

图 2 齐墩果酸固体脂质纳米粒透射电镜照片

Fig. 2 TEM Micrograph of oleanolic acid solid lipid nanoparticles

包封率, 药物浓度也是影响包封率的一个因素。在预试验中发现, 药物浓度过高, 会影响包封率, 提示包封率具有饱和性<sup>[6]</sup>。

通过预试验, 确定影响固体脂质纳米粒包封率、形态、均匀度、粒径分布的 3 个主要因素, 即齐墩果酸与大豆磷脂的比例、60 g/L 甘露醇用量和超声时间, 设计了 3 因素 3 水平的正交试验, 结果表明超声时间越长, 包封药物量越多; 大豆磷脂用量不能过多, 说明齐墩果酸固体脂质纳米粒包封有饱和性; 60 g/L 甘露醇用量不能过多, 否则包封率降低。

本实验选用生理盐水、60 g/L 甘露醇作为分散

介质, 实验证明, 用 60 g/L 甘露醇水溶液作分散介质室温放置 3 个月无明显变化, 而用生理盐水则很快混浊、分层, 表明药物大量泄漏, 磷脂凝聚。原因可能是电解质的加入改变了各种粒子间电荷的相互作用, 促进了磷脂晶型的转变。

#### References:

- [1] Liu H J, Sun H N, Inhibition effects of oleanolic acid from *Chaenomeles lagenaria* on hepatitis B virus *in vitro* [J]. *Pharm J Chin PLA* (解放军药学报), 2002, 1(5): 272-274.
- [2] Pattarino F M, Ignoni T. Stability of drug-carrier emulsions containing 'phosphatidyl choline mixtures' [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2002, 53(4): 203.
- [3] Xue K C, Gu Y, Zhang S Q, et al. Preparation of lamivudine palmitate solid lipid nanoparticles [J]. *J Fourth Mil Med Univ* (第四军医大学学报), 2003, 24(10): 890-892.
- [4] Gao X L, Ji X M, Determining the trap efficiency of liposome using sephadex column chromatography [J]. *Chin Pharm J* (中国药学杂志), 2003, 38(7): 515-517.
- [5] Chen J, Tu Q R. Research and development on solid lipid nanoparticles [J]. *Foreign Med Sci; Sect Pharm* (国外医学: 药学分册) 2002, 29(4): 241-245.
- [6] Muller R H, Mader K, Gohla S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery—a review of the state of the art [J]. *Eur J Pharm Biopharm*, 2000, 50: 161.

## 化学发光法测定白果白蛋白的体外抗氧化活性

邓乾春<sup>1</sup>, 陈春艳<sup>2</sup>, 田斌强<sup>1</sup>, 谢笔钧<sup>1\*</sup>

(1. 华中农业大学食品科技学院, 湖北 武汉, 430070; 2. 湖南科技学院 化学与生物工程系, 湖南 永州, 425006)

**摘要:**目的 研究白果白蛋白的体外抗氧化活性、对 DNA 损伤的保护作用及其作用机制。方法 以莲房原花青素和小牛血清蛋白为对照, 分别采用邻苯三酚-鲁米诺化学发光体系测定了白果白蛋白对超氧阴离子的清除作用, 硫酸铜-邻菲罗啉-抗坏血酸-双氧水、硫酸亚铁-鲁米诺-双氧水和硫酸亚铁-鲁米诺 3 个体系测定了白果白蛋白对羟自由基的清除作用, 双氧水-鲁米诺体系测定了白果白蛋白对体外双氧水的清除作用, 采用硫酸铜-邻菲罗啉-抗坏血酸-双氧水-脱氧核糖核酸体系测定了白果白蛋白对体外 DNA 损伤的保护作用。结果 白果白蛋白具有较好的体外清除活性氧和保护 DNA 损伤的活性, 但在硫酸亚铁-鲁米诺-双氧水和双氧水-鲁米诺化学发光体系中表现出“促氧化”作用。结论 采用化学发光体系衡量白果白蛋白的抗氧化活性具有选择性。

**关键词:**白果白蛋白; 化学发光法; 体外抗氧化活性

中图分类号: R286.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)05-0685-06

## Investigation of *in vitro* antioxidant activity of ginkgo albumin by chemiluminescence method

DENG Qian-chun<sup>1</sup>, CHEN Chun-yan<sup>2</sup>, TIAN Bin-qiang<sup>1</sup>, XIE Bi-jun<sup>1</sup>

(1. College of Food Science and Technology, Huzhong Agriculture University, Wuhan 430070, China; 2. Department of Chemistry and Bioengineering, Hunan Institute of Science and Technology, Yongzhou 425006, China)

**Abstract: Objective** To investigate the scavenging abilities of ginkgo albumin to reactive oxygen *in vitro*, as well as the protection and mechanism of ginkgo albumin on damaged DNA. **Methods** Lotus

收稿日期: 2006-09-21

基金项目: 湖北省“十五”攻关资助项目(2001AA204B02)

作者简介: 邓乾春(1979—), 男, 湖北黄石人, 博士生在读, 从事天然产物化学和食品蛋白质化学研究。

Tel: (027)87283201 E-mail: spring332288@yahoo.com.cn

\* 通讯作者 谢笔钧

Seedpod Procyanidin (LSPC) and bovine serum albumin (BSA) were used as control sample, the effect of ginkgo albumin on removal of superoxide anion was determined by Pyrogallol-Luminol system. Scavenging ability of ginkgo albumin on hydroxide free radical was determined by  $\text{CuSO}_4$ -Phen-Vc- $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{FeSO}_4$ -Luminol- $\text{H}_2\text{O}_2$ , and  $\text{FeSO}_4$ -Luminol systems. Luminol- $\text{H}_2\text{O}_2$  system was used to measure the scavenging effect on hydrogen peroxide. Preventive effect of ginkgo albumin on *in vitro* damaged DNA was determined by  $\text{CuSO}_4$ -Phen-Vc- $\text{H}_2\text{O}_2$ -DNA system. **Results** Ginkgo albumin possessed a good scavenging potency on reactive oxygen and protection on damaged DNA, but promoted oxidation in the  $\text{FeSO}_4$ -Luminol- $\text{H}_2\text{O}_2$  and Luminol- $\text{H}_2\text{O}_2$  chemiluminescence systems. **Conclusion** Not every chemiluminescence's system is suitable for investigating the antioxidant activity of ginkgo albumin.

**Key words:** ginkgo albumin; chemiluminescence method; *in vitro* antioxidant activity

白果为银杏科植物银杏 *Ginkgo biloba* L. 的种仁,主要成分为蛋白质、碳水化合物、脂肪、磷、铁、胡萝卜素、核黄素和多种氨基酸等。味甘苦涩平,有小毒,入肺、肾经,敛肺气,定喘嗽,止带浊,缩小便等。本实验室采用盐溶盐析法从白果中得到一种具有较好抗衰老和免疫调节活性的白果白蛋白(ginkgo albumin),动物体内实验表明其能有效清除体内自由基,保护细胞膜结构和功能的完整,避免细胞受损[1]。生化比色法采用单一体系测定表明其具有较强的体外清除羟自由基和超氧阴离子活性,但其灵敏度不高,操作步骤相对较为烦琐[2]。化学发光法作为一种灵敏的测定方法被广泛用来检测酶、细胞及生物机体中产生的自由基及反应代谢物,其氧化产物和代谢产物所发出的光可用各种光度计检测[3,4]。由于化学发光法具有灵敏、快速、操作简单和价格低廉等特点,而被广泛用于抗氧化剂的筛选和研究,如多酚、多糖、黄酮类、蒽醌类活性物质等等,但在蛋白类抗氧化剂的筛选中应用很少。为了进一步评价和了解白果白蛋白在不同体系中的抗氧化活性及其作用机制,并监测白果白蛋白在提取过程中抗氧化活性的变化,本实验采用化学发光法测定了白果白蛋白在体外对活性氧自由基的清除作用以及对 DNA 损伤的保护作用,且以小牛血清蛋白和强抗氧化活性物质莲房原花青素[5]作为对照,以探讨化学发光体系在测定蛋白类物质的抗氧化活性中的应用及其可能存在的作用机制。

## 1 仪器与试剂

BPCL 型超微弱化学发光测量仪(中国科学院生物物理研究所),测试条件:Hi-V 800;Kv—1;记录的波长范围:180~800 nm;温度 30 ℃。

白果购自江苏泰兴,经中国林学会银杏分会顾问刘燕君鉴定;白果白蛋白为本实验室自制,在白果总蛋白中占 41.99%,其化学成分为蛋白 85.2%,多糖 3.6%,核酸 10.3%;莲房原花青素(lotus seed-

pod procyanidin, LSPC)为本实验室自制,质量分数大于 98%,其中低聚原花青素质量分数为 85%,产品为浅黄色粉末,得率 15%左右;小牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA)、小牛胸腺 DNA、鲁米诺,邻苯三酚、双氧水、硫酸亚铁、邻菲罗啉、抗坏血酸、三羟甲基氨基甲烷、十二烷基硫酸钠和过硫酸铵为中国国药(集团)上海化学试剂公司产品,其余试剂均为分析纯。

## 2 方法与结果

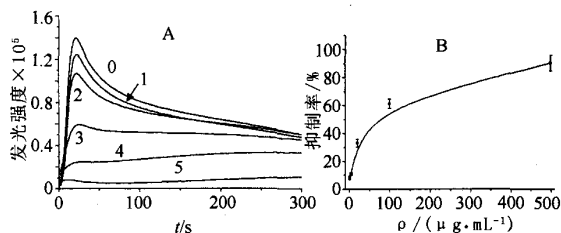
2.1 白果白蛋白对超氧阴离子的清除作用:用邻苯三酚-鲁米诺化学发光体系[6]。鲁米诺用 0.05 mol/L NaOH 溶液配成浓度为 0.05 mol/L 的溶液,在避光处保存,临用前用双蒸水稀释成 1 mmol/L 的溶液。邻苯三酚用 1 mmol/L HCl 配成 0.01 mol/L 的溶液,4 ℃冰箱中保存,用前用双蒸水稀释成  $6.25 \times 10^{-4}$  mol/L 的溶液。0.05 mol/L pH 10.2  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ - $\text{NaHCO}_3$  缓冲液(含 0.1 mmol/L EDTA)用前现配,试验前与 1 mmol/L 鲁米诺按照体积比 2:1 混合成鲁米诺-碳酸盐缓冲液。测定时,向发光池中注入 10.0  $\mu\text{L}$  不同浓度的样品(以样品缓冲液为对照),然后注入  $6.25 \times 10^{-4}$  mol/L 邻苯三酚 0.05 mL,最后加入鲁米诺-碳酸盐缓冲液 0.94 mL 启动反应(30 ℃),间隔 2 s 记数发光强度,测定 300 s 的总发光积分强度,本底发光强度为未加邻苯三酚时的发光值。实验均重复 3 次,曲线面积积分表示相对发光强度,计算抑制率,以 Origin 7.0 软件统计数据,各组数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。

$$\text{抑制率} = \frac{[(\text{Cl}_1 - \text{Cl}_0) - (\text{Cl}_2 - \text{Cl}_0)]}{(\text{Cl}_2 - \text{Cl}_0)} \times 100\%$$

式中  $\text{Cl}_1$  为空白对照组的相对发光强度,  $\text{Cl}_0$  为本底组相对发光强度,  $\text{Cl}_2$  为样品组相对发光强度

邻苯三酚在碱性条件下自氧化产生超氧阴离子,以鲁米诺为发光剂,超氧阴离子激发鲁米诺,鲁米诺由激发态返回到基态时产生化学发光。实验结

果表明本化学发光体系启动后,化学发光强度上升迅速,在 22 s 左右时就达到最大值,随后开始缓慢下降,在 300 s 附近各发光曲线开始重叠。0.8~500  $\mu\text{g/mL}$  白果白蛋白对超氧阴离子的清除作用见图 1。可见体系加入白果白蛋白后,发光曲线峰值降低,曲线面积减少,且呈剂量-效应关系,表明,白果白蛋白能清除体系中的超氧阴离子;在白果白蛋白从 0.8  $\mu\text{g/mL}$  上升到 4  $\mu\text{g/mL}$  时,抑制率的增加趋势缓慢,当质量浓度大于 4  $\mu\text{g/mL}$  后,抑制率近乎呈直线上升趋势,白果白蛋白质量浓度为 500  $\mu\text{g/mL}$  时,抑制率达 90.3%,其对超氧阴离子的抑制作用的  $\text{IC}_{50}$  值为 40.1  $\mu\text{g/mL}$ ;莲房原花青素表现出对抑制该体系的发光强度更为明显的趋势(图未给出),其质量浓度为 100  $\mu\text{g/mL}$  时,抑制率就达 97.8%,莲房原花青素的  $\text{IC}_{50}$  值为 6.1  $\mu\text{g/mL}$ ,要小于白果白蛋白的  $\text{IC}_{50}$  值。



0-0  $\mu\text{g/mL}$  1-0.8  $\mu\text{g/mL}$  2-4  $\mu\text{g/mL}$  3-20  $\mu\text{g/mL}$   
4-100  $\mu\text{g/mL}$  5-500  $\mu\text{g/mL}$

A-化学发光曲线 B-剂量-效应关系

A-chemiluminescence curve B-dose-effect relationship

图 1 白果白蛋白对邻苯三酚-鲁米诺化学发光体系产生超氧阴离子的清除作用

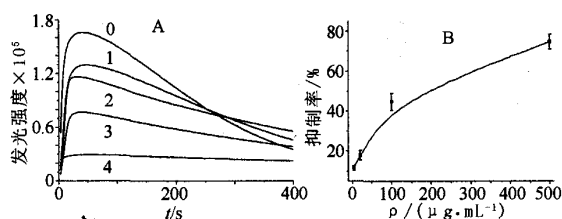
Fig. 1 Scavenging effect of ginkgo albumin on superoxide anion induced by chemiluminescence of Pyrogallol-Luminol system

## 2.2 白果白蛋白对羟自由基的清除作用<sup>[7~9]</sup>

2.2.1  $\text{CuSO}_4$ -Phen-Vc- $\text{H}_2\text{O}_2$  化学发光体系:取 50  $\mu\text{L}$  样品于样品池(以样品缓冲液为对照)中,分别加入 1.0 mmol/L  $\text{CuSO}_4$  溶液 50  $\mu\text{L}$ , 1 mmol/L 邻菲罗啉溶液 50  $\mu\text{L}$  和 0.05 mol/L 硼砂溶液 700  $\mu\text{L}$  (pH 9.0),充分混匀,然后再加入 100  $\mu\text{L}$  1 mmol/L 抗坏血酸溶液和 50  $\mu\text{L}$  0.15%  $\text{H}_2\text{O}_2$  溶液(本底不加双氧水),立即启动化学发光系统,间隔 3 s 记数,记录 400 s 内化学发光动力学曲线。试验均重复 3 次,曲线面积积分表示相对发光强度,计算抑制率,以 Origin 7.0 软件统计数据,各组数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。

在本体系中, $\text{Cu}^{2+}$  被 Vc 还原成  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Cu}^+$  与  $\text{H}_2\text{O}_2$  在 Fenton 反应中产生  $\cdot\text{OH}$ ,  $\cdot\text{OH}$  氧化 Phen

使 Phen 激发,Phen 退激时产生化学发光。试验结果(图 2)表明,发光动力学曲线在 40 s 左右迅速增加到最大发光强度,然后发光值开始较缓慢的下降,到 300 s 左右时各发光曲线开始重叠。观察了 4~500  $\mu\text{g/mL}$  白果白蛋白对羟自由基的清除作用。随着白果白蛋白质量浓度的增加,对羟自由基的清除作用增强;在 20~500  $\mu\text{g/mL}$  白果白蛋白的抑制率从 17.90% 增加到 74.75%,呈直线上升。莲房原花青素(图未给出)同样表现出较为显著的抑制该体系发光的趋势,在质量浓度为 100  $\mu\text{g/mL}$  时,抑制率达 88.43%,莲房原花青素和白果白蛋白的  $\text{IC}_{50}$  分别为 20.32  $\mu\text{g/mL}$  和 115.11  $\mu\text{g/mL}$ 。



0-0  $\mu\text{g/mL}$  1-4  $\mu\text{g/mL}$  2-20  $\mu\text{g/mL}$   
3-100  $\mu\text{g/mL}$  4-500  $\mu\text{g/mL}$

A-化学发光曲线 B-剂量-效应关系

A-chemiluminescence curve B-dose-effect relationship

图 2 白果白蛋白对  $\text{CuSO}_4$ -Phen-Vc- $\text{H}_2\text{O}_2$  化学发光体系产生羟自由基的清除作用

Fig. 2 Scavenging effect of ginkgo albumin on hydroxide free radical induced by  $\text{CuSO}_4$ -Phen-Vc- $\text{H}_2\text{O}_2$  chemiluminescence system

2.2.2  $\text{FeSO}_4$ -Luminol- $\text{H}_2\text{O}_2$  化学发光体系:在样品池中依次加入 0.4 mmol/L  $\text{FeSO}_4$  50  $\mu\text{L}$ , 1.5%  $\text{H}_2\text{O}_2$  50.0  $\mu\text{L}$ , 50.0  $\mu\text{L}$  样品或样品缓冲液(对照),最后加入 pH 7.4 0.05 mol/L 碳酸盐缓冲液配制成的 0.1 mmol/L 鲁米诺液 0.6 mL,立即混匀,测定发光强度。反应温度 30  $^\circ\text{C}$ ,间隔 1 s 记数,测定 60 s 的总发光积分强度,本底发光强度为未加  $\text{H}_2\text{O}_2$  时的系统发光值。试验均重复 3 次,曲线面积积分表示相对发光强度,计算抑制率,以 Origin 7.0 软件统计数据,各组数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。

本体系为典型的 Fenton 反应产生羟自由基,羟自由基再激发鲁米诺,鲁米诺由激发态返回到基态时产生化学发光。该体系在启动发光装置后 5 s 内发光强度迅速达到最大值,然后开始衰减,30 s 内发光曲线接近下降至稳定水平。分别观察了白果白蛋白、小牛血清蛋白和莲房原花青素对化学发光曲线的影响。其中白果白蛋白和小牛血清蛋白(图未给出)分别加入体系后,发光曲线峰值增加,曲线面积

增大,且均随蛋白质质量浓度的增大而增大,表现出“促氧化”作用;在  $0 \sim 0.16 \mu\text{g/mL}$  时,“促氧化”作用较小,从  $0.16 \mu\text{g/mL}$  增加到  $8 \mu\text{g/mL}$  或更高的质量浓度时,促氧化作用显著。莲房原花青素在此体系中仍表现出抗氧化作用(图未给出),其  $\text{IC}_{50}$  值为  $7.43 \mu\text{g/mL}$ ,结果见图 3。

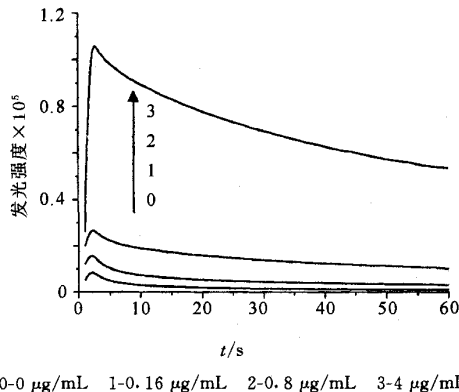


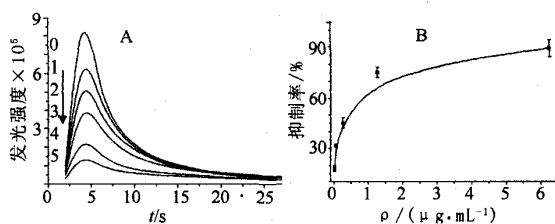
图 3 白果白蛋白对  $\text{FeSO}_4$ -Luminol- $\text{H}_2\text{O}_2$  化学发光体系产生羟自由基的清除作用

Fig. 3 Scavenging effect of ginkgo albumin on hydroxide free radical induced by  $\text{FeSO}_4$ -Luminol- $\text{H}_2\text{O}_2$  chemiluminescence system

2.2.3  $\text{FeSO}_4$ -Luminol 化学发光体系:取  $50 \mu\text{L}$  样品(以样品缓冲液为对照)于样品池,分别加入  $750 \mu\text{L}$  pH 7.4 10 mmol/L 磷酸盐缓冲液(含有 150 mmol/L NaCl)和  $100 \mu\text{L}$  2.5 mmol/L 鲁米诺溶液,最后加入  $100 \mu\text{L}$  400 nmol/L  $\text{FeSO}_4$  溶液(含有 0.9% NaCl)后立即启动发光系统,反应温度  $37^\circ\text{C}$ ,间隔 2 s 计数,测定 60 s 内的化学发光动力学曲线。实验均重复 3 次,曲线面积积分表示相对发光强度,计算抑制率,以 Origin 7.0 软件统计数据,各组数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。

该体系通过反应<sup>[10]</sup>产生羟自由基攻击鲁米诺发光,但发光强度较弱。为便于观测,将 Hi-V 调到 950。其发光动力学曲线同  $\text{FeSO}_4$ -Luminol- $\text{H}_2\text{O}_2$  类似。结果表明白果白蛋白在实验质量浓度范围内能较好的抑制该体系发光,其抑制率均随样品质量浓度的增大而增大,其  $\text{IC}_{50}$  值为  $0.21 \text{ mg/mL}$ ,要远远大于其他化学发光体系。而小牛血清蛋白即使在很高质量浓度下也只能轻微抑制该体系的发光(图未给出),在质量浓度为  $6.25 \text{ mg/mL}$  时其抑制率仅为 18.22%。莲房原花青素则作用显著(图未给出),其  $\text{IC}_{50}$  值低达  $0.26 \mu\text{g/mL}$ 。结果见图 4。

2.3 白果白蛋白对双氧水的清除作用:采用  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Luminol 化学发光体系<sup>[10]</sup>。取待测样品各  $50 \mu\text{L}$  于



0-0 mg/mL 1-0.01 mg/mL 2-0.05 mg/mL

3-0.25 mg/mL 4-1.25 mg/mL 5-6.25 mg/mL

A-化学发光曲线 B-剂量效应关系

A-chemiluminescence curve B-dose-effect relationship

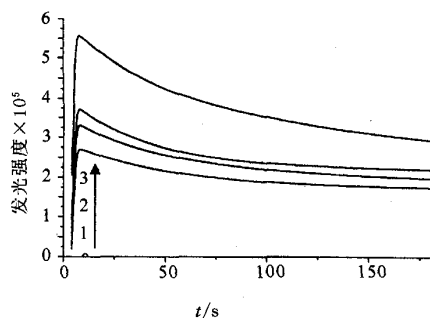
图 4 白果白蛋白对  $\text{FeSO}_4$ -Luminol 体系产生羟自由基的清除作用

Fig. 4 Scavenging effect of ginkgo albumin on hydroxide free radical induced by  $\text{FeSO}_4$ -Luminol chemiluminescence system

样品池中,加入  $50 \mu\text{L}$   $0.15 \text{ mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  和  $900 \mu\text{L}$   $0.1 \text{ mmol/L}$  鲁米诺-pH 9.4  $0.05 \text{ mol/L}$  碳酸盐缓冲液混合液(体积比为 1 : 17),反应总体积为  $1.0 \text{ mL}$ ,启动发光系统,间隔 2 s 记数,记录 180 s 内发光强度。本底不加双氧水。试验均重复 3 次,曲线面积积分表示相对发光强度,计算抑制率,以 Origin 7.0 软件统计数据,各组数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示。

本体系中  $\text{H}_2\text{O}_2$  能在有氧和碱性条件下氧化冷光剂鲁米诺产生化学发光。试验结果表明该体系在 6 s 内化学发光强度达到最大,随后开始缓慢下降,到 180 s 左右下降到最小值。在本体系中观察了白果白蛋白、小牛血清蛋白和莲房原花青素对化学发光强度的影响,结果见图 5。当体系加入白果白蛋白和小牛血清蛋白(图未给出)后,在  $0.16 \sim 500 \mu\text{g/mL}$  ( $20 \sim 500 \mu\text{g/mL}$  的曲线数据未给出)时,随着质量浓度的增加,发光曲线峰值和面积均增加,两者均表现出较强的“促氧化”作用。而莲房原花青素则随着其质量浓度的增加(图未给出),对双氧水的抑制率增加,其  $\text{IC}_{50}$  值为  $1.55 \mu\text{g/mL}$ 。

2.4 白果白蛋白对 DNA 损伤的保护作用:采用  $\text{CuSO}_4$ -Phen-Vc- $\text{H}_2\text{O}_2$ -DNA 化学发光体系<sup>[11]</sup>。分别用去离子水配制  $0.1 \text{ mol/L}$  醋酸-醋酸钠缓冲液,  $4.2 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$  VcC, 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  及 DNA- $\text{Cu}^{2+}$ -Phen 体系(用缓冲溶液配制, DNA 质量浓度为  $3 \mu\text{g/mL}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  浓度为  $7.5 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ , Phen  $5.25 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ );在发光池中依次加入  $100 \mu\text{L}$  样品溶液,  $800 \mu\text{L}$  DNA/ $\text{Cu}^{2+}$ /Phen 体系溶液,  $100 \mu\text{L}$  Vc,轻轻振荡混匀后,置于发光装置中,打开记录系统后,立刻注入  $200 \mu\text{L}$  双氧水,立刻启动发



0-0  $\mu\text{g/mL}$  1-0.16  $\mu\text{g/mL}$  2-0.8  $\mu\text{g/mL}$  3-4  $\mu\text{g/mL}$   
图 5 白果白蛋白对  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Luminol 化学发光体系中双氧水的清除作用

Fig. 5 Scavenging effect of ginkgo albumin on  $\text{H}_2\text{O}_2$  in  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Luminol chemiluminescence system

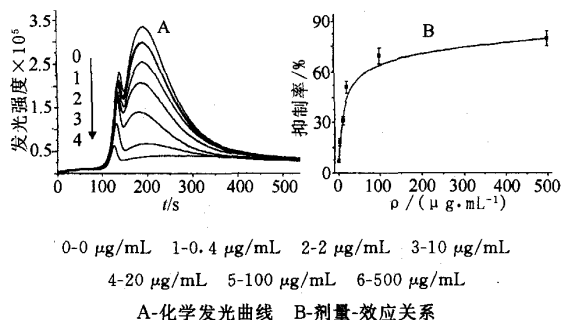
光装置,每隔 3 s 记录数据 1 次,记录 540 s 内的动态发光过程,本底不加双氧水。试验均重复 3 次,曲线面积积分表示相对发光强度,计算抑制率,以 Origin 7.0 软件统计数据,各组数据用  $\bar{x} \pm s$  表示。

该化学发光体系的发光动力学曲线出现两个峰,前峰是 Fenton 反应产生的  $\cdot\text{OH}$  攻击 Phen 出现的化学发光现象而导致的,后峰则是  $\cdot\text{OH}$  导致 DNA 损伤而产生的一延迟化学发光峰。与空白对照相比,在 0.4~500  $\mu\text{g/mL}$  时,随着白果白蛋白质量浓度的增加,化学体系发光动力学曲线的两个峰值和面积持续下降,但两峰均未发生位移,白果白蛋白对 DNA 损伤的抑制率不断增加,当白果白蛋白质量浓度为 500  $\mu\text{g/mL}$  时,抑制率为 79.78%,其  $\text{IC}_{50}$  值为 27.28  $\mu\text{g/mL}$ 。莲房原花青素同样在 0.4~100  $\mu\text{g/mL}$  时,近乎呈线性关系抑制羟自由基的产生和保护 DNA 免受损伤,且两峰均明显的不断后移(图未给出);在质量浓度为 100  $\mu\text{g/mL}$  时,抑制率达 81.36%,其  $\text{IC}_{50}$  值为 7.43  $\mu\text{g/mL}$ ,结果见图 6。

### 3 讨论

活性氧的测定方法有很多种,如核磁共振法、比色法、荧光法、气相色谱法、高效液相色谱法、示踪原子法和免疫分析法等,而化学发光法由于其灵敏快捷而被广泛用来测定各种活性氧,较常见的如超氧阴离子、羟自由基、脂质自由基和双氧水等,各种活性氧的测定则又有多种化学发光体系供选择,在本试验中选择了一些较为经典的化学发光体系。

测定超氧阴离子常用的化学发光体系有邻苯三酚-鲁米诺、黄嘌呤氧化酶-鲁米诺和二甲基亚砷-鲁米诺 3 种体系<sup>[12]</sup>。本试验采用了邻苯三酚-鲁米诺非酶促化学体系,结果表明白果白蛋白清除超氧阴离子能力接近强抗氧化剂莲房原花青素。测定羟自



0-0  $\mu\text{g/mL}$  1-0.4  $\mu\text{g/mL}$  2-2  $\mu\text{g/mL}$  3-10  $\mu\text{g/mL}$   
4-20  $\mu\text{g/mL}$  5-100  $\mu\text{g/mL}$  6-500  $\mu\text{g/mL}$   
A-化学发光曲线 B-剂量-效应关系

A-chemiluminescence curve B-dose-effect relationship

图 6 白果白蛋白对  $\text{CuSO}_4$ -Phen-Vc- $\text{H}_2\text{O}_2$ -DNA 化学发光体系 DNA 损伤的保护作用  
Fig. 6 Protective effect of ginkgo albumin on damaged DNA in  $\text{CuSO}_4$ -Phen-Vc- $\text{H}_2\text{O}_2$ -DNA chemiluminescence system

由基的化学发光体系主要有硫酸铜-酵母(或骨髓细胞)-抗坏血酸-双氧水、氯化铜-双氧水-邻菲罗啉-碳酸盐缓冲液、硫酸铜-邻菲罗啉-抗坏血酸-双氧水、硫酸亚铁-鲁米诺-双氧水和硫酸亚铁-鲁米诺 5 个化学发光体系<sup>[9,12,13]</sup>。本试验选择了后 3 种化学发光体系,得到了相反的结果,白果白蛋白和小牛血清蛋白在硫酸亚铁-鲁米诺-双氧水体系中表现出“促进”自由基产生的作用,白果白蛋白在其他两个体系中则能较好的清除羟自由基,且以硫酸铜-邻菲罗啉-抗坏血酸-双氧水体系较为灵敏。双氧水的化学发光测定体系主要是双氧水-鲁米诺体系,结果表明白果白蛋白和小牛血清蛋白均表现出强烈的“促氧化”作用,而莲房原花青素则能显著清除双氧水,因此该体系不宜衡量白果白蛋白的清除双氧水活性。在上述体系中,白果白蛋白和小牛血清蛋白均是在同时有鲁米诺和双氧水的发光体系中表现出“促氧化”作用,推测蛋白的“促氧化”作用可能是由于体系氧化电位升高从而增强了由  $\text{H}_2\text{O}_2$  氧化引起的鲁米诺发光作用,具体原因尚待进一步研究和证实。

观测天然活性成分对 DNA 损伤的保护作用的方法也有多种,如应用非常广泛的单细胞凝胶电泳法可检测单个细胞 DNA 的断裂。采用化学发光法目前则只有  $\text{CuSO}_4$ -Phen-Vc- $\text{H}_2\text{O}_2$ -DNA 体系;天然抗氧化剂对该体系 DNA 损伤的保护有抑制型、延迟型和混合型 3 种机制<sup>[14,15]</sup>。本试验结果表明白果白蛋白和莲房原花青素都能较好地保护 DNA 所受到的损伤,但白果白蛋白的保护机制属于抑制型,而莲房原花青素的保护机制则属于混合型。可见该体系能用来衡量白果白蛋白对 DNA 损伤的保护作用。

白果白蛋白的抗氧化作用则可能存在以下机

制:(1)由于自身蛋白质结构决定的,如能提供活泼氢质子,使其易于受到活性氧自由基的攻击,从而与发光剂竞争活性氧自由基导致发光强度的降低;(2)蛋白质的抗氧化活性多与巯基量或类似于酶的活性有关,如保护蛋白(protector protein)是巯基特异性抗氧化剂,能清除双氧水及羟自由基<sup>[16]</sup>;而肌球蛋白,血红蛋白及血红蛋白-蛋白质复合物(如肝球蛋白)等具有类似于过氧化物酶的活性,可清除H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>或有机氢过氧化物<sup>[17]</sup>。白果白蛋白的氨基酸组成分析表明其含有2.5%左右的半胱氨酸,因此具有较多的巯基,从而表现出类似于保护蛋白的抗氧化机制。而其是否具有类似于酶的抗氧化活性则有待于进一步的证实。

因此,本试验结果表明化学发光法能用于测定白果白蛋白对活性氧的清除作用及对DNA损伤的保护作用,但也具有一定的选择性。

#### References:

- [1] Huang W, Xie B J. Studies on antibiooxidation of ginkgo protein [J]. *Acta Nutrimenta Sin*, 2002, 24(2): 192-194.
- [2] Huang W, Xie B J, Wang Y, et al. Study on separation and purification of protein from ginkgo seed and its antioxidant activity [J]. *Sci Agric Sin*, 2004, 37(10): 1537-1543.
- [3] Ling Z Q, Xie B J. Effects of procyanidins extract from the Lotus seedpod on reactive oxygen species and lipid peroxidation [J]. *Acta Nutrimenta Sin*, 2002, 24(2): 121-125.
- [4] Archer S L, Nelson D P, Weir E. Detection of activated O<sub>2</sub> species *in vitro* and in rat lungs by chemiluminescence [J]. *J Appl Physiol*, 1989, 67: 1912-1921.
- [5] Demiryurek A T, Wainwright C L, Wadsworth R M, et al. Characterization of a method for the detection of drugs with free radical scavenging activity using porcine leukocytes [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 1994, 32: 35-40.
- [6] Guo A G, Wang Z Y. Antioxidation of Pyrogallol-chemiluminescence assay for superoxide dismutase activity [J]. *Plant Physiol Commun*, 1989, 3: 54-57.
- [7] Hu T X. *Progress of Free Radical of Life Science* (生命科学的自由基研究进展) [M]. Vol 5. Beijing: Atomic Energy Publishing House, 1997.
- [8] Zhang E X. *Progress of Free Radical of Life Science* (生命科学的自由基研究进展) [M]. Vol 2. Beijing: Atomic Energy Publishing House, 1994.
- [9] Yldz G, Demiryurek A T. Ferrous Iron-induced Luminol chemiluminescence: a method for hydroxyl radical study [J]. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 1998, 39(3): 179-184.
- [10] Hu T X, Chen J W, Xu J Y, et al. Effects of polysaccharide-peptide of *Coriolus* and polysaccharide of *Ganoderma* on scavenging active oxygen species [J]. *Acta Biochem Biophys Sin*, 1992, 24(5): 465-470.
- [11] Ma W J, Cao E H, Zhang J, et al. Phenanthroline-Cu complex-mediated chemiluminescence of DNA and its potential use in antioxidation evaluation [J]. *J Photochem Photobiol B: Biol*, 1998, 44: 63-68.
- [12] Hu T X. Free radical, lipid peroxide and antioxidant determined by chemiluminescence methods [J]. *Preclinic Med Clin*, 1993, 13(2): 81-85.
- [13] Xu S H. A new chemiluminescence system for measure OH radical [J]. *J Instrum Anal*, 2000, 19(2): 11-13.
- [14] Zhang J, Cao E H, Qin J F. Study on mechanism of antioxidant protection against DNA damage [J]. *Acta Biophys Sin*, 1997, 13(1): 123-127.
- [15] Ma W J, Cao E H, Zhang J. Structure analysis and theory calculation of protecting effect of over ten antioxidants on damaged DNA [J]. *Acta Biophys Sin*, 1998, 14(1): 155-160.
- [16] Xie L T. Protector protein—a new antioxidative protein and its biologic activity [J]. *Acad J Guangzhou Med Coll* (广州医学院学报), 1999, 27(3): 80-83.
- [17] Ren G P, Yu B, Li S L. Antioxidative ability of protein and its ramification [J]. *Chin Lipids*, 1997, 22(4): 47-50.

## 灌胃养阴通脑颗粒大鼠血浆中川芎嗪的HPLC法测定

张国平<sup>1</sup>,郭莹<sup>2</sup>,张莉<sup>2</sup>,樊守艳<sup>2</sup>,韩进<sup>2</sup>,余勤<sup>2</sup>,潘远江<sup>1</sup>,万海同<sup>2\*</sup>

(1. 浙江大学医学院附属第二医院, 浙江 杭州 310009; 2. 浙江中医药大学心脑血管病研究所, 浙江 杭州 310053)

**摘要:**目的 建立HPLC测定大鼠灌胃养阴通脑颗粒有效部位组合后血浆中川芎嗪质量浓度的方法。方法 以乙腈提取处理血浆,以安眠酮为内标,甲醇-水(55:45)为流动相,ODS C<sub>18</sub>色谱柱(150 mm×4.6 mm, 5 μm)为固定相,体积流量为1.0 mL/min,以紫外检测器在279 nm波长下测定血浆中川芎嗪。结果 川芎嗪在0.11~22 μg/mL线性关系良好,平均回收率为102.98%,RSD<10%,最低检测限为0.21 ng,血浆中最低检测质量浓度为0.042 μg/mL。结论 此法灵敏、可靠,可较好地用于口服养阴通脑颗粒有效部位组合后血浆中的川芎嗪的测定,为测定中药复方体内有效成分提供方法。

**关键词:**养阴通脑颗粒;川芎嗪;血药浓度;高效液相色谱

**中图分类号:**R286.02

**文献标识码:**B

**文章编号:**0253-2670(2007)05-0690-03

收稿日期:2006-07-03

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30371789;30672652);浙江省自然科学基金项目(Z 204424)

作者简介:张国平(1967—),男,浙江嵊州人,主治医师,硕士,主要从事脑血管病的中西医结合临床与实验研究。

Tel: (0571)87783511 E-mail: zhangguoping@zj.com

\* 通讯作者 万海同 E-mail: wanhaitong@zjctcm.net