

HPLC-DPPH在线联用技术评价制首乌的抗氧化活性

钱金珠¹, 梁明², 余意², 邓亚雷¹, 刘史佳³, 庞会明³, 戚进^{1*}

(¹中国药科大学中药学院,南京 211198; ²无限极(中国)有限公司,广州 510405; ³江苏省中医院药学部,南京 210029)

摘要 建立高效液相色谱-1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(HPLC-DPPH)在线联用技术对3种不同炮制方法的制首乌抗氧化活性进行了评价。通过分析16批制首乌样品的化学指纹峰(峰)和活性指纹峰(效),建立量效关系方程,并以活性加和的方式量化各批次何首乌的抗氧化总活性。结果表明,所建立的HPLC-DPPH在线联用技术可评价不同批次不同炮制方法的制首乌抗氧化活性,为制首乌的质量评价提供了数据支持和科学依据。

关键词 制首乌; HPLC-DPPH; 在线分析; 抗氧化活性; 质量评价

中图分类号 R917 文献标志码 A 文章编号 1000-5048(2022)02-0185-07

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20220208

引用本文 钱金珠,梁明,余意,等.HPLC-DPPH在线联用技术评价制首乌的抗氧化活性[J].中国药科大学学报,2022,53(2):185–191.

Cite this article as: QIAN Jinzhu, LIANG Ming, YU Yi, et al. Determination of antioxidant activity of *Polygoni Multiflori* Radix Praeparata by HPLC-DPPH[J]. J China Pharm Univ, 2022, 53(2):185–191.

Determination of antioxidant activity of *Polygoni Multiflori* Radix Praeparata by HPLC-DPPH

QIAN Jinzhu¹, LIANG Ming², YU Yi², DENG Yalei¹, LIU Shijia³, PANG Huiming³, QI Jin^{1*}

¹School of Traditional Chinese Medicine Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198; ²Infinitus (China) Co., Ltd., Guangzhou 510405; ³Department of Pharmacy, Jiangsu Provincial Hospital of Chinese Medicine, Nanjing 210029, China

Abstract An on-line HPLC-DPPH system was developed to determine the antioxidant activity of 16 batches of *Polygoni Multiflori* Radix Praeparata. By analyzing the chromatographic and biological activity fingerprints of 16 batches of *Polygoni Multiflori* Radix Praeparata, the dose-effect relationship was established and the total antioxidant activity was quantified by activity addition. The results suggested that the online HPLC-DPPH method can evaluate the antioxidant activity of different batches of *Polygoni Multiflori* Radix Praeparata, with different processing methods, aiming to provide data support and scientific basis for quality evaluation of *Polygoni Multiflori* Radix Praeparata.

Key words *Polygoni Multiflori* Radix Praeparata; HPLC-DPPH; on-line analysis; antioxidant activity; quality evaluation

This study was supported by Chinese Medicine Technology Development Project of Jiangsu Province (No. 2020ZX11) and the Science and Technology Project of Jiangsu Administration of Traditional Chinese Medicine (No. JD2019SZ14)

何首乌(*Polygonum multiflorum* Thunb)为蓼科植物何首乌的块根,始载于《开宝本草》,为我国传统的知名中药^[1-2]。制首乌为何首乌生品的炮制加工品,现代炮制方法主要包括黑豆蒸制法、黑豆黄酒蒸制法和高压清炖法。制首乌善补肝肾、益精

血,临床多取其滋补功能入药^[3-5]。现代研究表明,何首乌具有抗氧化、抗衰老、降血脂、调节免疫等药理作用。抗氧化是何首乌主要的药理作用之一,也是其具有抗衰老等其他药理作用的可能原因。目前对于何首乌的抗氧化活性和化学成分已

收稿日期 2021-10-11 *通信作者 Tel:025-86185157 E-mail:qijin2006@163.com

基金项目 江苏省中医药科技发展专项资助项目(No. 2020ZX11);江苏省中医药管理局科技资助项目(No. JD2019SZ14)

有大量的研究报道,其中酚酸类、二苯乙烯苷类和蒽醌类等类型的化学成分被认为是何首乌中的主要抗氧化成分类型^[6-9],但是对于不同类型化合物中各有哪些具体成分与何首乌特别是制首乌的抗氧化活性相关联,目前尚未见报道。

对于抗氧化活性物质的测定方法主要有传统模式和在线模式两种。传统模式抗氧化活性测定方法如:清除羟自由基法($\cdot\text{OH}$)、超氧阴离子法(O_2^-)、1,1-二苯基-2-三硝基苯肼法(DPPH)法、 H_2O_2 法、 Fe^{3+} 还原(FRAP)法等,通常用于中药提取物中一组成分的总抗氧化能力的测定,对于单一成分的抗氧化活性测定,则往往需要大量的分离纯化过程^[10-11]。在线模式抗氧化活性测定方法如HPLC-DPPH、高效液相色谱-[2,2-联氨-双(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)二胺盐](HPLC-ABTS⁺)、高效液相色谱-化学发光分析法(HPLC-CL)等,具有自动化、稳定化、快速化、规范化等优点,可以同时分析和评价中药中单一成分的抗氧化活性及其对中药总活性的贡献,而减少大量的分离纯化步骤^[11-13],已逐步在中药抗氧化活性研究中得到应用。此前本课题组曾报道采用HPLC-CL分析方法对14批不同产地的何首乌的抗氧化活性进行

综合评判,并确定了何首乌中主要抗氧化活性成分,但未涉及不同炮制方法的制首乌的抗氧化活性研究^[14]。

课题组前期采用传统模式的抗氧化活性测定方法对制首乌不同部位的抗氧化活性进行了初步研究,发现制首乌醇部位具有较强的清除DPPH作用。因此,本研究建立HPLC-DPPH在线分析方法,对16批不同炮制方法的制首乌进行抗氧化活性测定,通过对各批次制首乌的抗氧化总活性以活性加和的方式进行量化,实现对制首乌抗氧化活性的综合评价。并明确制首乌中的主要抗氧化活性物质,对不同炮制方法的制首乌的抗氧化活性进行比较。

1 材料

1.1 样品与试剂

DPPH(1,1-二苯基-2-三硝基苯肼,美国Sigma公司);二苯乙烯苷(南京春秋生物有限公司,纯度≥99%);甲醇(色谱纯,南京化学试剂有限公司);乙腈(色谱纯,美国Tedia试剂公司),其余试剂均为市售分析纯。16批不同炮制方法的制首乌样品信息见表1。

Table 1 Sample information of *Polygoni Multiflori Radix Praeparata*

No.	Preparation method	Batch No.	No.	Preparation method	Batch No.
S01	Black bean juice	201506001	S09	High pressure	201506008
S02	Black bean juice	201506002	S10	High pressure	201506009
S03	Black bean juice	201506003	S11	Black bean with yellow wine	201506004
S04	Black bean juice	201512001	S12	Black bean with yellow wine	201506005
S05	Black bean juice	201512003	S13	Black bean with yellow wine	201506006
S06	Black bean juice	201512005	S14	Black bean with yellow wine	201512002
S07	Black bean juice	201512007	S15	Black bean with yellow wine	201512004
S08	High pressure	201506007	S16	Black bean with yellow wine	201512006

1.2 仪器

LC-2010CHT高效液相色谱仪,配置四元梯度泵、自动进样器、柱温箱、UV检测器及色谱工作站(日本岛津公司);十万分之一天平(上海梅特勒-托利多仪器有限公司);P230Ⅱ高压恒流泵(大连依利特分析仪器有限公司);pHS-25型酸度计(上海雷磁仪器厂)。

2 方法

2.1 DPPH溶液的制备

精密称取DPPH适量,溶解于甲醇中,将溶液转移至500 mL量瓶中,加甲醇至刻度,得到浓度为 1×10^{-3} mol/L的DPPH母液,4 °C避光存放,备用。

2.2 对照品溶液的配制

精密称取二苯乙烯苷对照品适量,50%乙醇

溶解, 配制成不同浓度的二苯乙烯苷溶液。

2.3 供试药材的制备

将制首乌人工粉碎至约 1 cm 块状, 去离子水提取两次, 料液比为 1:10, 合并提取液, 减压浓缩, 浓缩液加无水乙醇除去多糖, 将上清液浓缩, 用 D101 型大孔树脂富集, 依次用水和乙醇洗脱。收集醇部位, 挥干溶剂, 即得制首乌大孔树脂醇部位。将 16 份不同炮制方法的制首乌按照上述方法制备醇部位供试品进行后续研究。

2.4 HPLC-DPPH 分析方法

按照图 1 的方式将 UV 与 PDA 连接, 色谱柱为 Agela Venusil MP C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), 基

于相关文献报道^[14], 结合本课题组前期对不同波长下色谱峰出峰情况的考察, 选择 LC-10AD 检测器波长为 254 nm, 二极管阵列检测器 PDA 检测波长为 517 nm, 流速 1.0 mL/min, 柱温 30 °C, 进样量 15 μL, 流动相为 0.1% 磷酸水(A)和乙腈(B), 洗脱程序如下: 0 ~ 6 min, 6% ~ 6% B; 6 ~ 10 min, 6% ~ 10% B; 10 ~ 15 min, 10% ~ 10% B; 15 ~ 25 min, 10% ~ 15% B; 25 ~ 45 min, 15% ~ 20% B; 45 ~ 70 min, 20% ~ 30% B; 70 ~ 75 min, 30% ~ 35% B; 75 ~ 85 min, 35% ~ 60% B; 85 ~ 90 min, 60% ~ 65% B; 90 ~ 100 min, 65% ~ 65% B; 100 ~ 105 min, 65% ~ 100% B; 105 ~ 110 min, 100% ~ 100% B。

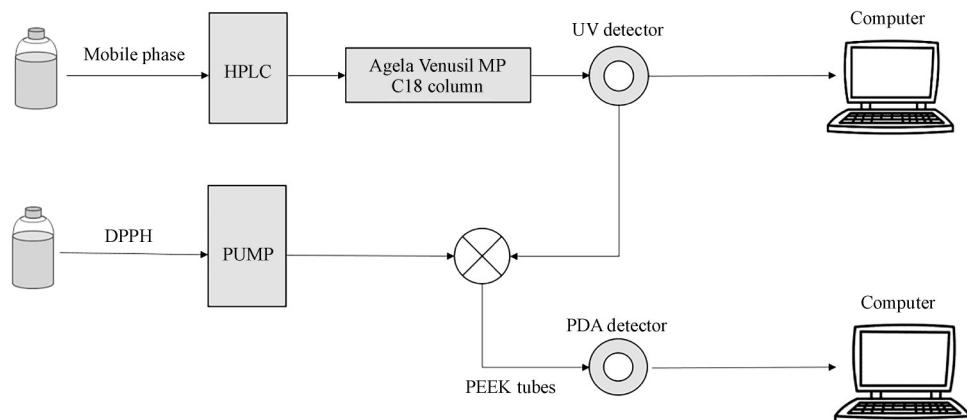


Figure 1 HPLC-DPPH on-line analyzer system

外接设备条件:P230Ⅱ外接高压恒流泵泵入 DPPH 流速 0.4 mL/min, 浓度 1×10^{-4} mol/L。PEEK 管长度 6 m, 内径 0.1 mm。

2.5 HPLC-Q-TOF-MS 条件

Agilent 1260-6530 HPLC-Q-TOF, 负离子模式扫描。流动相中将 0.1% 磷酸替换成 0.1% 甲酸。离子源参数: 干燥气(N₂)温度: 350 °C, 流速, 9.0 L/min; 毛细管电压, 3 300 V; 雾化压力, 40 psi(1 psi = 6.895 kPa); 质量扫描范围 *m/z*: 100 ~ 1 000。

数据采集采用 HPLC-Q-TOF-MS MassHunter Acquisition Software Version B. 04. 00 软件, 数据处理采用 MassHunter Workstation Qualitative Analysis 软件 Version B. 06. 00 软件完成。其中元素组成测定参数设定如下: C, 0 ~ 50; H, 0 ~ 100; O, 0 ~ 50; N, 0 ~ 3; 初步假定所有化合物均不含有磷、硫、溴和氯等元素; 最大允许误差范围为 $\pm 5 \times 10^{-6}$ 。

3 结果与讨论

3.1 HPLC-DPPH 在线分析条件考察

前期实验表明, DPPH 流速与浓度对系统检测灵敏度影响较大, 因此以 S01 批次(201506001)制首乌作为研究对象, 以总倒峰峰面积为考察指标, 对实验条件进行优化, 分别考察 P230Ⅱ外接高压恒流泵泵入 DPPH 流速(0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9 mL/min), 以及泵入 DPPH 浓度(1×10^{-5} 、 2×10^{-5} 、 3.5×10^{-5} 、 5×10^{-5} 、 1×10^{-4} mol/L), 如图 2-A、2-B 所示, 在 DPPH 泵入流速为 0.4 mL/min, 浓度为 1×10^{-4} mol/L 时检测效果最好。

PEEK 管的长度可直接影响样品与 DPPH 的反应时间, 管越长, 反应越完全, 系统压力也越大, 因此以系统能承受最大压力为考察限度, 选择 PEEK 管的长度为 6 m 进行后续实验(图 2-C)。

此外, PEEK 管的内径可影响活性峰的展宽, 对 PEEK 管内径(0.1 mm、0.5 mm)进行考察, 结果

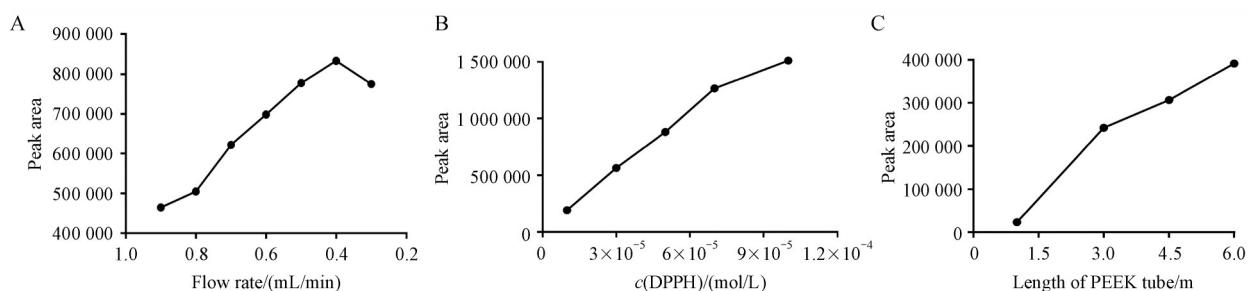


Figure 2 Effect of different flow rate (A), different concentration of DPPH (B) and different lengths of PEEK tube on (C) sample determination

表明,PEEK管内径为0.1 mm时,峰宽为1.007;内径为0.5 mm时,峰宽为4.235。因此,选择内径为0.1 mm PEEK管用于后续实验。

3.2 不同批次制首乌醇部位抗氧化活性指纹图谱的建立及共有峰标识

通过HPLC-DPPH在线联用系统得到不同批次制首乌样品中的化学指纹图谱和对应的抗氧化活性指纹图谱,对其进行综合分析,标识出具有抗氧化活性作用的共有峰共12个(图3)。通过HPLC-Q-TOF-MS对11个抗氧化活性物质进行鉴定,其中,儿茶素(catechin,峰2),2,3,5,4'-tetrahydro-

droxystilbene-2-O-di-glucoside(峰3),*trans*-2,3,5,4'-tetrahydroxy-stilbene-2-O-β-D-glucoside(反-2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-β-D-葡萄糖苷,峰5),2,3,5,4'-tetrahydroxy-stilbene-2-O-(galloyl)-β-D-glucoside(2,3,5,4'-四羟基二苯乙烯-2-O-(没食子酰)-β-D-葡萄糖苷,峰6、8、11),峰12对DPPH产生了显著的清除作用。从质谱数据可知,制首乌抗氧化成分为酚酸类和二苯乙烯苷类化合物,与文献报道结果一致^[16-18]。

3.3 制首乌中抗氧化物质的活性评价

不同批次不同炮制方法的制首乌,其抗氧化活能力各不相同,且活性无法简单加和,需建立一个可加和的活性指标对其整体抗氧化活性进行评价。本研究以二苯乙烯苷作为阳性参比,首先建立二苯乙烯苷清除DPPH的峰效数学模型,x为二苯乙烯苷的量(单位:mg/mL),y为活性峰面积,建立二苯乙烯苷清除DPPH的峰(y)与效(x)之间的函数关系: $y = 280.226.05x - 9.523.83x^2 + 123.44x^3 + 25.866.5 (R^2 = 0.99922)$,峰效关系方程曲线见图4,根据峰效函数关系方程计算16批制首乌抗氧化活性,以1 mg/mL二苯乙烯苷为一个活性单位(1 U)^[19],对16批样品中各峰的抗氧化相对

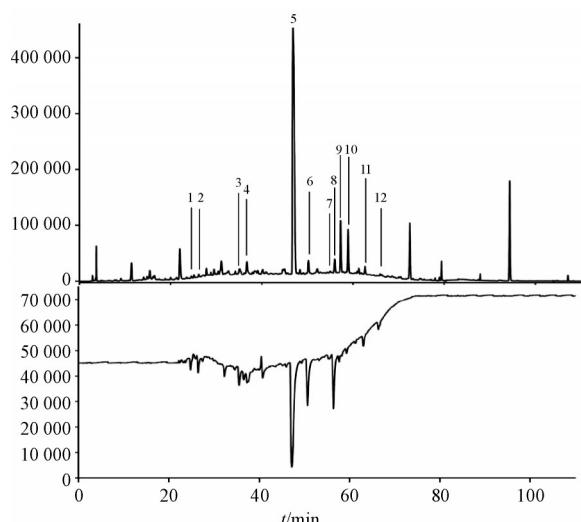


Figure 3 HPLC chemical chromatogram with activity chromatogram of *Polygoni Multiflori Radix Praeparata*

1: Hypaphorine; 2: Catechin; 3: 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxystilbene-2-O-di-glucoside; 4: *cis*-2,3,5,4'-tetrahydroxy-stilbene-2-O-β-D-glucoside; 5: *trans*-2, 3, 5, 4'-tetrahydroxy-stilbene-2-O-β-D-glucoside; 6: 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxy-stilbene-2-O-(galloyl)-β-D-glucoside; 7: emodin-8-O-(6'-O-acetyl)-β-D-glucoside; 8: 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxy-stilbene-2-O-(galloyl)-β-D-glucoside; 9: polygonumosides A or B; 10: polygonumosides A or B; 11: 2, 3, 5, 4'-tetrahydroxy-stilbene-2-O-(galloyl)-β-D-glucoside, respectively; 12: Unknown

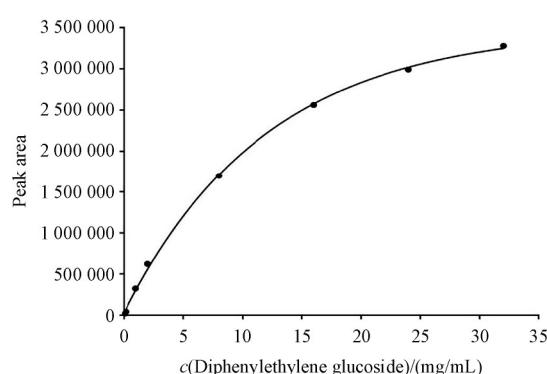


Figure 4 Peak-effect function relationship equation of standard peak area and antioxidant capacity

活性及其总活性进行测定,每个化学峰的峰面积对总峰面积的贡献率(图 5-A)及各共有峰相对活性对总抗氧化活性的贡献率(图 5-B)。图 5-A 中 Peak 5、6 在大多数样品中都显示较高的峰面积贡献度,其相对活性贡献在图 5-B 显示也很高。相反 Peak 2 和 Peak 8 在图 5-A 并未表现出较高的峰面积贡献度,但在图 5-B 中依然有较高的活性贡献度;图 5-A 中峰面积贡献度较高的 Peak 9、10 在图 5-B 中并没有出现相应的活性贡献度。根据

HPLC-MS 鉴定,活性较好的化合物多为二苯乙烯苷类,而 Peak 9、10 为 polygonumosides A 类化合物,为二苯乙烯苷类衍生物,虽然在何首乌中具有较高的含量,但是其并未表现出较高的抗氧化活性。因此化合物的相对活性并不与峰面积成正相关,在抗氧化活性评价中,不适宜以化学指纹图谱的峰面积作为评价指标,应结合活性指纹图谱共同评价为宜。

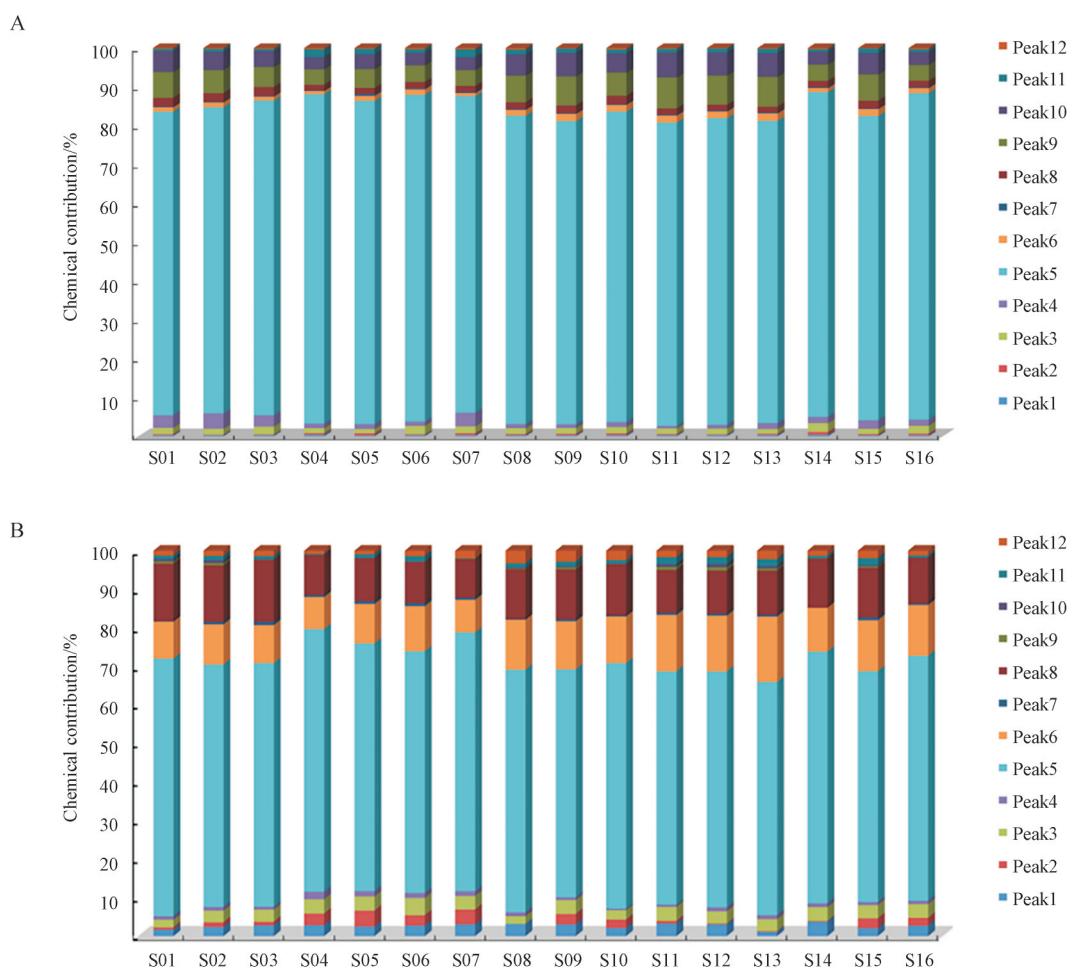


Figure 5 Chemical contributions of fingerprint peaks of fingerprint peaks in *Polygoni Multiflori Radix Praeparata* samples (S01-S16 See Table 1) (A); Relative activity contributions of *Polygoni Multiflori Radix Praeparata* samples (B)

通过已建立的加和方法,对 16 批制首乌具有抗氧化活性的 12 个共有峰总抗氧化活性进行加和分析,可以更直观地得到不同批次制首乌的抗氧化活性强弱(图 6-A)。以上分析剔除了活性较弱的活性峰,为了验证该方法是否能准确评价制首乌的抗氧化活性,对每批次制首乌总活性进行加和分析,得到 16 批制首乌所有活性峰总抗氧化活

性(图 6-B)。通过比较分析,活性较强的共有峰总抗氧化活性结果与所有活性峰总抗氧化活性结果一致,证明该方法能够反映制首乌的总体抗氧化活性,且批次 S01(黑豆)、S02(黑豆)、S03(黑豆)、S09(高压)、S11(黑豆黄酒)、S15(黑豆黄酒)表现出较高的抗氧化活性,表明不同炮制方法均具有一定的抗氧化活性,但其结果可能与本研究所选

取的高压炮制的制首乌批次较少有关。此方法的建立在一定程度上能够更好地评价制首乌的

质量,也为制首乌的质量评价标准提供了新的依据。

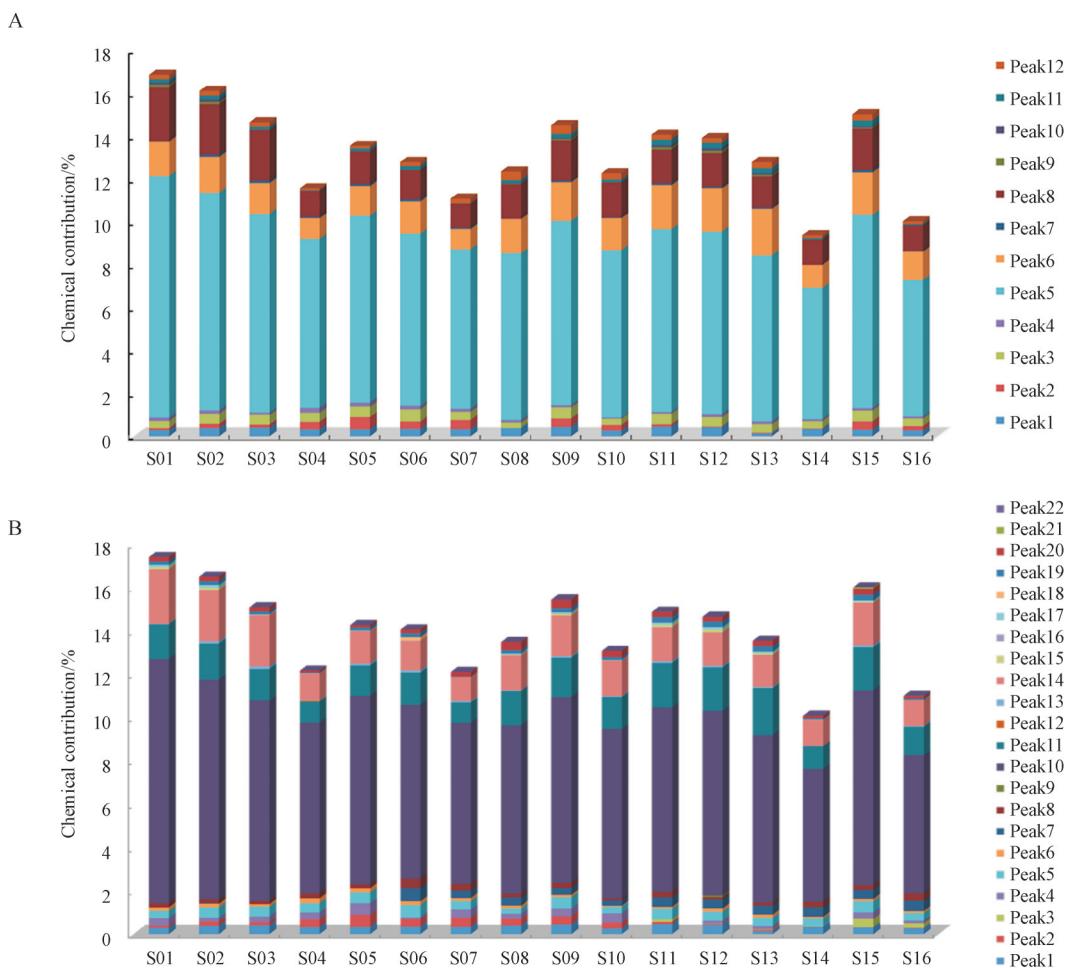


Figure 6 Total antioxidant activity contributions of *Polygoni Multiflori Radix Praeparata* samples (A) and total antioxidant activity of all active peaks in *Polygoni Multiflori Radix Praeparata* samples (B)

4 结 论

现代研究表明,氧化应激可诱发多种疾病的发生,如动脉硬化、肿瘤、糖尿病、高血压和代谢综合征等疾病。制首乌具有调节造血功能、延缓衰老、改善中枢神经退行性疾病等药理作用。如二苯乙烯苷能改善小鼠记忆力,增加SOD酶活性,减少血清活性氧(ROS)、一氧化氮(NO)等水平,上调小鼠各脏器组织相关蛋白表达,延缓衰老^[20];作为的滋补中药,制首乌在抗氧化、增强免疫力、抗衰老等多方面作用显著^[21]。因此对其抗氧化活性及质量控制研究具有重要意义。

本研究建立了从复杂化学成分中快速遴选抗

氧化活性成分的HPLC-DPPH在线联用分析方法,并对16批3种炮制方法的制首乌进行抗氧化活性测定,结合化学指纹图谱和活性指纹图谱,筛选出12个共有抗氧化活性成分,通过HPLC-Q-TOF-MS鉴别出其中11个成分,其中多为二苯乙烯苷类、酚酸类成分。并以二苯乙烯苷为阳性对照,建立峰效关系模型,对各成分及各批次制首乌抗氧化活性进行评价。3种炮制方法的16批制首乌均具有一定的抗氧化活性,表明不同炮制方法对制首乌的品质无明显影响,但也可能与选取的高压炮制的制首乌批次较少有关。所建方法能够体现不同批次制首乌之间抗氧化活性的差异,其中批次S01、S02、S03、S09、S11和S15表现出较高的抗氧化

活性。

本研究建立的 HPLC-DPPH 在线联用方法相较于传统模式抗氧化活性测定方法具有操作简便、耗时短等优势, 在得到化学指纹峰的同时可得到活性指纹峰, 在快速测定制首乌中主要抗氧化活性成分的同时分析其抗氧化能力, 该方法进一步结合 HPLC-Q-TOF-MS 技术进行鉴别, 能够提供活性指纹峰的结构信息, 以实现“成分—峰—效”的综合分析。上述研究为遴选制首乌中的抗氧化活性成分提供了一种高效、便利的方法, 也为其他中药及其炮制品的抗氧化活性成分遴选提供了参考。

References

- [1] Chinese Pharmacopoeia Commission. *Chinese Pharmacopoeia*: part 1(中华人民共和国药典:一部)[S]. Beijing: China Medical Science Press, 2020:183-184.
- [2] Lu LS, Recent advances on stilbene glucoside from *Polygonum multiflorum* Thunb. [J]. *Food sci(食品科学)*, 2006, **10**(27): 608-612.
- [3] Wu CS, Sun R. Research development and thinking of clinical study of *Polygonum multiflorum* [J]. *China J Chin Mater Med(中国中药杂志)*, 2017, **42**(2):259-263.
- [4] Liu L. Historical concise studies on *Polygonum multiflorum* Thunb. (何首乌药用史研究) [D]. Haerbin: Heilongjiang University Of Chinese Medicine, 2020.
- [5] Zhang HJ, Ren XL, Sun H, et al. Study on change of ingredients content and DPPH free radical scavenging activity of drug pairs with *Polygoni Multiflori Radix Praeparata* based on semi-quantitative analysis [J]. *Chin Tradit Herbal Drugs(中草药)*, 2021, **52**(7):1924-1936.
- [6] Zhu WL, Xue XP, Zhang ZJ. Structural, physicochemical, antioxidant and antitumor property of an acidic polysaccharide from *Polygonum multiflorum* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2017, **96**:494-500.
- [7] Lv LS, Cheng YH, Zhang TS, et al. Purification, antioxidant, activity and antiglycation of polysaccharides from *Polygonum multiflorum* Thumb. [J]. *Carbohydr Polym*, 2014, **99** (2) : 765-773.
- [8] Zhou Y, Liu GF, Feng J, et al. Study on separation and DPPH radical scavenging activities of 3 components from *Polygonum multiflorum* Thunb. [J]. *Acad J Guangdong Pharm Coll(广东药学学报)*, 2014, **30**(3):301-304.
- [9] Feng GY, Shi LY, Cui BD, et al. Effect of water extract and main monomer components of processed *Polygonum multiflorum* on intracellular tyrosinas and their antioxidant activity [J]. *Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发)*, 2015, **27**(4) : 578-584.
- [10] Xu PC, Zhang XQ, Chen LP, et al. Rapid screening and analysis of antioxidants in *shiliang tea* by HPLC-DPPH [J]. *Anal Instrument(分析仪器)*, 2021(1):128-131.
- [11] He YJ, Xie HQ, Wu RY, et al. Rapid determination of antioxidant constituents in *aurantii fructus* by HPLC-DPPH method [J]. *Mod Chin Med(中国现代中药)*, 2017, **19**(8) : 1131-1135.
- [12] Wei YF, Yang J, Li JY, et al. On-line HPLC-DPPH-UV/Vis-MS screening for antioxidant components in *Sibiraea angustata* leaves[J].*Chin J Pharm Anal(药物分析杂志)*, 2018, **38**(8) : 1369-1375.
- [13] Yan GL, Zhou YZ, Hu YH, et al. Rapid screening and isolation of antioxidants from *Eupatorium lindleyanum* DC. using CCC target-guided by on-line HPLC-DPPH assay [J]. *Prep Biochem Biotechnol*, 2021, **51**(6):530-535.
- [14] Chen HF, Chen YH, Liu CH, et al. Integrated chemometric fingerprints of antioxidant activities and HPLC-DAD-CL for assessing the quality of the processed roots of *Polygonum multiflorum* Thunb. (Heshouwu)[J]. *Chin Med*, 2016, **11**:18.
- [15] Wang JX, Fan LD, Hu MH, et al. Spectrum-effect relationship between fingerprints and hemopoietic effects of small molecular fraction of *Polygoni multiflori Radix praeparata* [J]. *Biomed Chromatogr*, 2020, **34**(6):e4821.
- [16] Li M, Jing XL, Tan WL. Study on separation, purification and antioxidant activity of stilbene glycosides from *Polygonum multiflorum* Thunb.[J]. *Bio Chem Eng(生物化工)*, 2019, **5**(2) : 17-22.
- [17] Lv LS, Tang J, He QT. Property and activity of DPPH radical scavenging of stilbene glucosides [J]. *J Harbin Inst Technol(哈尔滨工业大学学报)*, 2009, **41**(9):252-255.
- [18] Zhu M, Yao Y. Comparison of antioxidant activities *in vitro* of raw processed *Polygoni multiflori Radix* and its main chemical constituents [J] *Chin J Hosp Pharm(中国医院药学杂志)*, 2018, **38**(20):2119-2123.
- [19] Zhang L, Ding XP, Qi J, et al. Determination of antioxidant activity of tea by HPLC-DPPH[J]. *J China Pharm Univ(中国药科大学学报)*, 2012, **43**(3):236-240.
- [20] Zhou XX, Yang Q, Xie YH, et al. Protective effect of tetrahydroxystilbene glucoside against D-galactose induced aging process in mice[J]. *Phytochem Lett*, 2013, **6**(3):372-378.
- [21] Chen F, Li XY, Aquadro E, et al. Inhibition of histone deacetylase reduces transcription of NADPH oxidases and ROS production and ameliorates pulmonary arterial hypertension [J]. *Free Radic Biol Med*, 2016, **99**:167-178.