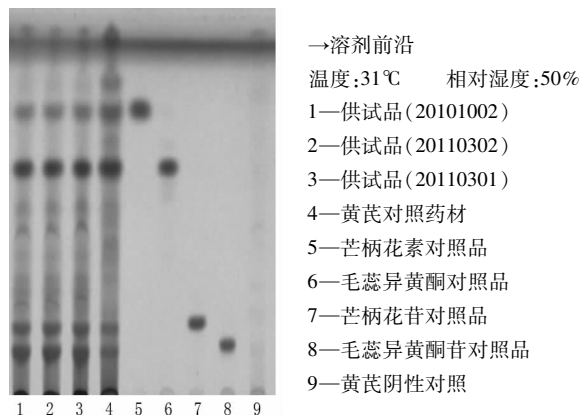


图1 新胃乃安片中4种异黄酮类成分的薄层色谱鉴别图

2.2 薄层色谱生物自显影——抗氧化活性的筛选 在“2.1 的色谱条件下展开, 取出, 晾干, 置紫外光灯(254nm)下检视”后, 喷以 0.1% DPPH 无水乙醇显色, 在日光下检视, 结果见图 2。供试品色谱在与对照药材、毛蕊异黄酮及毛蕊异黄酮苷对照品色谱对应的位置上, 显清晰的相同黄色斑点, 而在芒柄花素和芒柄花苷对照品色谱对应的位置上均无显黄色斑点。

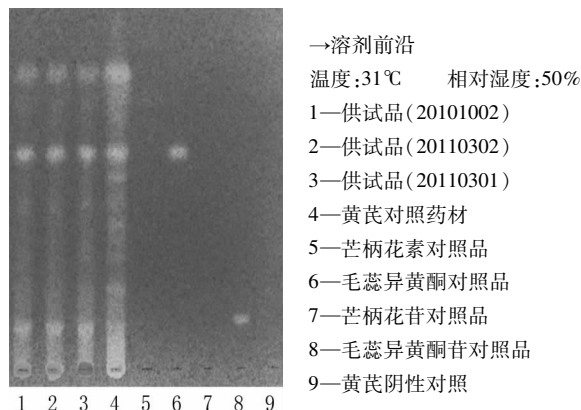


图2 新胃乃安片中抗氧化活性成分筛选的薄层色谱生物自显影图

3 讨论

3.1 薄层色谱展开剂的选择 参考《中国药典》(2015 年版一部) 中黄芪【鉴别】(3) 的展开剂氯仿-甲醇(10:1), 结果芒柄花素与毛蕊异黄酮斑点的 R_f 值较适中, 而芒柄花苷与毛蕊异黄酮苷的 R_f 值很低, 为顾及 4 种成分的 R_f 值及其分离度, 分别采用氯仿-甲醇不同比例进行试验, 结果均无法达到同时兼顾 4 种成分 R_f 值的最佳状态, 为此本研究从低极性到高极性溶剂(石油醚→甲苯→乙醚→氯仿→乙酸乙酯→正丁醇→甲醇)逐渐混合配比, 结果以甲苯-乙酸乙酯-甲醇(20:20:9)为展开剂对上述 4 种异黄酮类成分展开的 R_f 值及其分离度较为理想, 因此最终选择其作为本文的展开系统。研究中分别对不同薄层板、不同展开温湿度进行考察, 结果表明该方法的耐用性良好。

3.2 抗氧化活性成分的筛选 薄层色谱-生物自显影技术是一种建立在 TLC 分离的基础上快速筛选药物活性成分的方法, 它无需特殊的仪器设备就能在薄层板上直接显现肉眼可见的活性成分斑点, 具有操作简单、实验耗费低等优点^[8-9]。目前该技术在国内外已被应用于中药质量评价及抗氧化活性成分的筛选^[10-11], 且已被《中国药典》(2015 年版一部) 记载^[12]。DPPH 是一种很稳定的以氮为中心的自由基, 它本身显紫色, 可被具有抗氧化活性的被测物还原成 DPPH-H 而呈现黄色^[8,12]。由 2.2 项下抗氧化活性成分筛选结果可知, 毛蕊异黄酮及毛蕊异黄酮苷具有清除 DPPH 自由基能力。

本实验建立的新胃乃安片中芒柄花素、毛蕊异黄酮、芒柄花苷及毛蕊异黄酮苷 4 种异黄酮成分的同时鉴别方法简单, 重现性好, 可用于新胃乃安片的质量控制, 本研究初步筛选出毛蕊异黄酮及毛蕊异黄酮苷具有清除 DPPH 自由基能力。

(下转第 206 页)

有统计学意义(均 $P < 0.05$)。故认为阿托伐他汀联合丹参多酚可能通过调节 HIF-1 α 、ET-1、ADM 的表达而降低 COPD 合并 PH 患者的肺动脉压力,提高运动耐力。

4 小结与展望

综上所述,目前中西医结合疗法在 COPD 合并肺动脉高压的治疗上均取得了一定的进展,西医治疗包括戒烟、长期氧疗、无创正压通气及药物干预等,药物包括他汀类、5 型磷酸二酯酶抑制剂(PDE-5)、钙离子拮抗剂、钾通道开放剂、血管紧张素 II 受体拮抗剂、内皮素受体拮抗剂、前列环素及其类似物、白三烯受体拮抗剂等,中医治疗以活血化瘀为主。中西医结合治疗疗效明显,但仍需大规模的临床试验、多中心研究加以验证,同时重视中西医干预治疗的机制,加强中药研究力度,加强中药与西药联合应用治疗肺动脉高压的研究,相信中西医结合治疗会有更好的前景。

参考文献

- [1] 王蕾,杨汀,王辰. 2017 年版慢性阻塞性肺疾病诊断、处理和预防全球策略解读[J]. 中国临床医生杂志,2017,45(1):104-108.
- [2] 牛莉娜,郭素娟,牛丽鑫,等. 阿托伐他汀治疗慢阻肺合并肺动脉高压的临床观察[J]. 临床肺科杂志,2015,20(11):2114-2116.
- [3] 南景龙,贺文帅,韩雪峰,等. 瑞舒伐他汀治疗慢阻肺合并肺动脉高压的临床观察及机制研究[J]. 中国老年保健医学,2016,14(1):47-49.
- [4] 唐晨. 辛伐他汀治疗对慢性阻塞性肺疾病合并肺动脉高压患者心肺功能及炎症细胞因子的影响[J]. 现代中西医结合杂志,2017,26(8):851-853.
- [5] 马肖龙. 阿奇霉素联合辛伐他汀治疗慢性阻塞性肺疾病合并肺动脉高压的临床疗效[J]. 中国临床药理学杂志,2015,31(4):250-258.
- [6] 卢坤琴,陈龙,张华俊,等. 法舒地尔联合舒利迭治疗 COPD 合并肺动脉高压作用机制研究[J]. 心血管康复医学杂志,2017,26(2):182-185.
- [7] 刘真,周梅芳. 辛伐他汀及法舒地尔治疗慢性阻塞性肺疾病合并肺动脉高压患者的临床疗效观察[J]. 吉林医学,2016,37(3):647-649.

- [8] 雷劲沛,江仁,余和安,等. 孟鲁司特钠联合西地那非治疗慢性阻塞性肺疾病合并肺动脉高压的临床疗效[J]. 实用中西医结合临床,2016,16(3):19-21.
- [9] 吴心宏,石翔. 辛伐他汀联合西地那非治疗 COPD 相关肺动脉高压的临床研究[J]. 中国现代医生,2012,50(35):71-73.
- [10] 徐小琴,骆建文,吴智珊. 噻托溴铵联合沙美特罗替卡松治疗慢性阻塞性肺疾病合并肺动脉高压的疗效分析[J]. 现代诊断与治疗,2015,26(2):243-245.
- [11] 李黎,温敏勇,王怀振,等. 医院家庭序贯无创通气治疗慢性阻塞性肺病并肺动脉高压患者的疗效评价[J]. 临床肺科杂志,2017,22(4):623-626.
- [12] 吴刚,白冲. COPD 合并肺动脉高压诊治分析[J]. 临床肺科杂志,2013,18(11):1950-1951.
- [13] 朱立成. N-乙酰半胱氨酸对慢阻肺合并 PAH 患者血氧化应激相关指标的影响研究[J]. 中外医学研究,2017,15(17):24-26.
- [14] 姜静,吕赛丽. 法舒地尔注射液治疗肺动脉高压疗效的临床研究[J]. 临床肺科杂志,2016,21(10):1808-1810.
- [15] 任勇,吴金如,汤永谦,等. 缬沙坦治疗慢阻肺并肺动脉高压的疗效分析[J]. 临床肺科杂志,2016,21(7):1239-1241.
- [16] 赵东芳. 中西医结合治疗慢性阻塞性肺疾病合并肺动脉高压患者[J]. 辽宁中医药大学学报,2016,18(4):141-143.
- [17] 冷报浪,梁斌. 肺康宁合剂对慢性阻塞性肺疾病肺动脉高压患者内皮素和 D-二聚体的影响[J]. 中华中医药学刊,2017,35(1):254-256.
- [18] 刘江,王东. 活血定喘汤对 COPD 伴肺动脉高压患者血液流变学的影响[J]. 中医药学报,2016,44(6):85-88.
- [19] 周渭. 加用血塞通、酚妥拉明治疗慢性阻塞性肺疾病急性加重期伴肺动脉高压 48 例[J]. 广西中医药,2015,38(1):28-30.
- [20] 朱峰,高平,郑建. 大株红景天与阿托伐他汀对慢性阻塞性肺疾病合并肺动脉高压中的临床研究[J]. 中国临床药理学杂志,2015,31(10):783-786.
- [21] 严杰,沈青. 阿托伐他汀联合丹参多酚治疗慢阻肺合并肺动脉高压患者的临床效果[J]. 中国生化药物杂志,2016,36(11):59-61.

(收稿日期:2017-10-12)

(上接第 187 页)

参考文献

- [1] 林传权. 胃乃安新制剂提取分离工艺研究及抗胃黏膜损伤机制初探[D]. 广州:广州中医药大学,2011.
- [2] 陈娟,刘佳,秦泽慧,等. 新胃乃安片对胃黏膜损伤的作用[J]. 中药药理与临床,2013,29(4):131-134.
- [3] 孙政华,邵晶,郭政. 黄芪化学成分及药理作用研究进展[J]. 中医临床研究,2015,7(25):22-25.
- [4] 于玲,王知斌,王秋红,等. 黄芪中黄酮类化合物药理作用研究进展[J]. 中医药信息,2018,35(2):104-108.
- [5] 张妍,董琳,雍婧姣,等. 黄芪药材主要成分的含量测定方法及高效液相指纹图谱研究[J]. 时珍国医国药,2016,27(11):2610-2613.
- [6] 陈华国,周欣,杨世林,等. 黄芪颗粒的 HPLC 特征图谱研究及

4 个成分含量测定[J]. 药物分析杂志,2013,33(10):1756-1763.

- [7] 汪祺,张聿梅,戴忠,等. 黄芪中氨基酸、黄酮类成分的特征薄层图谱鉴别[J]. 中国药事,2012,26(1):50-56.
- [8] 丁晓艳,赵英博,王伟杰,等. 薄层色谱-生物自显影技术在活性物质筛选中的应用[J]. 实用药物与临床,2017,20(10):1220-1224.
- [9] 梁小银,陈少旭,吴垠. 中药制剂质量控制研究的发展趋势[J]. 中国药房,2014,25(3):280-283.
- [10] 谷丽华,郝希民,赵森森,等. 紫苏梗质量标准研究[J]. 中国药学杂志,2010,45(17):1308-1312.
- [11] 代文洁,孙莲. 应用薄层色谱-生物自显影技术筛选芫菁子中抗氧化活性成分[J]. 安徽农业科学,2014,42(26):8944-8947.
- [12] 韩松林,李新霞,勉强辉,等. 薄层生物自显影技术比较新疆 2 种洋甘菊抗氧化活性[J]. 中国中药杂志,2013,38(2):193-198.

(收稿日期:2018-04-24)