

两种筛选玄参中清除过氧亚硝基活性成分的 在线检测方法比较研究

王莹, 陈佑华, 戚进, 余伯阳*

(中国药科大学 江苏省中药评价与转化重点实验室, 南京 211198)

摘要 建立柱后 HPLC-DAD-(Luminol-ONOO⁻)-CL(方法1)和柱前 ONOO⁻-HPLC-DAD(方法2)两种简单、快速在线检测清除 ONOO⁻的方法,将这两种方法应用于从玄参中筛选具有清除 ONOO⁻作用的活性物质,并结合 HPLC-ESI-Q-TOF MS/MS 对主要的活性成分进行鉴定。方法1从玄参中共筛选出了 P1(decaffeoylacteoside)、P9(acteoside)、I6(6''-O-feruloylharpagide)、P11(cis-acteoside)、P13(angoroside)等5个具有清除 ONOO⁻作用的活性成分,方法2从玄参中筛选出了 P9和 P13两个具有清除 ONOO⁻作用的活性成分。两种筛选方法各具特点:方法1需要的仪器系统较为复杂,操作简单检测灵敏度高;方法2需要的仪器简单,操作相对方法1繁琐且灵敏度低。但是筛选结果表明,方法1和方法2均可以从复杂体系中快速地筛选出具有清除 ONOO⁻作用的活性物质,这两种方法可以为中药复杂体系中天然 ONOO⁻清除剂的快速发现提供技术平台。

关键词 过氧亚硝基;化学发光;玄参;在线检测

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2016)05-0560-06

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20160509

引用本文 王莹,陈佑华,戚进,等. 两种筛选玄参中清除过氧亚硝基活性成分的在线检测方法比较研究[J]. 中国药科大学学报,2016,47(5):560-565.

Cite this article as: WANG Ying, CHEN Youhua, Qi Jin, et al. Comparison of two new on-line methods on screening peroxynitrite scavengers in *Radix Scrophulariae*[J]. *J China Pharm Univ*, 2016, 47(5):551-559.

Comparison of two new on-line methods on screening peroxynitrite scavengers in *Radix Scrophulariae*

WANG Ying, CHEN Youhua, Qi Jin, YU boyang*

Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Evaluation and Translational Research, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

Abstract Two simple and efficient methods have been developed for screening and identification of natural peroxynitrite scavengers in *Radix Scrophulariae* (RS). Method I was based on HPLC-DAD-(luminol-peroxynitrite)-CL techniques combined with Q-TOF MS/MS analysis, while method II was based on the pre-column reaction with peroxynitrite followed by HPLC separation with Q-TOF MS/MS analysis. Five active constituents, P1(decaffeoylacteoside), P9(eoside), I6(6''-O-feruloylharpagide), P11(cis-acteoside) and P13(angoroside), were found to possess potential peroxynitrite-scavenging activity by method I, while P9 and P13 were also screened by method II. Method I requires more complex apparatus, but has advantages on simple detection and high sensitivity. Method II requires simpler apparatus than method I, but with more tedious detection and lower sensitivity. However, the methods established above would provide new ways for rapid detection of natural peroxynitrite-scavenging compounds in RX complex matrices.

Key words peroxynitrite; chemiluminescence; *Radix Scrophulariae*; on-line detection

过氧亚硝基(peroxynitrite, ONOO^-)是生物体内由一氧化氮(NO)和超氧阴离子(O_2^-)快速结合生成的一种生物活性分子,具有强氧化和硝化性质,因此可以与体内多种生物分子发生反应,造成DNA 碱基修饰和单链断裂^[1]以及修饰蛋白质氨基酸残基^[2]造成蛋白质损伤^[3]、引发自由基链使脂质过氧化^[4]等,与心血管疾病、神经退行性疾病和肿瘤等疾病的发生和发展有着密切的关系,是目前氧化代谢研究领域的热点之一。具有清除 ONOO^- 的活性物质可保护机体降低其受自由基的伤害,而近年来人们对于 ONOO^- 清除剂的关注与日俱增。

中药含有结构丰富的天然产物,因而是很有潜力的天然抗氧化剂资源库,目前从中药中发现的 ONOO^- 清除剂主要为多酚类成分^[5-8],该类成分可以通过酚羟基的离解和自由基途径产生抗氧化作用,是医药、食品、化妆品中很有前景的一类天然抗氧化剂。有研究表明^[9],中药玄参(*Scrophularia ningpoensis* Hemsl.)含有丰富的多酚类化合物而具有抗氧化的活性,但玄参中具有清除 ONOO^- 的活性成分尚不明确。

目前检测清除 ONOO^- 作用的活性方法主要有荧光法^[10]、化学发光法^[11-12]以及基于3-硝基酪氨酸检测法^[1,13]等,但这些方法多为离线测定,耗时长、自动化程度低,只能进行单一成分或中药提取物的分析,不适用于中药及中药复方复杂体系的多成分同时测定。此外,上述方法容易产生人为误差(如样品和试剂混合不充分、反应时间不充足等),造成多次反应之间的数据差异较大。由此可见,建立能够简单、有效地识别中药材中 ONOO^- 清除剂的方法十分必要。因此,本研究建立了柱后 HPLC-DAD-(Luminol- ONOO^-)-CL 和柱前 ONOO^- -HPLC-DAD 两种在线检测的方法,将其应用于从玄参中筛选具有清除 ONOO^- 活性成分的测定,解决了离线测定方法诸多的不便和限制,且以上两种方法可以为中药复杂体系中天然 ONOO^- 清除剂的快速发现提供技术平台。

1 材料

1.1 试剂与药材

鲁米诺(瑞士 Fluka 公司);绿原酸(中国南京泽朗医药有限公司)。过氧亚硝基按照 Beckman 等^[14]所描述的方法合成后 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存,其浓度采

用分光光度法测定,最大吸收波长为 302 nm , $\varepsilon = 1\ 670/(\text{mol/L}\cdot\text{cm})$ 。乙腈、甲醇均为色谱级(德国 Merk 公司)。超纯水由 Milli-Q 系统制备(美国 Millipore 公司)。其他化学试剂均为市售分析纯。

玄参,产地湖南,经戚进副教授鉴定为玄参科植物玄参 *Scrophularia ningpoensis* Hemsl. 的干燥根。药材置烘箱中烘干,粉碎备用。

1.2 仪器

LC-2010CHT 高效液相色谱仪(包括在线脱气、四元泵、全自动进样器、柱温箱、SPD-M20A 二极管阵列检测器及 LC-Solution 色谱工作站)(日本岛津公司);BPCL-1-G-C 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);1200 HPLC 系统(具双高压泵、脱气机、盘式自动进样器、柱温箱和 DAD 检测器),6520 Q-TOF 质谱仪(具 ESI 离子源)(美国 Agilent 公司)。数据采集与处理采用 Agilent Masshunter 工作站 B.02.00。

2 方法

2.1 HPLC-DAD-CL 从玄参中筛选过氧亚硝基的清除剂(方法1)

2.1.1 发光溶液的配制 发光溶液 A:取鲁米诺约 0.32 g ,加 0.1 mol/L 碳酸钠溶液 100 mL ,配成浓度为 18.02 mmol/L 的鲁米诺储备液,避光, $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冷藏, 3 d 后使用。后续用 $\text{NaCO}_3\text{-NaHCO}_3(1:9)$ 的混合溶液($\text{pH } 9.16$)稀释至浓度为 $5.41 \times 10^{-6}\text{ mol/L}$ 的工作液。发光溶液 B:将已合成好的过氧亚硝基储备液用 0.1 mol/L NaOH 稀释至浓度为 $2.4 \times 10^{-4}\text{ mol/L}$ 的工作液。

2.1.2 供试药材的制备 取玄参样品粉末(过 $40\text{ }\mu\text{m}$ 筛)约 1 g ,精密称定,加入甲醇 40 mL ,超声波提取 40 min ,滤过,滤液用 $0.25\text{ }\mu\text{m}$ 微孔滤膜过滤,取续滤液,作为供试品溶液。

2.1.3 HPLC-DAD-CL 的分析方法 按照图 1-A 所示将 CL 和 DAD 串联起来。色谱柱为 Alltima C_{18} 分析柱($4.6\text{ mm} \times 250\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$, Allteck),流速 1 mL/min ,柱温 $30\text{ }^\circ\text{C}$,进样量 $10\text{ }\mu\text{L}$ 。分析过程所用的流动相为 0.1% 磷酸水溶液(A)和乙腈(B),洗脱程序如下: $0 \sim 55\text{ min}$, $5\% \sim 33\% \text{ B}$; $55 \sim 65\text{ min}$, $33\% \sim 33\% \text{ B}$; $65 \sim 75\text{ min}$, $33\% \sim 50\% \text{ B}$ 。

化学发光条件:鲁米诺浓度为 5.41×10^{-6}

mol/L;碳酸钠缓冲液 pH 为 9.16;ONOO⁻ 浓度为 2.4 × 10⁻⁴ mol/L;鲁米诺-碳酸盐缓冲溶液、ONOO⁻ 溶液分别通过双通道恒流泵以 1.2 mL/min 流速输送。CL 负高压 900 V。

2.2 ONOO⁻-HPLC-DAD 从玄参中筛选过氧亚硝基的清除剂(方法 2)

2.2.1 供试药材的制备 取玄参样品粉末(过 40 目筛)约 1 g,精密称定,加入甲醇 30 mL,超声提取 40 min,滤过,用旋转蒸发仪 40 ℃ 回收甲醇,加 0.2 mol/L 的磷酸盐缓冲液(pH 7.0)溶解,定容至 50 mL。

2.2.2 ONOO⁻-HPLC-DAD 分析方法 按照图 1-B 所示,分别取 6 份“2.2.1”项下玄参 PBS 溶液 1 mL 于 5 mL EP 管中,其中 3 份样品加入 4.22 mmol/L ONOO⁻ 溶液(终浓度为 2.11 mmol/L)0.3 mL,涡旋数秒;另 3 份样品加入酸化 ONOO⁻ 分解后溶液 0.3 mL,涡旋数秒,作为空白对照。10 min 后 6 份样品同条件下进行 HPLC 分析(色谱分析条件同“2.1.3”项),得到玄参反应前后各主要成分的峰面积。

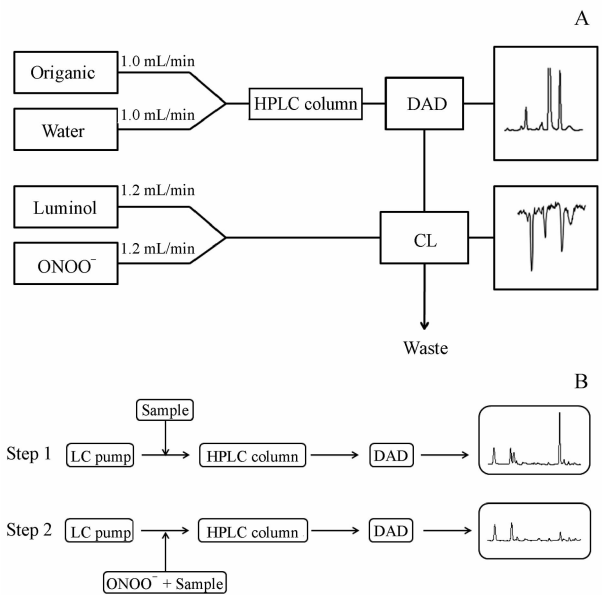


Figure 1 Principle of method I and II
A: Apparatus for HPLC-DAD-CL analysis; B: Principle of peroxynitrite spiking test. Step 1: unreacted control Radix Scrophulariae (RS) sample injected to HPLC-DAD system; Step 2: after reaction with peroxynitrite, RS extract injected to HPLC-DAD system

2.3 HPLC-Q-TOF MS/MS 条件

由于磷酸水溶液不能作为液质联用的流动相,因此在保证分离效果的前提下,用 0.1% 乙酸水溶

液代替磷酸水溶液。进样量 1 μL,其他色谱条件同“2.1.3”项。

Q-TOF MS/MS 质谱条件:ESI 离子源,在负离子模式下采集数据。数据采集范围为 *m/z* 100 ~ 2 000。离子源参数:干燥气体 N₂,流速 10.0 L/min,温度 320 ℃,喷雾器 35 psi(1 psi = 6.895 kPa),毛细管 3 500 V,取样锥 65 V,八极杆射频电压峰值 750 V,碎裂器电压 175 V,MS/MS 碰撞能量 25 V。数据处理系统为 Masshunter 工作站 B.02.00(美国 Agilent 公司)。

3 结果与讨论

3.1 HPLC-DAD-CL 从玄参中筛选 ONOO⁻ 的清除剂

在“2.1”项条件下对玄参进行在线清除 ONOO⁻ 活性分析,得到玄参的紫外色谱图(图 2-A),并获得相应的清除 ONOO⁻ 活性图谱(图 2-B)。在图 2-B 中,具有清除 ONOO⁻ 作用的活性化学成分在色谱峰相应的位置出现明显的倒峰,可见玄参中抑制化学发光较强的有 5 个成分。HPLC-ESI-Q-TOF MS/MS 对玄参中这 5 个成分进行识别鉴定,采用负离子模式,通过与文献[15-16]中的 MS 碎片比对而得出结果(表 1),其结构见图 3。这 5 个活性成分分别为 P1 (decaffeoyl acteoside)、P9 (acteoside)、I6 (6''-O-feruloylharpagide)、P11 (cis-acteoside) 和 P13 (angoroside C),其中 P1、P9、P11 和 P13 为苯乙醇苷,I6 为环烯醚萜苷,均含有酚羟基。根据公式(1)计算各活性峰的活性峰与紫外峰的峰高之比(表 2)。

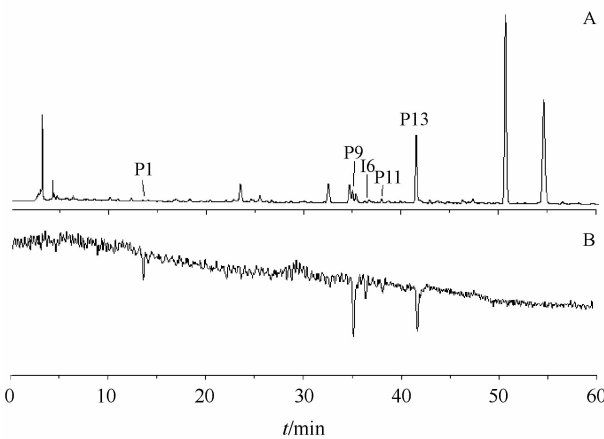


Figure 2 UV Chromatogram (A) at 280 nm and CL profile (B) of RS extract

$R_x = H'_x / H_x$ (1)

由表 2 可知, $R_{P1} > R(b)_{16} > R_{P9} > R_{P11} > R_{P13}$, 即这 5 个成分清除 $ONOO^-$ 活性由大到小顺序为: P1、I6、P9、P11、P13。

对其中 4 个苯乙醇苷类活性成分的结构和活性大小进行分析可以发现: P9 比 P1 多了一个反式咖啡酰基, 可能是因为多了一个基团使得 P9 的空间位阻增加而影响清除活性; P11 比 P1 多了

一个顺式咖啡酰基, 顺式基团与反式基团相比空间位阻增加地更多, 因此 P11 的清除活性比 P9 低; P13 与 P1、P9、P11 相比, 不仅多了一个酚羟基被甲基化的反式咖啡酰基, 还多了一个糖基以及甲基化的酚羟基, 其空间位阻与 P11 相比更大, 因此它的活性最低。由此可见, 化合物清除 $ONOO^-$ 的活性大小与其结构中取代的基团大小和数目有着密切的关系。

Table 1 Fragments of main active components in RS

No.	t_R /min	$[M-H]^-$	Fragment ions and pathways	Identification
P1	12. 59	461. 1651 (C ₂₀ H ₂₉ O ₁₂)	$[M-H-Rha]^-$ 315. 108 6, $[M-H-Rha-Glc-H_2O]^-$ 135. 0453	decaffeoyllacteoside
P9	33. 65	623. 1971 (C ₂₉ H ₃₅ O ₁₅)	$[M-H-caffeoyl]^-$ 461. 167 6, $[M-H-caffeoyl-Rha]^-$ 315. 108 0, $[caffeic\ acid-H]^-$ 179. 034 3, $[caffeic\ acid-H-H_2O]^-$ 161. 024 0, $[caffeic\ acid-H-CO_2]^-$ 135. 044 4	acteoside ^a
I6	34. 55	539. 177 5 (C ₂₅ H ₃₁ O ₁₃)	$[feruloyl+Glc]^-$ 337. 093 2, $[ferulic\ acid-H]^-$ 193. 050 3, $[M-H-6''-O-feruloylharpagide]$ 539. 177 5, $[ferulic\ acid-Glc]^-$ 183. 066 6, $[ferulic\ acid-H-H_2O]^-$ 175. 039 6, $[ferulic\ acid-H-2H_2O]^-$ 165. 055 0	6''-O-feruloylharpagide
P11	36. 26	623. 196 5 (C ₂₉ H ₃₅ O ₁₅)	$[M-H-caffeoyl]^-$ 461. 164 9, $[M-H-caffeoyl-Rha]^-$ 315. 109 2, $[caffeic\ acid-H]^-$ 179. 034 1, $[caffeic\ acid-H-H_2O]^-$ 161. 024 2, $[caffeic\ acid-H-CO_2]^-$ 135. 044 2	cis-acteoside
P13	40. 18	783. 2716 (C ₃₆ H ₄₇ O ₁₉)	$[M-H-feruloyl]^-$ 607. 225 7, $[M-H-feruloyl-H_2O]^-$ 589. 216 2, $[M-H-feruloyl-Rha]^-$ 461. 164 5, $[ferulic\ acid-H]^-$ 193. 050 6, $[ferulic\ acid-H-H_2O]^-$ 175. 040 3	angoroside C ^a

^a Further confirmation in comparison with authentic standards

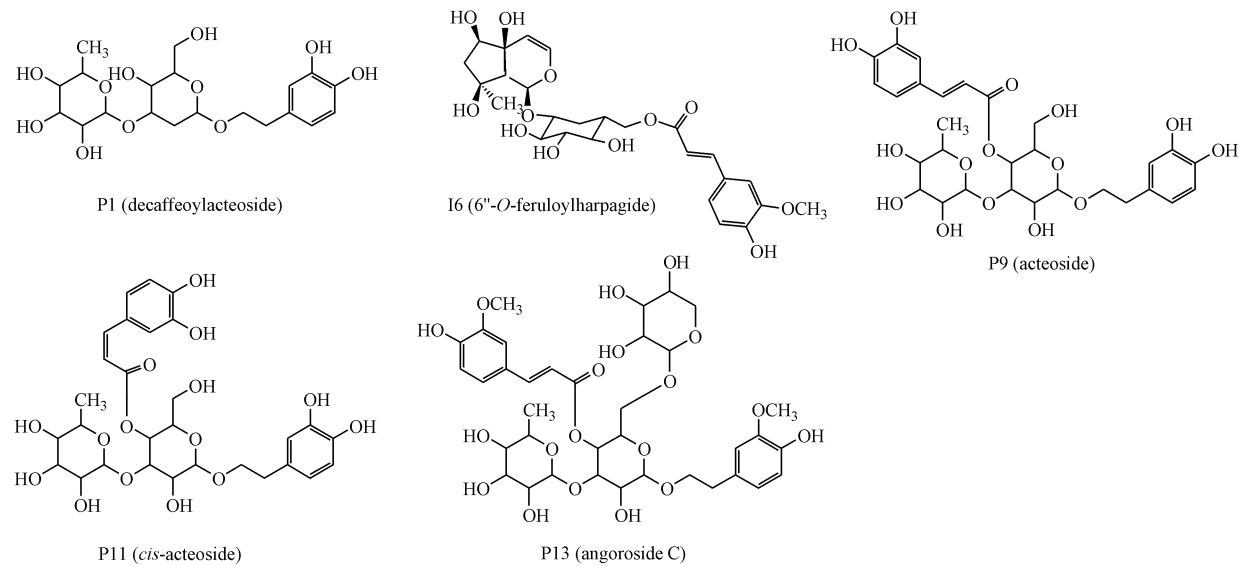


Figure 3 Chemical structures of main components identified in RS extract

3.2 $ONOO^-$ -HPLC-DAD 应用于从玄参中筛选 $ONOO^-$ 的清除剂

控制柱前反应体系中玄参样品溶液和 $ONOO^-$ 溶液的相对浓度是本实验的关键。当玄参提取液

浓度过高,而加入的 $ONOO^-$ 浓度相对过低时,样品中活性峰峰面积变化不明显,本实验通过反复调节二者相对浓度,充分反应后按照“2. 1. 3”项中色谱条件进行分析。玄参中大部分成分在 280 nm 波长

下均能检测,哈帕昔(I2)由于紫外吸收较弱选择 210 nm 波长下检测。玄参提取液与 ONOO⁻ 反应前后的 HPLC 图谱见图 4,记录各主要成分与 ONOO⁻ 反应前后的相应波长下的峰面积(PA),根据公式(2)计算消减率:

$$\text{消减率} = (\text{PA}_{\text{blank}} - \text{PA}_{\text{sample}}) / \text{PA}_{\text{blank}} \times 100\% \quad (2)$$

结果见表 2,与 ONOO⁻ 反应后,具有清除 ONOO⁻ 活性的成分的峰面积将减小。

Table 2 Scavenging activity of main active components in RS by method I

No.	Component	H'_x	H_x	R_x
P1	Decaffeoylacteoside	1 438 412	664	2 166.28
P9	Acteoside	3 332 766	2 981	1 118.00
I6	6''-O-Feruloylharpagide	1 024 604	542	1 890.41
P11	cis-Acteoside	774 288	845	916.32
P13	Angoroside C	2 357 294	15 941	147.88

由图 4 和表 3 可以看出,与 ONOO⁻ 反应后,P9 (acteoside,阿克替昔)和 P13 (angoroside C,安格洛昔 C)的峰面积发生了大幅消减,消减率分别为 91.4% 和 83.6%,表明这两个成分具有较强的

Table 3 Main active components in RS screened by method II ($\bar{x} \pm s, n=3$)

No.	Component	λ/nm	PA_{blank}	$\text{PA}_{\text{sample}}$	Potential reactivity
I2	Harpagide	210	$(2.70 \pm 0.14) \times 10^5$	$(2.62 \pm 0.28) \times 10^5$	No
P1	Decaffeoylacteoside	280	$(1.43 \pm 0.02) \times 10^4$	$(1.40 \pm 0.27) \times 10^4$	No
P7	Acretoside	280	$(7.83 \pm 0.01) \times 10^4$	$(7.58 \pm 1.03) \times 10^4$	No
O1	p-Coumaric acid	280	$(1.24 \pm 0.02) \times 10^5$	$(1.21 \pm 0.15) \times 10^5$	No
I5	6''-O-(p-Coumaroyl) harpagide	280	$(1.00 \pm 0.01) \times 10^5$	$(1.02 \pm 1.01) \times 10^5$	No
P9	Acteoside	280	$(7.49 \pm 0.02) \times 10^4$	$(6.44 \pm 0.65) \times 10^3$	Yes
I6	6''-O-Feruloylharpagide	280	$(1.02 \pm 0.11) \times 10^4$	$(1.22 \pm 0.03) \times 10^4$	No
P11	cis-Acteoside	280	$(1.29 \pm 0.02) \times 10^4$	$(1.60 \pm 0.34) \times 10^4$	No
P13	Angoroside C	280	$(2.79 \pm 0.01) \times 10^5$	$(4.58 \pm 1.57) \times 10^4$	Yes
I14	Harpagoside	280	$(8.31 \pm 0.04) \times 10^5$	$(8.37 \pm 0.02) \times 10^5$	No
O3	Cinnamic acid	280	$(7.94 \pm 0.03) \times 10^5$	$(7.88 \pm 0.16) \times 10^5$	No

PA:peak area

3.3 两种筛选方法的对比

方法 1 和方法 2 在本研究中已成功应用于从玄参复杂基质中筛选出具有清除 ONOO⁻ 的活性成分。虽然这两种方法针对同一检测对象,但是得出的结果却略有不相同。方法 1 共筛选出了 5 个具有清除 ONOO⁻ 的活性成分,而方法 2 仅筛选出了 2 个。两种方法共同筛选出来的活性成分为 P9 和 P13,且这 2 个成分在两种方法中所表现出来的活性大小一致,均为 P9 大于 P13,说明两种方法用于筛选 ONOO⁻ 清除剂都是有效的。方法 1 之所以比方法 2 筛选出来的成分多,可能是因为化学发光检

测器的灵敏度高于紫外检测器,从图 2-A 中可以看到 P1、I6、P11 在 280 nm 检测波长下紫外吸收很弱,而在图 2-B 中却检测到了明显清除活性。另外还可能因为方法 2 是药材中所有的成分和 ONOO⁻ 共同孵育,这些活性成分之间存在竞争,而且每个成分的含量高低不同,含量高的且具有清除作用的成分(P9、P13)优先与 ONOO⁻ 反应,使得 ONOO⁻ 的浓度下降地很快,导致与含量少且具有清除作用的成分(P1、I6、P11)发生反应的 ONOO⁻ 不足,所以 P1、I6、P11 在色谱图中没有显示出明显的峰面积减少。而方法 1 由于不存在各个活性成分之间

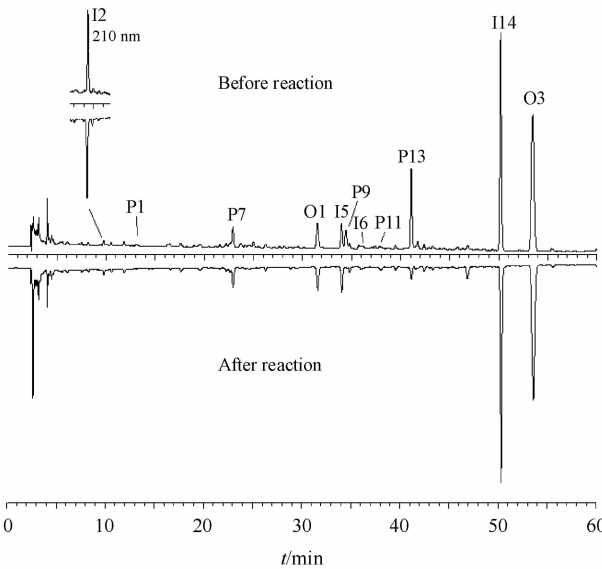


Figure 4 UV chromatograms of RS extract with or without peroxynitrite treatment

的竞争,它们是通过色谱柱将其分离后再与 ONOO^- 反应的柱后反应,因此在方法 1 中清除活性相对较弱的成分 P1, I6, P11 显示出了清除活性。

这两种筛选方法各有不同的优势和劣势:方法 1 筛选出来的成分更为全面,但是方法 1 需要将 HPLC 和 CL 进行串联,要兼顾色谱分离条件和化学发光条件,因此对色谱中流动相的选择和流动相方法的设置较为挑剔。而方法 2 筛选出来的成分虽然较方法 1 来说受各个组分之间竞争的影响而导致筛选信息不全,但是方法 2 的操作简单,对仪器没有过多的限制条件。

综上所述,本研究建立的 HPLC-DAD-(Luminol- ONOO^-)CL 法和 ONOO^- -HPLC-DAD 法均为简单有效地适用于中药复杂体系清除 ONOO^- 活性筛选方法,对于研究中药的物质基础以及从中快速发现天然 ONOO^- 清除剂具有重要意义。两种方法具有各自的优缺点和不同的适用范围,可以互相补充,在后期研究中,建议两种方法配合使用。

参 考 文 献

- [1] Deiana M, Aruoma OI, Bianchi ML, *et al.* Inhibition of peroxynitrite dependent DNA base modification and tyrosine nitration by the extra virgin olive oil-derived antioxidant hydroxytyrosol[J]. *Free Radic Biol Med*, 1999, **26**(5/6): 762 – 769.
- [2] Ahmad R, Rasheed Z, Ahsan H. Biochemical and cellular toxicology of peroxynitrite; implications in cell death and autoimmune phenomenon [J]. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 2009, **31**(3): 388 – 396.
- [3] Levrant S, Vannay-Bouchiche C, Pesse B, *et al.* Peroxynitrite is a major trigger of cardiomyocyte apoptosis *in vitro* and *in vivo*[J]. *Free Radic Biol Med*, 2006, **41**(6): 886 – 895.
- [4] Liaudet L, Rosenblatt-Velin N, Pacher P. Role of peroxynitrite in the cardiovascular dysfunction of septic shock[J]. *Curr Vasc Pharmacol*, 2013, **11**(2): 196 – 207.
- [5] Ho SC, Tang YL, Lin SM, *et al.* Evaluation of peroxynitrite-scavenging capacities of several commonly used fresh spices[J]. *Food Chem*, 2010, **119**(3): 1102 – 1107.
- [6] Shen K, Kiu JP, Yu BY. Research advances in the mechanisms of active components in Chinese materia medica against oxidative stress-induced neuronal apoptosis[J]. *J China Pharm Univ* (中国药科大学学报), 2015, **46**(5): 532 – 540.
- [7] Kassim M, Mansor M, Kamalden TA, *et al.* Caffeic acid phenethyl ester (CAPE): scavenger of peroxynitrite *in vitro* and in sepsis models[J]. *Shock*, 2014, **42**(2): 154 – 160.
- [8] Xu M, Chen X, Gu Y, *et al.* Baicalin can scavenge peroxynitrite and ameliorate endogenous peroxynitrite-mediated neurotoxicity in cerebral ischemia-reperfusion injury [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, **150**(1): 116 – 124.
- [9] Li QF, Shi SL, Liu QR, *et al.* Anticancer effects of ginsenoside Rg1, cinnamic acid, and tanshinone IIA in osteosarcoma MG-63 cells; nuclear matrix downregulation and cytoplasmic trafficking of nucleophosmin[J]. *Int J Biochem Cell B*, 2008, **40**(9): 1918 – 1929.
- [10] Huang JC, Li DJ, Diao JC, *et al.* A novel fluorescent method for determination of peroxynitrite using folic acid as a probe[J]. *Talanta*, 2007, **72**(4): 1283 – 1287.
- [11] Alvarez S, Zaubornyj T, Actis-Goretta L, *et al.* Polyphenols and red wine as peroxynitrite scavengers: a chemiluminescent assay [J]. *Ann Ny Acad Sci*, 2002, **957**: 271–273.
- [12] Van Dyke K, Ghareeb E, Van Dyke M, *et al.* Ultrasensitive peroxynitrite-based luminescence with L-012 as a screening system for antioxidative/antinitrating substances, e. g. Tylenol (R) (acetaminophen), 4-OH tempol, quercetin and carboxy-PTIO [J]. *Luminescence*, 2007, **22**(4): 267 – 274.
- [13] Kumar SS, Priyadarsini KI, Sainis KB. Inhibition of peroxynitrite-mediated reactions by vanillin[J]. *J Agr Food Chem*, 2004, **52**(1): 139 – 145.
- [14] Beckman JS, Chen J, Ischiropoulos H, *et al.* Oxidative chemistry of peroxynitrite[J]. *Methods Enzymol*, 1994, **233**: 229 – 240.
- [15] Jing J, Chan CO, Xu L, *et al.* Development of an in-line HPLC fingerprint ion-trap mass spectrometric method for identification and quality control of Radix Scrophulariae[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2011, **56**(4): 830 – 835.
- [16] Wu QA, Yuan QA, Liu EH, *et al.* Fragmentation study of iridoid glycosides and phenylpropanoid glycosides in Radix Scrophulariae by rapid resolution liquid chromatography with diode-array detection and electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry [J]. *Biomed Chromatogr*, 2010, **24**(8): 808 – 819.