

· 药理 ·

活血化瘀方清除 DPPH 自由基活性量效关系

唐于平*, 姜玮, 宋树霖, 张彦华, 束晓云, 丁安伟, 段金廉
(南京中医药大学江苏省方剂研究重点实验室, 南京 210046)

[摘要] 目的:对活血化瘀代表性方剂进行清除 2,2-二苯基-1-苦肟基(DPPH)自由基活性评价。方法:采用 DPPH 自由基清除率法测定活血化瘀代表方血府逐瘀汤(XF)、少腹逐瘀汤(SF)、膈下逐瘀汤(GX)、身痛逐瘀汤(ST)、通窍活血汤(TQ),每个组方分别取全方、醇沉沉淀和醇沉上清液 3 个不同样品测清除 DPPH 自由基活性。结果:活血化瘀方各样品对 DPPH 自由基都有明显的清除作用,与空白比较有显著性差异($P < 0.01$),且有明显的量效关系,按生药量比较,5 个全方较各分离部位效果好,全方清除自由基活性顺序为:GX > TQ > SF > ST > XF。其 IC_{50} 按生药量计依次为 0.93, 1.40, 1.50, 2.31, 2.32 $g \cdot L^{-1}$ 。结论:采用酶联免疫检测仪检测活血化瘀方对 DPPH 自由基的清除作用,方法简便,重复性好,适合高通量筛选中药及方剂的清除自由基活性。

[关键词] 活血化瘀方;抗氧化;2,2-二苯基-1-苦肟基;量效关系

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)19-0142-04

[DOI] CNKI:11-3495/R.20110809.1705.010 **[网络出版时间]** 2011-08-09 17:05

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20110809.1705.010.html>

Dose-response Relationship of Free Radical Scavenging Activity by Blood-activating and Stasis-removing Formulae

TANG Yu-ping*, JIANG Wei, SONG Shu-lin, ZHANG Yan-hua, SHU Xiao-yun, DING An-wei, DUAN Jin-ao
(Jiangsu Key Laboratory for Traditional Chinese Medicine Formulae Research, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210046, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effects of the free radical scavenging activity of these formulae for blood-activating and stasis-removing such as Xuefu Zhuyu Decoction(XF), Shaofu Zhuyu Decoction(SF), Gexia Zhuyu Decoction(GX), Shentong Zhuyu Decoction(ST) and Tongqiao Huoxue Decoction(TQ). **Method:** Free radical scavenging activity was determined by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) method. **Result:** The result showed that all these formulae had significant effects on scavenging DPPH radical ($P < 0.01$), in a dose-dependent manner. The free radical scavenging capacity on DPPH were in the following descending order:GX > TQ > SF > ST > XF. The scavenging ability in total formula was better than in ethanol precipitant and supernatant. **Conclusion:** Validation studies proved that the enzyme-linked immunosorbent assay for DPPH had good reproducibility and feasibility. The method could be used as high throughput screening for Chinese herbs and traditional chinese medicine formulae.

[Key words] formulae for blood-activating and stasis-removing; antioxidant activity; DPPH; dose-response relationship

[收稿日期] 20110204(002)

[基金项目] 国家科技支撑计划课题(2008BAI51B01);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重大基础研究项目(06KJA36022, 07KJA36024);江苏省方剂高新技术研究重点实验室建设项目(BM2010576);江苏高校优秀学科(中药学)建设工程资助项目

[通讯作者] *唐于平,博士,教授,主要从事中药及方剂功效物质基础、量效关系与相互作用研究, Tel:025-85811916, E-mail: yupingtang@njutcm.edu.cn

自由基与人体一些重大疾病有一定的相关性, Harman 提出的自由基学说认为:自由基攻击生命大分子造成的损伤是引起机体衰老的根本原因^[1],也是诱发肿瘤^[2]、血栓和动脉硬化等疾病的重大原因,这一学说已被越来越多的人所接受。活血化癥类方药具有改善心脑血管功能、血小板及凝血系统功能、微循环等生理功能,抗心肌缺血、脑缺血,抑制血小板聚集,抗凝、抗血栓形成,抗肿瘤等作用^[3-6]。有文献报道,酚酸类成分具有较强的氧化作用,我们的前期研究活血化癥方中含有丰富的酚酸类成分^[5,7],因此,该类方剂可能会有较强抗氧化作用。

本实验采用 2,2-二苯基-1-苦肼基自由基(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH)自由基清除率法测定清代王清任的经典活血化癥代表方血府逐癥汤(XF)、少腹逐癥汤(SF)、膈下逐癥汤(GX)、身痛逐癥汤(ST)、通窍活血汤(TQ)全方、醇沉沉淀和醇沉上清液 3 个不同样品的抗氧化活性。

1 材料

1.1 试剂 DPPH(Sigma-Aldrich 公司),DMSO(上海凌峰化学试剂有限公司),超纯水自制,其他试剂均为分析纯。

1.2 仪器 酶联免疫检测仪(美国 Bio-Tek 公司)

1.3 组方药材 活血化癥方组方药材桃仁、红花、当归、生地、赤芍、川芎、柴胡、枳壳、桔梗、牛膝、甘草、小茴香(炒)、干姜(炒)、延胡索、没药、肉桂、蒲黄、五灵脂(炒)、丹皮、乌药、香附、枳壳、秦艽、羌活、地龙、麝香、生姜、大枣,均购自安徽丰原铜陵中药饮片公司,经南京中医药大学中药鉴定教研室乐巍博士鉴定,符合《中国药典》2010 年版项下标准。

2 方法

2.1 受试药物的制备 称取血府逐癥汤(XF)组方药材[桃仁:红花:当归:生地黄:川芎:赤芍:牛膝:桔梗:柴胡:枳壳:甘草12:9:9:9:5:6:9:5:3:6:3]6.08 kg,少腹逐癥汤(SF)组方药材[小茴香(炒):干姜(炒):延胡索:没药:当归:川芎:肉桂:赤芍:蒲黄:五灵脂(炒)1.5:3:3:3:9:3:3:6:9:6]3.26 kg,膈下逐癥汤(GX)组方药材[五灵脂(炒):当归:川芎:桃仁(研泥):丹皮:赤芍:乌药:延胡索:甘草:香附:红花:枳壳6:9:6:9:6:6:6:3:9:5:9:5]3.16 kg,身痛逐癥汤(ST)组方药材[秦艽:川芎:桃仁:红花:甘草:羌活:没药:当归:五灵脂(炒):香附:牛膝:地龙(去土)3:6:9:9:6:3:6:9:6:3:6:6]2.88 kg,这 4 个

组方药材分别水提 2 次,第 1 次加 10 倍量,煎煮 2 h,第 2 次加 8 倍量,再煎煮 2 h;通窍活血汤(TQ)组方药材[赤芍:桃仁(研泥):川芎:红花:老葱:生姜(切片):大枣(去核):麝香(绢包)3:9:3:9:6:9:12:0.15]3.11 kg,用体积分数为 20% 的醇提,第 1 次加 10 倍量,煎煮 2 h,第 2 次加 8 倍量,再煎煮 2 h。各方煎出液合并后浓缩,浓缩液加入乙醇至含醇量为 80%,搅匀,放置过夜,过滤沉淀,上清液浓缩得干浸膏。每个组方制得 3 个样品,分别为全方,醇沉上清液,醇沉沉淀。各提取物的浸膏得率见表 1。精密称定各样品,样品用体积分数为 1% 的 DMSO 溶解,配制成最高质量浓度为生药 10 g·mL⁻¹ 的受试品溶液,离心,吸取上清液,稀释成含生药为 5,2.5,1.25,0.625 g·L⁻¹ 4 个质量浓度,稀释所用的溶液为溶解样品的溶液。

表 1 5 个组方各提取物的浸膏得率

编号	样品情况	样品得量	得率	生药含量
		/g	/%	/g·g ⁻¹ 浸膏
XF-1	全方水提液	955.8	31.4	3.18
XF-2	醇沉上清液	324.6	10.6	9.37
XF-3	醇沉沉淀	492.2	16.2	6.18
SF-1	全方水提液	336.1	30.5	3.28
SF-2	醇沉上清液	153.3	7.1	14.04
SF-3	醇沉沉淀	234.1	10.9	9.20
GX-1	全方水提液	382.8	36.4	2.75
GX-2	醇沉上清液	221.9	10.5	9.50
GX-3	醇沉沉淀	259.8	12.3	8.11
ST-1	全方水提液	406.6	42.4	2.36
ST-2	醇沉上清液	125.4	6.5	15.31
ST-3	醇沉沉淀	134.2	7.0	14.31
TQ-1	全方水提液	253.2	15.9	6.28
TQ-2	醇沉上清液	120.3	79.4	12.59
TQ-3	醇沉沉淀	74.0	4.9	20.48

2.2 DPPH 溶液的配制 称取 DPPH 粉末适量,用无水乙醇溶液配制成 0.1 g·L⁻¹ 的溶液,避光保存(0~4℃)。

2.3 活血化癥方清除自由基活性的测定 分别移取上述供试品溶液 0.1 mL 于 96 孔板中,每列 8 个复孔加入同一个样品,5 个复孔加入 0.1 mL DPPH 溶液,3 个复孔加入 0.1 mL 无水乙醇扣除药物本底颜色对实验的影响,待各溶液加入完毕,避光反应 30 min 后在 517 nm 波长下测定其吸光度(A),溶剂空白加 DPPH 后为 A₀,溶剂空白加无水乙醇后为

A_0 , 供试品加 DPPH 后为 A_1 , 供试品加无水乙醇后的吸光度为 A_1' , 按下述公式计算各供试品对 DPPH 自由基的清除能力^[8]。

$$\text{DPPH 清除率} = \frac{(A_0 - A_0') - (A_1 - A_1')}{A_0 - A_0'} \times 100\%$$

2.4 统计分析 实验数据统计采用 SPSS 11.5 软件中的 one way-ANOVA 完成, 与空白组比较采用 Dunnett 检验。IC₅₀ 的计算采用 IC₅₀ 计算软件。

3 结果

3.1 各样品对 DPPH 自由基的清除率 活血化瘀方各样品对 DPPH 自由基都有明显的清除作用, 与空白比较有显著性差异 ($P < 0.01$) 且有明显的量效关系, 各样品清除率结果见图 1。

图 1 显示, 5 个全方效果较不同提取部位效果好, 而醇沉上清液部位和醇沉沉淀部位的效果, 各方各有特点。XF, SF, GX, ST 4 个方剂醇沉上清液部位和醇沉沉淀部位效果均较好, 和整方效果差距不大, 而 TQ 部位效果明显差于全方, 且两部位清除率相加也低于整方的效果。

3.2 清除 DPPH 自由基的 IC₅₀ 本实验采用生药量和干浸膏量 2 种浓度表示方法表示清除自由基的 IC₅₀, 按生药量表示是为考察部位对整方的贡献, 按干浸膏量表示为考察每 1 g 浸膏里所含成分清除 DPPH 自由基的活性。由表 2 可以看出, 按生药量表示的 IC₅₀, 5 个全方的 IC₅₀ 均比部位小, 说明全方

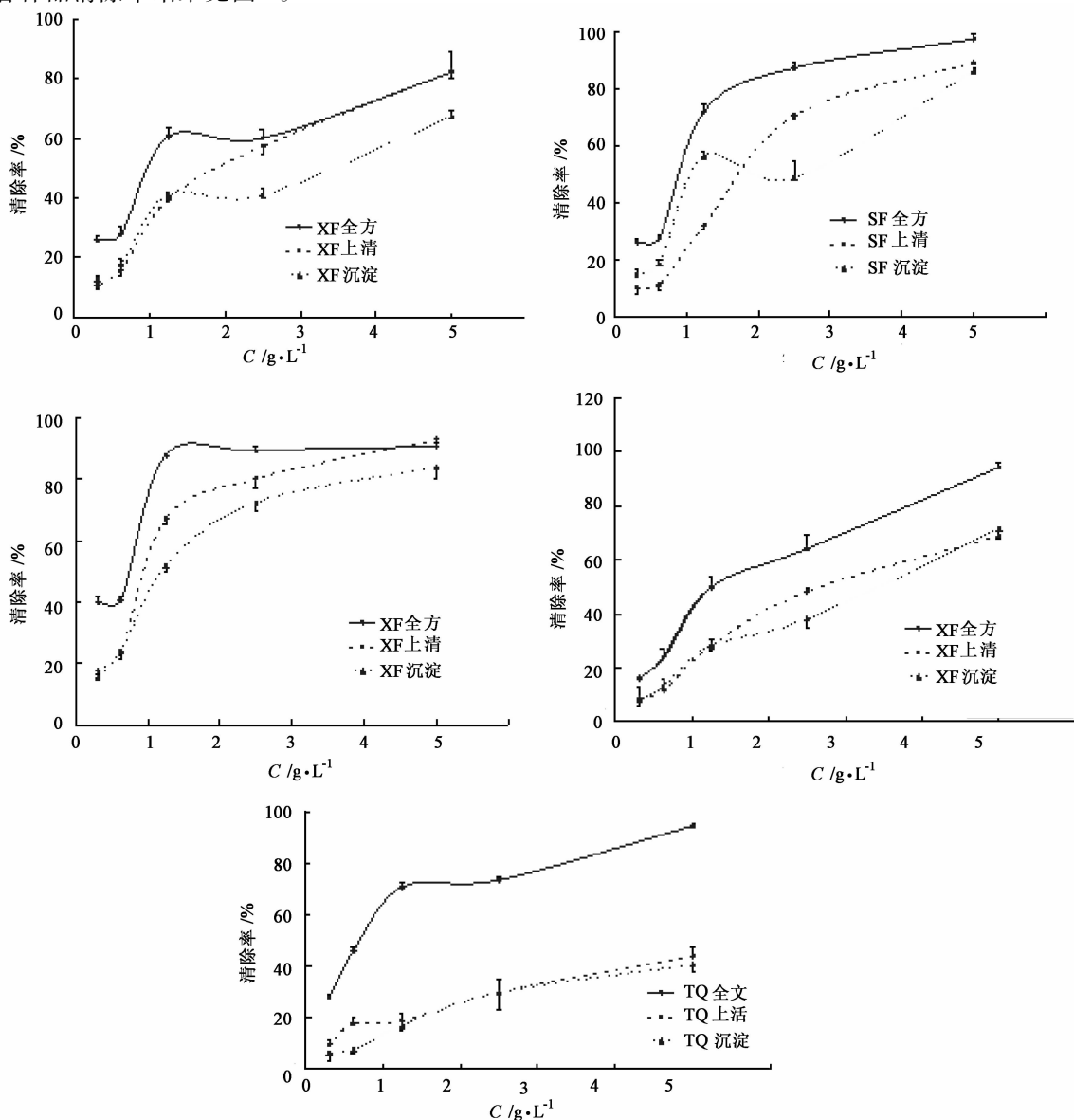


图 1 活血化瘀方 5 个组对 DPPH 自由基的清除率量效曲线

的清除自由基效果较部位好,2 部位中成分无明显的拮抗作用。全方清除自由基活性 $GX > TQ > SF > ST > XF$ 。按浸膏量表示的 IC_{50} ,前 4 个方醇沉上清部位的 IC_{50} 最小,全方次之,醇沉沉淀部位最大,说明每克醇沉上清部位干浸膏中成分清除自由基的活性较全方和醇沉沉淀部位强。TQ 全方比 2 个部位效果强很多,沉淀部位比上清部位中成分清除自由基效果好。

表 2 活血化癥方各样品清除 DPPH 自由基的 IC_{50}

样品	$IC_{50}/g \cdot L^{-1}$	IC_{50}/g 干浸膏/L
XF-1	2.32	0.87
XF-2	3.56	0.47
XF-3	5.26	1.44
SF-1	1.50	0.37
SF-2	3.17	0.25
SF-3	3.02	0.50
GX-1	0.93	0.27
GX-2	1.93	0.20
GX-3	2.56	0.44
ST-1	2.31	0.78
ST-2	5.37	0.73
ST-3	5.70	1.04
TQ-1	1.40	0.39
TQ-2	16.30	2.12
TQ-3	14.55	1.98

4 讨论

文献报道的 DPPH 法测定样品清除自由基的活性实验大部分采用紫外-可见分光光度计测定各样品的吸光度^[9],通过计算得到清除率。也曾有文献采用酶联免疫检测仪^[10-11]进行清除自由基实验,96 孔板作为反应容器,具有加样量少,节省试剂,实验方便,是高通量筛选清除自由基活性的方法。本实验室^[8]不进行单独的调零,而在 96 孔板上通过加入 0.1 mL 溶剂 0.1 mL 无水乙醇调零,样品溶液加无水乙醇做为药物本底颜色的吸光度,并加以扣除。通过本实验研究,我们发现采用酶联免疫检测仪检测活血化癥方对 DPPH 自由基的清除作用,方法简便,重复性好,适合高通量筛选中药及方剂的清除自由基活性。

中药及方剂在药效评价过程中采用什么浓度表示方法直接影响着结论的正确性。采用何种浓度表示,要由实验的目的来判定,对于研究方剂的配伍

作用,各部位对复方总效应的贡献,建议采用在同一生药量下进行比较,各部位都在同一生药量下的加和相当于整个复方的全部成分,各部位的药效加和与总方的比较可以得出配伍的作用。按生药量表示浓度,本实验结果显示,5 个方各部位效果均低于全方,这充分体现了中医方剂整体作用的优势与特色。通过 IC_{50} 测定比较分析,全方清除自由基活性强弱顺序为:膈下逐瘀汤 > 通窍活血汤 > 少腹逐瘀汤 > 身痛逐瘀汤 > 血府逐瘀汤,这可能与各方的组方药味不同及所含效应物质的差异有关。

[参考文献]

- [1] 张铁军,陈常青. 延缓衰老和抗疲劳中药现代研究与应用 [M]. 北京:人民卫生出版社,2007:11.
- [2] Valko M, Izakovic M, Mazur M. Role of oxygen radicals in DNA damage and incidence [J]. Mol Cell Biol, 2004, 266(1):37.
- [3] 周卫,宿树兰,刘培,等. 蒲黄-五灵脂药对在少腹逐瘀汤活血化癥效应中的贡献[J]. 中国实验方剂学杂志,2010,16(6):179.
- [4] 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):68.
- [5] 唐于平,段金廛,范欣生,等. 芳香酸类成分在活血化癥方中的作用分析[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2008,10(4):38.
- [6] 鹿燕敏,李兰芳,霍海如,等. 4 种活血化癥中药有效成分对血管紧张素 II 诱导的血管外膜成纤维细胞增殖及胶原合成的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2008,14(11):68.
- [7] 张彦华,唐于平,丁安伟,等. 高效液相色谱法同时测定四个活血化癥方中六种芳香酸的含量[J]. 药物分析杂志,2010,30(3):379.
- [8] Liu R, Wang M, Duan J A, et al. Purification and identification of three novel antioxidant peptides from *Cornu bubali*(water buffalo horn)[J]. Peptides, 2010, 31(5):786.
- [9] 张志国,陈锦屏,邵秀芝,等. 红枣核类黄酮清除 DPPH 自由基活性研究[J]. 食品科学,2007,28(2):67.
- [10] 李波,黄明菊,李妍岚,等. 肿节风中咖啡酸衍生物及抗氧化活性[J]. 沈阳药科大学学报,2009,26(11):900.
- [11] 李先霞,黄明菊,李妍岚,等. 肿节风中抗氧化活性成分的研究[J]. 中国药物化学杂志,2010,20(1):57.

[责任编辑 聂淑琴]