

基于石墨烯纳米酶效应构建民族药醉马草抗氧化活性测定方法

董旭, 郭华, 兰玮妃, 周文斌, 申刚义*

中央民族大学药学院 民族医药教育部重点实验室(中央民族大学), 北京 100081

摘要:目的 利用石墨烯纳米酶优良的类过氧化物酶活性, 构建药物抗氧化活性测定新方法; 并实际用于民族药醉马草抗氧化活性的测定。方法 在优化 H_2O_2 浓度和反应时间的基础上, 对 18 批醉马草样品进行抗氧化活性测定。同时采用 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)法作为方法对照。使用 Bland-Altman、Passing-Bablok 回归法, 对 2 种方法测定结果进行比较。结果 利用纳米酶法, 测得 18 个批次醉马草的抑制率在 37.28%~71.58%, 平均值为 50.87%, 中位数为 47.09%; 利用 DPPH 法, 测得的自由基清除率在 36.06%~83.11%, 平均值为 54.89%, 中位数为 50.83%。统计结果显示, 纳米酶法和 DPPH 法的测定值相近; 2 种方法之间存在线性关系, 且可以通过 Passing-Bablok 回归法实现不同方法的相互转化。结论 成功将石墨烯纳米酶应用到抗氧化活性检测, 避免了试剂光敏感问题, 缩短了反应时间, 减少了药材用量, 且结果与经典 DPPH 法一致。同时也显示了醉马草具有抗氧化活性, 为进一步探究其生物活性奠定了基础。

关键词: 纳米酶; 石墨烯; 醉马草; 抗氧化活性; 一致性检验; 民族药; DPPH 法; Bland-Altman 回归法; Passing-Bablok 回归法

中图分类号: R286.02

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2020)12-3246-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.12.016

Establishment of antioxidative activity determination for *Achnatherum inebrians* by graphene nanoenzyme

DONG Xu, GUO Hua, LAN Wei-fei, ZHOU Wen-bin, SHEN Gang-yi

Key Laboratory of Ethnomedicine, Ministry of Education, School of Pharmacy, Minzu University of China, Beijing 100081, China

Abstract: **Objective** To develop a new method for the determination of anti-oxidant activity of drugs by using the peroxidase activity of graphene nanoenzyme, and apply it for the determination of the anti-oxidant activity of the national medicine *Achnatherum inebrians*. **Methods** The anti-oxidant activity of 18 batches of samples was measured after optimizing H_2O_2 concentration and reaction time. At the same time, the anti-oxidative activity was measured again using the DPPH method. The Bland-Altman and Passing-Bablok regression methods were used to compare the detection data of the two methods. **Results** Using the nanoenzyme method, the inhibition rates of 18 batches of *A. inebrians* were between 37.28% and 71.58%, with an average of 50.87% and a median of 47.09%. Free radical scavenging rates of 18 batches of *A. inebrians* measured by the DPPH method were between 36.06% and 83.11%, with an average of 54.89% and a median of 50.83%. The statistical results showed that the measured values of nanoenzyme method and DPPH method were similar; There was a linear relationship between the two methods, and different methods can be transformed by Passing-Bablok regression method. **Conclusion** The graphene nanoenzyme was successfully applied to the detection of anti-oxidant activity, and the anti-oxidant activity of *A. inebrians* was also found. The nanoenzyme method can avoid the problem of light sensitivity of the reagent, shorten the reaction time, reduce the amount of medicinal solution, and the results are consistent with the DPPH method, which is suitable for the determination of antioxidant activity.

Key words: nanoenzyme; graphene; *Achnatherum inebrians* (Hance) Keng; anti-oxidant activity; consistency test; ethnomedicine; DPPH method; Bland-Altman regression method; Passing-Bablok regression method

收稿日期: 2019-12-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(81573834); 民族医药教育部重点实验室(中央民族大学)自主课题(KLEM-ZZ201808); 中央民族大学青年教师科研能力提升计划项目(2019QNPY67)

作者简介: 董旭, 女, 硕士研究生, 主要研究方向为中药与民族药分析方法的开发。E-mail: dongxu_pharmacy@163.com

*通信作者 申刚义, 男, 副教授, 主要研究方向为中药与民族药分析方法的开发。Tel: (010)68939942 E-mail: shengyi@muc.edu.cn

现代医学研究表明,过多的自由基容易引起衰老或心血管疾病,甚至肿瘤^[1]。由于抗氧化剂具有清除自由基作用,因此,合理地利用抗氧化活性物质可有效预防和治疗某些疾病并延缓衰老^[2]。发展准确测量物质抗氧化活性的方法,成为抗氧化药物研发的基础。目前,药物抗氧化活性的测定方法有多种,包括 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)法、ABST 法、Fe³⁺还原/抗氧化能力(FRAP)法、生物化学发光(CL)法^[3]以及 HPLC-DAD-CL 体系、HPLC-DPPH 体系、HPLC-ABTS 体系等^[4]。这些方法虽优势明显,但仍有不足之处。如 DPPH 法必须在避光条件下进行,且反应时间 30 min 较长,如需进行批量测定,则耗时更甚。而 HPLC-DAD-CL 法设备昂贵成本高,难以推广。因此,发展新型的兼具快速、简便、经济的测定方法仍有必要。

新材料的发展为开发抗氧化活性测定方法开辟

了新的方向^[5]。石墨烯是一类具有优良的类过氧化物酶活性的二维纳米材料。它具有丰富的比表面积、良好的催化性能^[6-8]。其检测原理如图 1 所示,石墨烯可以使 H₂O₂ 产生羟基自由基(•OH),并氧化底物 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)生成蓝色产物氧化 TMB(Ox-TMB);加入抗氧化活性物质后,与 •OH 发生反应,导致后者减少而不能氧化 TMB。反应被抑制,Ox-TMB 减少,蓝色变浅。由于石墨烯纳米酶简单易制、性质稳定、反应条件温和,在可视化检测方面潜力巨大,目前已经应用于葡萄糖和血糖、半胱氨酸、谷胱甘肽制剂等检测^[9]。另一方面,中药材中蕴含丰富且类型多样的活性成分,是抗氧化药物筛选的重要源泉。特别是民族药用植物为抗氧化药物的研发提供了得天独厚的资源优势。综上所述,本实验计划拓展石墨烯的应用,拟将其应用于民族药醉马草的抗氧化活性检测中。

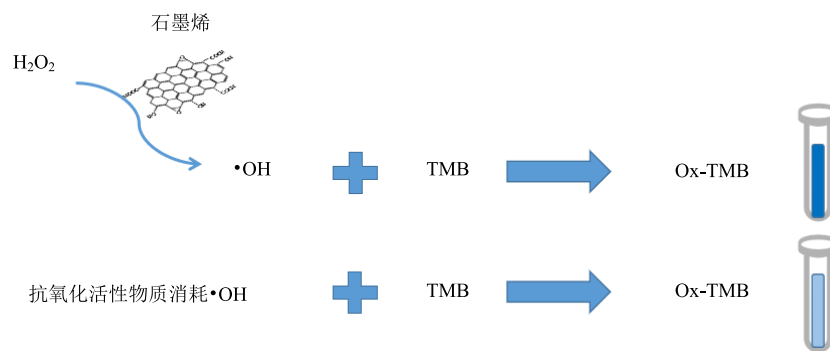


图 1 石墨烯纳米酶催化及抑制原理示意图

Fig. 1 Catalysis and inhibition mechanism of graphene nanoenzyme

醉马草 *Achnatherum inebrians* (Hance) Keng 是禾本科芨芨草属植物,广泛分布于我国甘肃、内蒙古、新疆、宁夏、青海等地^[10]。醉马草存在严重的同物异名现象,其别名包括药老、醉针茅、药草、米米蒿、德里松-霍尔、得里斯-霍尔、阿尔善^[11]等。《中医辞海》将醉马草称作药老,并记载其具有治疗腮腺炎、关节疼痛等作用^[12]。醉马草成分复杂。研究显示醉马草中含有生物碱、黄酮类、酚类、鞣质、有机酸、甾体和三萜类化合物等活性成分^[13-15]。本课题组也从醉马草中提取分离到丁香醛等苯甲醛/酮类活性成分^[16]。其中的黄酮类、酚类和萜类等物质均为抗氧化活性成分。然而对醉马草的抗氧化活性研究尚未见文献报道。

基于此,本研究选取醉马草为对象,在构建新方法同时,对醉马草的生物活性进行探究。并选用 DPPH 法作为对比,通过统计学手段与现有的 DPPH

法进行比较,确定方法的可靠性与可行性。期望能够广泛应用于中药的抗氧化活性检测中。

1 材料与仪器

1.1 试药

醉马草编号及采集地点见表 1。各批次药材均经过中国科学院植物研究所陈文俐研究员进行种属鉴定,均为禾本科芨芨草属植物醉马草 *Achnatherum inebrians* (Hance) Keng 的干燥全草。

1.2 仪器

Phenix UV 1700 PC 型紫外分光光度计,上海凤凰光学仪器有限公司;KQ-500 B 型超声波清洗器,昆山市超声仪器有限公司;Qilinbeier Vortex-5 涡旋混合器,海门市其林贝尔仪器制造有限公司;H₂O₃-PRO 保温计量槽,卡尤迪生物科技有限公司;Sartorius PB-10 pH 计,Sartorius 公司;XP 205 型电子分析天平,瑞士 Mettler Toledo 公司;Alpha1-2

表 1 醉马草批次及采集地点

Table 1 Origins of collected *A. inebrians*

编号	采集地	采集时间	编号	采集地	采集时间	编号	采集地	采集时间
S1	内蒙古巴彦淖尔	2018-10	S7	甘肃张掖	2019-07	S13	内蒙古乌拉特后旗	2019-07
S2	内蒙古巴彦淖尔	2015-05	S8	甘肃张掖	2019-07	S14	内蒙古乌拉特后旗	2019-07
S3	内蒙古巴彦淖尔	2015-05	S9	内蒙古阿拉善左旗	2019-09	S15	内蒙古乌拉特后旗	2019-07
S4	内蒙古阿拉善	2015-05	S10	甘肃天祝	2019-07	S16	内蒙古乌拉特后旗	2019-07
S5	新疆木垒	2015-03	S11	内蒙古阿拉善左旗	2019-09	S17	内蒙古乌拉特后旗	2019-07
S6	新疆木垒	2018-06	S12	内蒙古乌拉特后旗	2019-07	S18	内蒙古阿拉善左旗	2019-09

型冻干机, 德国 Marin Christ 公司; NW10VF 超纯水系统, 上海康雷分析仪器有限公司; 计时器。

1.3 试剂

羧基化氧化石墨烯 (GO-COOH), 先丰纳米材料科技有限公司; TMB, 上海源叶生物科技有限公司; H_2O_2 , 30%, 北京化工厂; DPPH, 批号 LOT W27F10E81251, 上海源叶生物科技有限公司; 维生素 C (VC), 上海源叶生物科技有限公司; 实验过程中所用化学试剂除特殊说明外, 均为分析纯。实验用水为超纯水。

2 方法

2.1 溶液的制备

2.1.1 醉马草供试品溶液的制备 各批醉马草药材阴干后粉碎处理。分别称取 10.0 g 各批次药材粉末, 加入 100 mL 无水乙醇浸泡 2 h。超声 2 h, 超声功率为 500 W, 减压抽滤后再次加入 100 mL 无水乙醇超声 2 h, 随后按照相同的操作第 3 次超声 2 h。旋蒸后 (旋蒸温度 50 $^{\circ}\text{C}$) 将浓缩物真空冷冻干燥 12 h, 得到冻干粉 (得率 1.00%~1.10%), 备用。

精密称取 8.0 mg 各批次醉马草冻干粉, 加入无水乙醇溶解, 制成 1 mg/mL 冻干粉溶液。

2.1.2 GO-COOH 纳米酶溶液的制备 取 1 mL GO-COOH 溶液 (2 mg/mL), 混悬于 3 mL 三蒸水中, 超声 1 h, 即得。

2.1.3 H_2O_2 溶液的配制 移取 200 μL H_2O_2 , 加入

三蒸水至 8 mL, 使用涡旋混合器混匀, 得到母液。按需求用三蒸水稀释 H_2O_2 母液, 得到不同浓度的 H_2O_2 溶液备用。

2.1.4 DPPH 无水乙醇溶液的配制^[17] 精密称取 2.0 mg DPPH 粉末, 加无水乙醇溶解后分次转移至 50 mL 棕色量瓶中, 继续加无水乙醇定容并摇匀, 注意避光, DPPH 溶液临用现配。

2.1.5 VC 溶液的配制 精密称取 1.0 mg VC 粉末, 加三蒸水溶解后分次转移至 100 mL 量瓶中, 继续加水定容并摇匀, 即得。VC 溶液临用现配。

2.2 数据分析

采用 MedCalc 19.1.1 统计软件进行 Bland-Altman、Passing-Bablok 一致性检验。

2.3 醉马草药材的抗氧化活性观察

醉马草药材的抗氧化活性通过 DPPH 法和纳米酶法 2 种方法进行考量。

2 种方法均设置对照组与给药组, 按表 2 所示的方法进行反应, 观察与对照组相比, 给药组颜色是否变浅。

2.4 纳米酶法抗氧化活性测定

2.4.1 纳米酶法测量抗氧化活性过程中反应时间的选择 给药组和对照组按表 2 中纳米酶法的体积及浓度反应, 混匀后每隔 1 min, 在 652 nm 下测量吸光度 (A) 值。

2.4.2 纳米酶法测量抗氧化活性过程中 H_2O_2 浓度

表 2 DPPH 法与纳米酶法抗氧化活性的反应条件

Table 2 Reaction conditions of DPPH method and nanoenzyme method for anti-oxidant activity

方法	试剂浓度	对照组	给药组	反应条件	结果测量
DPPH 法	0.1 mmol·L ⁻¹ DPPH	4 mL DPPH+1 mL 无水乙醇	4 mL DPPH+1 mL 醉马草 S5 批冻干粉溶液	充分混合, 避光反应 30 min	515 nm 下测量 A
纳米酶法	0.5 mg·mL ⁻¹ GO-COOH; 250 mmol·L ⁻¹ H_2O_2 溶液; 10 mmol·L ⁻¹ TMB; pH 4.0 醋酸缓冲液 (离子强度 0.4 mmol·kg ⁻¹)	40 μL GO-COOH+50 μL H_2O_2 +40 μL TMB+370 μL 醋酸缓冲液	40 μL GO-COOH+50 μL H_2O_2 +40 μL TMB+25 μL 醉马草 S5 批冻干粉溶液+345 μL 醋酸缓冲液	充分混合, 35 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min	652 nm 下测量 A

的选择 按“2.1.3”项方法配制 H_2O_2 溶液, 使用三蒸水进行稀释, 使反应浓度分别为 1、5、10、15、20、25 mmol/L。

按表 2 中纳米酶法的体积及浓度反应 10 min, 然后在 652 nm 测定不同 H_2O_2 浓度下的 A 值。

2.4.3 纳米酶法测量醉马草的抗氧化活性 给药组: 在 345 μL 醋酸缓冲液中加入 25 μL 各批次醉马草冻干粉溶液与 40 μL 0.5 mg/mL GO-COOH 溶液、50 μL 250 mmol/L H_2O_2 溶液、40 μL 10 mmol/L TMB 溶液充分混合, 在 35 $^{\circ}\text{C}$ 条件下反应 10 min, 波长 652 nm 下测量 A 值, 平行测定 3 次, 取平均值, 得 A_1 ; 阴性组: 以醋酸缓冲液代替醉马草冻干粉溶液和 GO-COOH 溶液, 其他条件同上, 得 A_0 ; 对照组: 以醋酸缓冲液代替醉马草冻干粉溶液, 其他条件同上, 得 A_2 。将 A_1 与 A_2 扣除背景值 A_0 后, 按以下公式计算抑制率。

$$\text{抑制率} = (A_2 - A_1) / A_2$$

将各批次醉马草按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液, 按本项方法连续 3 d 重复测定, 得到其抗氧化活性, 以抑制率表示。

2.4.4 纳米酶法测量抗氧化活性的线性关系考察 精密称取 2.0 mg 醉马草 S5 批次冻干粉, 加入无水乙醇, 使成 2 mg/mL 母液。在此基础上继续使用无水乙醇稀释, 使反应质量浓度分别为 1、5、10、25、50、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。按“2.4.3”项下方法反应 10 min, 652 nm 下测定 A 值。

2.5 DPPH 法测量醉马草抗氧化活性

2.5.1 DPPH 法测量醉马草的抗氧化活性 给药组: 精密移取 1 mL 各批次药材冻干粉溶液和 4 mL DPPH 于试管, 摇匀, 避光反应 30 min, 随后在 515 nm 下测定, 得 A_1 。空白组: 以无水乙醇代替 DPPH 溶液, 同等条件下反应 30 min 后, 在 515 nm 下测定, 得 A_2 。阴性组: 以无水乙醇代替各批次药材冻干粉溶液, 同等条件下反应 30 min 后, 在 515 nm 下测定, 得 A_0 。

$$\text{清除率} = 1 - (A_1 - A_2) / A_0$$

按本项方法连续 3 d 重复测定, 得到其抗氧化活性, 以自由基清除率表示。

2.5.2 DPPH 法测量抗氧化活性的线性关系考察 按“2.1.5”项方法配制维生素 C (VC, 0.01 mg/mL) 溶液。

反应组: 精密移取 1 mL 不同浓度 VC 溶液和 4 mL DPPH 溶液于试管, 摇匀, 避光放置 30 min, 515

nm 下测定 A_1 。空白组: 以无水乙醇代替 DPPH 溶液, 同等条件下反应 30 min 后, 在 515 nm 下测定 A_2 。阴性组: 以三蒸水代替 VC 溶液, 同等条件下反应 30 min 后, 515 nm 下测定 A_0 。

$$\text{清除率} = 1 - (A_1 - A_2) / A_0$$

3 结果与分析

3.1 醉马草药材的抗氧化活性测定

根据“2.3”项反应得到结果如图 2 所示。图 2-a 是 DPPH 法测量醉马草抗氧化活性实验图。可以看出, 加入醉马草后, 颜色变浅, 这表明其具有抗氧化活性; 图 2-b 是本次拟开发的纳米酶法测量醉马草抗氧化活性实验图。可以发现加入醉马草后, 能抑制催化反应产物, 导致蓝色变浅。进一步表明醉马草具有抗氧化活性。

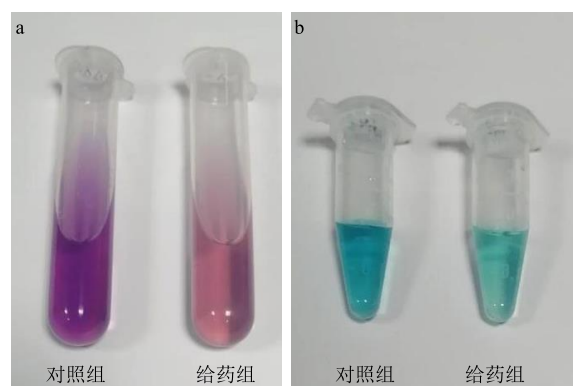


图 2 DPPH (a) 及纳米酶法 (b) 测量醉马草粗提物抗氧化活性实验

Fig. 2 Anti-oxidative activity in *A. inebrians* determined by DPPH method (a) and nanoenzyme method (b)

3.2 纳米酶法抗氧化活性测定条件的优化

3.2.1 反应时间的选择 反应时间直接影响到反应的抑制效率。有必要对反应时间进行考察, 并选取反应所需的最短时间。按照“2.4.1”项实验操作进行反应, 结果如图 3 所示, 前 6 min 抑制率迅速增加, 随后放缓, 第 10 分钟时已经达到平稳, 后续变化缓慢。因此, 为了保证结果的准确性, 同时缩短分析时间, 选择 10 min 作为反应时间。

3.2.2 H_2O_2 浓度的选择 H_2O_2 经纳米酶催化所产生的 $\cdot\text{OH}$ 是抗氧化剂的消耗目标, 也是定量测定的关键。因此, 有必要对 H_2O_2 的反应浓度进行考察。按照“2.4.2”项实验操作进行反应, 结果如图 4 所示, 随着 H_2O_2 浓度的增加, A 值快速增加, 随后缓慢增加至趋于平稳。这表明代表 H_2O_2 所产生的 $\cdot\text{OH}$ 基本消耗完全, 抑制反应到达终点。因此, 最终选

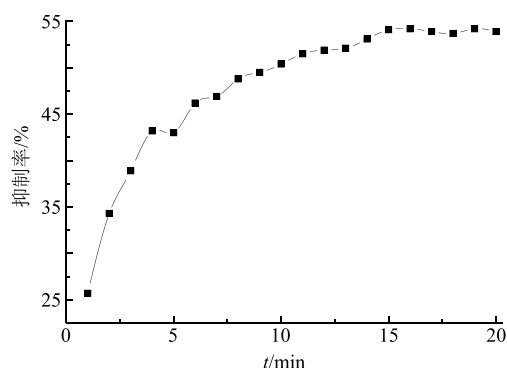
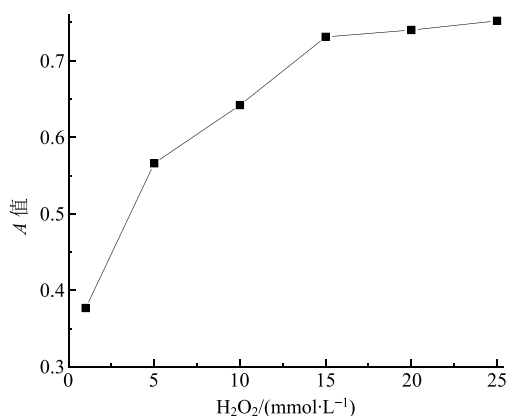


图3 纳米酶法测定抑制率随时间的变化曲线

Fig. 3 Curve of inhibition rate with time measured by nanoenzyme method

图4 H₂O₂ 浓度对反应的影响Fig. 4 Effect of H₂O₂ concentration on reaction of determination of inhibition

取 25 mmol/L 作为 H₂O₂ 反应浓度。

3.3 GO-COOH 纳米酶法测量醉马草抗氧化活性及线性关系考察

按“2.4.3”项下方法,连续 3 d 重复测量,得到各批次醉马草的抗氧化活性,以抑制率表示。结果表明,18 个批次醉马草的抑制率在 37.28%~71.58%,平均值为 50.87%,中位数为 47.09%。具体结果见表 3。

按“2.4.4”项方法进行线性关系考察。以 *A* 值为纵坐标 (*Y*),醉马草 S5 批次冻干粉溶液反应质量浓度为横坐标 (*X*),绘制标准曲线,结果如图 5 所示。线性回归方程为 $Y = -0.004 X + 0.963 5$, $r^2 = 0.992 8$,结果表明在反应质量浓度 1~100 μg/mL 时线性关系良好。

3.4 DPPH 法测量醉马草抗氧化活性及线性关系考察

按“2.5.1”项下方法,连续 3 d 重复测量,得到各批次醉马草的抗氧化活性,以自由基清除率表

表3 纳米酶法测量醉马草抗氧化活性结果

Table 3 Anti-oxidative activity of *A. inebrians* determined by nanoenzyme method

批次	抑制率/%			$\bar{x} \pm s$
	第 1 天	第 2 天	第 3 天	
S1	51.357	57.289	47.599	52.082 ± 4.886
S2	47.234	47.286	35.978	43.499 ± 6.514
S3	60.960	62.317	52.749	58.675 ± 5.177
S4	39.927	44.937	38.674	41.179 ± 3.314
S5	46.103	47.808	42.223	45.378 ± 2.862
S6	66.684	62.022	59.830	62.845 ± 3.501
S7	37.387	45.772	46.312	43.157 ± 5.004
S8	34.830	38.935	38.065	37.276 ± 2.164
S9	51.340	51.496	48.469	50.435 ± 1.704
S10	47.756	51.566	47.095	48.806 ± 2.413
S11	50.609	50.313	53.775	51.565 ± 1.919
S12	51.757	49.078	52.157	50.997 ± 1.674
S13	52.122	54.054	50.939	52.372 ± 1.572
S14	61.430	61.204	58.977	60.537 ± 1.356
S15	74.322	69.120	71.312	71.585 ± 2.612
S16	32.168	52.731	63.987	49.629 ± 16.135
S17	43.685	41.145	41.127	41.986 ± 1.472
S18	54.836	53.184	52.888	53.636 ± 1.050

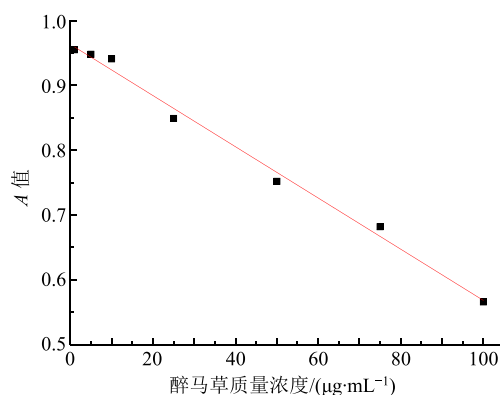
图5 纳米酶法的醉马草 *A* 值线性曲线

Fig. 5 Standard curve of anti-oxidative activity determined by nanoenzyme method

示。结果显示 18 个批次醉马草的清除率在 36.06%~83.11%,平均值为 54.89%,中位数为 50.83%。具体结果见表 4。将 VC 作为阳性对照药物,在 VC 质量浓度为 100 μg/mL 时,清除率为 29.53%。通过比较表 3 和表 4 数据,可以发现纳米酶法测定结果的标准差 (*s*) 总体低于 DPPH 法,表明该方法具有良好的稳定性和重现性。

表 4 DPPH 法测量醉马草抗氧化活性结果

Table 4 Anti-oxidative activity of *A. inebrians* determined by DPPH method

批次	清除率/%			$\bar{x} \pm s$
	第 1 天	第 2 天	第 3 天	
S1	53.54	52.66	49.80	52.00 ± 1.96
S2	52.74	41.04	40.52	44.77 ± 6.91
S3	42.08	35.46	30.64	36.06 ± 5.74
S4	54.81	49.23	48.50	50.85 ± 3.45
S5	59.75	41.58	37.03	46.12 ± 12.02
S6	78.52	71.83	74.55	74.97 ± 3.36
S7	67.70	64.09	64.07	65.29 ± 2.09
S8	60.54	52.39	53.79	55.57 ± 4.36
S9	37.26	37.27	68.35	47.63 ± 17.95
S10	54.02	47.97	50.40	50.80 ± 3.04
S11	26.17	22.51	76.26	41.65 ± 30.03
S12	83.53	81.37	84.43	83.11 ± 1.57
S13	40.41	54.91	55.99	50.44 ± 8.70
S14	38.27	50.95	51.00	46.74 ± 7.34
S15	51.39	66.34	68.06	61.93 ± 9.17
S16	60.38	76.15	76.65	71.06 ± 9.25
S17	51.31	64.54	72.16	62.67 ± 10.55
S18	34.63	36.05	68.35	46.34 ± 19.07

按“2.5.2”项方法进行线性关系考察。如图 6 所示。线性回归方程为 $Y = -0.0026X + 1.0294$, $r^2 = 0.9994$, 结果表明, VC 反应质量浓度在 1~250 $\mu\text{g/mL}$ 时线性关系良好。

3.5 2 种方法测量结果的比较

将 2 种方法的平均值导入 SPSS 软件中, 利用配对 t 检验, 按 $\alpha = 0.05$ 水准, 2 种方法的测量结果

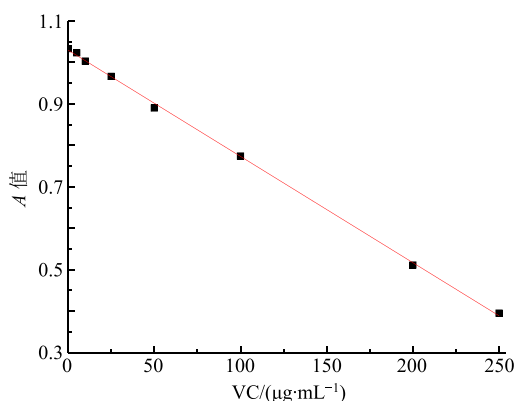


图 6 DPPH 法的 VC 线性曲线

Fig. 6 Standard curve of anti-oxidative activity of VC determined by DPPH method

差值无显著性差异, P 值为 0.261。继续分别利用统计学中的 Bland-Altman 和 Passing Bablok 回归法对 2 种方法进行一致性检验。

3.5.1 Bland-Altman 法 利用 MedCalc 统计软件, 采用 Bland-Altman 法进行一致性检验。将 2 种方法测量的均值输入软件。如图 7 所示, X 轴为经典方法 DPPH 法的差值, Y 轴为 DPPH 法与纳米酶法的差值。结果表明, 100% (18/18) 的点都分布在 95% LoA 以内, 差值的平均值为 4.0%, 证明结果具有一致性。

3.5.2 Passing & Bablok regression 法 为了进一步说明 2 种方法得出的结果具有一致性, 利用 MedCalc 软件, 以纳米酶法抑制率为横坐标, 以 DPPH 法清除率为纵坐标, 绘制 Passing & Bablok regression 回归曲线。图 8 显示纳米酶法和 DPPH 法的测量结果具有一致性, 且回归方程为 $Y = 2.134X - 56.255$ 。

3.6 纳米酶法与 DPPH 法的对比

表 5 对 2 种测定方法进行了对比。可以看出,

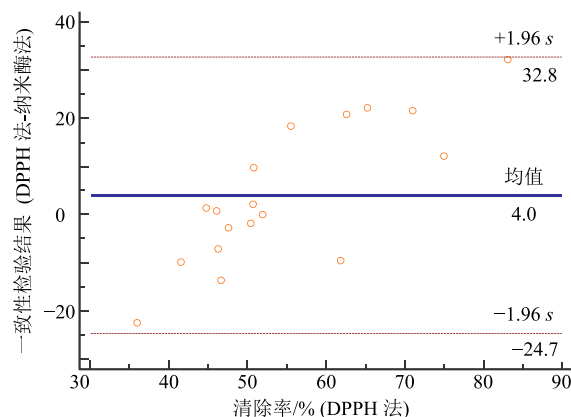


图 7 Bland-Altman 法结果

Fig. 7 Result of Bland-Altman method

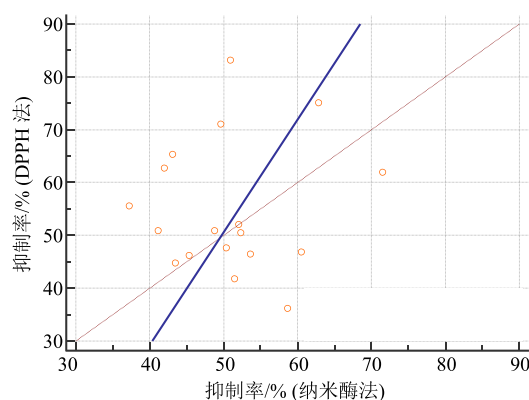


图 8 Passing & Bablok regression 法结果

Fig. 8 Result of Passing & Bablok regression method

表 5 纳米酶法与 DPPH 法的对比

Table 5 Comparison of nanoenzyme method and DPPH method

测定方法	反应条件	反应体积	药材体积	反应时间/min	反应限制	反应机制	检测成本
纳米酶法	35 ℃	500 μL	25 μL	10	无	与 OH ⁻ 自由基定量作用	0.075 元/次
DPPH 法	室温	5 mL	1 mL	30	需避光	与 DPPH 自由基定量作用 ^[18]	0.192 元/次

纳米酶法无需避光、反应时间短，并且用药量少、成本低，适合药材量有限或者昂贵药材的测定。

与 DPPH 法相比，纳米酶法的反应温度为 35 ℃，但它更接近于人体生理温度，所测值能反映真正的抗氧化活性。

4 讨论

发展构建了一种基于 GO-COOH 类过氧化物酶功能的中药材抗氧化活性的检测方法，以醉马草为对象进行了抗氧化性能的测定。同时利用统计学方法进行了方法学验证。与现有方法相比，该方法具有简便快速、成本低廉、稳定性好等优点。目前，实验仅选取醉马草作为检测对象进行研究，期待下一步选择更多的具有抗氧化活性的中药或民族药物为检测对象，为中药和民族药物的抗氧化活性检测提供技术支持。

参考文献

- [1] Phaniendra A, Jestadi D B, Periyasamy L. Free radicals: Properties, sources, targets, and their implication in various diseases [J]. *Ind J Clin Biochem*, 2015, 30(1): 11-26.
- [2] 邱妍川, 韦丽佳, 李琳, 等. 基于 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼检测中药抗氧化成分的方法及其原理研究进展 [J]. *中国药房*, 2016, 27(19): 2718-2721.
- [3] 李秋红, 李廷利, 黄莉莉, 等. 中药抗氧化的作用机理及评价方法研究进展 [J]. *时珍国医国药*, 2008, 19(5): 1257-1258.
- [4] 王璐, 孙莉琼, 苏航, 等. 联用技术在自由基清除物筛选中的应用 [J]. *中草药*, 2012, 43(5): 1032-1036.
- [5] 罗成, 李艳, 龙建纲. 纳米材料模拟酶的应用研究进展 [J]. *中国科学: 化学*, 2015, 45(10): 1026-1041.
- [6] 申玉坤, 申玉璞, 潘一峰, 等. 氧化石墨烯对多烯紫杉

醇的高效装载和缓释性能及其经皮给药的渗透性研究 [J]. *中草药*, 2019, 50(12): 2830-2834.

- [7] Lan J M, Xu W M, Wan Q P, *et al.* Colorimetric determination of sarcosine in urine samples of prostatic carcinoma by mimic enzyme palladium nanoparticles [J]. *Anal Chim Acta*, 2014, 825(5): 63-68.
- [8] 俞文英, 马建琦, 方杰, 等. 冬凌草甲素聚乙二醇功能化氧化石墨烯纳米粒的制备及抗结肠癌实验研究 [J]. *中草药*, 2017, 48(19): 3954-3960.
- [9] 董旭, 郭华, 闫春林, 等. 基于石墨烯纳米酶效应的谷胱甘肽含量的测定 [J]. *化学通报*, 2019, 82(7): 659-662.
- [10] 张树仁, 艾铁民. 中国药用植物志第十一卷 [M]. 北京: 北京大学出版社, 2014.
- [11] 南京中医药大学. 中药大辞典 [M]. 南京: 上海科学技术出版社, 2006.
- [12] 袁钟. 中医辞海 中册 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 1999.
- [13] 颜世利, 巴杭, 阿吉艾克拜尔. 新疆醉马草化学成分的研究 [J]. *天然产物研究与开发*, 2004, 16(5): 395-398.
- [14] 张伟, 李冠. 醉马草化学成分预试及毒性部位筛选 [J]. *动物医学进展*, 2006, 27(7): 97-99.
- [15] 桑明, 张继, 姚健, 等. 醉马草毒性成分的分析研究 [J]. *畜禽业*, 2006, 9(12): 9-11.
- [16] 王嫚. 基于 SPR 技术靶向筛选醉马草中与 α-甘露糖苷酶相互作用的活性成分 [D]. 北京: 中央民族大学, 2019.
- [17] 肖作为, 谢梦洲, 甘龙, 等. 山银花、金银花中绿原酸和总黄酮含量及抗氧化活性测定 [J]. *中草药*, 2019, 50(1): 210-216.
- [18] 韦献雅, 殷丽琴, 钟成, 等. DPPH 法评价抗氧化活性研究进展 [J]. *食品科学*, 2014, 35(9): 317-322.