

丹红、丹参和红花3种注射液 抗氧化活性比较研究*

李 晋,胡 月,葛爱华,白 洋,刘 姣,常艳旭

(天津中医药大学,天津市现代中药重点实验室,天津 300193)

摘要:[目的]对丹红、丹参、红花注射液的抗氧化活性进行比较,研究丹红、丹参、红花注射液抗氧化活性物质基础。[方法]采用清除1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)自由基、铁离子还原、亚铁离子螯合实验测定3种注射液的抗氧化活性;用高效液相色谱法对丹参和丹红注射液中主要的抗氧化活性成分进行含量测定。[结果]丹红、丹参、红花注射液均具有DPPH自由基清除能力、铁离子还原能力、亚铁离子螯合能力。[结论]丹红、丹参、红花注射液均具有良好的抗氧化活性,其物质基础与其总酚酸和总黄酮的含量密切相关。

关键词:丹红注射液;丹参注射液;红花注射液;抗氧化活性

中图分类号:R285.5

文献标志码:A

文章编号:1673-9043(2015)01-0037-05

自由基是人体内参与正常代谢的物质,但当其超过机体的清除能力时便攻击细胞内的包括DNA、蛋白质、脂质、糖类、有机酸等几乎所有的生物分子,具有很强的破坏性^[1],实验表明自由基与许多心血管疾病的发生都密切相关^[2]。适当的补充抗氧化剂能有效的促使机体内的抗氧化物质恢复到正常的水平,但人工合成的抗氧化剂存在或多或少的潜在毒性,因而从天然产物中寻找抗氧化剂成为治疗心血管疾病的一种趋势^[3]。

丹红注射液是由中药丹参、红花经过提取等制成的复方制剂,临床上主要用于治疗冠心病、心绞痛、心肌梗死等心脑血管疾病^[4-6]。现代药理研究发现,丹参注射液具有扩张冠状动脉、防止心肌缺血和心肌梗死、改善微循环、降低心肌耗氧量等作用,被广泛用于临床各种心血管疾病的治疗^[7]。红花注射液,具有活血通经,散瘀止痛的功效,用于治疗血脉闭塞、冠心病、高血压和心绞痛等^[8]。

现代研究表明,丹红、丹参、红花3种注射液均具有抗氧化活性^[9-11],均可以治疗心脑血管疾病。但

是有关丹红、丹参、红花3种注射液的抗氧化活性比较,以及抗氧化活性与有效成分之间的关联的报道相对来说较少。因此,通过1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)清除自由基能力、对铁离子的还原能力、亚铁离子螯合能力的测定,比较3种注射液的抗氧化活性大小,并测定其中总酚酸和总黄酮的含量。结果表明总酚酸和总黄酮的含量与抗氧化活性大小一致,为其临床应用提供了物质基础。

1 仪器与试剂

1.1 仪器 Agilent 1260 高效液相色谱仪,包括在线真空脱气机、高压四元梯度泵、自动进样器、柱温箱、二极管阵列检测器(DAD)(美国 Agilent 公司)。Tecan Infinite M200 Microplate Reader 多功能酶标仪(瑞士 Tecan 集团公司),Costar-3599 96 孔细胞培养板(美国 Costar 公司),FlexStation 3 多功能孔板分析仪(美国 MolecuLar Devices 公司),XW-80A 微型漩涡混合仪(上海沪西仪器厂有限公司)等。

1.2 试剂

1.2.1 试剂 抗坏血酸[维生素 C(VC)分析纯,天津市北方化玻购销中心],生育酚[维生素 E(VE)分析纯,天津市北方化玻购销中心],亚硝酸钠(天津市北方天医化学试剂厂,分析纯),三氯化铁(天津市北方天医化学试剂厂,分析纯),DPPH(美国 Sigma-aldrich 公司),硫酸亚铁(天津市北方天医化学试剂厂,分析纯),铁氰化钾(天津市北方天医化学试剂

* 基金项目:天津市应用基础与前沿技术研究计划项目(12JCQ NJC08800);天津市高等学校创新团队培养计划(TD12-5033)资助。

作者简介:李 晋(1981-),女,硕士,助理实验师,主要从事中药药理研究。

通讯作者:常艳旭,E-mail:tcmeiyx@126.com。

厂,分析纯),磷酸氢二钠(天津市北方天医化学试剂厂,分析纯),磷酸二氢钠(天津市北方天医化学试剂厂,分析纯),Ferrozine(BR-生物试剂-Biological reagent,1g 进口),三氯乙酸(天津市光复精细化工研究所),双氧水(30%),无水碳酸钠(天津市北方天医化学试剂厂,分析纯),甲酸(Tedia)水为超纯水(Milli-Q),乙腈(美国 Fisher),甲酸(高纯,含量>99.99%,美国 Tedia 天地试剂公司),其余试剂均为色谱纯。

1.2.2 药材 没食子酸,芦丁,丹参素,原儿茶酸,原儿茶醛,咖啡酸,迷迭香酸,紫草酸,迷迭香酸,丹酚酸 B,丹酚酸 A,均购自中国药品制品检定所提供且纯度均大于 98%。红花注射液、丹参注射液和丹红注射液购买于当地医院。

2 方法

2.1 DPPH 自由基清除能力的测定 分别取丹红、丹参注射液和红花注射液于 eppendorf (EP)管中,用甲醇配成一系列浓度,取 450 μL 样品加入 450 μL DPPH (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 溶液,混合室温下放置 30 min 后,测定 517 nm 波长下吸光度,以 VC 和 VE 作为阳性对照^[2],每份样品平行操作 3 次。清除率计算公式 $K=[1-(A_1-A_2)/A_0]\times 100\%$,其中 A_0 为空白对照的吸光度, A_1 为加入待测液后的吸光度, A_2 为待测液的吸光度。

2.2 3 种注射液对铁离子还原能力的测定

2.2.1 没食子酸标准曲线的制备 精密称取没食子酸(GAE)标准品 1 mg,用甲醇配成一系列浓度的标准品溶液,分别取标准品溶液加入磷酸盐缓冲溶液(0.2 mol/L,pH 6.6)和铁氰化钾(1%,质量体积比:W/V),混匀于 50 $^{\circ}\text{C}$ 下水浴 20 min。加入三氯乙酸(10%,质量体积百分比:W/V)后,取上清液用水稀释 1 倍,加入氯化铁溶液(0.1%,质量体积比:W/V),30 min 后在 700 nm 波长下测定吸光度,以甲醇-水代替没食子酸作为空白溶液,每份样品平行操作 3 次。以没食子酸的浓度(X)为横坐标,吸光度(Y)为纵坐标,绘制没食子酸的标准曲线 $\hat{Y}=0.0037X+0.0688(r^2=0.997)$ 。

2.2.2 GAE 当量的计算 分别取 3 种注射液,甲醇稀释 50 倍于 EP 管中,按照“2.2.1”项操作步骤进行实验,利用回归方程求出供试品溶液中折合没食子酸的浓度,即 GAE 当量。

空白组:超纯水代替氯化铁溶液(0.1%,质量体积比:W/V)。

2.3 3 种注射液亚铁离子螯合能力的测定 分别取 3 种注射液 1 mL,分别加入 1 mL 硫酸亚铁(FeSO_4),0.025 mmol/L,再加入 1 mL Ferrozine(0.025 mmol/L),10 min 后 562 nm 下测定其吸光度,以甲醇-水溶液代替样品作为对照,每份样品平行操作 3 次。螯合率计算公式: $(1-A_1)/A_0\times 100\%$,其中 A_1 为样品吸光度, A_0 为空白样品对照吸光度。

2.4 福林试剂法测定总酚酸含量

2.4.1 没食子酸标准曲线的制备 分别精密吸取不同体积的没食子酸(1.0 g/L)对照品溶液,用甲醇逐级稀释成 8 个浓度,分别加入 500 μL 福林试剂(1:10,体积比:V/V),混匀后加入 400 μL 的碳酸钠(Na_2CO_3 ,7.5%,质量体积比:W/V),30 $^{\circ}\text{C}$ 反应 90 min,于微型多功能酶标仪 765 nm 下测定,以待测液的本底溶液为空白对照^[3],每份样品重复 3 次。以没食子酸标准品的浓度(X)为横坐标,吸光度(Y)为纵坐标,绘制没食子酸标准曲线。回归方程为 $\hat{Y}=0.0051X+0.1066(r^2=0.999)$,在 1.5625~400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内与吸光度呈良好的线性关系。

2.4.2 样品总酚酸含量测定 分别取 3 种供试品溶液 100 μL ,按照“2.4.1”项操作步骤进行实验,利用回归方程求出供试品溶液中折合没食子酸的浓度(总酚酸),并计算 3 种注射液中总酚酸的含量。

2.5 三氯化铝比色法测定总黄酮含量

2.5.1 芦丁标准曲线制备 精密吸取不同体积的芦丁对照品溶液,用甲醇稀释成不同的浓度。分别取 1 mL 于 EP 管中,加入 100 μL 的亚硝酸钠(NaNO_2 ,5%),静置 6 min 后加入 100 μL 的三氯化铝(AlCl_3 ,10%),静置 6 min 后加入 1 mL 的氢氧化钠(NaOH ,5%),混合均匀,于 405 nm 波长下测定吸光度,以待测液的本底溶液为空白对照^[4],每个样品重复测定 3 次。以芦丁标准品的浓度(X)为横坐标,吸光度(Y)为纵坐标,绘制芦丁的标准曲线。回归方程为 $\hat{Y}=0.0060X+0.0750(r^2=0.9988)$,结果表明在 1~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 范围内与吸光度呈良好的线性关系。

2.5.2 样品总黄酮含量测定 分别取 3 种供试品溶液(稀释 10 倍)各 1 mL,按照“2.5.1”项操作步骤进行实验,利用回归方程求出供试品溶液中折合芦丁的浓度(总黄酮),并计算总黄酮的含量。

2.6 丹参和丹红注射液中活性成分的含量测定

2.6.1 液相色谱条件 色谱柱:Agilent Eclipse Plus C_{18} 柱(4.6 mm \times 100 mm,1.8 μm);流动相:乙腈(A)-0.05%甲酸水(B);流速:300 $\mu\text{L}/\text{min}$;柱温:25 $^{\circ}\text{C}$;检

测波长:254 nm。梯度洗脱程序,见表1。

表1 梯度程序洗脱表

时间(min)	A(%)	B(%)
0	3	97
3	3	97
10	10	90
15	12	88
18	13	87
20	20	80
40	25	75
55	25	75
60	70	30

2.6.2 标准曲线的绘制 精密移取适量的丹参素(1.0 g/L),原儿茶醛(1.02 g/L),咖啡酸(1.01 g/L),迷迭香酸(1.01 g/L),紫草酸(1.0 g/L),丹酚酸B(1.01 g/mL),丹酚酸A(0.99 g/mL)等溶液,制备混合标准品溶液,绘制标准曲线。

2.6.3 含量测定 进样丹参和丹红注射液 5 μL,计算各个化合物的含量。

2.7 统计学方法 利用 SPSS19.0 分析软件进行统计分析,组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 丹红、丹参、红花 3 种注射液抗氧化活性比较

3.1.1 丹红、丹参、红花 3 种注射液的清除 DPPH 自由基能力比较 采用 DPPH 法,以 IC₅₀ 值为指标,测定丹红、丹参、红花 3 种注射液的抗氧化活性,结果见表 2。结果表明,红花、丹参、红花 3 种注射液均具有较好的抗氧化活性,其中以丹参的抗氧化活性为最好,丹红注射液介于丹参与红花之间,但其抗氧化能力均小于 VC 和 VE。

表2 3种注射液 DPPH 清除率及 VC、VE 对照($\bar{x} \pm s$) μg/mL

样品	n	IC ₅₀
丹红注射液	3	107 ± 5
红花注射液	3	118 ± 3
丹参注射液	3	103 ± 11
VC	3	9.65 ± 0.04
VE	3	32.98 ± 0.70

3.1.2 丹红、红花、丹参 3 种注射液对铁离子的还原能力测定 考察了 3 种注射液对铁离子的还原能力,结果见表 3。结果表明,丹红、丹参与红花注射液均具有良好的铁离子还原能力,其还原能力测定顺序为丹参注射液、红花注射液、丹红注射液。

3.1.3 丹红、红花、丹参 3 种注射液的亚铁离子螯

表3 3种注射液的没食子酸当量($\bar{x} \pm s$) μg/mL

样品	n	没食子酸当量
丹红注射液	3	148.5 ± 1.0
红花注射液	3	125.0 ± 1.5
丹参注射液	3	83.9 ± 1.4

合能力测定 考察了 3 种注射液对亚铁离子螯合能力的测定,结果见图 1。结果显示,丹红、红花、丹参 3 种注射液的铁离子螯合能力均不是很强,清除率均小于 25%。顺序如下:丹红注射液>丹参注射液>红花注射液。

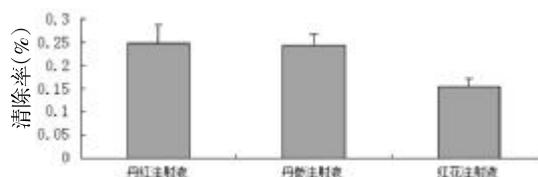


图1 3种注射液亚铁离子螯合能力测定

3.1.4 总酚酸及总黄酮含量测定 本研究中采用福林试剂法,对丹红、丹参、红花 3 种注射液的总酚酸含量进行了测定,结果见表 4。结果表明,总酚酸含量从高到低的顺序为丹参注射液、丹红注射液、红花注射液,该结果与清除 DPPH 自由基能力一致。

本实验研究采用了三氧化铝比色法测定丹红、丹参、红花 3 种注射液中总黄酮的含量,结果见表 4。结果表明,总黄酮含量从高到低的顺序为丹参注射液、丹红注射液、红花注射液,该结果与总酚酸的含量测定和清除 DPPH 自由基能力均一致。

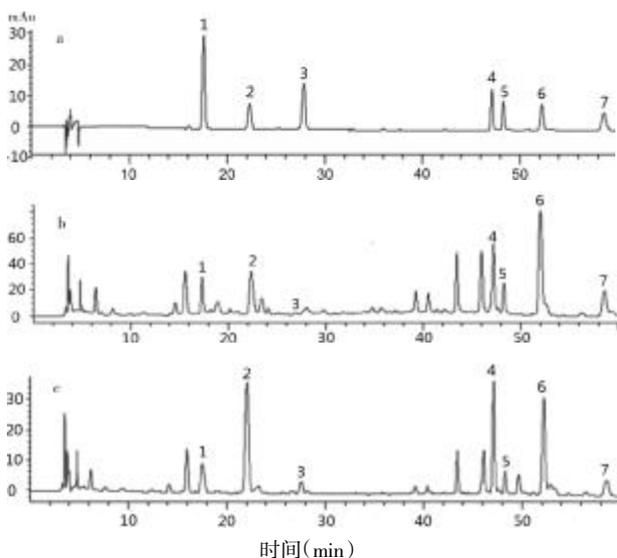
表4 3种注射液中总酚酸没食子酸和

样品	n	总黄酮芦丁当量($\bar{x} \pm s$) μg/mL	
		没食子酸当量	芦丁当量
丹红注射液	3	281.7 ± 0.9	405.4 ± 1.5
红花注射液	3	167.4 ± 3.3	378.2 ± 3.4
丹参注射液	3	347.3 ± 1.8	425.3 ± 1.9

3.2 丹红、丹参注射液中主要化合物含量测定 本实验研究通过运用高效液相色谱法对丹参、丹红注射液中主要的 7 种抗氧化活性成分进行了含量测定,其分离效果图见图 2,其标准曲线方程见表 5,含量测定结果见表 6。结果表明,各个化合物分离效果良好;各线性方程 r^2 均大于 0.999,表明其线性关系良好;抗氧化活性成分含量均较高,为其发挥抗氧化能力提供物质基础。

4 讨论

许多研究表明氧化损伤与心血管病密切相关。环境及膳食中某些化学物质进入机体后通过体内



a: 标准品, b: 丹红注射液, c: 丹参注射液, (1-7 分别为: 丹参素、原儿茶醛、咖啡酸、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸 B、丹酚酸 A)

图 2 典型高效液相色谱图

表 5 各标准品曲线方程

标准品	曲线方程	r ²
丹参素	$\hat{Y} = 245.58X + 29.55$	0.999
紫草酸	$\hat{Y} = 2\,296.9X - 5.81$	0.999
咖啡酸	$\hat{Y} = 3\,772.3X + 22.21$	0.999
丹酚酸 A	$\hat{Y} = 9\,198.6X - 9.96$	0.998
丹酚酸 B	$\hat{Y} = 3\,617.4X - 31.91$	0.999
迷迭香酸	$\hat{Y} = 2\,922.7X - 3.88$	1.000
原儿茶醛	$\hat{Y} = 4\,292.5X - 20.485$	0.999

表 6 丹红、丹参注射液含量测定结果 $\mu\text{g/mL}$

化合物	丹红注射液	丹参注射液
丹参素	548	228
原儿茶醛	4	45
咖啡酸	8	4
迷迭香酸	66	42
紫草酸	36	11
丹酚酸 B	111	4
丹酚酸 A	48	12

的代谢过程,引起活性氧自由基大量生成、内源性抗氧化物质减少甚至耗竭,从而引发脂类、蛋白质等生物大分子的一系列改变,进而引起心血管疾病^[15-18]。近年研究证实,抗氧化剂无论在体内还是在体外实验均有很强的清除自由基作用,在心血管病的发生中均具有重要的生理及药理作用^[19]。化学合成的抗氧化剂一般都存在一定的不良反应,因而从天然产物中寻找抗氧化剂仍然是一个热点话题^[20]。

在本研究中,丹参、红花及丹红注射液可通过直接清除 DPPH 自由基、还原铁离子、亚铁离子螯合能力而发挥抗氧化能力,其中丹参的抗氧化活性最好,三者均可以用来治疗心血管疾病。3 种注射液抗氧化活性的有效成分是酚酸类和黄酮类成分,并且总酚酸和总黄酮的含量与抗氧化活性能力一致。对丹参及丹红注射液中有有效成分的含量进行了测定,为抗氧化活性提供了物质基础,为其临床应用提供了科学依据。

参考文献:

- [1] Battino M, Bullon P, Wilson M, et al. Oxidative injury and inflammatory periodontal diseases: the challenge of antioxidants to free radicals and reactive oxygen species [J]. Critical Reviews In Oral Biology & Medicine, 1999, 10 (4): 458-476.
- [2] Murugan P, Pari L. Antioxidant effect of tetrahydrocurcumin in streptozotocin -nicotinamide induced diabetic rats [J]. Life Science, 2006, 79 (18): 1720-1728.
- [3] Ozsoy N, Can A, Yanardag R, et al. Antioxidant activity of Smilax excelsa L. leaf extracts [J]. Food Chemistry, 2008, 110 (3): 571-583.
- [4] 黄涛, 杨小虎. 丹红注射液对心脑血管疾病的药理作用研究进展[J]. 天津中医药, 2014, 31(9): 573-576.
- [5] 常连赢, 朱彦, 高秀梅. 丹红注射液抗血栓作用研究进展[J]. 天津中医药大学学报, 2013, 32(4): 246-249.
- [6] 王硕, 康立源, 秦秀德, 等. 丹红注射液抗脑损伤作用研究进展[J]. 天津中医药大学学报, 2012, 31(3): 183-186.
- [7] 王志华, 王玉水. 丹参对野百合碱所致肺动脉高压大鼠的保护作用[J]. 天津中医药, 2014, 31(4): 231-233.
- [8] He H, Yang X, Shi M, et al. Protective effects of hydroxysafflor yellow A on acute and chronic congestive cardiac failure mediated by reducing ET-1, NOS and oxidative stress in rats[J]. Journal of Pharmacy and Pharmacology, 2008, 60 (1): 115-123.
- [9] Liu HT, Wang YF, Olaleye O, et al. Characterization of in vivo antioxidant constituents and dual-standard quality assessment of Danhong injection [J]. Biomedical Chromatography, 2013, 27(5): 655-663.
- [10] 廖力夫, 周昕. 丹参素抑制过亚硝酸根引发的鲁米诺发光和蛋白质酪氨酸硝化 [J]. 中国现代应用药学, 2002, 19(2): 132-134.
- [11] 蒋旭宏, 黄小民. 红花注射液对急性肝损伤大鼠抗氧化作用的实验研究[J]. 中华中医药学刊, 2010, 28 (4): 832-834.
- [12] Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical [J]. Nature, 1958, 181: 1199-1200.
- [13] 赵兵. 青蒿药用成分提取分离技术现状 [J]. 中草药,

- 1998, 29 (11): 784-786.
- [14] Wallwaart TE, Bouwmesster HJ, Hille J, et al. Amorpho-4,11-diene synthase:cloning and functional expression of a key enzyme in the biosynthetic pathway of the novel antimalarial drug artemisinin [J]. *Plant*, 2001, 212 (3): 460-465.
- [15] 袁 蓉, 郭丽丽, 郜凤香. 痰瘀与自由基的关系探讨[J]. *天津中医药大学学报*, 2014, 33(4): 242-245.
- [16] 王志华, 王玉水. 高浓度丹参注射液对高糖所致内皮细胞损伤的保护作用 [J]. *天津中医药大学学报*, 2014, 33(2): 87-89.
- [17] 段真珍, 于佳慧, 李玉红, 等. 丹红注射液减轻 DPPH 所致离体心脏功能损伤的作用研究 [J]. *天津中医药大学学报*, 2014, 33(5): 283-286.
- [18] 刘灵芝. 丹红注射液对自然衰老大鼠心脏大脑组织 SOD、MDA 及 GSH-PX 的影响 [J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2012, 15(17): 73-74.
- [19] Yamamoto H, Hirose K, Hayasaki Y, et al. Mechanism of enhanced lipid peroxidation in the liver of Long-Evans cinnamon (LEC) rats [J]. *Archives of toxicology*, 1999, 73 (8-9): 457-464.
- [20] Ozsoy N, Yilmaz T, Kurt O, et al. In vitro antioxidant activity of *Amaranthus lividus* L [J]. *Food Chemistry*, 2009, 116 (4): 867-872.
- (收稿日期: 2014-10-28)

Comparison of antioxidant activities of Danhong, Danshen and Honghua injection

LI Jin, HU Yue, GE Ai-hua, BAI Yang, LIU Jiao, CHANG Yan-xu

(*Tianjin State Key Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China*)

Abstract: [Objective] To compare the antioxidant activity of Danhong, Danshen and Honghua injection and investigate the material basis for the antioxidant activity. [Methods] DPPH free radical scavenging, ferric reducing ability, ferrous ion chelating ability experiments were used for evaluation of the antioxidant components of Danhong, Danshen and Honghua injection. The main antioxidant components in *Salvia* and Danhong injection were determined by HPLC. [Results] Danhong, Danshen and Honghua injection had the DPPH free radical scavenging, ferric reducing ability, ferrous ion chelating ability. [Conclusion] The results suggest that Danhong, Danshen and Honghua injection have good antioxidant activity, which is closely related to the material basis of their total phenolic content of total flavonoids.

Key words: Danhong injection; Danshen injection; Honghua injection; antioxidant