

文章编号:1673-1689(2010)01-0064-07

川芎有效成分的体外抗氧化研究

李文明¹, 刘洪涛², 李佳佳¹, 张吉¹, 石磊¹, 于超^{*1}

(1. 重庆医科大学 生命科学研究院, 重庆 400016; 2. 中国科学院 大连化学物理研究所, 辽宁 大连 116023)

摘要: 探讨了天然药用植物川芎(*Ligusticum chuanxiong* Hort.) 根茎内有效成分—川芎嗪的体外自由基清除活性, 以及对过氧化氢诱导的内皮细胞氧化损伤的抑制作用。流式细胞仪检测川芎嗪对 H_2O_2 诱导内皮细胞内活性氧(ROS)产生的抑制作用; Griess 法测定川芎嗪对一氧化氮(NO)的清除能力; 比色法测定川芎嗪对羟自由基($\cdot OH$)、过氧化氢(H_2O_2)、DPPH 自由基($\cdot DPPH$)及脂质过氧化的清除能力。川芎嗪可抑制 H_2O_2 诱导的内皮细胞内 ROS 的产生($P < 0.05$), 具有显著的 $OH\cdot$ 清除能力, 并且对 DPPH $\cdot$ 、NO、 H_2O_2 及脂质过氧化反应均具有一定的清除能力。具有一定的自由基清除活性并可抑制内皮细胞的氧化损伤。

关键词: 川芎嗪; 氧化应激; 自由基; 血管内皮细胞

中图分类号: O 629.32; R 285.5

文献标识码: A

Isolation and Antioxidative Activity of the Substrate Isolated from Chuanxiong

LI Wen-ming¹, LIU Hong-tao², LI Jia-jia¹, ZHANG Ji¹, SHI Lei¹, YU Chao^{*1}

(1. Institute of Life Science, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2. Dalian Institute of Chemical Physics, Chinese Academy of Science, Dalian 116023, China)

Abstract: The objective of this study is to investigate scavenging activity of tetramethylpyrazine (TMP), an effective constituent isolated from the rhizome of nature medicinal plant *Ligusticum chuanxiong* Hort., on free radicals in vitro and inhibitory effect of TMP on H_2O_2 -induced oxidative damage of endothelial cells. The inhibition of H_2O_2 -induced intracellular reactive oxygen species (ROS) by TMP was analyzed on a FACS Vantage SE flow cytometer. The suppressive effect of TMP on nitric oxide (NO) production was measured by Griess method. The scavenging effect of TMP on free radicals including hydroxyl radical ($\cdot OH$), hydrogen peroxide (H_2O_2), DPPH free radical (DPPH $\cdot$) and lipid peroxidation free radical was determined by colorimetry method. It was found that TMP inhibited H_2O_2 -induced production of intracellular ROS and exhibited strong scavenging activity against hydroxyl radical. In addition, TMP displayed scavenging activity against DPPH $\cdot$, NO, H_2O_2 and lipid peroxidation. The results presented here indicated that TMP may exhibit scavenging activity on free radicals in vitro and

收稿日期: 2009-02-25

基金项目: 重庆市教育委员会科学技术研究项目资助(NO KJ070304); 重庆医科大学人才启动基金资助项目(NO 0200100263)。

*通讯作者: 于超(1963-), 男, 辽宁沈阳人, 医学博士, 教授, 主要从事天然药物分析与研究。Email: yuchao@163.com

inhibitory effect on oxidative damage of endothelial cells.

Key words: tetramethylpyrazine, oxidative stress, free radical, vascular endothelial cell

自由基是人体组织中许多生化反应的中间代谢物,一般情况下,自由基的产生和清除处于动态平衡,机体存在着完善的自由基清除系统,但在某些病理情况下(如动脉粥样硬化),这种平衡被打破,致使机体损伤,机体产生的自由基不能被及时消除,活泼的自由基与不饱和脂肪酸反应,最终导致疾病的发生。

因此改善细胞功能,保护内皮细胞免受损伤,是预防和治疗血管性疾病的一种重要手段。在诸多因素导致内皮细胞损伤的过程中,氧化应激参与了其中的多个环节,所以天然药用植物来源的有效抗氧化成分在防治细胞损伤方面的特性和作用一直备受重视。

川芎为天然药用植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的根茎,属伞形科藁本属,多产于四川、江西、湖北等一带,具有活血化淤作用。川芎嗪(tetramethylpyrazine)是川芎中的有效单体之一,属生物碱类,可降低人体的脂质过氧化物^[1],抑制 2,2-联苯-1-苦基肼(DPPH)或次黄嘌呤(HX) + 黄嘌呤氧化酶(XO)诱导内、外源性自由基对大鼠离体心脏模型所致的心肌损伤^[2];抑制家兔红细胞自氧化和 H₂O₂ 所致红细胞溶血,并能抑制肝匀浆自发性和 Fe²⁺ 诱导的脂质过氧化反应^[3]。川芎嗪具有一定的体内抗氧化功效,但川芎嗪对自由基清除作用原理尚不十分清楚,为进一步探索其对各种自由基的作用方式,通过建立体外抗氧化模拟体系及细胞学实验模型,研究了其有效成分川芎嗪对自由基的清除能力,为揭示川芎嗪的抗氧化机理提供一定的理论依据与实验基础。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

川芎嗪、DMSO 购于美国 Sigma 公司;DMEM-F12 培养基和胎牛血清购自美国 Gibco 公司;胞内 ROS 荧光探针(DCFH-DA)购于碧云天生物技术研究;2,2-联苯-1-苦基肼贮存液(DPPH)、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、2-脱氧核糖、亚麻酸、硝普钠、硫氰酸铵、氯化亚铁、2-硫代巴比妥酸(TBA)、三氯乙酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、抗坏血酸、过氧化氢购于阿拉丁试剂(中国)有限公司,其它试剂均为分析纯购于商业试剂公司。

1.2 实验方法

1.2.1 NO 清除能力试验 川芎嗪对 NO 清除能力参照文献[4]的方法。取不同质量浓度的川芎嗪甲醇溶液(50~800 mg/L,以下相同)1.8 mL 与 0.2 mL 硝普钠(2.5 mmol/L)充分混匀,25℃光照下准确反应 2 h,之后取上清液,采用 Griess 法于 540 nm 波长下测定川芎嗪对 NO 清除能力,空白管为 1.8 mL 双蒸水加 0.2 mL 硝普钠(1.2.2 OH·清除能力的试验 2.5 mmol/L)。

参照文献[5-7]并略加以改进,采用比色法测定川芎嗪对 Fenton 体系产生的·OH 清除作用。将不同浓度的川芎嗪(50~800 mg/L)加入 Fenton 体系(终浓度为 3 mmol/L 2-脱氧核糖、0.1 mmol/L FeCl₂、1 mmol/L H₂O₂、0.1 mmol/L EDTA、0.1 mmol/L 抗坏血酸)中充分混匀并用 0.02 mol/L PBS 补足 3 mL,于 37℃准确反应 1 h。反应完毕,分别加入 1 mL 三氯乙酸(2.8%)及 1 mL TBA(1%),充分混匀后将各样品管于 100℃加热 20 min。加热完毕,取出各样品管,流水冷却后,于 532 nm 下测定其吸光度值,并按下述公式计算川芎嗪对 OH·的百分清除率。

$$I\% = \frac{OD_{\text{对照}} - (OD_{\text{样本}} - OD_{\text{空白}})}{OD_{\text{对照}}} \times 100$$

OD_{对照}为未加 TMP 时测得的 OD 值;OD_{空白}为 Fenton 体系中只加 2-脱氧核糖时测得的 OD 值;OD_{样本}为加入不同浓度 TMP 时测得的 OD 值。

1.2.3 DPPH·自由基清除试验 参照文献[8-9]的方法,采用比色法测定川芎嗪对 DPPH·清除作用。将不同的浓度川芎嗪(50~800 mg/L)与 1 mL 浓度为 90 μmol/L 的 DPPH 溶液混匀后加甲醇至 4 mL,室温准确反应 60 min 后于 515 nm 下测定其吸光度值,并按下述公式计算川芎嗪对 DPPH·的百分清除率。

$$I\% = \frac{OD_{\text{对照}} - (OD_{\text{样本}} - OD_{\text{空白}})}{OD_{\text{对照}}} \times 100$$

OD_{对照}为未加 TMP 时测得的 OD 值;OD_{空白}为未加 DPPH 时测得的 OD 值;OD_{样本}为加入不同浓度 TMP 时测得的 OD 值。

1.2.4 抑制脂质过氧化反应的试验 川芎嗪抑制脂质过氧化反应的测定参照文献[10]采用比色法。将 1 mL 乙醇(99.5%)与 13 μL 亚麻酸于 10 mL 离心管中混匀后,加入 1 mL 待测样品(对照管加入 1

mL 去离子水)与 0.5 mL PBS(pH 7.0),混匀,40℃,避光孵育 24 h,之后取反应混合物 100 μ L 与 4.9 mL 硫氰酸铁反应体系(4.7 mL 75%的乙醇、0.1 mL 30%的硫氰酸铵及 0.1 mL 的 2×10^{-2} mol/L 氯化亚铁)充分混匀,准确反应 3 min 后于 500 nm 下测定其吸光度值,并按下述公式计算川芎嗪对脂质过氧化反应的抑制率(A 及 A_0 分别代表样品及空白对照的吸光度)。

$$\text{脂质过氧化率} / \% = \frac{A}{A_0} \times 100$$

1.2.5 过氧化氢的清除率试验 过氧化氢清除率的测定按照文献^[11]的方法进行。取不同质量浓度的川芎嗪(50 ~ 800 mg/L)各 200 μ L 与 0.6 mL H_2O_2 (40 mmol/L)混匀,室温准确反应 10 min 后于 230 nm 波长下测定其吸光度值,并按下述公式计算川芎嗪对 H_2O_2 的百分清除率。

$$\text{清除率} / \% = \frac{OD_{\text{对照}} - (OD_{\text{样本}} - OD_{\text{空白}})}{OD_{\text{对照}}} \times 100$$

$OD_{\text{对照}}$ 为未加 TMP 时测得的 OD 值; $OD_{\text{空白}}$ 为未加 H_2O_2 时测得的 OD 值; $OD_{\text{样本}}$ 为加入不同浓度 TMP 时测得的 OD 值。

1.2.6 内皮细胞的培养 人脐静脉内皮细胞生长于含 10% 胎牛血清的 DMEM-F12 培养基(含 10^5 U/L 青霉素, 10^5 U/L 链霉素, 30 mg/L 内生长因子添加物及 5×10^3 U/L 肝素)中,置于 37℃, 5% CO_2 培养箱中贴壁培养,待细胞 80% 融合时,用 0.125% 胰酶(含 0.02% EDTA)消化传代。

1.2.7 胞内 ROS 的清除能力试验 细胞内总 ROS 水平采用 ROS 的特异性荧光探针 DCFH-DA 测定^[12],当 DCFH-DA 进入细胞内后可与细胞内活性氧结合生成具有荧光的 DCFH。细胞接种于 50 mL 培养瓶,培养 24 h,加入不同浓度的川芎嗪(50、100、200 mg/L)孵育 4 h 后,加 H_2O_2 (750 μ mol/L)继续培养 20 h,去除培养液, PBS(pH 7.4)洗 2 遍,加 20 μ M 的 ROS 荧光探针(DCFH-DA) 37℃ 避光孵育 2 h,用 PBS(pH 7.4)洗 2 遍,收集细胞后流式细胞仪(FACS Vantage SE, Becton Dickinson, USA)分析细胞内的荧光强度,选择激发波长 485 nm,发射波长 530 nm,之后做细胞滴片于荧光显微镜下观测 ROS 荧光变化。

1.2.8 统计分析 每批试验至少重复 3 次,数据以均数 $\pm$ 标准差表示,采用 SPSS11.0 软件分析,两组间差异用 Student's t 检验分析,多组间比较用方差分析法处理数据, $P < 0.01$ 或 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 分析川芎嗪体外抗氧化试验

川芎嗪甲醇溶液的紫外可见吸收光谱图见图 1。从图 1 可以看出,在 230 nm 波长处川芎嗪吸收微弱,根据公式计算清除率时,可以排除干扰。川芎嗪在 500、515、532 及 540 nm 处均无明显吸收,因此在上述波长下测定时,不会对测定结果造成干扰,故可用比色法测定川芎嗪对 H_2O_2 、脂质过氧化、DPPH $\cdot$ 、 $OH\cdot$ 和 NO 清除能力。

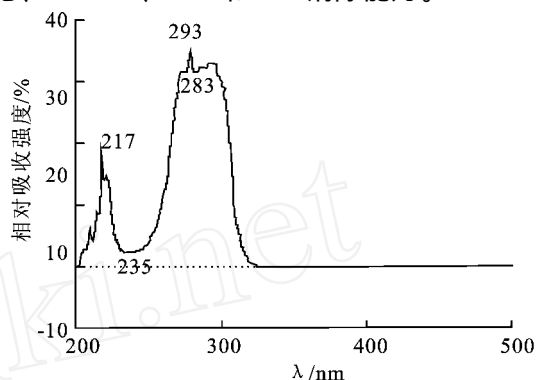


图 1 川芎嗪波长扫描图

Fig. 1 Wavelength scanogram of TMP

2.2 NO 的清除能力分析

NO 在体内由一氧化氮合酶催化 L-精氨酸生成,正常情况下,NO 作为第二信使发挥其生理功能,当机体处于病理情况(如氧化应激),NO 可与体内其它自由基结合生成氧化性更强的过氧化亚硝基阴离子,从而对机体造成更大的危害^[13],因此,要考察川芎嗪的抗氧化能力,测定其对 NO 的清除能力是非常必要的。本研究采用硝普钠作为 NO 供体,前者在光照条件下产生 NO^+ 形式存在的 NO,产生 NO 的量用 Griess 法测定。如图 2 所示,在所取的质量浓度范围(50 ~ 800 mg/L)内,川芎嗪对 NO 具有一定的清除作用,且具有一定的浓度依赖性。

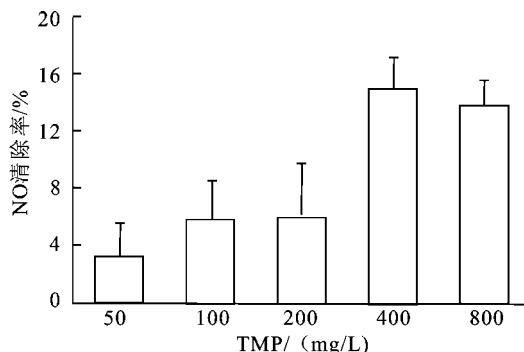


图 2 川芎嗪对 NO 的清除

Fig. 2 NO scavenging activity of TMP

2.3 自由基的清除能力分析测定

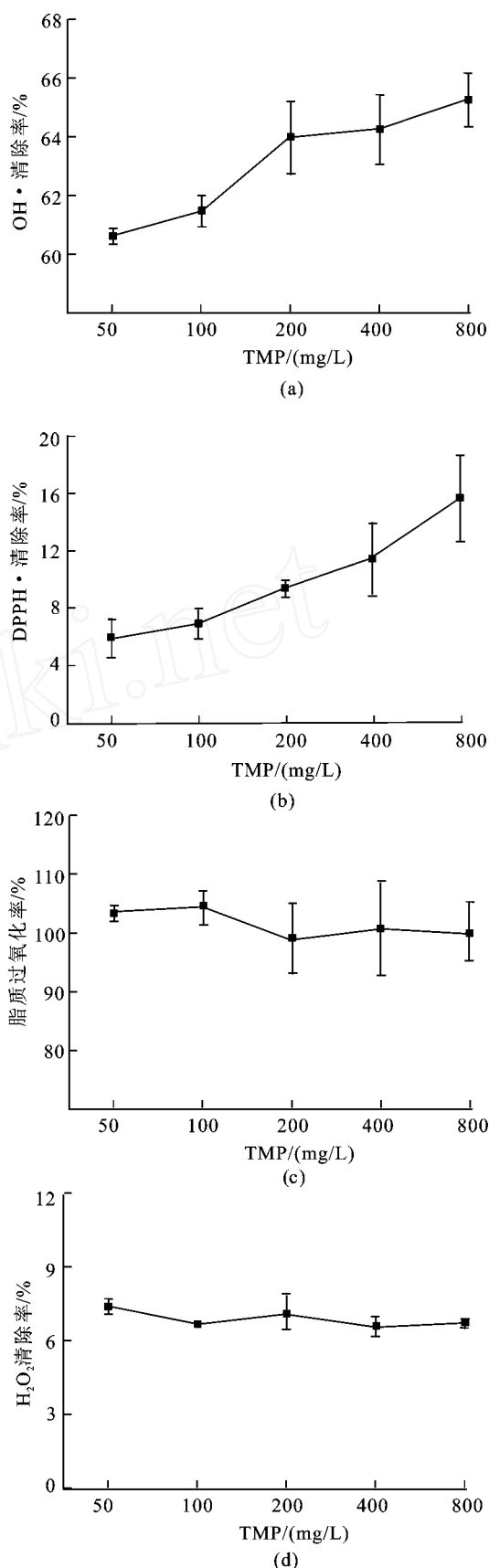
2.3.1 $\text{OH}\cdot$ 的清除能力分析 实验采用质量浓度为 50、100、200、400、800 mg/L 的川芎嗪进行 $\text{OH}\cdot$ 清除实验,实验结果见图 3 A。由图 3 A 可知,在实验所取的质量浓度范围内,川芎嗪对 Fenton 体系中 $\text{OH}\cdot$ 具有显著的清除作用,并随样品质量浓度的增加而增强。抗氧化剂提供 50%抑制作用时的质量浓度 IC_{50} 常用来表征抗氧化剂的抗氧化能力, IC_{50} 值越小,清除能力越强,反之越弱。从本实验可以看出当川芎嗪质量浓度为 50 mg/L 时, $\text{OH}\cdot$ 清除率已达到 60.63%,说明川芎嗪具有较强的 $\text{OH}\cdot$ 清除活性,其原因可能是川芎嗪与铁结合或形成螯合物,或者是其吡嗪环上的氮原子提供孤对电子与 $\text{OH}\cdot$ 结合而起到抗氧化的作用。

2.3.2 DPPH $\cdot$ 的清除能力分析 二苯基苦味肼自由基(DPPH $\cdot$)是一种稳定的以氮为中心的自由基,其甲醇溶液呈紫色,在 515 nm 波长处有最大吸收峰。由于自由基清除剂与其单电子配对而使其吸收逐渐消失,在一定范围内褪色程度与其所接受的电子有定量关系,可以反映出试样清除稳定自由基的能力,因此已经成为评价抗氧化剂清除自由基能力的常用方法^[14-16]。

本研究采用比色法,测定了 50~800 mg/L 不同质量浓度下川芎嗪对 DPPH $\cdot$ 的清除能力,实验结果见图 3 B。由图 3 B 可知,川芎嗪在实验质量浓度范围内对 DPPH $\cdot$ 具有一定的清除作用,且对 DPPH $\cdot$ 的清除能力具有典型的量效关系。与川芎嗪的清除羟自由基能力相比,其对 DPPH $\cdot$ 清除能力较弱。

2.3.3 抗脂质过氧化能力分析 亚麻酸属多不饱和脂肪酸,是构成人体组织细胞的主要成分,常用于脂质氧化与抗氧化相关分析。本研究中,如图 3 C 所示,川芎嗪对脂质过氧化反应抑制效果不明显。这与张兆辉^[17]等人结果有些矛盾,可能是由于所用的川芎嗪的剂量、脂质过氧化系统以及检测方法不同而造成的。

2.3.4 H_2O_2 的清除能力分析 川芎嗪对 H_2O_2 的清除能力采用比色法测定。川芎嗪的质量浓度为 50、100、200、400、800 mg/L。如图 3 D 所示,在所取的质量浓度范围内,川芎嗪对 H_2O_2 清除作用不明显,提示前者在用于 H_2O_2 所致的氧化应激损伤研究中,可与 H_2O_2 同时给药而不影响结果的可靠性。



(a) 川芎嗪对 $\text{OH}\cdot$ 的清除; (b) 川芎嗪对 DPPH $\cdot$ 的清除; (c) 川芎嗪对脂质过氧化的抑制; (d) 川芎嗪对 H_2O_2 的清除

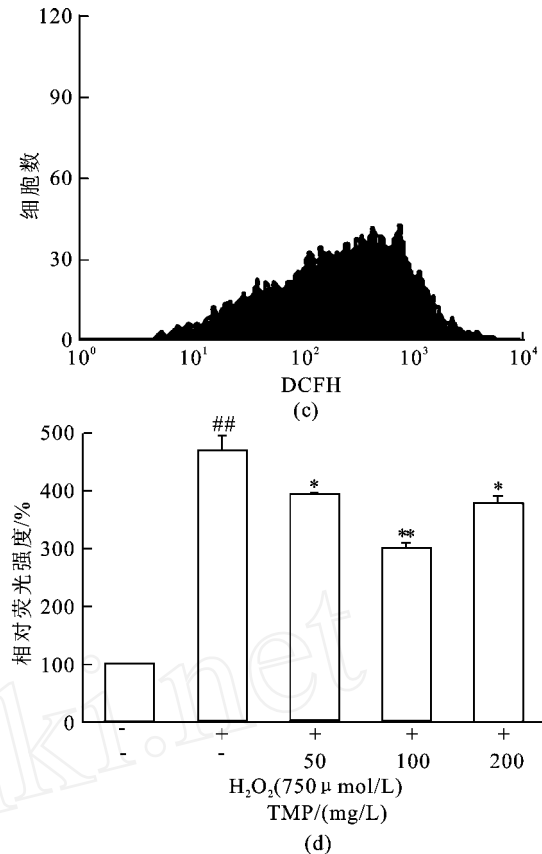
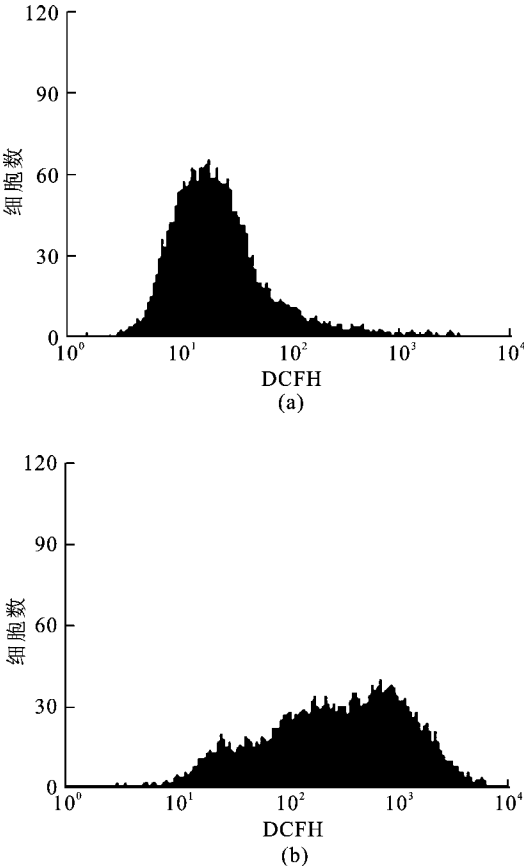
图 3 川芎嗪对自由基的清除

Fig. 3 Free radical scavenging activity of TMP

2.4 抑制胞内 ROS 的产生分析

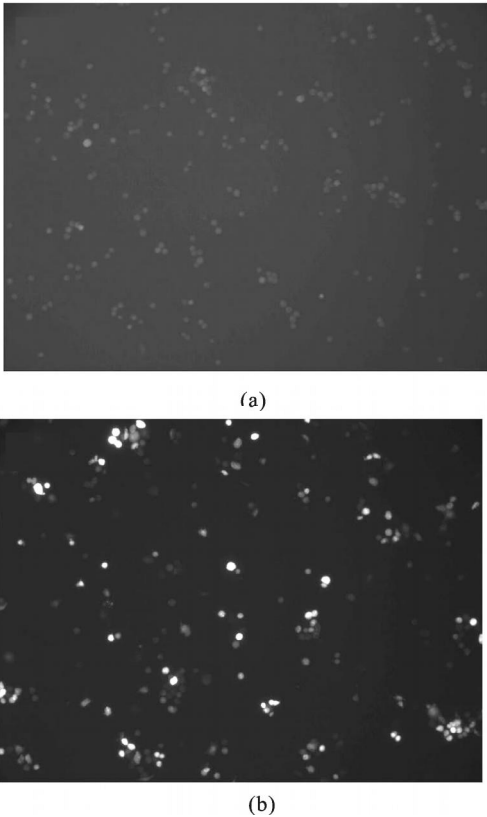
目前被普遍接受的 Ross 修正的“炎症学说”认为,动脉粥样硬化是一种炎症性疾病,如氧化应激、高血压、炎症以及感染等因素均可导致血管损伤,促使动脉粥样硬化的发生和发展,而内皮细胞功能障碍又是动脉粥样硬化形成早期的始动环节。因此选用被普遍接受的研究动脉粥样硬化内皮细胞模型——人脐静脉内皮细胞作为研究对象。

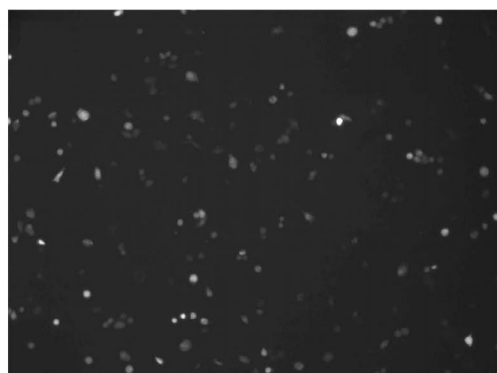
过氧化氢作为胞内 ROS 的一种,经常作为外源性刺激制造氧化应激损伤模型,以此来考察氧化应激损伤发生时细胞以至机体发生的一系列应激改变,同时由于体外化学模型证实川芎嗪与 H₂O₂ 不产生交叉反应,因此,川芎嗪完全可以应用于过氧化氢所致的氧化应激损伤模型中。基于此,本研究采用过氧化氢刺激的内皮细胞作为模型,考察川芎嗪对氧化应激损伤的保护作用。如图 4 流式检测发现当 H₂O₂ (750 μmol/L) 刺激 20 h 后,胞内 ROS 水平比正常增高约 4.7 倍 ($P < 0.01$),而预先加入不同浓度的川芎嗪(50~200 mg/L)预保护 4 h 后再加 H₂O₂ (750 μmol/L),胞内 ROS 水平与模型组相比则有不同程度的下降,分别下降 16.11 % ($P < 0.05$)、35.64 % ($P < 0.01$)、19.26 % ($P < 0.05$)。另外通过荧光显微镜观察发现荧光强度变化与流式所得结果相同(见图 5)。



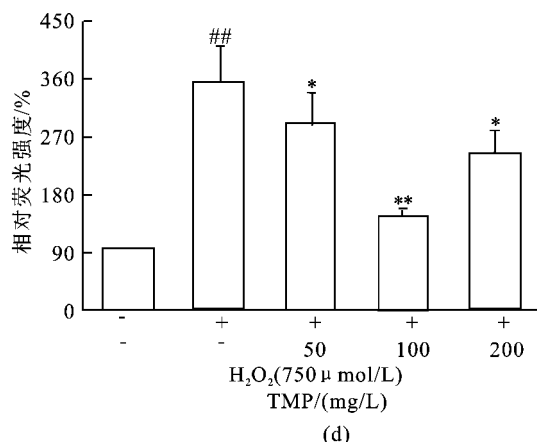
(a) Control 组; (b) H₂O₂ 组; (c) TMP(100 mg/L) + H₂O₂ 组; (d) 流式定量分析结果; # # $P < 0.01$ VS 对照组; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ VS H₂O₂ 组

图 4 流式检测川芎嗪抑制胞内 ROS 的产生($\bar{X} \pm S$ n=3)
Fig. 4 Inhibitory effect of TMP on the production of intracellular ROS analyzed by flow cytometry





(c)



(d)

(a) 对照组; (b) H₂O₂组; (c) TMP(100 mg/L) + H₂O₂组; (d) 荧光定量分析结果, [#] [#] $P < 0.01$ VS 对照组

^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ VS H₂O₂组

图 5 荧光分析川芎嗪对胞内 ROS 产生的抑制作用 ($\bar{X} \pm S$ $n=3$)

Fig.5 Inhibitory effect of TMP on the production of intracellular ROS analyzed by fluorescent quantitation

由此可以看出,虽然川芎嗪对 H₂O₂ 清除能力欠佳,但它可以抑制 H₂O₂ 诱导的胞内 ROS 的产生,这提示我们川芎嗪可能是通过其他途径(如上调细胞内某些抗氧化酶的水平)来抑制胞内 ROS 的产生减轻细胞的氧化损伤。

3 结 语

研究通过体外抗氧化体系从抑制 NO、OH[·]、H₂O₂、DPPH[·]及脂质过氧化等方面证明了川芎嗪

的自由基清除能力:在所取的浓度范围内(50-800mg/L),川芎嗪对 OH[·]的清除率都超过 50%,具有显著的清除作用,对 NO、DPPH[·]具有一定的清除作用且浓度依赖关系较明显,对脂质过氧化及过氧化氢的清除能力较对羟自由基清除能力弱,另外流式细胞仪检测发现川芎嗪对过氧化氢诱导的内皮细胞胞内 ROS 的生成具有显著的抑制作用。综上所述,川芎嗪具有一定的体外自由基清除活性,并能抑制过氧化氢诱导的胞内 ROS 的生成。

参考文献(References):

- [1] 王倩,汪海. 具有抗动脉粥样硬化作用的天然药物及其单体化合物[J]. 世界科学技术—中药现代化, 2002, 4(5):52-58.
- WANG Qian, WANG Hai. Natural medicines and their monomers with anti-atherosclerosis effects [J]. **World Science and Technology/ Modernization of Traditional Chinese Medicine**, 2002, 4(5):52-58. (in Chinese)
- [2] 刘红,艾明仙,阳辉. 川芎嗪对自由基致大鼠离体心脏损伤的保护作用[J]. 中药药理与临床, 2007, 23(5):68-70.
- LIU Hong, AI Ming-xian, YANG Hui. Protective effects of tetramethylpyrazine on free radicle-induced injury in isolated rat heart[J]. **Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica**, 2007, 23(5):68-70. (in Chinese)
- [3] 刘晓丽,霍展样,张金莲. 盐酸川芎嗪体外抗氧化作用的研究[J]. 中国航天医药杂志, 2003, 5(2):37-39.
- LIU Xiao-li, HUO Zhan-yang, ZHANG Jin-lian. Antioxidative activity of ligustrazine in vitro[J]. **Medical Journal of CASE**, 2003, 5(2):37-39. (in Chinese)
- [4] Meng Xue-lian, Yang Jing-yu, Chen Guo-liang, et al. RV09, a novel resveratrol analogue, inhibits NO and TNF- α production by LPS-activated microglia [J]. **International Immunopharmacology**, 2008, 8(8):1074-1082.
- [5] Singh HP, Mittal S, Kaur S, et al. Chemical composition and antioxidant activity of essential oil from residues of *Artemisia scoparia*[J]. **Food Chemistry**, 2009, 114(2):642-645.
- [6] Xing Rong, Yu Hua-hua, Liu Song, et al. Antioxidant activity of differently regioselective chitosan sulfates in vitro[J]. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 2005, 13(4):1387-1392.

- [7] 吕晓玲,朱惠丽,姜平平,等. 紫苏提取物抗氧化活性体外实验研究[J]. 中国食品添加剂,2003,5:22 - 25.
L ÜXiao - ling, ZHU Hui - li, JIANG Ping - ping, et al. In vitro Antioxidant Activity of Perillae Leaves Extract [J]. **China Food Additives**, 2003, 5:22 - 25. (in Chinese)
- [8] Bozin B, Mimica - Dukic N, Simin N, et al. Characterization of the volatile composition of essential oils of some lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils [J]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2006;54(5):1822 - 1828.
- [9] Liu Shih-chuan, Lin Jau-tien, Wang Chir-kun, et al. Antioxidant properties of various solvent extracts from lychee (Litchi chinensis Sonn.) flowers [J]. **Food Chemistry**, 2009, 114:577 - 581.
- [10] Huang Rong-hua, Mendis E, Kim SK. Factors affecting the free radical scavenging behavior of chitosan sulfate[J]. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2005, 36(1 - 2):120 - 127.
- [11] Ruch RJ, Cheng Shu-jun, Klaunig JE. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intercellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea [J]. **Carcinogenesis**, 1989, 10(6):1003 - 1008.
- [12] Liu Hong-tao, Li Wen-ming, Xu Gang, et al. Chitosan oligosaccharides attenuate hydrogen peroxide-induced stress injury in human umbilical vein endothelial cells [J]. **Pharmacological Research**, 2009, 59(3):167 - 75.
- [13] Cai H. Hydrogen peroxide regulation of endothelial function: origins, mechanisms, and consequences[J]. **Cardiovasc Res**, 2005, 68: 26 - 36.
- [14] Cotclle N, Bemier JL, Cattcau JP, et al. Antioxidant properties of hydroxyl-flavones[J]. **Free Radical Biology and Medicine**, 1998, 20(1): 35 - 43.
- [15] Cavin A, Hostettmann K, Dyatmko, et al. Antioxidant and lipophilic constituents of *tinospora crispa*[J]. **Planta medica**, 1998, 64:393 - 396.
- [16] 陆健,樊伟,孔伟宝,等. 大麦总多酚不同溶剂提取物对 DPPH 自由基清除能力的影响[J]. 食品与生物技术学报,2008, 27(1):57 - 61.
LU Jian, FAN Wei, KONG Wei - bao, et al. Study on the extraction of total polyphenol in Barley (*Hordeum vulgare* L.) and its ability on scavenging DPPH free radical [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2008,27(1):57 - 61. (in Chinese)
- [17] Zhang Zhao-hui, Yu Shao-zu, Wang Zhen-ao, et al. Scavenging effects of tetramethylpyrazine on active oxygen free radicals[J]. **Acta Pharmacologica Sinica**, 1994, 15(3):229 - 231.

(责任编辑:杨萌)