

· 化学与分析 ·

生脉散中人参、麦冬和五味子提取物体外抗氧化作用

陈海芳^{1,2}, 戚进^{1*}, 余伯阳^{1*}

- (1. 中国药科大学 江苏省中药评价与转化重点实验室, 南京 211198;
2. 江西中医药大学 现代中药制剂教育部重点实验室, 南昌 330004)

[摘要] 目的:明确生脉散中人参、麦冬和五味子提取物的体外抗氧化作用。方法:采用超氧阴离子($O_2^- \cdot$),过氧化氢(H_2O_2)和过氧硝基($ONOO^-$)生成体系,以离线方式分析生脉散中的人参、麦冬和五味子清除 3 种活性氧(ROS)的作用,并在此基础上,采用 HPLC-鲁米诺- H_2O_2 -发光强度(CL)和 HPLC-鲁米诺-邻苯三酚-CL, HPLC-鲁米诺- $ONOO^-$ -CL 联用技术在线分析生脉散中的人参、麦冬和五味子直接清除 $O_2^- \cdot$, H_2O_2 和 $ONOO^-$ 的作用,明确生脉散直接清除 ROS 的物质基础和抗氧化作用特点。结果:生脉散中人参、麦冬和五味子对于 3 种 ROS 具有直接清除作用的活性成分主要集中在亲水性部位,亲脂性部位成分直接清除 ROS 作用较弱。结论:通过 3 种 ROS 在线清除体系,明确了生脉散中人参、麦冬和五味子中直接清除 ROS 的成分,且直接清除 ROS 可能并不是生脉散的主要作用,为后期生脉散在心肌缺血损伤中作用机制的研究提供依据以及新思路。

[关键词] 人参;麦冬;五味子;活性氧

[中图分类号] R284.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2016)19-0037-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfx.2016190037

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20160804.1119.068.html>

[网络出版时间] 2016-08-04 11:19

Antioxidative Effect *in Vitro* of Ginseng Radix et Rhizoma, Ophiopogonis Radix and Schisandrae Chinensis Fructus from Shengmai San

CHEN Hai-fang^{1,2}, QI Jin^{1*}, YU Bo-yang^{1*}

- (1. Jiangsu Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine (TCM) Evaluation and Translational Research, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198 China;
2. Key Laboratory of Modern Preparation of TCM of Ministry of Education, Jiangxi University of TCM, Nanchang 330004, China)

[Abstract] **Objective:** To clarify the antioxidative effects *in vitro* of Ginseng Radix et Rhizoma, Ophiopogonis Radix and Schisandrae Chinensis Fructus from Shengmai San. **Method:** With the use of superoxide anion ($O_2^- \cdot$) H_2O_2 and $ONOO^-$ generation system, reactive oxygen species (ROS) scavenging effect of Ginseng Radix et Rhizoma, Ophiopogonis Radix and Schisandrae Chinensis Fructus was analyzed in offline mode; furthermore, three online ROS systems including HPLC-luminol- H_2O_2 -CL, HPLC-luminol-pyrogallol-CL, HPLC- $ONOO^-$ -luminol-CL were used to analyze the direct scavenging effect of Ginseng Radix et Rhizoma, Ophiopogonis Radix and Schisandrae Chinensis Fructus on $O_2^- \cdot$, H_2O_2 and $ONOO^-$, and clarify its effective components and

[收稿日期] 20160412(002)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81274004,81473317);国家“重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09102201-015)

[第一作者] 陈海芳,博士,讲师,从事中药药效物质基础和药效研究, Tel:025-86185157, E-mail:chenhf88@126.com

[通讯作者] *戚进,教授,从事中药物质基础和药效研究, Tel:025-86185157, E-mail:yaoyuelingxing@163.com;

*余伯阳,博士,教授,从事中药复方物质基础和药效研究, Tel:025-86185157, E-mail:boyangyu59@163.com

antioxidative characteristics. **Result:** Water-soluble components could be the main constituents in scavenging three ROS, and lipophilic component exerted little effect on scavenging ROS. **Conclusion:** Three constituents with direct ROS scavenging effect were clarified with use of 3 ROS online scavenging systems, and the effect of directly scavenging ROS could be not the main effect of Shengmai San, providing basis and new thoughts for further study on mechanism of Shengmai San in preventing and treating myocardial ischemia injury.

[**Key words**] Ginseng Radix et Rhizoma; Ophiopogonis Radix; Schisandrae Chinensis Fructus; reactive oxygen species

心血管疾病已成为世界范围内的一个“现代流行病”,现代研究表明活性氧(ROS)不仅参与生物体正常的免疫、代谢与细胞信号传导等生理过程,同时也与心血管疾病的发生发展过程密切相关^[1-2]。缺血性心脏病是死亡率最高的一类心血管疾病,其发病机制十分复杂,涉及多种病理环节,其中过多产生的 ROS 造成的氧化损伤是缺血性心脏病的关键病理环节^[3]。生物体内产生的 ROS 主要包括 $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 , 羟自由基($\cdot OH$), $NO\cdot$, $ONOO^-$ 和 $LOO\cdot$ 自由基等^[4-5],这些活性氧非常活泼,易攻击生物膜以及核酸和蛋白,造成生物膜脂质过氧化,核酸断裂和蛋白硝化等后果^[6],引发细胞凋亡或坏死。因此,抗氧化可能是减轻心肌缺血性疾病的有效途径,其中清除 ROS 是抗氧化作用的一个方面,而基于 ROS 清除作用研究中药防治心肌损伤的抗氧化物质基础是切实可行的一种方法。

生脉散在临床上广泛用于冠心病、心力衰竭、心肌炎、心肌梗死等心血管疾病的治疗,目前研究证实生脉散防治缺血损伤的作用与抗氧化作用^[7-9]有关。生脉散由人参、麦冬和五味子构成,许多研究报告^[10-13]表明,人参、麦冬和五味子具有清除 ROS 作用。文献大多是基于离线 ROS 清除作用模式研究五味子、人参和麦冬的抗氧化作用,对于人参、麦冬和五味子体外清除 ROS 的药效物质基础尚不明确,且五味子中的木脂素类和多糖类在直接清除 ROS 的作用方面的报道也不一致^[14-15]。本课题前期研究表明,生脉散具有清除 TBS 自由基以及 H_2O_2 的作用^[11,16],为了明确生脉散中人参、麦冬和五味子直接清除 ROS 的抗氧化作用特点以及物质基础,本实验在前期研究以及前人的研究基础上,以参与机体氧化应激损伤的 3 种 ROS—过氧化氢(H_2O_2),超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)以及过氧硝基($ONOO^-$)为活性指标,基于离线 ROS 清除模式^[17]确证生脉散中人参、麦冬和五味子的 ROS 清除作用,并结合 HPLC-鲁米诺-过氧化氢-CL 和 HPLC-鲁米诺-邻苯三酚-CL,

HPLC-鲁米诺-过氧硝基-CL 在线联用技术^[18-19],分析生脉散中人参、麦冬和五味子直接清除 ROS 的物质基础,为生脉散在心肌缺血损伤疾病中的抗氧化损伤作用研究提供基础和参考依据。

1 材料

人参提取物(批号 20130902),麦冬提取物(批号 20130904)以及五味子提取物(批号 20130903),由天士力之骄药业有限公司提供。

3-氨基邻苯二甲酰肼(鲁米诺, Sigma 公司);焦性没食子酸(邻苯三酚),无水碳酸钠,碳酸氢钠,磷酸二氢钠,过氧化氢,乙二胺四乙酸二钠(EDTA),磷酸氢二钠、亚硝酸钠、盐酸、氢氧化钠,二氧化锰均为分析纯。蒸馏水由 Milli-Q 型超纯水系统(美国 Millipore 公司)制备。

LC-2010C 型高效液相色谱仪(包括四元泵,自动进样器,柱温箱, DAD 检测器及 LC Solution 数据工作站,日本 Shimadzu), 6520 系列 HPLC-Q-TOF-MS/MS 质谱仪(Agilent Technologies), BPCL-1-G-C 型微弱发光测量仪及 BPCL Appl. 7.2 数据处理工作站(中国科学院北京生物物理研究所), AE-240 型 1/10 万电子天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司), pHs-25 型酸度计(上海雷磁仪器厂), BT-200 型恒流泵(上海沪西分析仪器厂), DU640 型紫外-可见分光光度计(Beckman)。

2 方法与结果

2.1 样品制备

2.1.1 人参提取物 取人参饮片 100 g,加 8 倍量无水乙醇回流提取 3 次,合并乙醇液,浓缩至无醇味,加水至原药材等重,过滤,滤液浓缩后减压干燥,得提取物,提取物得率 11.6%。

2.1.2 麦冬提取物 取麦冬饮片 100 g,加 5 倍量水回流提取 3 次,合并提取液,浓缩至一定体积后,加无水乙醇至含醇量达 75%,静置,过滤,滤液浓缩后减压干燥,提取物得率 14.6%。

2.1.3 五味子提取物 取五味子饮片 100 g,加 7 倍量水回流提取 3 次,合并提取液,浓缩至一定体积

后,加无水乙醇至含醇量达 85%,静置,过滤,滤液浓缩后减压干燥,提取物得率 3.1%。

精密称取五味子提取物、人参提取物和麦冬提取物适量,加水超声使溶解,按照实验需要,临用前配制。

2.2 色谱条件 Venusil MP C₁₈ 色谱柱 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm), 流动相乙腈 (A)-0.1% 磷酸水 (B) 梯度洗脱 (0 ~ 20 min, 10% ~ 20% A; 20 ~ 40 min, 20% ~ 40% A; 40 ~ 100 min, 40% ~ 60% A; 100 ~ 120 min, 60% ~ 90% A), 柱温 30 °C, 流速 1.0 mL · min⁻¹, 分别在 203, 280, 254 nm 检测。

2.3 HPLC-MSⁿ 条件 ESI 离子源, 采用正、负离子模式检测并采集数据, 数据采集范围 *m/z* 100 ~ 1 500。干燥气流速 9.0 L · min⁻¹, 干燥气温度 350 °C, 毛细管电压 2 500 V, 碰撞能量 103.4 ~ 241.3 kPa。HPLC 分析条件同上, 0.1% 磷酸改用 0.1% 甲酸。数据处理系统为 Masshunter workstation software version B.02.00 (Agilent Technologies)。

2.4 化学发光液制备 鲁米诺贮备液:精密称取一定量的鲁米诺,用 0.1 mol · L⁻¹ 碳酸钠水溶液配制成浓度为 0.018 mol · L⁻¹ 的鲁米诺贮备液,避光,4 °C 保存,3 d 后使用。

2.5 离线 H₂O₂, O₂⁻ 和 ONOO⁻ 清除测试

2.5.1 鲁米诺-H₂O₂-碳酸缓冲液体系检测 H₂O₂ 清除能力在发光杯中加入样品溶液 (以相同量的 DMSO 为空白对照) 50 μL 和 0.15% H₂O₂ 溶液 50 μL, 再加入鲁米诺-碳酸缓冲液 (1:17) 混合溶液 900 μL 启动反应, 记录发光强度 (CL)。

2.5.2 鲁米诺-邻苯三酚-碳酸缓冲液 (pH 10.2) 体系检测 O₂⁻ 清除能力 在发光杯中加入样品溶液 (以相同量的 DMSO 作空白) 10 μL 和 1 × 10⁻³ mol · L⁻¹ 邻苯三酚溶液 20 μL, 再加入鲁米诺-碳酸缓冲液 (1:2, pH 10.2) 混合溶液 970 μL 启动反应, 反应总体积 1 mL, 记录 CL。

2.5.3 采用鲁米诺-ONOO⁻-碳酸缓冲液体系检测清除 ONOO⁻ 能力 过氧硝基 (ONOO⁻) 的制备: 将亚硝酸钠 0.172 5 g 加入至 0.135% H₂O₂ 溶液 50 mL 中, 在冰浴条件下, 以磁力搅拌器搅拌, 并快速加入 1 mol · L⁻¹ 稀盐酸溶液 25 mL, 1 s 后快速加入 1.5 mol · L⁻¹ 氢氧化钠溶液 25 mL。反应液加入适量二氧化锰粉末, 搅拌 5 min, 以除去过量的 H₂O₂, 抽滤, 取滤液, 即得。用紫外-可见分光光度计测定 ONOO⁻ 储备液浓度。以 0.1 mol · L⁻¹ 氢氧化钠溶液为空白, 检测其在 302 nm 的吸光度, ONOO⁻ 摩尔消

光系数 ε₃₀₂ = 1.67 mol · L⁻¹ · cm⁻¹, *N* 为稀释倍数。

$$C = A / 1.670 \times N \times 1.000$$

在发光杯中加入样品溶液 (以相同量的 DMSO 为空白) 50 μL 和 0.240 mmol · L⁻¹ ONOO⁻ 溶液 50 μL, 再加入 0.018 mol · L⁻¹ 鲁米诺-碳酸盐缓冲液 (pH 9.16, 1:17) 混合溶液 900 μL 启动反应, 记录 CL。

2.5.4 发光抑制率计算 一定浓度范围内 CL 与 ROS 的数量呈相关关系, 故可用 CL 表示 ROS 的产生量, 清除 ROS 的物质可以降低 CL, 根据 CL 下降可判断物质清除 ROS 的能力。

$$\text{发光抑制率} = (\text{CL}_{\text{空白}} - \text{CL}_{\text{样品}}) / \text{CL}_{\text{空白}} \times 100\%$$

2.6 在线 H₂O₂, O₂⁻ 和 ONOO⁻ 清除测试

2.6.1 清除 H₂O₂ 溶液的制备 碳酸盐缓冲液 (pH 10.0): 取 0.1 mol · L⁻¹ 碳酸钠水溶液和 0.1 mol · L⁻¹ 碳酸氢钠水溶液按 8:2 混合, pH 10.0。

鲁米诺溶液 (Solution I): 精密量取鲁米诺储备液, 加入用碳酸盐缓冲液 (pH 10.0) 稀释至浓度为 9.1 × 10⁻⁶ mol · L⁻¹。

H₂O₂ 溶液 (Solution II): 精密量取 30% H₂O₂ 溶液, 用水稀释至浓度为 8.8 × 10⁻⁷ mol · L⁻¹。

2.6.2 清除 O₂⁻ 溶液的制备 碳酸盐缓冲液 (pH 11.0): 取 0.1 mol · L⁻¹ 碳酸钠水溶液和 0.1 mol · L⁻¹ 碳酸氢钠水溶液按 117:8 混合, pH 11.0。

鲁米诺溶液 (Solution I): 精密量取鲁米诺储备液, 用碳酸盐缓冲液 (pH 11.0) 稀释至浓度为 5.5 × 10⁻⁵ mol · L⁻¹。

邻苯三酚储备液: 精密称定邻苯三酚试剂, 用 0.1 mmol · L⁻¹ 的盐酸水溶液配制成 1.0 × 10⁻² mol · L⁻¹ 邻苯三酚溶液。临用前用水稀释成浓度为 1.51 × 10⁻⁵ mol · L⁻¹ 溶液 (Solution II)。

2.6.3 清除 ONOO⁻ 溶液的制备 鲁米诺溶液 (Solution I): 精密量取鲁米诺储备液, 加入碳酸盐缓冲液 (pH 9.16) 稀释至浓度为 5.41 × 10⁻⁶ mol · L⁻¹。

ONOO⁻ 稀溶液 (Solution II): 取 ONOO⁻ 储备液适量, 用 0.1 mol · L⁻¹ NaOH 溶液稀释成终浓度为 0.240 mmol · L⁻¹ 的溶液, 备用。

2.7 在线化学发光检测 HPLC-CL 联用系统是由高效液相和化学发光仪两台仪器串联组成, 主要包括 HPLC (输液泵、色谱柱、DAD 检测器)、混合器、化学发光检测器 (流通池、光电倍增管和记录仪) 及蠕动泵 (输送化学发光溶液) 等主要组成部分。2 台仪器连接主要由不同内径 PEEK 管和 T 型管连接, 示意图见图 1。

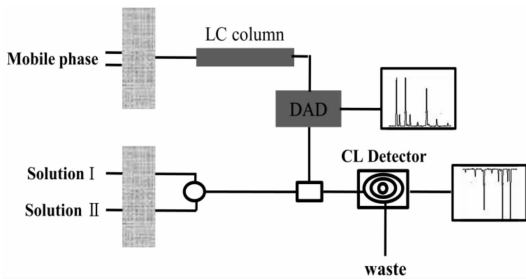


图 1 HPLC-CL 联用检测系统
Fig. 1 HPLC-CL detection apparatus

2.8 人参、麦冬和五味子离线清除 H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$ 以及 $ONOO^-$ 的作用考察 不同浓度人参、麦冬和五味子样品清除 H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$ 以及 $ONOO^-$ 3 种 ROS 的作用, 根据药物浓度以及药物对化学发光的抑制率建立量效关系曲线, 计算半抑制浓度 (IC_{50}), 见表 1。结果表明人参、麦冬和五味子均具有清除 ROS 的作用, 但是相对白藜芦醇, 作用较弱, 表明直接清除 ROS 可能不是生脉散的主要作用。

表 1 人参、麦冬、五味子对 H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$ 和 $ONOO^-$ 3 种 ROS 的半抑制浓度

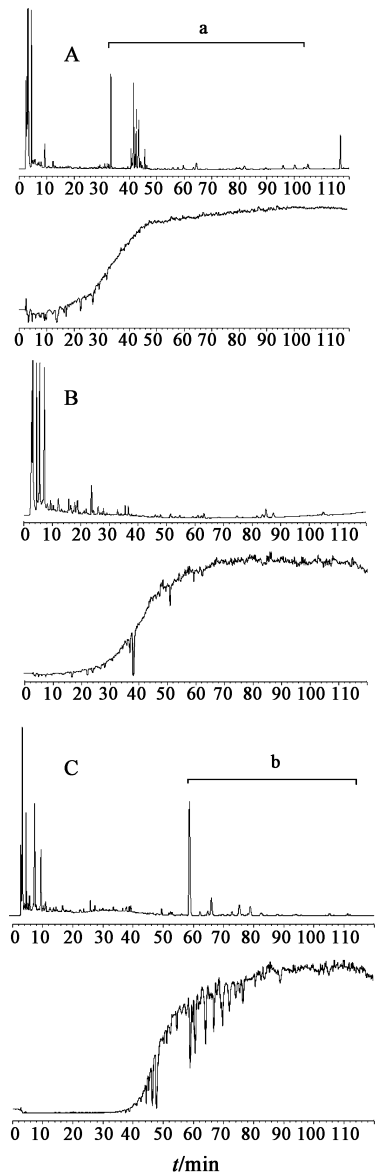
Table 1 IC_{50} of Ginseng Radix et Rhizoma, Ophiopogonis Radix and Schisandrae Chinensis Fructus from Shengmaisan on H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$ and $ONOO^-$ $g \cdot L^{-1}$

样品	H_2O_2	$O_2^{\cdot-}$	NOO^-
人参	0.45	195.5	269.45
麦冬	0.413	279.42	321.61
五味子	0.044	32.61	170.42
白藜芦醇	0.000 56	0.204	0.003 1

2.9 人参、麦冬和五味子在线清除 H_2O_2 人参、麦冬和五味子亲水性部位成分具有清除 H_2O_2 的作用, 人参皂苷类以及麦冬中的亲脂性部位成分活性很弱, 五味子中的亲脂性部位成分具有一定的清除 H_2O_2 的作用, 其中大多数木脂素类成分直接清除 H_2O_2 的作用很弱, 而木脂素类成分戈米新 J 和当归酰戈米辛 H 显示出一定的清除 H_2O_2 的活性。见图 2。

2.10 人参、麦冬和五味子在线清除 $O_2^{\cdot-}$ 人参、麦冬和五味子具有清除 $O_2^{\cdot-}$ 作用, 但作用较弱, 且 3 味药的活性均主要集中在亲水性部位, 结果与目前文献中报道人参、麦冬以及五味子多糖等一些亲水性部位成分具有自由基清除作用相符。相比于亲水性部位成分, 人参皂苷和木脂素类化合物直接清除 $O_2^{\cdot-}$ 的作用很弱。见图 3。

2.11 人参、麦冬和五味子在线清除 $ONOO^-$ 人参、麦冬和五味子对 $ONOO^-$ 清除作用的活性成分主

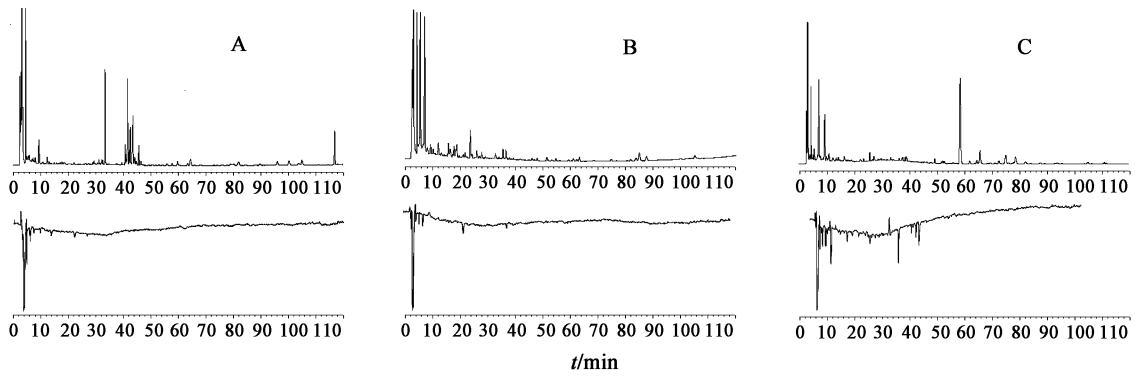


A. 人参 HPLC 及清除 H_2O_2 活性; B. 麦冬 HPLC 及清除 H_2O_2 活性; C. 五味子 HPLC 及清除 H_2O_2 活性; a. 人参皂苷; b. 木脂素

图 2 人参、麦冬和五味子提取物 HPLC 及其对 H_2O_2 清除作用
Fig. 2 Scavenging activity and HPLC profiles of Ginseng Radix et Rhizoma, Ophiopogonis Radix and Schisandrae Chinensis Fructus from Shengmaisan on H_2O_2

要集中在亲水性部位, 人参皂苷类成分以及麦冬亲脂性部位成分几乎没有活性。五味子中木脂素类成分戈米新 J 显示出了一定的清除自由基的活性, 同时五味子醇乙具有微弱的清除 $ONOO^-$ 的作用, 而其他木脂素对于 $ONOO^-$ 的清除作用较弱。见图 4。

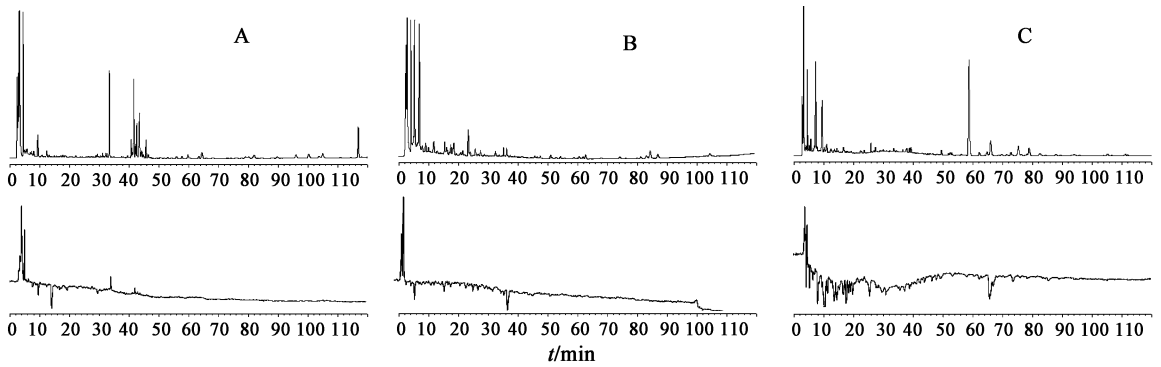
2.12 HPLC-Q-TOF-MS/MS 分析 利用 HPLC-Q-TOF-MS/MS 对人参、麦冬和五味子提取物中的化学成分进行了分析, 在人参和五味子中均检测到了大量的皂苷类和木脂素类成分, 具体质谱信息见表 2。麦冬主要含有大量水溶性成分糖类, 无法用液质联



A. 人参 HPLC 及清除 O_2^- 活性; B. 麦冬 HPLC 及清除 O_2^- 活性; C. 五味子 HPLC 及清除 O_2^- 活性

图 3 人参、麦冬和五味子提取物 HPLC 及其对 O_2^- 清除作用

Fig. 3 Scavenging activity and HPLC profiles of Ginseng Radix et Rhizoma, Ophiopogonis Radix and Schisandrae Chinensis Fructus from Shengmaisan on O_2^-



A. 人参 HPLC 及清除 $ONOO^-$ 活性; B. 麦冬 HPLC 及清除 $ONOO^-$ 活性; C. 五味子 HPLC 及清除 $ONOO^-$ 活性

图 4 人参、麦冬和五味子提取物 HPLC 及其对 $ONOO^-$ 清除作用

Fig. 4 Scavenging activity and HPLC profiles of Ginseng Radix et Rhizoma, Ophiopogonis Radix and Schisandrae Chinensis Fructus from Shengmaisan on $ONOO^-$

表 2 人参、麦冬和五味子化学成分 HPLC-Q-TOF-MS/MS 联用分析

Table 2 HPLC-Q-TOF-MS/MS analysis on ingredients in Ginseng Radix et Rhizoma, Ophiopogonis Radix and Schisandrae Chinensis Fructus

化合物	准分子离子峰	$MS^2(m/z)$	来源
ginsenoside Rg ₁	845.361 2[M + HCOO] ⁻ , 799.362 8[M - H] ⁻ ,		人参
ginsenoside Rf	799.360 4[M - H] ⁻ , 845.356 7[M + HCOO] ⁻		人参
ginsenoside Rb ₁	1 107.407 2[M - H] ⁻ ,	945.381 3, 783.153 6	人参
ginsenoside Rc	1 077.416 5[M - H] ⁻ , 1 123.414 4[M + HCOO] ⁻	945.411 1	人参
ginsenoside Ro	955.344 7[M - H] ⁻	793.312 6, 655.211 0, 455.287 9	人参
ginsenoside Rb ₂	1 077.402 1[M - H] ⁻ , 1 123.398 8[M + HCOO] ⁻	783.356 6	人参
ginsenoside Rd	991.379 7[M + HCOO] ⁻ , 945.382 8[M - H] ⁻		人参
schisandrin	433.22[M + H] ⁺ , 455.205[M + Na] ⁺	415.2	五味子
gomisin D	531.224 8[M + H] ⁺ , 553.209 7[M + Na] ⁺		五味子
gomisin J	389.19[M + H] ⁺ , 411.17[M + Na] ⁺	-	五味子
schisandrol B	417.19[M + H] ⁺ , 439.17[M + Na] ⁺	399.18	五味子
angeloylgomisin H	501.25[M + H] ⁺ , 523.23[M + Na] ⁺	483.2, 401.2	五味子
angeloylgomisin Q	553.240 9[M + Na] ⁺		五味子

用技术进行成分鉴定,已在前期的工作中有报道^[11]。

3 讨论

为了全面认识生脉散的抗氧化作用,本研究在离线清除 ROS 作用的基础上,采用 HPLC-鲁米诺-H₂O₂-CL 和 HPLC-鲁米诺-邻苯三酚-CL, HPLC-鲁米诺-ONOO⁻-CL 在线联用技术,基于多种 ROS 指标,全面考察了生脉散组成药物人参、麦冬和五味子直接清除 ROS 的作用特点和作用部位。研究表明生脉散中的人参、麦冬和五味子直接清除 H₂O₂, O₂⁻· 以及 ONOO⁻ 成分主要集中在水溶性部位,这与前期的研究报道相符^[11],五味子中木脂素戈米辛 J 结构中含有酚羟基,因此表现出直接清除 H₂O₂ 和 ONOO⁻ 的作用。

本研究采用在线清除 ROS 体系,研究了生脉散中人参、麦冬和五味子直接清除 ROS 的作用,明确了人参皂苷以及五味子中的极大多数木脂素类成分均无直接清除自由基的作用特点,表明生脉散在防治心肌损伤作用方面可能主要是通过调节其他作用靶点达到抗心肌缺血损伤的作用,也为后期人参、麦冬和五味子以及生脉散制剂的作用机制提供一定的参考依据。

[参考文献]

[1] Victor T, Fanburg B. Reactive oxygen species in cell signaling [J]. Am J Physiol-lung C, 2000, 279 (6): L1005-L1028.

[2] Russell E G, Cotter T G. New insight into the role of reactive oxygen species (ROS) in cellular signal-transduction processes[J]. Int Rev Cel Mol Bio, 2015, 319: 221-254.

[3] Garcia-Dorado D, Rodríguez-Sinovas A, Ruiz-Meana M, et al. Protection against myocardial ischemia-reperfusion injury in clinical practice[J]. Revista Espa De Cardiologia, 2014, 67(5):394-404.

[4] Schieber M, Chande N S. ROS function in redox signaling oxidative stress[J]. Curr Bio, 2014, 24(10): R453-R462.

[5] Ye Z W, Zhang J, Townsend D M, et al. Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation [J]. BBA-Gen Subjects, 2015, 1850 (8): 1607-1621.

[6] Labuschagne C F, Brenkman A B. Current methods in quantifying ROS and oxidative damage in *Caenorhabditis elegans* and other model organism of aging[J]. Ageing Res Rev, 2013, 12 (4): 918-930.

[7] Li L H, Wang J S, Kong L Y, et al. Protective effects

of Shengmai San and its three fractions on cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. Chin J Nat Med, 2013, 11(3): 222-230.

[8] Wang L, Nishida H, Ogawa Y, et al. Prevention of oxidative injury in PC12 cells by a traditional Chinese medicine, Shengmai San, as a model of an antioxidant-based composite formula[J]. Biol Pharm Bull, 2003, 26(7): 1000-1004.

[9] Ichikawa H, Wang L, Konishi T. Prevention of cerebral oxidative injury by post-ischemic intravenous administration of Shengmai San[J]. Am J Chin Med, 2006,34(4): 591-600.

[10] 穆卫东,王虹,史影影,等.南北五味子多糖的提取及清除自由基作用的对比分析[J].光谱实验室, 2011, 28(1): 95-97.

[11] 王宇卿,朱丹妮,寇俊萍,等. HPLC-ABTS-DAD 在线检测生脉散和益气复脉粉针的体外抗氧化能力[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(16): 51-54.

[12] 成兰英,梁书凤,张治强. DPPH 法研究麦冬提取物抗氧化活性[J].精细化工,2012, 29(9): 870-874.

[13] Kim H G, Jang S S, Lee J S, et al. *Panax ginseng* meyer prevents radiation-induced liver injury viamodulation of oxidative stress and apoptosis [J]. J Ginseng Res, doi:10.1016/j.jgr.2016.02.006.

[14] 李斌,孟宪军,薛雪,等.北五味子乙素清除自由基及体外抑菌作用的研究[J].食品科学,2011,32(5): 79-82.

[15] 韩志福,胡高升,李娜,等.不同产地五味子质量评价及抗氧化活性研究[J].中药材,2012, 35(12): 1904-1909.

[16] Wu L, Ding X P, Zhu D N, et al. Study on the radical scavengers in the traditional Chinese medicine formula Shengmai San by HPLC-DAD coupled with chemiluminescence (CL) and ESI-MS/MS [J]. J Pharm Biomed Anal, 2010, 52(4): 438-445.

[17] 秦民坚,吉文亮,刘峻,等.射干中异黄酮成分清除自由基的作用[J].中草药,2003,34(7): 640-641.

[18] Qi J, Chen Y H, Wang Y, et al. Screening of peroxynitrite scavengers in Flos Lonicerae by using two new methods, an HPLC-DAD-CL technique and a peroxynitrite spiking test followed by HPLC-DAD analysis [J]. Phytochem Anal, 2016, 27(1):57-63.

[19] Ding X P, Qi J, Chang Y X, et al. Quality control of flavonoids in *Ginkgo biloba* leaves by high-performance liquid chromatography with diode array detection and on-line radical scavenging activity detection [J]. J Chromatogr A,2009, 1216 (11): 2204-2210.

[责任编辑 顾雪竹]