

## 复方丹参的体外抗氧化活性研究

向志军<sup>1</sup>, 赵广荣<sup>1</sup>, 元英进<sup>1</sup>, 郭治昕<sup>2</sup>

(1. 天津大学化工学院 制药工程系, 天津 300072; 2. 天津天士力集团研究院, 天津 300402)

**摘要:**目的 探讨复方丹参的体外抗氧化活性。方法 采用 DPPH 自由基、超氧阴离子、羟基自由基、螯合亚铁离子和还原力、过氧化氢的反应体系, 检测了复方丹参的体外抗氧化活性, 并与维生素 C 进行比较。结果 复方丹参和维生素 C 消除 DPPH 自由基的  $EC_{50}$  分别是  $41.0 \mu\text{g/mL}$  和  $8.2 \mu\text{g/mL}$ ; 复方丹参消除超氧阴离子自由基的  $EC_{50}$  是  $1.39 \text{ mg/mL}$ ; 复方丹参和维生素 C 抑制羟基自由基产生的  $EC_{50}$  分别是  $1.73 \text{ mg/mL}$  和  $0.58 \text{ mg/mL}$ ; 在实验体系中, 未检测到复方丹参螯合亚铁离子的能力; 复方丹参和维生素 C 的还原能力的  $EC_{50}$  分别是  $0.42 \text{ mg/mL}$  和  $0.08 \text{ mg/mL}$ 。在实验最高质量浓度  $100 \mu\text{g/mL}$  时, 复方丹参和维生素 C 对过氧化氢的清除率分别为 36% 和 94%。**结论** 复方丹参具有较强还原力, 能清除 DPPH 和超氧阴离子自由基的作用, 并抑制羟基自由基的产生。复方丹参的多方面抗氧化活性可能是在治疗心血管疾病效果显著的原因之一。

**关键词:** 复方丹参; 抗氧化作用; 还原力; 清除自由基

**中图分类号:** R286.02

**文献标识码:** B

**文章编号:** 0253-2670(2006)02-0211-03

### *In vitro* antioxidant activity of Compound Danshen

XIANG Zhi-jun<sup>1</sup>, ZHAO Guang-rong<sup>1</sup>, YUAN Ying-jin<sup>1</sup>, GUO Zhi-xin<sup>2</sup>

(1. Department of Pharmaceutical Engineering, School of Chemical Engineering and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072, China; 2. Research Institute of Tianjin Tasly Group Co., Ltd., Tianjin 300402, China)

**Key words:** Compound Danshen; antioxidation; reducing activity; scavenging free radicals

活性氧的积累是心血管疾病如心绞痛、心肌梗死和猝死的危险因素, 而流行病学研究表明摄入适量的抗氧化剂能够降低心血管病的发病概率<sup>[1]</sup>。抗氧化剂能直接清除活性氧或抑制更强活性的活性氧的生成, 从而防止活性氧对血管细胞的损伤。因此从抗氧化的角度研究具有治疗心血管疾病的中药药理作用, 对进一步阐明中药的作用机制具有重要意义。复方丹参滴丸是对心血管疾病具有显著疗效的中成药, 模型动物的缺血再灌注等氧化损伤研究表明, 复方丹参对缺氧-复氧损伤具有一定保护作用<sup>[2]</sup>, 但未见其直接化学抗氧化活性的研究报道。本实验从消除 DPPH 自由基、消除超氧阴离子、消除过氧化氢、抑制羟基自由基的产生、螯合亚铁离子和还原力 6 个方面比较研究复方丹参的抗氧化效果, 试图从体外抗氧化方面揭示复方丹参滴丸在治疗心脑血管疾病方面的可能机制。

#### 1 实验材料

1.1 实验药物: 复方丹参(无辅料的复方丹参滴丸)由天津天士力集团研究院提供。用 ddH<sub>2</sub>O 分别精确配制复方丹参的系列质量浓度(5.0、10.0、20.0、40.0、60.0、80.0、100.0  $\mu\text{g/mL}$  和 1.0、2.0、3.0、

4.0、5.0  $\text{mg/mL}$ ), 冰箱保存, 供实验使用。

1.2 实验器材: Tu-1900 紫外分光光度计。

1.3 实验试剂: 还原性辅酶 I (NADH)、酚嗪二甲基硫酸盐(PMS)、四氮唑蓝(NBT), 1,1-二苯基-2-苦基苯基(DPPH)、菲洛嗪(Ferrozine)、六氰合铁(Ⅰ)酸钾[Potassium hexacyanoferrate (Ⅰ)], 菲咯啉均为 Sigma 产品。无水乙醇、氯化亚铁( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), 三氯乙酸(TCA)、氯化铁( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )、过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ , 31%)、钼酸铵、碘化钾(KI)、硫代硫酸钠( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ )、淀粉为分析纯试剂, 购于天津化学试剂厂。

#### 2 方法与结果

2.1 药物对 DPPH 自由基的消除作用: 参考 Amarowicz 等<sup>[3]</sup>的方法检测药物对 DPPH 的清除作用。1.5 mL 0.25 mmol/L DPPH 的乙醇溶液与不同质量浓度的复方丹参等体积混合均匀, 静置室温反应 30 min, 517 nm 处测定吸光度值( $A_1$ )值; 以 ddH<sub>2</sub>O 代替药品, 517 nm 处测定  $A_0$ ; 药品溶液(1.5 mL 药品溶液+1.5 mL 50%乙醇)在 517 nm 处测定  $A_2$ ; 50%的乙醇水溶液调零。按公式清除率 =  $[1 - (A_1 - A_0)/A_0] \times 100\%$  计算清除率, 并计算药

物清除 DPPH 的半数有效浓度值  $EC_{50}$ 。用维生素 C 为正对照,进行平行实验。复方丹参对 DPPH 自由基的清除能力见图 1。复方丹参对 DPPH 自由基具有很强的清除作用,且呈浓度依赖性。相对于维生素 C ( $EC_{50}$  为  $8.2 \mu\text{g}/\text{mL}$ ),复方丹参的  $EC_{50}$  为  $41.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ ,约是维生素 C 的 5 倍。

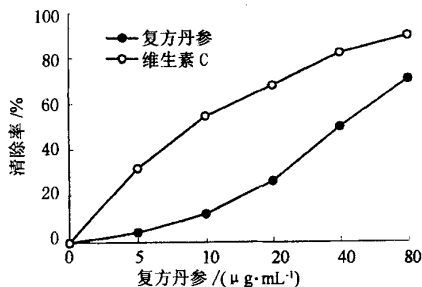


图 1 复方丹参对 DPPH 自由基的清除活性

Fig. 1 Scavenging activity of Compound Danshen against DPPH free radicals

2.2 药物对超氧阴离子的清除作用:参考 Liu 等的方法<sup>[4]</sup>检测药物清除超氧阴离子的能力。依次加入  $120 \mu\text{mol}/\text{L}$  PMS、 $936 \mu\text{mol}/\text{L}$  NADH、 $300 \mu\text{mol}/\text{L}$  NTB 溶液(用  $0.1 \text{ mol}/\text{L}$  的 pH 7.4 的磷酸盐缓冲溶液配制)各  $0.75 \text{ mL}$ ,建立反应体系,然后加入不同质量浓度的药物  $0.3 \text{ mL}$ ,混匀,室温静置反应 5 min。在  $560 \text{ nm}$  处测定  $A_1$ ;以  $\text{ddH}_2\text{O}$  代替药品,在  $560 \text{ nm}$  处测定  $A_0$ ;以磷酸盐缓冲溶液代替 PMS 溶液,在  $560 \text{ nm}$  处测定  $A_2$ ;  $\text{ddH}_2\text{O}$  调零。对超氧阴离子清除率和  $EC_{50}$  的计算方法同前。复方丹参对超氧阴离子表现出具有较强的清除作用,在  $1.0$ 、 $2.0$ 、 $3.0$ 、 $4.0$ 、 $5.0 \text{ mg}/\text{mL}$  时,清除率分别为  $45.53\%$ 、 $59.32\%$ 、 $71.71\%$ 、 $76.51\%$ 、 $84.21\%$ 。在供试质量浓度范围内,随药物质量浓度增加,清除率趋于最大,其  $EC_{50}$  为  $1.39 \text{ mg}/\text{mL}$ 。

2.3 药物抑制羟基自由基产生的能力:参考 Fenton 反应体系<sup>[6]</sup>检测药物抑制羟基自由基产生的能力。用  $60 \mu\text{L}$   $1.0 \text{ mmol}/\text{L}$   $\text{FeCl}_2$ ,  $90 \mu\text{L}$   $1 \text{ mmol}/\text{L}$  菲咯啉,  $2400 \mu\text{L}$  磷酸盐缓冲溶液(pH 7.8),  $150 \mu\text{L}$   $0.17 \text{ mol}/\text{L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  组成反应体系,加入不同质量浓度的药物,混合后室温反应 5 min。在  $560 \text{ nm}$  测定  $A_1$ ,以  $\text{ddH}_2\text{O}$  代替药品,在  $560 \text{ nm}$  处测定  $A_0$ ;以磷酸盐缓冲溶液代替菲咯啉溶液,在  $560 \text{ nm}$  处测定  $A_2$ ,  $\text{ddH}_2\text{O}$  调零。药物对羟基自由产生的清除率及其  $EC_{50}$  计算方法同前,见图 2。在  $0\sim 3 \text{ mg}/\text{mL}$ ,复方丹参抑制羟基自由基的能力呈较好的浓度依赖关系。当质量浓度为  $5.0 \text{ mg}/\text{mL}$  时,抑制羟基

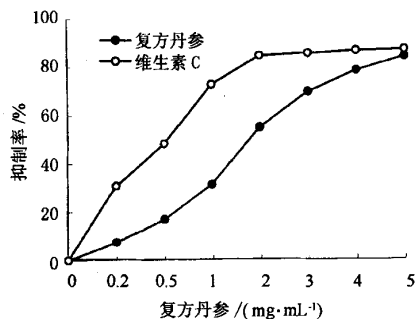


图 2 复方丹参对羟基自由基产生的抑制率

Fig. 2 Inhibiting rate of Compound Danshen on production of hydroxide free radicals

自由基产生能力达  $83.8\%$ 。相当于维生素 C ( $EC_{50}$  为  $0.58 \text{ mg}/\text{mL}$ ),复方丹参对羟基自由基的  $EC_{50}$  为  $1.73 \text{ mg}/\text{mL}$ ,约是维生素 C 的 3 倍。

2.4 药物对亚铁离子的螯合作用:测定药物螯合亚铁离子的能力参考 Dinis 等的方法<sup>[6]</sup>。在  $1\sim 5 \text{ mg}/\text{mL}$ ,复方丹参基本上没有表现出螯合亚铁离子的能力。

2.5 药物的还原力的比较:药物的还原力检测参考 Oyaizu 方法<sup>[7]</sup>。依次加入  $0.75 \text{ mL}$   $0.2 \text{ mol}/\text{L}$  磷酸盐缓冲溶液(pH 6.6)、 $0.75 \text{ mL}$   $1\%$  六氰合铁(Ⅰ)酸钾和  $0.75 \text{ mL}$  不同质量浓度药品,混匀,  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  水浴 20 min。冰浴快速冷却后,加入  $0.75 \text{ mL}$   $10\%$  三氯乙酸,于  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  下离心( $3000 \text{ r}/\text{min}$ ) 10 min。取上清  $1.5 \text{ mL}$  加入  $\text{ddH}_2\text{O}$   $1.5 \text{ mL}$  及  $0.1\%$   $\text{FeCl}_3$ ,混匀后,室温静置反应 10 min。在  $700 \text{ nm}$  处测定  $A_1$ ;以  $\text{ddH}_2\text{O}$  代替药物,在  $700 \text{ nm}$  处测定  $A_0$ ;  $\text{ddH}_2\text{O}$  调零。以维生素 C 质量浓度  $1.0 \text{ mg}/\text{mL}$  下的 A 为基准,按相对还原力  $= (A_1 - A_0) / (A - A_0) \times 100\%$  计算相对还原力,并计算药物还原力的  $EC_{50}$ ,见图 3。复方丹参还原力较强,  $EC_{50}$  为  $0.42 \text{ mg}/\text{mL}$ ,约是维生素 C ( $EC_{50}$  为  $0.08 \text{ mg}/\text{mL}$ ) 的 5 倍。

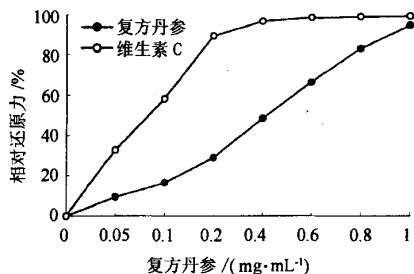


图 3 复方丹参的相对还原力

Fig. 3 Reductive activity of Compound Danshen

2.6 药物对过氧化氢的消除能力:过氧化氢是一种强氧化剂,具有良好的扩散性,容易透过细胞膜,并引起氧化损伤。采用置换滴定法检测过氧化氢浓度。

分别取 0.1 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1.0 mL 和不同质量浓度的药物 1.0 mL 混合,加入 2 滴 3% 钼酸铵,2 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 mL 和 1.8 mol/L KI 7.0 mL,用 0.005 mol/L Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 开始滴定,待体系变黄,加 1~2 mL 淀粉溶液,滴定到无色即为终点。滴定样品的体积为 V<sub>1</sub>,滴定过氧化氢所用体积为 V<sub>0</sub>,按清除率=(V<sub>0</sub>-V<sub>1</sub>)/V<sub>0</sub>×100% 计算过氧化氢的清除率,见图 4。复方丹参显示出一定的过氧化氢的清除作用,在最高质量浓度 100 μg/mL<sup>-1</sup> 时,对过氧化氢的清除率为 36%。而维生素 C 在此质量浓度下,清除率已达 94%。

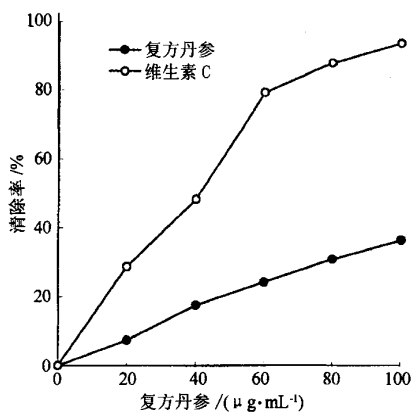


图 4 复方丹参对过氧化氢的清除率

Fig. 4 Scavenging rate of Compound Danshen against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

### 3 讨论

氧自由基生成增加是心肌缺血-再灌注损伤的细胞学机制之一<sup>[8]</sup>。再灌注时心肌细胞黄嘌呤氧化酶的增多、中性粒细胞异常呼吸爆发、线粒体呼吸功能受损、儿茶酚胺自身氧化等引起氧自由基生成增多,进而自由基引起脂质过氧化增强,破坏膜的正常结构,间接抑制膜蛋白功能,损伤肌纤维蛋白;线粒体脂质过氧化,导致线粒体功能抑制。实验研究表明丹参、三七具有减轻心肌缺血-再灌注损伤的作用。Wang 等<sup>[9]</sup>研究表明丹参能够明显降低缺血再灌注造成的犬心肌的损伤面积和 MDA 的生成,Lin 等<sup>[10]</sup>研究表明丹酚酸 A 能够明显的清除 FLMP 和 PMA 诱导的中性粒细胞释放的超氧阴离子和过氧

化氢等活性氧。还原力反映了一种物质作为电子供体的能力,药物还原力和捕获过氧化氢能力的大小在一定程度上反映了其预防性抗氧化功能的强弱。本实验的结果表明,复方丹参具有较强的还原力,其还原力与较强地抑制羟自由基产生有关,也与一定的消除过氧化氢有关,但与螯合金属铁离子无关。此外,复方丹参具有消除包括 DPPH 自由基和超氧阴离子等活性氧的能力。本实验结果直接证明了复方丹参在多方面具有较强的抗氧化活性,这可能是复方丹参滴丸在治疗活性氧诱发的心脑血管疾病方面效果显著的原因之一。

### References:

- [1] Abe J, Berk B C. Reactive oxygen species as mediators of signal transduction in cardiovascular disease [J]. *Trends Cardiovas Med*, 1998, 8: 59-64.
- [2] Guo Z X, Zhao L B. Basal research advance of Compound Danshen Dropping Pills [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2003, 34 (1): 4-5.
- [3] Amarowicz R, Naczek M, Shahidi F. Antioxidant activity of various fractions of non-tannin phenolics of canola hulls [J]. *J Agric Food Chem*, 2000, 48: 2755-2759.
- [4] Liu F, Ooi V E C, Chang S T. Free radicals scavenging activity of mushroom polysaccharide extracts [J]. *Life Sci*, 1997, 60: 763-771.
- [5] Yu W L, Zhao Y P, Shu B. The radical scavenging activities of *Radix Puerariae* isoflavonoids: A chemiluminescence study [J]. *Food Chem*, 2004, 86: 525-529.
- [6] Dinis T C, Madeira V M C, Almeida L M. Action of phenolic derivatives (acetoaminophen, salicylate, and 5-amino-salicylate) as inhibitors of membrane lipid peroxidation and peroxyl radicals scavengers [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1994, 315: 161-169.
- [7] Oyaizu M. Studies on products of browning reactions: antioxidant activities of products of browning reaction prepared from glucose amine [J]. *J P J Nutr*, 1986, 44: 307-315.
- [8] Cuzzocrea S, Reiter R J. Pharmacological action of melatonin in shock, inflammation and ischemia/reperfusion injury [J]. *Eur J Pharmacol*, 2001, (1-2): 1-10.
- [9] Wang L, Zhang Y, Song W, et al. Protective effects of isovolumic hemodilution and Danshen solution on ischemic reperfused myocardium [J]. *Biorheology*, 1995, 32: 275-275.
- [10] Lin T J, Zhang K J, Liu G T. Effects of salvianolic acid A on oxygen radicals released by rat neutrophils and on neutrophil function [J]. *Biochem Pharmacol*, 1996, 51: 1237-1241.

欢迎订阅《中草药》1996—2005 年增刊