

TU-1901 分光光度计时间扫描结果的图谱处理

池明宇 张澄波 郑贵元 金星光

(全国中医血栓病医疗中心 沈阳 110101)

摘要 以测定绞股蓝, 丹参, 黄芪, 何首乌, 红花等等若干中药提取物的自由基清除作用为例介绍 TU-1901 分光光度计时间扫描功能的使用, 将所有扫描结果置于同一图。观察 DPPH· (二苯代苦味肼基自由基) 溶液和中药提取物作用后 OD_{517nm} 光密度的变化发现, 各种中药水提取物显示不同的清除自由基能力, 不同次的时间扫描结果可以置于同一图中。证明 TU-1901 分光光度计时间扫描的方法可快速检测出中药提取物的自由基清除剂, 本研究还为该仪器开发出将所有时间扫描结果置于同一图中的功能。

关键词 DPPH 自由基清除剂 分光光度法

1 前言

TU-1901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器公司)具有先进的时间扫描的功能, 可以用于观察光密度随时间而变化的反应系统并记录完整的反应过程, 因此有广泛的用途。本文以测定中药自由基清除剂为例说明使用方法。

自由基测定选用 DPPH· (二苯代苦味肼基自由基) 法。该法的原理是: DPPH· 是一种稳定的自由基, 其醇溶液呈深紫色, 在 517nm 处有一吸收峰。当反应系统中存在自由基清除剂时, 它可以和 DPPH· 的单电子配对, 而使 517 nm 处的吸收峰渐渐消退。根据消退速度和峰值改变程度可了解反应系统中自由基清除剂的反应速度和能力^{[1][2]}。与其他方法相比, 用 DPPH· 筛选自由基清除剂具有简便, 快速的优点。本法既可测定纯化合物, 也可测定混合物。

使用 UV-1901 双光束紫外可见分光光度计的时间扫描功能可以很方便的完成上述测定。但进行时间扫描时, 只能一次观察

一个反应并记录之。最后当我们欲将所有结果置于同一图中, 以便比较时, 发现仪器说明书上无此功能介绍, 也无文献及其他资料可供借鉴。是本设备没有这一功能, 还是尚未被开发? 通过对仪器的进一步研究, 终于解决了问题。本文介绍我们对 TU-1901 分光光度计时间扫描功能使用的经验。

2 实验部分

2.1 仪器和药品

2.1.1 仪器 UV-1901 双光束紫外可见分光光度计(北京普析通用仪器公司)

2.1.2 药品

DPPH· [2, 2-D (4-tert-octyl-phenyl) -1-picrylhydrazyl.] (美国 Aldrich chemical cooperation), 绞股蓝, 丹参, 黄芪, 何首乌等水提物, 浓度为生药 lg/mL。复方绞股蓝(含绞股蓝, 丹参, 黄芪等中药)水提物, 生药总量为 lg/mL。复洛红花注射液。(太原华卫药业有限公司) 血塞通注射液(昆明制药集团股份有限公司)。长龙通注射液(吉林辉南长龙生化药

业股份有限公司)。低聚花青素 (OPC) 水溶液 (10mg/mL)。

2.2 方法

配制 DPPH · 10 μ mol/L 甲醇溶液: 内含 1/4 体积的柠檬酸磷酸缓冲液 (0.2mol/L, pH5.8)。以 3mL 甲醇柠檬酸磷酸缓冲液加 10 μ L 中药提取物为空白调零。另取 3mL 上述 DPPH · 甲醇柠檬酸磷酸缓冲液, 加至另一比色杯中, 向此比色杯中加入 10 μ L 待测中药提取物, 迅速混匀, 用时间扫描或精确计时并读取不同时间的 OD 值。由读数变化计算出 OD_{517 nm} 的吸收值改变。自由基清除剂的活性用抑制百分率表示, 即抑制百分率 = $1 - [(A_0 - A_s) / A_0 \times 100\%]$ 。A₀ 是 0 秒时 DPPH · 的吸光值, A_s 是某一时刻的吸光值。

2.3 将多次扫描结果置于同一图

先将每次扫描结果保存为一个文件, 然后在 TU-1901 紫外窗口的页面用鼠标点击配置 (C)。再点击参数, 然后根据在进行时间扫描时所用的波长数, 设定波长数及所用的各个波长。确认。确认后出现一空白时间扫描图, 其纵轴是 Abs, 横轴是时间 s, 这时从波长数 0 开始逐一点击, 1, 2, 3 ……, 每激活一个波长数, 输入一个已经保存的扫描文件。最后就可将所有的扫描结果显示在同一时间扫描图上, 参见图 1。

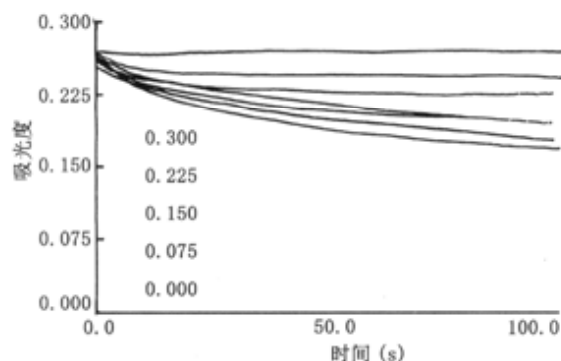


图 1 同一时间扫描图

3 结果和讨论

对复洛红花、长龙通、血塞通等用于治

疗脑卒中的中药制剂和绞股蓝、丹参等等中药水提取物抗自由基能力进行了测定, DPPH · 517nm 处吸收峰不同时间的变化值如表 1 所示。

表 1 加入若干中药后 DPPH · OD₅₁₇ 变化值

中药名称	OD ₅₁₇ 变化值			
	30	60	90	120 (sec)
夏洛红花	0.113	0.129	0.137	0.141
绞股蓝	0.120	0.128	0.132	0.141
丹参	0.133	0.134	0.134	0.134
黄芪	0.020	0.024	0.028	0.030
复方绞股蓝	0.099	0.121	0.127	0.129
何首乌	0.107	0.128	0.136	0.138
OPC	0.027	0.035	0.042	0.047
长龙通	0	0	0	0
血塞通	0	0	0	0

由 OD 值变化, 可以算出不同时间药物对 DPPH · 的抑制率, 见表 2。

表 2 若干中药对 DPPH · 的抑制率

中药名称	抑制率 (%)	
	60 (s)	120 (s)
夏洛红花	52.4	57.3
绞股蓝	52.2	57.3
丹参	57.8	57.8
黄芪	10.7	13.3
复方绞股蓝	52.6	56.1
何首乌	54.7	59.0
OPC	15.2	20.4

由表 1 可知, 复洛红花, 绞股蓝, 丹参, 何首乌水提取物具有很强的清除自由基的能力, 而且反应速度很快。黄芪则清除自由基的反应速度慢, 能力也较弱。复方绞股蓝清除自由基的能力和速度是其所含三种药物的平均值。长龙通、血塞通中主要成分是三七总皂甙, 虽有文献报道三七总皂甙具有抗氧化作用^[3]但表 1 的数据表明它没有清除 DPPH · 自由基的能力, 故它的抗氧化作用可能是通过其他机制。

为了观察自由基清除剂与 DPPH · 反应的量效关系, 加入不同量的低聚花青素

(OPC), 进行时间扫描, 得到图 2。

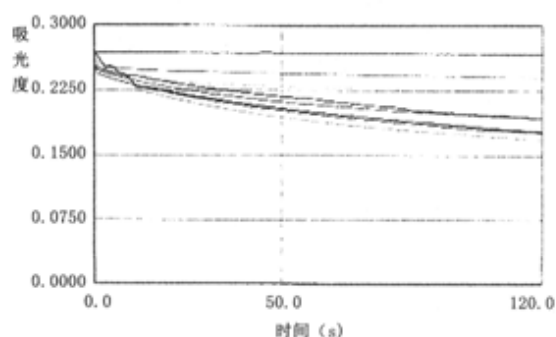


图 2 不同浓度 OPC 对自由基 DPPH· 的清除作用

自上而下 OPC 加入量: 0, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 80 μg

由图 2 可知, 在一定的浓度范围内, 本反应能反映自由基清除剂的量效关系, 判断出自由基清除剂的反应能力。

由本实验结果可知, 用 UV-1901 双光束紫外可见分光光度计的时间扫描功能可以很方便地解决从中药中寻找天然自由基清除剂的任务, 并可以对各个药物的作用强弱用图直观显示。

参 考 文 献

- [1] Ivina I. Koleva, Harm A. G. Neiderlander, Teris A. Van Beek; An on line HPLC method for detection of radical scavenging compounds in complex mixtures. Anal chem. 2000, 72: 2323
- [2] Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*. 1958; 181: 1199
- [3] 韩金安; 胡威夷: 三七总皂甙对中枢神经损伤时氧自由基病理作用的影响. 中国药理学通报, -1996, 12 (6) .487-489