

· 化学与分析 ·

糖脉康颗粒清除 DPPH 自由基的作用

赵启鹏^{1,2}, 兰莎³, 张艺³

(1. 宁夏回药现代化工程技术研究中心, 银川 750004; 2. 宁夏医科大学药学院, 银川 750004;
3. 成都中医药大学民族医药学院, 成都 611137)

[摘要] 目的: 建立体外清除 DPPH 方法, 评价糖脉康颗粒体外抗氧化作用。方法: 对清除 DPPH 方法进行反应时间, 反应温度, DPPH 的浓度与吸光度的关系, 糖脉康的提取溶剂, 提取方法等考察, 对 14 批糖脉康及含药血清进行体外清除 DPPH 实验。结果: 糖脉康以 60% 甲醇为溶剂, 超声提取 30 min, 与 0.099 8 g·L⁻¹ 的 DPPH 于 60 ℃ 反应 50 min; 14 批糖脉康颗粒对 DPPH 的平均 IC₅₀ = 0.48 mg(生药量); 含药血清对 DPPH 清除率与空白血清比有所下降。结论: 糖脉康颗粒具有体外抗氧化作用。

[关键词] 糖脉康颗粒; DPPH 法; 抗氧化

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)21-0041-05

DPPH Radical Scavenging Effect of Compound Tangmaikang

ZHAO Qi-peng^{1,2}, LAN Sha³, ZHANG Yi³

(1. Ningxia Research Center of Modern Hui Medicine Engineering and Technology, Yinchuan 750004, China;
2. College of Pharmacy, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China;
3. College of Ethnomedicine, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China)

[Abstract] **Objective:** To establish a method of scavenging DPPH radical, and then evaluate DPPH radical scavenging effect of compound Tangmaikang. **Method:** Investigated the reaction time, temperature, the concentration of DPPH and the extraction solvent and method, the study on the DPPH radical scavenging effect of 14 batches Tangmaikang and drug-containing serum was carried out. **Result:** Tangmaikang was extracted with 60% methanol by ultrasonic for 30 min. The optimum reaction conditions were obtained as follows: DPPH concentration 0.099 8 g·L⁻¹, reaction temperature 60 ℃, reaction time 50 min. The IC₅₀ of 14 batches of Tangmaikang was 0.48 mg. The DPPH clearance of drug-containing serum was lower than blank serum. **Conclusion:** Tangmaikang has antioxidant activity *in vitro*.

[Key words] Tangmaikang; DPPH; antioxidant

2 型糖尿病与机体内自由基的增多以及抗氧化功能紊乱有关, 存在明显的氧化应激现象^[1]。抗氧化剂能抑制活性氧物质 (ROS) 的产生, 并降低脂质过氧化, 改善体内抗氧化防御体系, 可以对氧化应激

所引起的疾病有显著作用。糖脉康颗粒由黄芪、丹参、赤芍、麦冬、牛膝等多味中药加工而成, 已有黄芪、丹参、赤芍、麦冬、牛膝具有抗氧化活性^[2-5], 及 DPPH 法测定黄芪^[6]、赤芍^[2] 抗氧化活性的报道。DPPH 自由基活性清除测定法已广泛应用于中药、植物、食品等, 方法成熟且快速。本文建立 DPPH 法快速测定糖脉康颗粒的体外抗氧化活性, 旨在寻找糖脉康颗粒用于治疗糖尿病的体外药效学依据。

1 材料

1.1 仪器 酶标仪 (Thermo Scientific), BP121S 型

[收稿日期] 20110529(002)

[基金项目] 国家“十一五”科技支撑计划项目 (2007BAI40B03)

[第一作者] 赵启鹏, 博士, 讲师, 研究方向: 中药及民族药药效物质基础, Tel: 0951-6980585, E-mail: zhqp623@126.com

电子天平(赛多利斯仪器有限公司)。

1.2 试药及动物 DPPH 溶液^[7-8]:精密称取 DPPH 10 mg,置 25 mL 量瓶中,超声 30 min 使其完全溶解,加甲醇定容置刻度,作为储备液;精密吸取 3 mL DPPH 储备液,置 25 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度即得。糖脉康颗粒(成都中汇制药有限公司,批号 090902, 081110, 081222, 090107, 090212, 090402, 090405, 090422, 090617, 090801, 081011, 090904, 090912, 090918)。维生素 C(成都市科龙化工试剂厂,批号 091025);甲醇、乙醇(分析纯、成都科龙化工试剂厂)。

SD 大鼠,SPF 级,雄性,12 只,体重 330~350 g,由四川省医学科学院实验动物研究所提供,许可证号 SCXK(川)2004-15。

2 方法

2.1 不同溶剂、提取方法对糖脉康颗粒清除 DPPH 的影响 精密称定糖脉康颗粒 0.1 g,分别加入甲醇、无水乙醇、30% 甲醇、60% 甲醇、30% 乙醇、60% 乙醇、水各 25 mL,分别采用超声法和回流法处理 30 min,静置到室温,过滤,滤液置 25 mL 量瓶中,加甲醇定容至刻度,即得供试品溶液。分别精密吸取上述糖脉康颗粒供试品溶液 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 mL,置 5 mL 离心管中,再精密加入 1.8, 1.6, 1.4, 1.2, 1 mL 甲醇溶液,摇匀。加入 2 mL DPPH 溶液,摇匀,避光放置 30 min,在 516 nm 下测定吸光度(A_s)。同法测得空白溶剂的 A_0 。DPPH 清除率计算公式为:

$$\text{清除率} = (A_0 - A_s) \times 100 / A_0 \times 100\%$$

将清除率(Y)对药物浓度(X)作图,求其对数函数方程,根据对数函数方程求出清除率为 50% 时药物的浓度(IC_{50})。

2.2 糖脉康颗粒与 DPPH 反应时间考察 精密称定糖脉康颗粒 3 份各 0.05 g,加入 20 mL 60% 甲醇,超声处理 30 min,静置,过滤,滤液置 25 mL 量瓶中,加 60% 甲醇定容至刻度,摇匀,即得。分别精密吸取糖脉康颗粒供试品溶液 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 mL,置 5 mL 离心管中,再精密加入 1.9, 1.8, 1.6, 1.4, 1.2 mL 60% 甲醇溶液,摇匀,加入 2 mL DPPH 溶液,摇匀,避光;分别放置 30, 40, 50 min,测定吸光度 A , DPPH 清除率及 IC_{50} 计算同 2.1 项。

2.3 糖脉康颗粒与 DPPH 反应温度考察 精密称定糖脉康颗粒 3 份各 0.05 g,加入 20 mL 60% 甲醇,超声处理 30 min,静置,过滤,滤液置 25 mL 量瓶中,

加 60% 甲醇定容至刻度,摇匀,即得。分别精密吸取糖脉康颗粒供试品溶液 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 mL,置 5 mL 离心管中,再精密加入 1.9, 1.8, 1.6, 1.4, 1.2 mL 60% 甲醇溶液,摇匀,加入 2 mL DPPH 溶液,摇匀,分别在室温(约 22 °C), 37 °C 和 60 °C 下避光放置 30 min,在 516 nm 下测定 A_s 。同法测得空白溶剂的 A_0 。DPPH 清除率及 IC_{50} 计算同 2.1 项下。

2.4 DPPH 浓度与吸光度关系的考察 精密吸取 DPPH 储备液 8 mL 定容至 25 mL,质量浓度为 0.133 1 g·L⁻¹,同法分别配制 0.116 5, 0.099 8, 0.083 2, 0.066 6, 0.049 9 g·L⁻¹ 的 DPPH 液,吸取各浓度的 DPPH 液 2 mL,再分别加入 60% 甲醇 2 mL,避光,60 °C 下反应 30 min,在 516 nm 下检测吸光度(A)。以吸光度(A)对质量浓度(C)作图,在 516 nm 下测定 A_s 。同法测得空白溶剂的 A_0 。

2.5 糖脉康颗粒对 DPPH 清除率的影响 分别取 14 批次糖脉康颗粒约 0.05 g,精密称定,加入 20 mL 60% 甲醇,超声处理 30 min,静置,过滤,滤液置 25 mL 量瓶中,加 60% 甲醇定容至刻度,摇匀,即得。分别精密吸取糖脉康颗粒供试品溶液 0.15, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8 mL 置 5 mL 离心管中,再精密加入 1.85, 1.8, 1.7, 1.6, 1.4, 1.2 mL 60% 甲醇溶液,摇匀,加入 2 mL DPPH 溶液,摇匀,避光 60 °C 下放置 50 min,吸光度测定, DPPH 清除率及 IC_{50} 计算同 2.1。

2.6 维生素 C 对 DPPH 清除率的影响 精密称定维生素 C 10 mg,加甲醇定容至 25 mL,作为储备液。精密量取储备液 0.01, 0.025, 0.04, 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 mL,置 5 mL 离心管中,精密加入 1.99, 1.975, 1.96, 1.95, 1.9, 1.85, 1.8 mL 甲醇溶液,摇匀,加入 2 mL DPPH 溶液,摇匀,避光 60 °C 下放置 50 min。测定 A , DPPH 清除率及 IC_{50} 计算同 2.1。

2.7 含药大鼠血清对 DPPH 清除率的影响 SD 大鼠,全雄,12 只,体重(350 ± 20)g,随机取 6 只,每天灌胃 5 g·kg⁻¹ 的糖脉康颗粒 2 次,灌胃体积 10 mL·kg⁻¹,中间间隔 12 h,连续给药 5 次,于第 5 次给药后 30, 60, 120, 180, 240, 300 min 经尾部取血约 0.5 mL,37 °C 静置 40 min 后,3 600 r·min⁻¹ 离心 10 min,取血清置 -70 °C 冰箱保存,备用。空白组 6 只大鼠灌胃等体积的纯净水,处理方法相同。

分别精密吸取血清 0.025, 0.050, 0.075, 0.10, 0.15 mL,置 5 mL 离心管中,再精密加入 1.975, 1.95, 1.925, 1.90, 1.85 mL 甲醇,摇匀。加入 2 mL

DPPH 溶液,摇匀,避光放置 30 min,在 516 nm 下测定 A_s 。同法测得空白溶剂的 A_0 。确定最佳取样量,然后进行给药后不同时间点的含药血清对 DPPH 清除率的影响。DPPH 清除率计算同 2.1。

3 结果

3.1 不同溶剂、提取方法对糖脉康颗粒清除 DPPH 的影响 表 1 结果得出,以 60% 甲醇超声 30 min 为最佳提取溶剂及最佳提取方法。

表 1 不同溶剂、提取方法对糖脉康颗粒清除 DPPH 的影响

加样体积 /mL	超声法							回流法						
	水	30% 甲醇	60% 甲醇	100% 甲醇	30% 乙醇	60% 乙醇	100% 乙醇	水	30% 甲醇	60% 甲醇	100% 甲醇	30% 乙醇	60% 乙醇	100% 乙醇
0.2	31.61	34.57	37.16	33.59	32.36	39.02	20.49	37.63	32.44	30.57	32.71	30.21	35.06	22.34
0.4	56.86	59.69	64.06	58.57	53.58	55.69	31.17	56.75	58.32	52.22	57.10	50.42	56.54	30.13
0.6	83.99	75.64	86.77	79.82	72.71	67.30	50.99	73.49	76.24	71.56	78.26	73.51	63.23	48.66
0.8	81.24	84.36	91.84	82.36	84.02	70.43	62.39	79.54	85.42	81.74	82.07	80.05	71.33	61.54
1.0	87.34	88.84	92.34	85.10	92.43	74.56	70.24	82.33	85.83	82.67	85.50	82.54	70.44	63.17
IC ₅₀ /mg	0.54	0.58	0.35	0.52	0.57	0.69	1.64	0.56	0.61	0.46	0.57	0.60	0.73	1.85

表 2 反应时间对糖脉康颗粒清除 DPPH 的影响

浓度	30 min		40 min		50 min	
	生药量/mg	清除率/%	生药量/mg	清除率/%	生药量/mg	清除率/%
浓度 1	0.204	16.667	0.203 6	17.271	0.203	20.086
浓度 2	0.409	33.544	0.407	34.755	0.416	36.096
浓度 3	0.818	64.979	0.814	64.819	0.813	68.034
浓度 4	1.226	85.865	1.222	85.714	1.219	88.985
浓度 5	1.635	91.350	1.629	91.684	1.626	92.441
IC ₅₀ /mg	0.538		0.530		0.497	

表 3 反应温度对糖脉康颗粒清除 DPPH 的影响

浓度	室温/20 ℃		37 ℃		60 ℃	
	生药量/mg	清除率/%	生药量/mg	清除率/%	生药量/mg	清除率/%
浓度 1	0.201	17.089	0.201	30.467	0.204	30.476
浓度 2	0.402	34.599	0.402	50.860	0.408	60.952
浓度 3	0.803	67.299	0.803	86.978	0.816	88.254
浓度 4	1.205	84.599	1.205	89.927	1.224	87.302
浓度 5	1.606	90.506	1.606	88.943	1.632	86.667
IC ₅₀ /mg	0.522		0.353		0.321	

3.5 14 批糖脉康颗粒对 DPPH 清除率的影响 在同一浓度下不同批号之间的糖脉康颗粒清除 DPPH 作用存在差异,其差异可能与不同批次的化学成分

3.2 糖脉康颗粒与 DPPH 反应时间考察 表 2 结果分析可知,与 DPPH 反应的较佳时间为 50 min。

3.3 糖脉康颗粒与 DPPH 反应的温度的考察 表 3 结果可知,与 DPPH 反应的最好温度为 60 ℃。

3.4 DPPH 浓度与吸光度 A 关系的考察 考虑吸光度检测限要求,选择最佳反应 DPPH 液的质量浓度为 0.099 8 g·L⁻¹,即精密吸取 DPPH 储备液 6 mL 定容至 25 mL。

不同有关。14 批糖脉康颗粒平均 IC₅₀ 为 0.48 mg,见表 4。

表 4 14 批糖脉康颗粒对 DPPH 清除作用

批号	不同浓度下的抑制率/ $g \cdot L^{-1}$						IC_{50}/mg
	0.15	0.20	0.30	0.40	0.60	0.80	
081011	3.43	18.97	25.56	40.33	55.22	65.66	0.53
081110	5.82	16.72	26.42	44.36	53.08	62.13	0.54
081222	9.65	17.68	32.25	47.18	57.31	69.02	0.47
090107	12.23	25.39	38.54	50.79	60.23	71.35	0.42
090212	4.67	13.99	26.31	42.69	52.46	62.35	0.55
090402	3.521	15.35	26.66	38.41	51.11	63.33	0.56
090405	9.65	18.99	35.5	44.83	54.02	68.54	0.48
090422	4.39	13.26	26.12	43.53	55.12	69.63	0.50
090617	12.66	24.55	39.53	53.33	70.22	76.38	0.38
090801	13.09	24.88	35.44	50.68	66.22	75.26	0.40
090902	8.05	19.04	31.44	48.36	63.14	72.05	0.44
090904	8.88	17.79	34.25	45.36	56.36	69.36	0.48
090912	12.68	21.89	33.79	45.69	57.25	72.05	0.46
090918	12.17	20.96	33.25	47.22	55.56	70.66	0.46
$\bar{x} \pm s$	8.64 ± 3.67	19.25 ± 3.90	31.79 ± 4.81	45.91 ± 4.10	57.66 ± 5.48	69.13 ± 4.44	0.48 ± 0.055

3.6 维生素 C 对 DPPH 清除率的影响 表 5 结果得出,维生素 C 的 IC_{50} 为 0.016 mg。

3.7 给药后不同时间点含药大鼠血清清除 DPPH 的结果 由图 1 可知,取样量为 75 μL 吸光度(A)在 0.7 以内,以该取样量作为取样依据。

从表 6 结果可知,给药后大鼠血清清除 DPPH 能力减弱,以给药后 1~3 h 这个时间段减弱较为明

显,且可持续到 5 h。

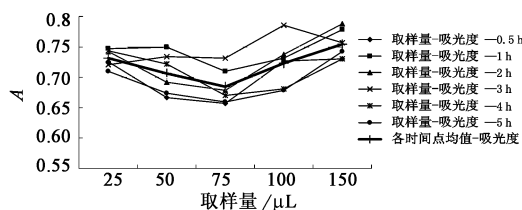


图 1 不同取样量和吸光度的关系

表 5 维生素 C 对 DPPH 清除作用

清除率/%	12.65	30.75	45.06	47.43	91.28	91.52	91.69	IC_{50}/mg
V_c 量/mg	0.004 0	0.010	0.016	0.020	0.040	0.060	0.080	0.016

表 6 给药后不同时间点的含药血清对 DPPH 清除率作用比较($\bar{x} \pm s, n = 6$)

分组	清除率					
	0.5 h	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h
糖脉康颗粒	15.38 ± 3.46	8.97 ± 2.05	7.69 ± 1.34	6.41 ± 1.23	14.10 ± 5.40	15.38 ± 4.67
空白对照	18.64 ± 8.92	$17.36 \pm 7.64^{1)}$	$16.92 \pm 6.89^{2)}$	$17.42 \pm 6.04^{2)}$	$17.08 \pm 6.87^{1)}$	$17.72 \pm 9.12^{1)}$

注:与空白对照组比较 ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

4 讨论

目前研究自由基清除的方法有很多,如:脂质体氧化模型、不饱和脂肪酸氧化模型、LP-TBA 模型、DPPH 模型、微粒体和线粒体等。其中 DPPH 模型具有直接(抗氧化剂直接作用于 DPPH 自由基,测定

DPPH 吸收的变化)、灵敏(只需要少量的样品)、简便(操作简单,用一般的分光光度计即可测定)等的优点,且对抗氧化剂有筛选效果,因此该方法成为近年来应用最为广泛的模型。但此方法也有一定的劣势,样品液与 DPPH 液反应的影响因素较多,正式实

验前必须对其影响因素进行考察,如温度、光照、时间、pH、反应量等,如考察不全面,任一因素均会影响反应的结果。和任何一个体外实验的缺陷相同,因为脱离了机体的环境,其结果并不能反应药物对机体的真实影响。

含药大鼠血清实验结果表明,正常大鼠给予糖脉康颗粒后,血清清除 DPPH 的能力下降,说明给药对大鼠机体的氧化应激系统造成了一定的干扰,其可能机制为:正常机体是自由基和自由基清除剂动态平衡系统,连续以 $5 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 2 次/d(相当于临床人用剂量的 12 倍)给药 5 次,机体连续受到药物刺激后导致体内自由基大量产生,自由基清除剂相对不足,平衡系统被打破,最终体现的是含药血清对 DPPH 的清除率下降。其确切机制有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Naziroglu M, Bu Rerworth P. Protective effects of moderate exercise with dietary vitamin C and E on blood antioxidative defense mechanism in rats with streptozotocin-induced diabetes [J]. *Can J Appl Physiol*,

2005,30(2):172.

[2] 岳文. 中药库中的十大“抗氧化剂”[J]. *癌症康复*, 2002(2):22.

[3] 黄海兰,王国明,徐波. 赤芍抗氧化活性及其成分研究[J]. *食品科学*, 2007,28(7):76.

[4] 王昭晶. 麦冬提取物的抗氧化活性和抑菌作用[J]. *研究食品与发酵工业*, 2007,33(237):57.

[5] 刘国安,杨庆明,侯国鹏. 牛膝总皂苷的体外抗氧化性研究[J]. *天然产物研究与开发*, 2006,18:975.

[6] 付荣,朱蓓薇. 用二苯代苦味酰基自由基分光光度法测定川芎、红景天和黄芪的抗氧化活性[J]. *大连轻工业学院学报*, 2004, 23(2):114.

[7] Abdullah I H, Farooq A, Syed T H S, et al. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations[J]. *Food Chemistry*, 2008,108:986.

[8] Gardeli C, Papageorgiou V, Mallouchos A, et al. Essential oil composition of *Pistacia lentiscus* L. and *Myrtus communis* L.; Evaluation of antioxidant capacity of methanolic extracts [J]. *Food Chemistry*, 2008, 107:1120.

[责任编辑 蔡仲德]

欢迎订阅 2012 年度《中国实验方剂学杂志》

《中国实验方剂学杂志》由国家中医药管理局主管,中国中医科学院中药研究所和中国中西医结合学会中药专业委员会主办的学术刊物,已成为“中国科技论文统计源期刊”(中国科技核心期刊)、“中国中文核心期刊”;“中国学术期刊综合评价数据库来源”期刊、“中国期刊网、中国学术期刊光盘版”全文收录期刊;并被评为“中国中医药优秀期刊”及“中国学术期刊优秀期刊”。本刊创刊于 1995 年 10 月,本着提高为主,提高与普及相结合的办刊方针,主要设置:工艺与制剂、化学与分析、资源与鉴定、药物代谢、药理、毒理、临床、综述、学术交流、消息等栏目,交流方剂的药效学、毒理学、药物动力学、药物化学、制剂学、质量标准、配伍研究、临床研究、学术专论以及方剂主要组成药物的研究结果与最新进展。本刊的读者对象是从事中西医药,尤其是方剂教学、科研、医疗、生产的高、中级工作者,以及中医药院校的高年级学生等。

本刊为半月刊,16 开本,304 页,标准刊号:ISSN1005-9903;CN11-3495/R。2012 年每期定价 25 元,全年 24 期定价为 600 元。国内外公开发行人,国内由北京市报刊发行局办理总发行,邮发代号:2-417;国外由中国国际图书贸易总公司办理发行,代号:BM4655。欢迎订阅。本编辑部也办理邮购。地址:北京市东直门内南小街 16 号,《中国实验方剂学杂志》编辑部,邮编:100700,联系电话:(010)84076882,电子邮件:czd@vip.sina.com,网址:www.syfjxzz.com。