

基于抗氧化效应的降脂宁质量评价方法研究

徐冬艳, 刘斌*, 王伟
(北京中医药大学, 北京 100102)

[摘要] 目的: 建立降脂宁有效部位抗氧化生物效应质量评价方法。方法: 采用 DPPH 法, 以维生素 C 为阳性对照, 测定降脂宁有效部位清除 DPPH IC_{50} 值和抗氧化作用强度, 以评价降脂宁质量。结果: 阳性对照(维生素 C)清除 DPPH IC_{50} 为 $7.43 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 降脂宁有效部位清除 DPPH IC_{50} 为 $11.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 抗氧化作用强度为 0.646; 不同批次药材制备的降脂宁有效部位抗氧化作用强度无明显差异。结论: 该方法简便、准确, 可用于降脂宁有效部位抗氧化效应测定和降脂宁质量评价。

[关键词] 降脂宁; 抗氧化; DPPH 法; 质量评价

[中图分类号] R283.6 [文献标识码] B [文章编号] 1005-9903(2010)10-0044-04

Study on Quality Evaluation of *Jiangzhining* Based on Anti-oxidative Activity

XU Dong-yan, LIU Bin*, WANG Wei
(Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

[Abstract] Objective: To establish a method based on the anti-oxidant biological effects, which could be used to evaluate and control the quality of the anti-oxidation effective fraction of *Jiangzhining*. **Method:** The IC_{50} value and anti-oxidation intensity were measured by DPPH free radical scan, and vitamin C served as a positive control. **Result:** The IC_{50} values were $7.43 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and $11.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ for vitamin C and the effective fraction of *Jiangzhining* respectively. The anti-oxidation intensity of the effective fraction of *Jiangzhining* was 0.646. There was no significant difference among the different batches of samples prepared from different batches of herbs. **Conclusion:** The method was efficient and accurate, and could be used to determine the anti-oxidation intensity and evaluate the quality of *Jiangzhining*.

[Key words] *Jiangzhining*; anti-oxidation; DPPH free radical scan; quality evaluation

降脂宁始载于《千金方》, 现载于《中华人民共和国卫生部药品标准》(中药)第十三册, 由山楂、制首乌、决明子、荷叶 4 味中药组成, 具有温通经脉、扶正疏风、通经活络之功效^[1]。现代药理研究表明降脂宁具有降血脂、软化血管作用^[2], 临床用于高脂血症, 疗效显著。我们运用中药复方有效部位研究思

路与方法^[3], 运用大孔树脂吸附技术, 结合药理学研究, 筛选确定了降脂宁抗氧化有效部位。该有效部位能提高高脂血症大鼠血清总一氧化氮合酶(NOS)活力, 增加一氧化氮(NO)含量, 降低血浆中内皮素-1(ET-1)含量和血清丙二醛(MDA)含量, 增加超氧化物歧化酶(SOD)活力及总抗氧化能力(T-AOC), 且部分指标呈剂量依赖性^[4-5]。采用 HPLC 法测定该有效部位中 12 个主要成分的含量^[6]为金丝桃苷 0.317%、异槲皮苷 0.955%、牡荆素 0.060 9%、槲皮素 2.03%、橙黄决明素 $0.907 \times 10^{-3}\%$ 、大黄素 $3.892 \times 10^{-3}\%$ 、大黄酚 $3.952 \times 10^{-3}\%$ 、大黄素甲醚 $3.244 \times 10^{-3}\%$ 、2-羟基-1-甲氧基阿朴啡 0.141%、荷叶碱 0.043 2%、红链霉素龙胆二糖苷 0.194%、2, 3,

[收稿日期] 20100314(003)

[基金项目] “十一五”国家科技支撑计划项目(2006BAI08B03-04)

[第一作者] 徐冬艳, 在读医学硕士生, 研究方向为中药(复方)生物效应质量控制和评价方法

[通讯作者] * 刘斌, 教授, 博士生导师, Tel: 010-84738629, Fax: 010-84738611; E-mail: liubinyn67@163.com

5,4-四羟基二苯乙烯-2-O- β -D-葡萄糖苷 0.558%, 上述各成分均有明确的调脂抗氧化功效^[7-10]。为了能够进一步将该有效部位进行创新药物开发^[11], 本文采用 DPPH 法建立了该有效部位抗氧化生物效应质量评价方法^[12], 并对同批次药材制备 10 批有效部位及不同批次药材制备 40 批有效部位进行了测定。研究结果表明所建立的方法简便快速, 结果准确可靠, 可作为降脂宁抗氧化有效部位质量控制方法之一。

1 仪器与试药

TU-1810 型紫外-可见分光光度计; Sartorius BT 25S 型 1/10 万电子分析天平(北京赛多利斯仪器有限公司); KQ-500DE 型超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司)。

制首乌 10 批, 经鉴定为蓼科植物何首乌 *Polygonum multiflorum* Thunb. 的干燥块根; 荷叶 10 批, 经鉴定为睡莲科植物莲 *Nelumbo nucifera* Gaertn. 的干燥叶; 山楂 10 批, 经鉴定 P₃ 为蔷薇科山楂 *Crataegus pinnatifida* Bge. 的干燥成熟果实, 其余药材为山里红 *C. pinnatifida* Bge. var. *major* N. E. Br. 的干燥成熟果实; 决明子 10 批, 经鉴定 C₄ 为豆科植物小决明 *Cassia tora* L. 的干燥成熟种子, 其余药材为决明 *C. obtusifolia* L. 的干燥成熟种子。40 批药材购自全国各省市, 药材代码及产地见表 1。

表 1 药材代码及产地

制首乌		荷叶		山楂		决明子	
代码	产地	代码	产地	代码	产地	代码	产地
M ₁	湖北	N ₁	河北	P ₁	河北	C ₁	安徽
M ₂	四川	N ₂	四川	P ₂	山东	C ₂	浙江
M ₃	四川	N ₃	湖南	P ₃	安徽	C ₃	河北
M ₄	贵州	N ₄	安徽	P ₄	湖南	C ₄	广西
M ₅	云南	N ₅	浙江	P ₅	山东	C ₅	山东
M ₆	湖南	N ₆	湖南	P ₆	山东	C ₆	安徽
M ₇	广西	N ₇	河北	P ₇	湖南	C ₇	湖南
M ₈	湖北	N ₈	湖南	P ₈	四川	C ₈	四川
M ₉	湖北	N ₉	广西	P ₉	河北	C ₉	沈阳
M ₁₀	北京	N ₁₀	辽宁	P ₁₀	河北	C ₁₀	河北

AB-8 型大孔吸附树脂(南开大学化工厂); 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH, 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical)(Alfa Aesar A Johnson Matthey 公司, 批号 I23T009); 维生素 C(北京欣经科生物技术有限公司, 批号 0801603); 乙醇等试剂为分析纯。

2 方法与结果

2.1 供试液制备

2.1.1 DPPH 溶液制备 精密称取 DPPH 适量, 加乙醇溶解, 制成浓度约为 0.5 g · L⁻¹ 的 DPPH 贮备液, 于 4℃ 保存, 用时稀释 10 倍。

2.1.2 维生素 C 阳性对照溶液制备 精密称取维生素 C 约 5 mg, 置 25 mL 量瓶中, 加 2.5 mL DMSO 溶解后, 加乙醇稀释至刻度, 摇匀, 精密吸取 5 mL, 加乙醇 5 mL, 配制成浓度为 0.1 g · L⁻¹ 的维生素 C 阳性对照溶液。按此方法, 反复进行, 2 倍逐步稀释, 配制 7 个系列浓度的维生素 C 阳性对照溶液。

2.1.3 供试品溶液制备 根据文献[1] 记载的降脂宁制备工艺, 按原方配比称取制首乌 5 g 和荷叶 15g, 混合, 加 20 倍体积的 50% 乙醇浸泡 1 h 后回流提取 3 h, 滤过, 滤渣同上法再回流提取 2 次(分别为 2 h 和 1 h), 合并 3 次滤液, 减压浓缩至无醇味。另称取山楂 100 g 和决明子 5 g, 混合, 加 7 倍量水, 煎煮 2h, 滤过, 滤渣加 5 倍量水再煎煮 2 h, 滤过, 合并两次滤液, 水浴浓缩。将上述醇提和水煮浓缩液合并, 混匀, 加蒸馏水至 1 000 mL, 量取 50 mL, 加水稀释至 120 mL, 摇匀, 通过 AB-8 型大孔吸附树脂柱(50 mL, 径高比为 1:7) 进行吸附, 待吸附完毕, 先用水洗脱 5 个柱体积, 水洗液弃去, 再用 50% 乙醇洗脱 5 个柱体积, 收集 50% 乙醇洗脱液, 减压回收溶剂, 蒸干, 得降脂宁有效部位。精密称取降脂宁有效部位约 10 mg, 置 50 mL 量瓶中, 加 5 mL DMSO 溶解后, 加乙醇稀释至刻度, 摇匀, 精密吸取 5 mL, 加乙醇 5 mL, 配制成浓度为 0.1 g · L⁻¹ 的供试品溶液。按此方法, 反复进行, 2 倍逐步稀释, 配制 7 个系列浓度的供试品溶液。

2.2 清除 DPPH IC₅₀ 值测定及抗氧化作用强度计算 精密吸取不同浓度维生素 C 阳性对照溶液和供试品溶液各 2 mL, 分别加入浓度为 0.05 g · L⁻¹ 的 DPPH 溶液 2 mL, 摇匀, 避光放置 30 min, 以乙醇为空白对照, 照紫外-可见分光光度法, 在 517 nm 波长处测定吸光度(A₀); 另取 DPPH 溶液 2 mL 与乙醇 2 mL 混合, 以乙醇为空白对照, 照紫外可见分光光度法, 在 517 nm 波长处测定吸光度(A), 计算 DPPH 清除率:

$$\text{清除率} = (1 - A_0 / A) \times 100\%$$

以样品浓度为横坐标, DPPH 清除率为纵坐标, 拟合对数曲线, 计算清除 DPPH IC₅₀ 值。

抗氧化作用强度 = 阳性对照(维生素 C) IC₅₀ 值 / 样品 IC₅₀ 值。

2.3 测定波长确定 取 DPPH 溶液适量, 在 480 ~ 550 nm 扫描测定吸收光谱, DPPH 溶液在 (517 ± 2) nm 处有最大吸收, 故确定 517 nm 为测定波长。

2.4 线性关系考察 精密吸取浓度为 0.068 g · L⁻¹ 的 DPPH 溶液 0.25, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mL, 置 5 mL 量瓶中, 加乙醇稀释至刻度, 配成浓度分别为 3.4, 6.8, 13.6, 20.4, 27.2 和 30.4 mg · L⁻¹ 的系列溶液, 以乙醇为空白对照, 照紫外-可见分光光度法, 在 517 nm 波长处测定吸光度。以 DPPH 溶液浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标绘制标准曲线, 并进行线性回归, 得回归方程 $Y = 27.4578X + 0.0001$, $r = 0.9999$ 。结果表明, DPPH 在 3.4 ~ 30.4 mg · L⁻¹ 与吸光度呈良好的线性关系。

2.5 精密度考察 精密吸取样品溶液 2 mL, 加入 DPPH 溶液 (0.050 g · L⁻¹) 2 mL, 摇匀, 避光放置 30 min, 以乙醇为空白对照, 照紫外-可见分光光度法, 在 517 nm 波长处测定吸光度, 连续测定 6 次, 计算 RSD 0.51%。

2.6 稳定性考察 精密吸取样品溶液 2 mL, 加入 DPPH 溶液 (0.050 g · L⁻¹) 2 mL, 摇匀, 避光放置, 每间隔 5 min, 以乙醇为空白对照, 照紫外可见分光光度法, 在 517 nm 波长处测定吸光度, 连续测定 60 min, 结果见图 1, 反应 30 min 后吸光度值基本稳定。

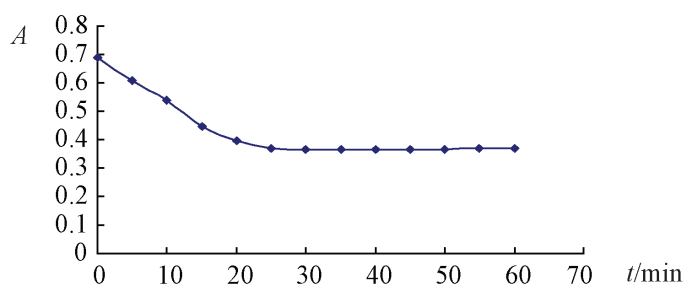


图 1 DPPH 清除稳定性考察

2.7 重复性考察 取同一批降脂宁有效部位 6 份, 按 2.1 项下方法制备供试品溶液。精密吸取各供试样品溶液 2 mL, 分别加入 DPPH 溶液 (0.050 mg · mL⁻¹) 2 mL, 摇匀, 遮光放置反应 30 min, 以乙醇为空白对照, 照紫外-可见分光光度法, 在 517 nm 波长处测定吸光度 (A₀); 另取 DPPH 溶液 2 mL 与乙醇 2 mL 混合, 以乙醇为空白对照, 照紫外-可见分光光度法, 在 517 nm 波长处测定吸光度 (A), 计算各浓度清除率及清除 DPPH IC₅₀ 值。清除 DPPH IC₅₀ 值平均值为 11.50 mg · L⁻¹, RSD 1.44%。表明该方法重复性良好。

2.8 样品清除 DPPH IC₅₀ 值及抗氧化作用强度测定 取维生素 C 及 50 批降脂宁有效部位 (同批次药材制

备有效部位 10 批, 不同批次药材制备有效部位 40 批), 按 2.1 项下方法制备供试品溶液。精密吸取各供试样品溶液 2 mL, 分别加入 DPPH 溶液 (0.050 g · L⁻¹) 2 mL, 摇匀, 遮光放置反应 30 min, 以乙醇为空白对照, 照紫外-可见分光光度法, 在 517 nm 波长处测定 (A₀); 另取 DPPH 溶液 2 mL 与乙醇 2 mL 混合, 以乙醇为空白对照, 照紫外可见分光光度法, 在 517 nm 波长处测定 (A), 计算各浓度清除率、清除 DPPH IC₅₀ 及抗氧化作用强度。维生素 C IC₅₀ 为 7.43 mg · L⁻¹, RSD 1.56% (n=3)。50 批降脂宁有效部位测定结果见表 2。

表 2 降脂宁有效部位清除 DPPH IC₅₀ 和抗氧化作用强度*

No.	代码	IC ₅₀ /mg · L ⁻¹	抗氧化 作用强 度	No.	代码	IC ₅₀ /mg · L ⁻¹	抗氧化 作用强 度
1	M ₁ N ₁ P ₁ C ₁	11.86	0.626	26	M ₁ N ₆ P ₁ C ₁	12.36	0.601
2	M ₁ N ₁ P ₁ C ₁	11.89	0.625	27	M ₁ N ₇ P ₁ C ₁	14.75	0.504
3	M ₁ N ₁ P ₁ C ₁	12.26	0.606	28	M ₁ N ₈ P ₁ C ₁	14.67	0.506
4	M ₁ N ₁ P ₁ C ₁	12.40	0.599	29	M ₁ N ₉ P ₁ C ₁	12.93	0.575
5	M ₁ N ₁ P ₁ C ₁	12.55	0.592	30	M ₁ N ₁₀ P ₁ C ₁	13.98	0.531
6	M ₁ N ₁ P ₁ C ₁	12.16	0.611	31	M ₁ N ₁ P ₁ C ₁	11.74	0.633
7	M ₁ N ₁ P ₁ C ₁	11.98	0.620	32	M ₁ N ₁ P ₂ C ₁	13.71	0.542
8	M ₁ N ₁ P ₁ C ₁	11.98	0.620	33	M ₁ N ₁ P ₃ C ₁	13.10	0.567
9	M ₁ N ₁ P ₁ C ₁	12.06	0.616	34	M ₁ N ₁ P ₄ C ₁	16.26	0.457
10	M ₁ N ₁ P ₁ C ₁	11.99	0.620	35	M ₁ N ₁ P ₅ C ₁	13.72	0.542
11	M ₁ N ₁ P ₁ C ₁	12.65	0.587	36	M ₁ N ₁ P ₆ C ₁	13.74	0.541
12	M ₂ N ₁ P ₁ C ₁	12.82	0.580	37	M ₁ N ₁ P ₇ C ₁	13.41	0.554
13	M ₃ N ₁ P ₁ C ₁	12.99	0.572	38	M ₁ N ₁ P ₈ C ₁	15.93	0.466
14	M ₄ N ₁ P ₁ C ₁	12.53	0.593	39	M ₁ N ₁ P ₉ C ₁	10.63	0.699
15	M ₅ N ₁ P ₁ C ₁	13.69	0.543	40	M ₁ N ₁ P ₁₀ C ₁	11.00	0.675
16	M ₆ N ₁ P ₁ C ₁	13.30	0.559	41	M ₁ N ₁ P ₁ C ₁	11.91	0.624
17	M ₇ N ₁ P ₁ C ₁	12.94	0.574	41	M ₁ N ₁ P ₁ C ₂	12.80	0.580
18	M ₈ N ₁ P ₁ C ₁	13.11	0.567	43	M ₁ N ₁ P ₁ C ₃	12.56	0.592
19	M ₉ N ₁ P ₁ C ₁	13.81	0.538	44	M ₁ N ₁ P ₁ C ₄	12.45	0.597
20	M ₁₀ N ₁ P ₁ C ₁	11.57	0.642	45	M ₁ N ₁ P ₁ C ₅	12.66	0.587
21	M ₁ N ₁ P ₁ C ₁	11.89	0.625	46	M ₁ N ₁ P ₁ C ₆	12.17	0.611
22	M ₁ N ₂ P ₁ C ₁	15.60	0.476	47	M ₁ N ₁ P ₁ C ₇	12.18	0.610
23	M ₁ N ₃ P ₁ C ₁	14.09	0.527	48	M ₁ N ₁ P ₁ C ₈	12.57	0.591
24	M ₁ N ₄ P ₁ C ₁	14.72	0.505	49	M ₁ N ₁ P ₁ C ₉	11.86	0.626
25	M ₁ N ₅ P ₁ C ₁	14.07	0.528	50	M ₁ N ₁ P ₁ C ₁₀	11.81	0.629

注:* 降脂宁有效部位代码由组方单味药代码组合表示。例如: M₁N₂P₁C₁ 表明该批降脂宁有效部位由制首乌 M₁、荷叶 N₂、山楂 P₁ 和决明子 C₁ 制备得到。

3 讨论

复方中药质量控制和评价模式目前大体可分为两种,一种是化学药的质量控制和评价模式,即以复方中药中有限的(一种或数种)活性成分或指标性成分为指标的定性与定量分析;另一种是指纹图谱模式,即以复方中药所含化学成分的主要类型,结合其理化性质,选择适宜的提取分离方法和检测手段,建立相应的指纹图谱,以此作为控制和评价质量的依据。但毋庸置疑的是,不管采用哪种质量控制和评价模式,只有在明确复方中药化学指标成分与其药理药效相关性基础上,将复方中药质量控制和评价方法与其药效药理、临床疗效有机结合,才能真正保证复方中药应用的安全性和有效性。而复方中药作为一个复杂体系,目前很难全面、准确、清晰地实现化学成分与药理效应的关联。面对这种现状,近年来,生物效应法因具有突出的药效学作用,直接关切中药用药的有效性和安全性;且量效关系确切,可量化的效价值为临床用药剂量的规范化提供重要参考依据;同时无需全面研究和阐明中药的化学成分或有效成分,不受物质基础研究进程的限制,符合中药物质基础研究现状^[13-15],在中药复方质量控制和评价应用方面得到了迅速发展。

降脂宁具有明确而显著的抗氧化作用,其有效部位对 DPPH 自由基有明显的清除作用,且呈现出稳定的量效关系。但由于该复方中药成分的复杂性,目前尚不清楚其抗氧化的有效成分,难以选择适当的化学成分指标对其质量进行控制和评价。为此,本文采用 DPPH 法,以维生素 C 为阳性对照,测定降脂宁有效部位清除 DPPH IC₅₀ 值和抗氧化作用强度,建立了一种抗氧化生物效应质量评价方法,为降脂宁的质量控制和评价提供新的手段。50 批样品测定结果表明该方法简便、准确、稳定,可用于降脂宁的质量控制和评价。

[参考文献]

[1] 中华人民共和国卫生部药品标准[S]. 中药成方制剂. 第十三册. 1997: 116.

[2] 关建红,薛征,任晋斌. 降脂宁调脂及抗动脉粥样硬化的研究[J]. 中药药理与临床, 2001, 17(4): 29.

[3] 梁吉春,石任兵,刘斌,等. 银翘散研究方法的新探讨[J]. 北京中医药大学学报, 1999, 22(1): 37.

[4] 杨英,刘斌,毕力夫,等. 降脂宁有效部位及其药效组分对脐静脉内皮细胞损伤的保护作用[J]. 北京中医药大学学报, 2009, 32(3): 160.

[5] 杨英,刘斌,毕力夫,等. 降脂宁调血脂及抗脂质过氧化作用的实验研究[J]. 中华中医药杂志, 2009, 24(5): 647.

[6] 徐冬艳,刘斌,王伟,等. HPLC 法测定降脂宁调脂抗氧化有效部位中 4 种蒽醌类成分的含量[J]. 北京中医药大学学报, 2010, 33(3): 203.

[7] 李贵海,孙敬勇,张希林,等. 山楂降血脂有效成分的实验研究[J]. 中草药, 2002, 33(1): 50.

[8] 李续娥,郭宝江. 决明子蛋白质和蒽醌苷对高脂血症大鼠血脂的影响[J]. 中国中药杂志, 2002, 27(5): 374.

[9] Yong Chen, Mingfu Wang, Rosen Robert T, et al. 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical-scavenging active components from *Polygonum multiflorum* Thunb[J]. J Agric Food Chem, 1999, 47(6): 2226.

[10] 赵骏,高岚,齐召朋. 荷叶总生物碱及其盐的提取和降脂作用的比较[J]. 天津中医药, 2005, 22(2): 161.

[11] 石任兵,刘斌,石钺,等. 中药复方化学与创新药物研究[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2003, 5(6): 6.

[12] 宋怀恩,闻韧. 抗氧化剂筛选方法的研究进展[J]. 中国药物化学杂志, 2003, 13(2): 119.

[13] 王伽伯,李会芳,肖小河,等. 生物检定方法控制中药质量的思考[J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2007, 9(6): 36.

[14] Zhao Z, Hu Y, Liang Z, et al. Authentication is fundamental for standardization of Chinese medicines [J]. Planta Med, 2006, 72(10): 865.

[15] Wu Y W, Gao W Y, Xiao X H, et al. Calorimetric investigation of the effect of hydroxyanthraquinones in *Rheum officinale* Baill on staphylococcus aureus growth [J]. Thermochim Acta, 2005, 429(2): 167.

[责任编辑 顾雪竹]