



桃红四物汤抗氧化效应物质基础研究

刘立, 段金廛*, 唐于平, 马宏跃, 宿树兰, 李晓曦

(南京中医药大学 江苏省方剂研究重点实验室, 江苏 南京 210046)

[摘要] 目的:评价桃红四物汤及各分离化学部位的抗氧化效应,对效应显著部位进行物质基础定性定量分析。方法:大孔吸附树脂分离制备各化学部位样品(TH-1~TH-15);采用清除 DPPH 和 OH· 的方法以及考察样品对过氧化氢(H₂O₂)损伤内皮细胞的保护作用,3种体外抗氧化实验评价桃红四物汤及各部位的抗氧化效应及特点。采用 HPLC 对效应显著部位的化学成分进行定性定量分析。结果:TH-2, TH-4, TH-7, TH-8, TH-9 部位具有抗氧化效应,其中 TH-8 部位的抗氧化活性显著。分析结果表明 TH-8 部位中包含 6 种主要化学成分,分别为苦杏仁苷、芍药内酯苷、芍药苷、香豆酸、阿魏酸、苯甲酸,相对含量分别为 75.70, 31.26, 60.79, 1.196, 1.108, 4.861 mg·L⁻¹。结论:一系列芳香酸及苷类成分是桃红四物汤抗氧化的主要效应物质基础。

[关键词] 桃红四物汤;抗氧化;物质基础

方剂是中医临床用药的主要形式和手段,是中医理论整体观和辨证施治的具体体现,是防病治病的物质基础。桃红四物汤源于清·吴谦等所著《医宗金鉴》“妇科心法要诀·调经门”,是在基本方四物汤基础上配伍桃仁、红花药对而成,具有养血活血祛瘀的功效。临床上主要用来治疗血虚血瘀证,主治妇女月经不调及痛经等诸多妇科血瘀疾病,被历代医家推崇为治疗妇科疾病的首选良方。

现代药理研究表明,痛经时子宫平滑肌阵发性的收缩导致肌间血管受压而出现子宫肌层及内膜的暂时性缺血,使子宫组织细胞由于缺血-再灌注而生成较多的氧自由基。清除氧自由基的超氧化物歧化酶(SOD)会相应降低^[1]。此外,细胞膜磷脂中多聚不饱和脂肪酸和脂肪酸的不饱和双键极易受到氧自由基攻击,导致脂质过氧化反应,激起自由基的连锁、增殖反应,形成一系列的脂质自由基及其降解产物丙二醛(MDA),将进一步引起膜的流动性降低,

通透性增高,线粒体肿胀,溶酶体破坏及溶酶体酶的释放,更加重了子宫内膜的损伤,加快了细胞死亡。坏死物质的组织碎片及部分细胞内容物可使血管收缩,并可能增加炎症反应,可以使痛经加剧^[2]。亦有文献报道桃红四物汤水煎液的抗氧化作用对血瘀证的缓解有一定意义^[3],且氧自由基涉及桃红四物汤所应用的妇科、内科、骨伤科以及养生等多个领域的病理机制^[4]。探讨桃红四物汤的抗氧化活性对于进一步阐释该方其组方机制起到重要作用。

本文在前期研究工作基础上^[5-6],采用3种体外抗氧化模型综合评价桃红四物汤及各分离化学部位的抗氧化效应;采用 HPLC 对抗氧化效应显著部位中的化学成分进行定性定量分析,探讨物质基础与抗氧化效应之间的相关性,以期阐明桃红四物汤的效应物质基础及指导临床合理用药提供科学依据。

1 材料

酶联免疫检测仪(美国 Bio-Tek 公司);Waters 2695 高效液相色谱仪,包括四元泵溶剂系统,在线脱气机和自动进样器;2998PDA 检测器;数据经 Empower 工作站采集和处理。

桃红四物汤组方中当归、川芎、白芍、熟地、桃仁、红花 6 味药材,经南京中医药大学段金廛教授鉴定,符合《中国药典》(2010 年版)项下规定。其中当归、川芎药材分别来源于甘肃当县当归 GAP 种植基地和四川彭州川芎 GAP 种植基地,其余均购自于南京市药材公司。FeSO₄·7H₂O,水杨酸,过氧化氢

[稿件编号] 20101102015

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2008BA151B01);国家教育部“新世纪优秀人才支持计划”(NCET-09-0163);江苏省高校自然科学基金重大项目(06KJA36022,10KJA360039);江苏省方剂高技术重点实验室建设项目(BM2010576);江苏高校优势学科建设工程项目

[通信作者] *段金廛,教授,博士生导师,研究方向方剂物质基础及中药资源化学,Tel:(025)85811116, E-mail:dja@njutem.edu.cn

[作者简介] 刘立,博士研究生,研究方向中药及方剂活性物质基础研究,Tel:(025)85811917



(H₂O₂) 购买于无锡市亚盛化工有限公司; DPPH 购自于 ALDRICH Chemistry。人脐静脉血管内皮细胞株 (HUVEC) (南京中医药大学张旭教授馈赠); RPMI-1640 培养基 (GIBCO, USA); 胰蛋白酶 (GIBCO, USA); 噻唑蓝 (MTT) (GIBCO, USA); 小牛血清 (杭州四季青公司)。

甲醇 (色谱纯, 汉邦公司); 其余试剂均为市售分析纯。对照品苦杏仁苷、芍药苷、阿魏酸购自中国药品生物制品检定所, 批号分别为 110820-200403, 110736-200934, 110773-200611。芍药内酯苷购于上海中药标准化研究中心, 香豆酸购自上海融禾医药科技发展有限公司。

2 方法与结果

2.1 样品制备^[7]

称取桃红四物汤组方药材, 按照当归-川芎-白芍-熟地-桃仁-红花 3:3:3:3:2 比例配比, 即 4 kg: 4 kg: 4 kg: 4 kg: 2.67 kg, 共 22.67 kg。药材经粉碎至粒径 40 目, 水煎煮 2 次, 第 1 次 10 倍量水煎煮 2 h, 第 2 次 8 倍量水煎煮 1.5 h。合并 2 次提取液, 减压浓缩至一定体积 (如 1:1, 即 1 kg/L)。水煎液 (TH-2) 6 750 g 浓缩至 1:1, 加乙醇至醇浓度达 80%, 沉淀部分为 (TH-3) 4 380 g。上清液回收乙醇 (TH-4) 2 598 g, 水不溶部分为 (TH-5) 2.34 g。用 (TH-4) 1 732 g, 上 D101 大孔树脂柱, 乙醇梯度洗脱, 依次得水洗部分 (TH-6) 1 111.82 g, 10% 醇洗部分 (TH-7) 118 g, 20% 醇洗部分 (TH-8) 55.4 g, 30% 醇洗部分 (TH-9) 37 g, 40% 醇洗部分 (TH-10) 23.4 g, 50% 醇洗部分 (TH-11) 13.4 g, 60% 醇洗部分 (TH-12) 4.8 g, 70% 醇洗部分 (TH-13) 3.3 g, 80% 醇洗部分 (TH-14) 2.1 g, 95% 醇洗部分 (TH-15) 9.5 mL。按照相同制备方法另外收集挥发油 (TH-1) 6 mL。

2.2 抗氧化活性测定

2.2.1 DPPH 清除率的测定^[8] 在 96 孔板中加入各部位样品受试药物 (TH-1 ~ TH-15) 100 μL, 终浓度分别为 50, 100, 200, 400 mg · L⁻¹。加入各部位样品受试药物后, 溶于含 0.05 g · L⁻¹ DPPH 的无水乙醇溶液, 避光反应 30 min 后在 517 nm 波长下测定其吸光度为 A₀。同时作空白对照, 在 517 nm 波长下测定其吸光度为 A₁。为扣除药物本底颜色对实验的影响, 在加入终浓度分别为 50, 100, 200, 400 mg · L⁻¹ 的药物后加入无水乙醇在 517 nm 波长下

测定其吸光度 A₂。按照下式进行计算各部位样品受试药物 (TH-1 ~ TH-15) 对 DPPH 清除率: $A_1 - (A_0 - A_2)/A_1 \times 100\%$, 计算 IC₅₀, 结果见表 1。TH-2, TH-4, TH-5, TH-7, TH-8, TH-9 化学部位有较强的清除 DPPH 的能力, 其中 TH-8 活性较为显著, DPPH IC₅₀ 为 0.11 g · L⁻¹。

表 1 TH-1 ~ TH-15 清除 DPPH 和 OH · 的 IC₅₀

有效部位	DPPH IC ₅₀	Fe ²⁺ /H ₂ O ₂ IC ₅₀
TH-1	3.13	0.69
TH-2	0.17	0.80
TH-3	0.25	1.87
TH-4	0.18	0.63
TH-5	0.15	-
TH-6	0.38	1.17
TH-7	0.13	1.33
TH-8	0.11	0.28
TH-9	0.12	0.78
TH-10	0.19	0.95
TH-11	0.26	0.53
TH-12	0.32	0.62
TH-13	0.84	0.50
TH-14	0.60	-
TH-15	3.97	-

2.2.2 OH · 清除率的测定^[9] 在 96 孔板中加入终浓度为 2.25 mol · L⁻¹ 的 FeSO₄ · 7H₂O 溶液和终浓度为 2.25 mol · L⁻¹ 的水杨酸各 50 μL, 加入终浓度分别为 50, 100, 200, 400 mg · L⁻¹ 各部位样品受试药物 (TH-1 ~ TH-15) 50 μL 后, 加入终浓度为 2.2 mmol · L⁻¹ H₂O₂, 37 °C 水浴锅加热 30 min 在 536 nm 波长下测定其吸光度为 A₀。同时作空白对照, 在 536 nm 波长下测定其吸光度为 A₁。为扣除药物本底颜色对实验的影响, 在同法加入 FeSO₄ · 7H₂O, 水杨酸和各部位样品受试药物 (TH-1 ~ TH-15) 各 50 μL 后, 加入 50 μL 蒸馏水, 37 °C 水浴锅加热 30 min 后在 536 nm 波长下测定其吸光度为 A₂。按下式进行计算各部位样品受试药物 (TH-1 ~ TH-15) 对 OH · 清除率: $A_1 - (A_0 - A_2)/A_1 \times 100\%$, 计算 IC₅₀, 结果见表 1。TH-8 清除 OH · 的活性最为显著, Fe²⁺/H₂O₂ IC₅₀ 为 0.28 g · L⁻¹。

2.2.3 H₂O₂ 诱导 HUVEC 损伤的保护作用测定^[10] HUVEC 细胞用含 10% 小牛血清 DMEM 培养液接种于 75 cm² 的细胞培养瓶中, 置 CO₂ 培养箱培

养,隔 3 d 传代 1 次,取约覆盖瓶底 80% 即对数生长期细胞进行实验。用 0.25% 胰蛋白酶消化单层培养的 HUVEC,用含 10% 小牛血清 DMEM 培养基制成单细胞悬液后,以 5×10^3 个/孔的密度接种于 96 孔培养板,每组重复 6 孔,置于 37°C , 5% CO_2 恒温培养箱中培养 24 h,加入终浓度分别为 100, 200, 400 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的各部位样品受试药物 (TH-1 ~ TH-15) 100 μL 和终浓度为 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ H_2O_2 100 μL ,继续放置培养箱中培养 4 h,然后加入 20 μL MTT,继续孵育 4 h 后终止培养,弃去上清液,加入二甲亚砜 150 μL 振荡,置于 37°C 温箱中 10 min,待蓝色结晶完全溶解后,用酶标仪在 490 nm 波长处测定吸光度 (A),以 A 代表细胞活性,同法重复 3 块培养板,取 A 均值,结果见图 1。在 100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 下,各化学部位样品对 H_2O_2 诱导 HUVEC 损伤无明显的保护作用;在 200 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, TH-2, TH-4 对 H_2O_2 诱导 HUVEC 损伤具有保护作用 ($P < 0.05$), TH-7 和 TH-8 对 H_2O_2 诱导 HUVEC 损伤具有显著的保护作用 ($P < 0.01$); 在 400 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 下, TH-4, TH-7 对 H_2O_2 诱导 HUVEC 损伤具有保护作用 ($P < 0.05$), TH-8 和 TH-9 对 H_2O_2 诱导 HUVEC 损伤具有显著的保护作用 ($P < 0.01$)。

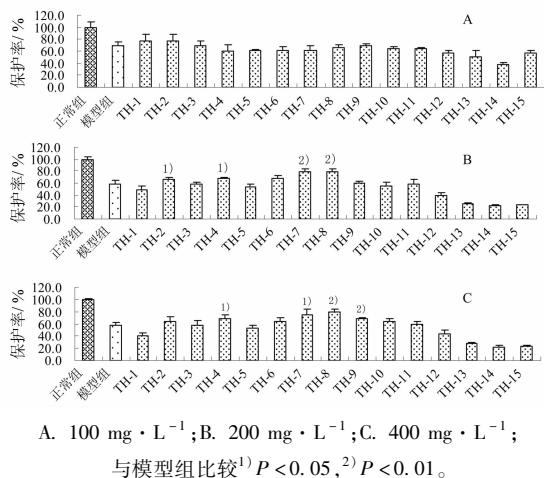


图 1 不同浓度有效部位对 H_2O_2 损伤内皮细胞的保护作用

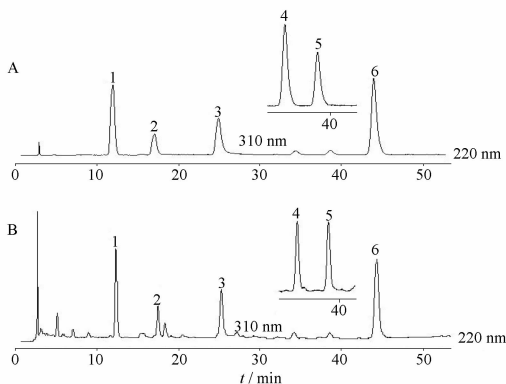
2.3 HPLC 测定

2.3.1 供试品溶液的制备 精密称取 TH-8 0.5 g, 置 5 mL 量瓶中,加 50% 甲醇使溶解并稀释至刻度,摇匀,作为供试品储备液。精密量取供试品储备液 100 μL ,置 1 mL 量瓶中,加 50% 甲醇使溶解并稀释

至刻度,摇匀,0.45 μm 微孔滤膜过滤后,作为供试品溶液。

2.3.2 混合对照品的制备 精密称取对照品苦杏仁苷、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酸、香豆酸、阿魏酸适量,加甲醇稀释配制成质量浓度分别为 525, 170.34, 303.85, 6.5, 6.37, 25 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合对照品溶液,即得。

2.3.3 色谱条件 GRACE-Apollo- C_{18} 色谱柱 (4.6 mm \times 250 mm, 5 μm); 流动相甲醇 (A)-0.2% 磷酸 (B), 梯度洗脱, 0 ~ 40 min, 22 ~ 32% A; 40 ~ 55 min, 32 ~ 42% A。流速 1.0 $\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$, 柱温 25°C 。苦杏仁苷检测波长 220 nm, 芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酸检测波长 230 nm, 香豆酸检测波长 310 nm, 阿魏酸检测波长 323 nm。色谱图见图 2。



A. 混合对照品; B. TH-8 样品; 1. 苦杏仁苷; 2. 芍药内酯苷; 3. 芍药苷; 4. 香豆酸; 5. 阿魏酸; 6. 苯甲酸。

图 2 对照品和 TH-8 样品在不同波长下的 HPLC 图

2.3.4 方法学考察 分别精密吸取 2.3.2 项下混合对照品溶液 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 μL , 进样测定, 记录峰面积, 以峰面积 Y 对进样量 X (μg) 进行线性回归, 得回归方程及线性范围, 结果见表 2。

表 2 6 种有效成分的标准曲线与线性范围

成分	标准曲线	R^2	线性范围/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
苦杏仁苷	$Y = 1.050 \times 10^4 X + 2.023 \times 10^5$	0.999 9	26.25 ~ 183.8
芍药内酯苷	$Y = 9.367 \times 10^3 X + 6.345 \times 10^4$	0.999 7	8.517 ~ 59.62
芍药苷	$Y = 1.204 \times 10^4 X - 1.844 \times 10^5$	0.999 8	15.19 ~ 106.3
香豆酸	$Y = 8.394 \times 10^4 X - 6.329 \times 10^4$	0.999 7	0.325 0 ~ 2.275
阿魏酸	$Y = 6.422 \times 10^4 X - 4.897 \times 10^4$	0.999 5	0.319 0 ~ 2.230
苯甲酸	$Y = 2.432 \times 10^5 X + 1.246 \times 10^5$	0.999 9	1.250 ~ 8.750

逐级稀释各对照品储备液, 按 3 倍信噪比



($S/N = 3$) 计算苦杏仁苷、芍药内酯苷、芍药苷、香豆酸、阿魏酸、苯甲酸的检测限 (LOD) 分别为 0.32, 0.26, 0.08, 0.09, 0.07, 0.15 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 按 10 倍信噪比 ($S/N = 10$) 计算定量限 (LOQ) 分别为 0.98, 0.72, 0.25, 0.31, 0.26, 0.40 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

精密吸取 2.3.2 项下混合对照品溶液 10 μL , 连续进样 6 次, 记录峰面积, 计算苦杏仁苷、芍药内酯苷、芍药苷、香豆酸、阿魏酸、苯甲酸峰面积的 RSD, 得日内精密度 RSD 分别为 0.77%, 0.78%, 0.88%, 0.82%, 0.47%, 0.63%。精密吸取 2.3.2 项下混合对照品溶液 10 μL , 每日进样 2 次, 连续 3 d, 得日间精密度 RSD 分别为 1.1%, 1.0%, 1.1%, 1.0%, 1.2%, 0.8%, 表明仪器精密度良好。

取供试品溶液, 分别于 0, 2, 4, 6, 8, 12, 24 h 进样 10 μL , 记录峰面积。结果表明, 苦杏仁苷、芍药内酯苷、芍药苷、香豆酸、阿魏酸、苯甲酸的平均含量分别为 77.310, 32.537, 63.381, 1.206, 1.181, 4.930 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为 1.3%, 1.7%, 0.43%, 0.35%, 0.44%, 表明 TH-8 样品溶液在 24 h 内稳定。

精密称取 TH-8 6 份, 按 2.3.3 项下方法制备供试品溶液, 分别进样 10 μL , 记录峰面积, 计算含量。结果表明, 苦杏仁苷、芍药内酯苷、芍药苷、香豆酸、阿魏酸、苯甲酸的平均含量分别为 76.070, 32.700, 60.886, 1.273, 1.241, 4.810 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$, RSD 分别为 1.6%, 1.4%, 1.6%, 0.74%, 1.6%, 0.86%, 表明此法具有较好的重复性。

精密称取已知含量 TH-8 的供试品适量 (3 份), 按 50%, 100%, 150% 浓度分别添加一定量的对照品, 按含量测定方法测定。苦杏仁苷、芍药内酯苷、芍药苷、香豆酸、阿魏酸、苯甲酸的加样回收率分别为 103.3%, 101.6%, 101.6%, 103.7%, 101.5%, 101.9%, RSD 分别为 1.2%, 2.8%, 1.9%, 1.1%, 3.2%, 2.9%。

2.3.5 样品含量测定 分别取 TH-8 样品 3 份, 按 2.3.3 项下方法制备供试品溶液, 按上述色谱条件测定, 外标法计算样品中苦杏仁苷、芍药内酯苷、芍药苷、苯甲酸、香豆酸、阿魏酸质量分数分别为 75.70, 31.26, 60.79, 1.196, 1.108, 4.861 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

4 讨论

近年来很多研究发现氧自由基改变与血瘀证痛经的发生密切相关^[1-2]。本文对临床上用来治疗妇

科血瘀证的桃红四物汤的抗氧化效应进行评价。

首先通过清除 DPPH 自由基的实验测定各部位是否在自由基连锁起始反应阶段起抑制作用, 结果表明 TH-2, TH-4, TH-7, TH-8, TH-9 具有较强的活性 ($\text{IC}_{50} < 0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$); 其次通过清除 $\text{OH} \cdot$ 的 Fenton 实验测定各部位是否具有在自由基连锁成长反应阶段起抑制作用, 结果表明仅有 TH-8 具有较强的活性 ($\text{IC}_{50} < 0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)。另外, 现代研究表明血瘀证的形成与血管内皮细胞损伤密切相关。血管内皮细胞具有复杂的酶系统, 可以合成和分泌多种生物活性物质, 参与血管收缩和舒张、凝血、免疫功能及细胞增殖的调节^[11]。而不同氧化物前体可直接刺激血管内皮细胞, 损伤内皮细胞的正常功能。抗氧化剂可通过清除活性氧改变氧化环境或直接调节氧化还原敏感信号传导通路, 产生内皮保护作用^[12]。所以用 H_2O_2 诱导内皮细胞损伤, 观察各部位对其保护作用。结果表明 TH-2, TH-4, TH-7, TH-8, TH-9 与模型组比较表现出明显的差异性 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

从效应结果分析, 全方 (TH-2) 及醇沉上清 (TH-4) 有较好的抗氧化活性说明抗氧化活性源于除去生物大分子的水溶性部位的贡献, 是许多化学物质 (群) 相互作用产生的整体效应评价; 水溶性小分子 (TH-4) 部位经大孔树脂吸附醇洗脱得到 10% ~ 30% (TH-7 ~ TH-9) 部位均呈现出不同程度的抗氧化活性, 提示相邻醇梯度洗脱部位的化学物质可能存在交叉, 有待于进一步从成分组成与量的配比关系层面揭示效应成分群。

效应显著 TH-8 部位定性定量分析出 6 种成分, 分别为苦杏仁苷、芍药内酯苷、芍药苷、香豆酸、阿魏酸、苯甲酸, 其中苦杏仁苷的含量最高 (75.698 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。有文献报道当归、川芎中的阿魏酸及红花中的香豆酸等有机酸类具有较强的清除 DPPH 的活性^[13], 其中阿魏酸对细胞的氧化损伤具有保护作用^[14]; 桃仁中的苦杏仁苷有较强的清除 $\text{OH} \cdot$ 的活性^[15]; 芍药中的芍药苷对细胞氧化损伤具有保护作用^[16]。可见有机酸及苷类成分为 TH-8 部位的效应物质基础。

抗氧化作用与该方的溶栓、抗凝等效应可能起到相辅相成作用, 共同改善血瘀症状的整体效果, 本文研究结果为阐明该方抗氧化效应物质奠定了一定基础, 对于深入探讨氧自由基的改变与血瘀证之间



的关系有一定的指引作用。

[参考文献]

[1] 嵇波, 任晓暄, 赵雅芳, 等. 原发性痛经发病机制与防治研究述评[J]. 中国现代医学杂志, 2008, 18(13): 1856.

[2] 裴培田, 姚凝, 赵一梅, 等. 舒经玫瑰胶囊对小鼠原发性痛经血清中谷胱甘肽过氧化物酶及一氧化氮的影响[J]. 中国药物与临床, 2005, 5(1): 24.

[3] 田分. 加味桃红四物汤治疗黄褐斑的临床研究及抗氧化作用机制研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2005.

[4] 马宏跃, 李伟霞, 尚尔鑫, 等. 基于抗氧化活性的不同制法当归-川芎药对配伍比例研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2010, 15(6): 631.

[5] 刘立, 马宏跃, 段金廛, 等. 凝血酶时间法的改进及对四物汤类方筛选研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(4): 69.

[6] Liu L, Duan J A, Tang Y P, et al. The protective effects of the active fraction of Shaofu Zhuyu decoction on hydrogen peroxide-induced oxidative injury in vascular smooth muscle cells[J]. Molecules, 2010, 15: 5066.

[7] 宿树兰, 华永庆, 段金廛, 等. 少腹逐瘀汤对小鼠离体子宫收缩模型的生物效应及物质基础评价[J]. 中国药科大学学报, 2007, 38(6): 544.

[8] 刘小兵. 生物活性物质的抗氧化能力评价方法及其研究进展[J]. 中国食品卫生杂志, 2008, 20(5): 440.

[9] 张昊, 任发政. 羟基和超氧自由基的检测研究进展[J]. 光谱学和光谱分析, 2009, 29(4): 1093.

[10] Hou Y Z, Zhao G R, Yang J, et al. Protective effect of *Ligusticum chuanxiong* and *Angelica sinensis* on endothelial cell damage induced by hydrogen peroxide[J]. Life Sci, 2004, 75: 1775.

[11] 宿树兰. 少腹逐瘀汤的基础研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2008.

[12] 张健, 魏欣冰, 丁华, 等. 卡维地洛对过氧化氢致血管内皮细胞氧化应激损伤的保护作用[J]. 中国药理学通报, 2006, 22(5): 620.

[13] 袁亚男, 陈承瑜, 杨滨, 等. 31种黄酮、酚酸类化合物和10种中药清除DPPH能力考察[J]. 中国中药杂志, 2009, 34(13): 1695.

[14] Kanski J, Aksenova M, Stoyanova A, et al. Ferulic acid antioxidant protection against hydroxyl and peroxy radical oxidation in synaptosomal and neuronal cell culture systems *in vitro*: structure-activity studies[J]. J Nutr Biochem, 2002, 13: 273.

[15] 董捷, 尹策, 张红城, 等. 杏花花粉中苦杏仁苷的抗氧化性研究[J]. 食品科学, 2007, 28(8): 65.

[16] Li C R, Zhou Z, Zhu D, et al. Protective effect of paeoniflorin on irradiation-induced cell damage involved in modulation of reactive oxygen species and the mitogen-activated protein kinases [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2007, 39: 426.

Study on antioxidant effect and chemical constituents of Taohong Siwu decoction

LIU Li, DUAN Jin'ao*, TANG Yuping, MA Hongyue, SU Shulan, LI Xiaoxi

(Jiangsu Key Laboratory for Traditional Chinese Medicine Formulae Research, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

[Abstract] **Objective:** To evaluate the antioxidant effects of Taohong Siwu decoction and to exploit the bioactive constituents.

Method: The samples were prepared by macroporous adsorptive resins (TH-1-TH-15). Three antioxidant models were adopted to evaluate the antioxidant activities of Taohong Siwu decoction and its different separated fractions *in vitro*. It was found that fractions (TH-2, TH-4, TH-7, TH-8, TH-9), separated from Taohong Siwu decoction, mainly contributed to the antioxidant effects. The chemical constituents in the most active fraction TH-8 were identified and determined by HPLC. **Result:** TH-8 showed significant antioxidant activities in the antioxidant experiments. Six compounds in the fraction were determined which were amygdalin, albiflorin, paeoniflorin, benzoic acid, coumaric acid and ferulic acid. The contents were 75.70, 31.26, 60.79, 1.196, 1.108, 4.861 mg L⁻¹, respectively.

Conclusion: Glycosides and aromatic acids may be the principle effective constituents in the active fraction.

[Key words] Taohong Siwu decoction; antioxidant effects; bioactive constituents

doi:10.4268/cjcm20111209

[责任编辑 马超一]