

基于 HPLC-UV-DPPH 法的地黄和熟地黄药材抗氧化活性成分比较研究

沈华旦¹, 方江济³, 郭鹏程², 定天明², 刘军锋¹, 丁晓萍^{2*}

1. 湖北中医药大学药学院, 湖北 武汉 430065

2. 湖北省药品监督检验研究院, 湖北 武汉 430075

3. 武汉理工大学化学化工与生命科学学院, 湖北 武汉 430070

摘要: 目的 建立 HPLC-UV-DPPH 在线分析方法, 比较不同生产企业的地黄药材在炮制前后抗氧化活性成分的变化, 为中药炮制及质量控制提供有效的评价方法。方法 HPLC-UV-DPPH 在线联用筛选系统中 HPLC 流动相为乙腈-0.1%醋酸水溶液, 梯度洗脱, 体积流量为 1.0 mL/min, 色谱柱为 Agilent Extend C₁₈ 柱 (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 柱温 30 °C, 检测波长 334 nm, DPPH 溶液体积流量 0.5 mL/min, 检测波长 517 nm。以毛蕊花糖苷为阳性对照, 通过“量-效”研究思路评价样品的总抗氧化活性及各成分对总抗氧化活性的贡献率。采用 HPLC-FT-MS 对药材中主要的抗氧化活性成分进行鉴定并比较药材炮制前后的差异。结果 HPLC-UV-DPPH 方法检测到地黄中主要含有 9 个抗氧化活性成分, 而熟地黄含有 13 个, 地黄和熟地黄有 8 个共有抗氧化活性成分, 地黄在炮制前后抗氧化活性成分明显不同, 不同生产企业的样品中各抗氧化活性成分的活性差异较大。抗氧化活性贡献率较高的成分分别为玉叶金花苷酸、海胆苷、焦地黄苯乙醇苷 A1/A2、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷。结论 HPLC-UV-DPPH 法稳定、灵敏、重现性好, 适用于地黄和熟地黄中抗氧化活性成分的快速筛选和质量评价。

关键词: HPLC-UV-DPPH; 抗氧化活性; 地黄; 熟地黄; HPLC-FT-MS; 玉叶金花苷酸; 海胆苷; 焦地黄苯乙醇苷 A1/A2; 毛蕊花糖苷; 异毛蕊花糖苷

中图分类号: R286.02 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)03-0582-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.03.012

Study of anti-oxidants of *Rehmanniae Radix* and *Rehmannia Radix Praeparata* by HPLC-UV-DPPH method

SHEN Hua-dan¹, FANG Jiang-ji³, GUO Peng-cheng², DING Tian-ming², LIU Jun-feng¹, DING Xiao-ping²

1. School of Pharmaceutical Science, Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China

2. Hubei Institute for Drug Control, Wuhan 430075, China

3. School of Chemistry, Chemical Engineering and Life Science, Wuhan University of Technology, Wuhan 430070, China

Abstract: Objective To develop an HPLC-UV-DPPH method to compare anti-oxidants of *Rehmanniae Radix* and *Rehmannia Radix Praeparata* sample from different manufactories and to provide an effective method for the processing and quality control of traditional Chinese medicine. **Methods** HPLC in HPLC-UV-DPPH system was performed on Agilent Extend C₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5 μm) column with gradient elution of acetonitrile-0.1% acetic acid at the flow rate of 1.0 mL/min, and the detection wavelength was at 334 nm. The column temperature was 30 °C. Flow rate of DPPH solution is 0.5 mL/min, and detection wavelength was set at 517 nm. The total activities of the samples and the contribution rate of each component to the total activity were evaluated by the “quantity-effect” research idea, and verbascoside was regarded as a positive reference. The main anti-oxidants in original and processed herbs were identified by HPLC-FT-MS and were compared. **Results** The detection of HPLC-UV-DPPH method showed that there were nine anti-oxidants in *Rehmanniae Radix* extract, while 13 anti-oxidants were found in *Rehmanniae Radix Praeparata*. There were eight common anti-oxidants in the two herbs. The anti-oxidants were obviously different before and after *Rehmanniae Radix* processed. The activities of the antioxidants in different samples were markedly different. Anti-oxidants with higher contributions were mussaenosidic

收稿日期: 2017-09-26

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81403093); 湖北省食品药品监督管理局科研项目 (2016010+02); 中央高校基本科研业务费资助项目 (175220006)

作者简介: 沈华旦, 硕士研究生, 研究方向为中药及其制剂的物质基础研究。Tel: (027)87705274 E-mail: 656550720@qq.com

*通信作者 丁晓萍, 副研究员, 研究方向为中药质量控制及药效物质基础研究。Tel: (027)87705274 E-mail: dxp2888@126.com

acid, echinacoside, jionoside A1/A2, verbascoside, and isoverbascoside, respectively. **Conclusion** The HPLC-UV-DPPH method is stable, sensitive, reproducible, and suitable for rapid screening of anti-oxidants and quality evaluation of *Rehmanniae Radix* and *Rehmannia Radix Praeparata*.

Key words: HPLC-UV-DPPH; anti-oxidant activity; *Rehmanniae Radix*; *Rehmanniae Radix Praeparata*; HPLC-FT-MS; mussaenosidic acid; echinacoside; jionoside A1/A2; verbascoside; isoverbascoside

目前研究表明,人类的很多疾病及衰老与人体内自由基代谢失衡有关,适当服用抗氧化剂可以清除体内过多的自由基,有利于身体健康和疾病的预防控制^[1-4]。因此寻找具有自由基清除活性的天然来源或人工合成的抗氧化剂已成为研究热点^[5]。目前用于评价抗氧化能力的方法有 HPLC-CL(化学发光法)^[6-8]、HPLC-ABTS 法^[9-10]、HPLC-DPPH 法^[11-12]、HPLC-铜铁还原法^[13-14]。其中在线的 HPLC-CL 方法仪器系统多为自行搭建,仅用于探索性研究,仪器稳定性有待于进一步提高。而 HPLC-DPPH/ABTS 方法与现有柱后衍生仪器进行连接,方法稳定、灵敏、重现性好。为了更好地评价中药抗氧化活性,本研究采用 HPLC-UV-DPPH 法对中药地黄中的抗氧化活性成分进行快速筛选,并评价每个成分的活性及样品总活性。

地黄 *Rehmanniae glutinosa* Libosch. 为玄参科(Scrophulariaceae)多年生草本植物,其主要药用部位为地下块根。生地性寒,味甘,具有清热凉血、养阴生津之功效;地黄经酒炖或清蒸法制成熟地黄,其味甘,性微温,具有滋阴补血、益精填髓之功效^[15-17]。现代药理研究表明,地黄和熟地黄对抗衰老起着重要作用,该药理作用与抗氧化活性相关,目前对地黄和熟地黄的抗氧化活性已有研究报道,但具体的抗氧化活性成分报道较少^[18-20]。在《中国药典》2015 年版地黄和熟地黄的薄层鉴别中,采用 DPPH 浸板鉴别毛蕊花糖苷成分,而其他的抗氧化活性成分没有被体现出来^[15]。为了明确地黄药材炮制前后抗氧化活性成分的变化,本研究建立 HPLC-UV-DPPH 在线分析技术^[21-23],快速筛查 2 种药材中的抗氧化活性成分,以“量-效”关系评价抗氧化活性成分的活性,HPLC-FT-MS 鉴定抗氧化活性成分,为中药炮制及质量控制提供研究思路和方法。

1 仪器与材料

高效液相色谱仪,配备泵 e2695,UV 检测器 2498,美国 Waters 公司;柱后衍生仪,美国 Pickering Laboratories 公司;UV 检测器,美国 Thermo Fisher 公司;Orbitrap Fusion 三合一组合超高分辨液质联用仪,美国 Thermo 公司;Milli-Q 超纯水净化系统,

美国 Millipore 公司;Mettler ME204 型十万分之一电子分析天平,瑞士 Mettler Toledo 公司。

13 批地黄 *Rehmanniae Radix* (S01~S13) 为 4 个省份 13 家生产企业的地黄饮片,原药材为玄参科地黄属植物地黄 *Rehmanniae glutinosa* Libosch., 来源于河南 11 批、河北 2 批、山西 1 批;S01~S06 和 S12 来自于湖北省 7 家生产企业,S07~S09 和 S13 来自安徽省 4 家生产企业,S10 为广东省生产企业产品,S11 为浙江省生产企业产品;药材经湖北省药品监督检验研究院丁晓萍研究员鉴定均为玄参科植物地黄 *Rehmanniae glutinosa* Libosch. 的干燥块根,样本存放于湖北省药品监督检验研究院标本室。13 批熟地黄 *Rehmanniae Radix Praeparata* (P01~P13) 样品为对应的地黄样品(S01~S13)按照《中国药典》2015 年版熟地黄制法项下操作制备。

乙腈、甲醇为色谱纯,美国 Merck 公司;DPPH,梯希爱化成工业发展有限公司;对照品毛蕊花糖苷,质量分数 $\geq 98\%$,美国 Chromadex 公司;超纯水,Milli-Q 超纯水纯化系统自制,过 0.22 μm 微孔滤膜;甲醇、乙醇、醋酸等试剂均为分析纯,国药集团化学试剂有限公司。

2 方法与结果

2.1 HPLC-UV-DPPH 在线分析方法

2.1.1 色谱条件 色谱柱为 Agilent Extend C₁₈ 柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm);温度 30 $^{\circ}\text{C}$;检测波长 334 nm;进样量 20 μL ;体积流量 1.0 mL/min;流动相为乙腈-0.1%醋酸水溶液;梯度洗脱:0~10 min, 2%~4%乙腈;10~40 min, 4%~15%乙腈;40~55 min, 15%~25%乙腈;55~60 min, 25%~30%乙腈;60~65 min, 30%~95%乙腈;柱后 DPPH 溶液检测体积流量 0.5 mL/min。

2.1.2 HPLC-UV-DPPH 仪器系统 在线联用系统装置见图 1,样品通过 HPLC 分离获得色谱指纹图谱,经检测器后与柱后衍生仪泵入的 DPPH 溶液在线混合,DPPH 溶液的体积流量为 0.5 mL/min,2 种溶液混合经 1.4 mL 反应管 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下反应后进入另一个 UV-Vis 检测器(Ultimate 3000 HPLC)在 517 nm 进行检测,得到抗氧化活性指纹特征图谱。

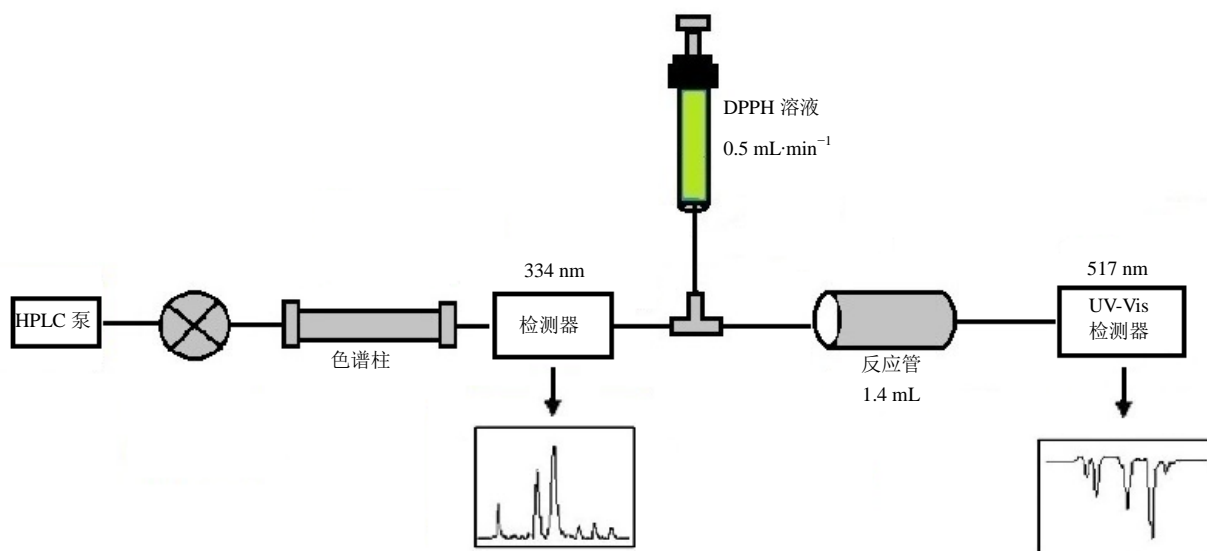


图 1 HPLC-UV-DPPH 在线联用仪器装置图

Fig. 1 Instrumental setup of on-line HPLC-UV-DPPH

2.1.3 样品溶液的制备^[24] 将地黄样品磨成最粗粉，经 80 °C 干燥 24 h 后，称取地黄粉末 3.0 g，精密称定，置具塞锥形瓶中，加入甲醇 70 mL，超声提取 2 次，每次超声 40 min，滤过，合并滤液，减压干燥回收溶剂至干，残渣用 15% 甲醇溶解并定容至 10 mL 量瓶中。取适量制备液，用 0.22 μm 微孔滤膜滤过，备用。熟地黄样品溶液制备同上。

2.1.4 对照品溶液的制备 分别精密称取毛蕊花糖苷对照品 7.78、3.81 mg，加流动相溶解至 50 mL，制备成质量浓度 155.6、76.2 μg/mL 的对照品储备液，将储备液稀释成质量浓度分别为 3.05、6.1、18.7、50.3、99.6、155.6 μg/mL 的系列对照品溶液，备用。

2.1.5 DPPH 溶液的制备 精密称取 DPPH 粉末适量，用甲醇制备成浓度分别为 10、25、50、75、100 μmol/L 的 DPPH 溶液，滤过，备用。DPPH 溶液每天现用现配，在分析过程中保持在 4 °C 冰水浴中。

2.2 HPLC-UV-DPPH 方法学考察

2.2.1 精密度试验 取同一批供试品 (P01, 湖北企业) 按“2.1.2”项方法制备供试品溶液。在“2.1.1”项所述色谱条件下连续进样 6 次，检测化学指纹图谱。记录活性指纹图谱，13 个共有倒峰的峰面积 RSD 值在 1.49%~4.61%。结果符合指纹图谱要求。

2.2.2 稳定性试验 取同一批供试品 (P01, 湖北企业) 溶液分别在 0、2、4、8、12、24 h 进样，按“2.1.1”项方法进样分析，记录活性指纹图谱，13 个共有倒峰的峰面积 RSD 值在 1.52%~4.25%。结果表明供试品溶液在 24 h 内稳定。

2.2.3 重复性试验 取同一批供试品 (P01, 湖北企业) 6 份，按“2.1.2”项方法制备供试品溶液，分别制成 6 份供试品溶液，按“2.1.1”项所述方法进行分析，记录活性指纹图谱，13 个共有倒峰的峰面积 RSD 值在 1.92%~5.28% (有个别峰面积很小，在积分时误差较大导致 RSD 偏高)。结果表明分析方法重复性良好。

2.3 HPLC-FT-MS 方法

HPLC 分析条件同“2.1.1”项下，为了达到质谱分析要求，在流动相流出 DAD 检测器后，采用三通管连接不同长度相同内径的 PEEK 管对流动相进行分流，使进入质谱检测器的溶液体积流量为 0.2 mL/min。

电喷雾离子源 (ESI) 负离子模式；鞘气 (N₂) 和辅助气 (Ar) 体积流量分别为 12 和 3 L/min；毛细管温度 320 °C；离子源电压 2.5 kV，电流 100 μA；一级质谱质量扫描范围为 m/z 150~1 000，分辨率为 60 000 (所使用质谱为高分辨质谱 Orbitrap 仪器，分辨率最高可达 240 000)；多级质谱采用 HCD 模式，依赖一级质谱扫描中的 1th 到 5th 强峰，分辨率 30 000；HCD 裂解能量 35 V。

2.4 在线分析方法 DPPH 溶液浓度的考察

^[25]

DPPH 溶液的浓度对测定结果的灵敏度影响较大，因此，对此因素进行考察，通过制备不同浓度 (10、25、50、75、100 μmol/L) DPPH 溶液进行考察，结果表明当 DPPH 浓度为 50 μmol/L 时，检测的倒峰分辨率高，背景噪音最小，且基线平稳。

2.5 HPLC-UV-DPPH 筛选地黄和熟地黄药材中的抗氧化活性成分

按照“2.1”项下方法，通过 HPLC-UV-DPPH 法对地黄和熟地黄样品中的抗氧化活性成分进行筛选，结果见图 2（图 2-A 为地黄 S07 号样品，图 2-B 为熟地黄 P07 号样品）。

由图 2 可知，地黄中有 9 个抗氧化活性成分峰，熟地黄中有 13 个抗氧化活性峰。其中峰 2、6、8~12、14 是地黄和熟地黄共有的抗氧化活性成分，峰 1、3~5、13 是熟地黄特有的抗氧化活性成分峰，而峰 7 是地黄特有的抗氧化活性成分峰，结果表明地黄在炮制后减少了 1 个抗氧化活性成分但增加了 4 个抗氧化活性成分。

2.6 抗氧化成分的活性评价

按“2.1”项所述方法进行测定，以活性指纹图谱的毛蕊花糖苷倒峰峰面积为横坐标（X），毛蕊花糖苷质量浓度为纵坐标（Y），得到毛蕊花糖苷的量-效曲线方程 $Y=0.0006X^4-0.0241X^3+0.4041X^2+1.299X+1.652$ ($R^2=1$)。

本研究以毛蕊花糖苷作为阳性对照，将地黄和熟地黄的各抗氧化活性成分倒峰峰面积值代入线性方程，即可计算出地黄和熟地黄样品中的各成分相当于毛蕊花糖苷的效价（图 3）。由图 3 可见，地黄样品中抗氧化活性较高的成分分别为峰 8~11，并且这几个峰对样品总抗氧化活性的贡献率也较高（图 4-A），其中毛蕊花糖苷（峰 10）贡献率最高。

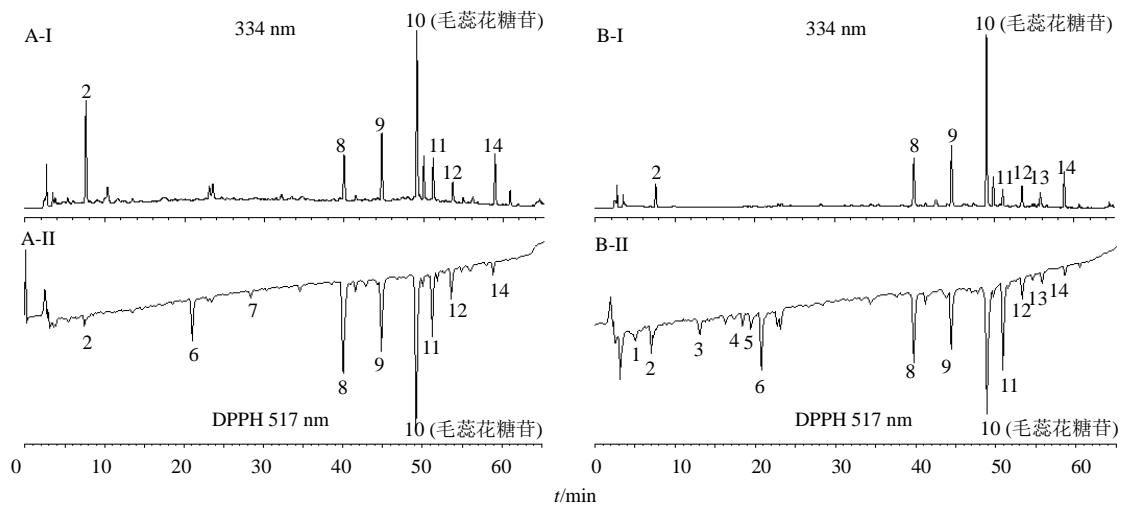


图 2 地黄 (A)、熟地黄 (B) 的 HPLC 指纹图谱 (I) 和活性指纹图谱 (II)

Fig. 2 HPLC fingerprints (I) and active fingerprints (II) of *Rehmanniae Radix* (A) and *Rehmanniae Radix Praeparata* (B)

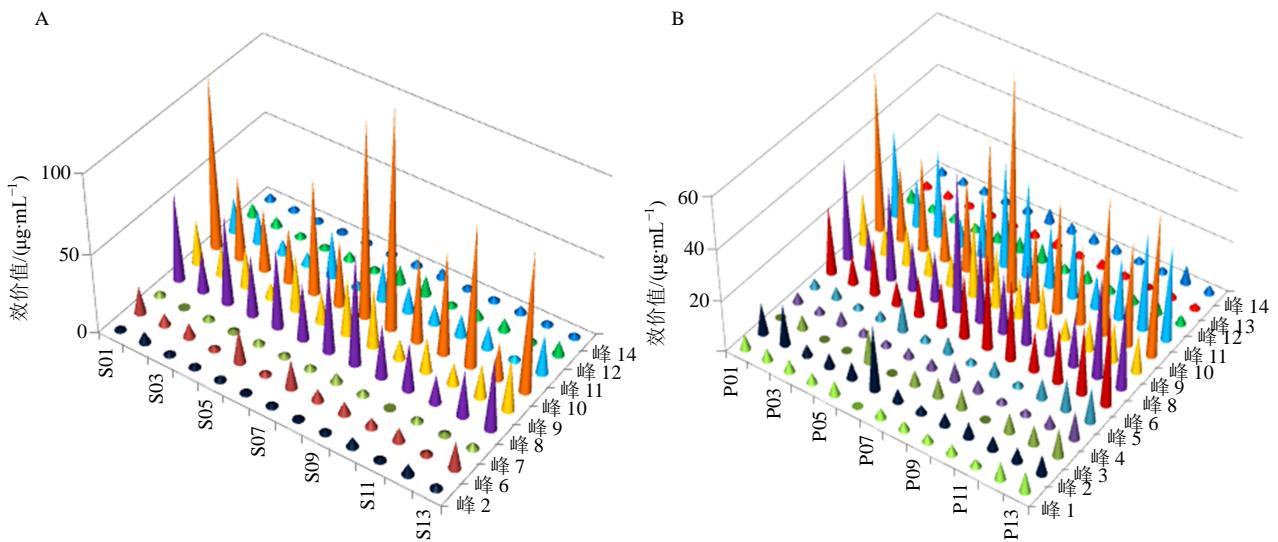


图 3 不同生产企业地黄 (A)、熟地黄 (B) 样品中抗氧化活性成分相对于毛蕊花糖苷的效价

Fig. 3 Potencies of antioxidants from *Rehmanniae Radix* (A) and *Rehmanniae Radix Praeparata* (B)

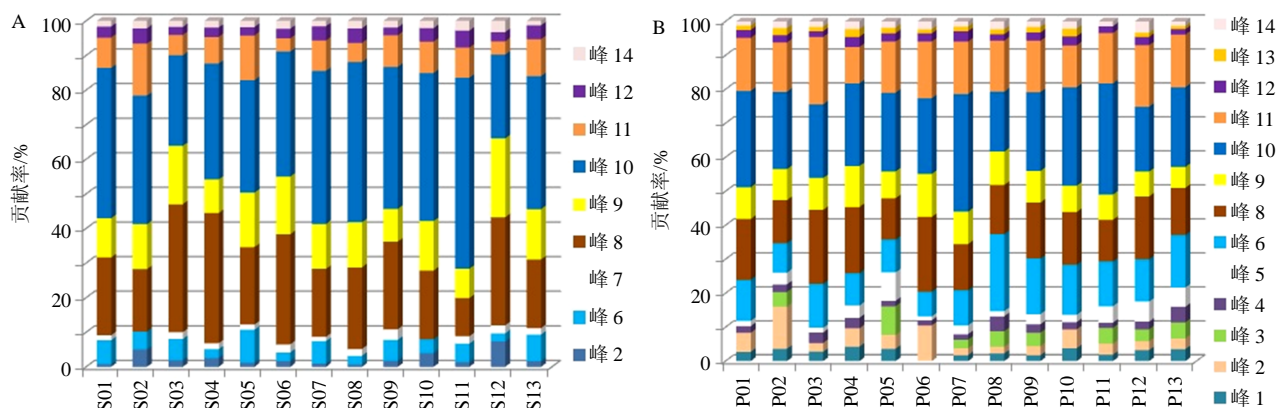


图 4 各抗氧化成分对不同生产企业地黄 (A) 和熟地黄 (B) 样品总活性的贡献率

Fig. 4 Contributions of antioxidants to the total activities of *Rehmanniae Radix* (A) and *Rehmanniae Radix Praeparata* (B) samples

而熟地黄样品中抗氧化活性较高的成分分别为峰 6、8~11，并且它们对样品的总抗氧化活性贡献率较高（图 4-B），毛蕊花糖苷（峰 10）的贡献率比在地黄中的低。此外，地黄在炮制后有几种成分显示了抗氧化活性，如峰 1、3~5、13。13 批熟地黄中上述特有成分对总抗氧化活性的总贡献率分别为 7.59%、15.63%、8.86%、13.21%、23.93%、4.98%、10.08%、15.11%、12.88%、10.22%、14.32%、18.30%、19.92%。除了毛蕊花糖苷外其他成分对总抗氧化活性也具有一定的贡献。

各成分的效价总和即为该样品清除 DPPH 自由基总活性，结果见表 1，大部分样品如 S01~S04、S07、S09~S11、S13 炮制前后总抗氧化活性差异变化不大，但样品 S06、S12 的抗氧化活性在炮制后大幅增大，说明熟地黄样品中除毛蕊花糖苷外，其他成分的抗氧化活性都有所增加，其中新增的成分对其总抗氧化活性升高具有一定的贡献，而 S05、S08 样品的抗氧化活性在炮制后大幅减小，表明在熟地黄中对总抗氧化活性起主要贡献作用的毛蕊花糖苷的量减少了，其他抗氧化活性成分的贡献率也相应降低。

2.7 HPLC-FT-MS 鉴定抗氧化活性成分

为了明确地黄和熟地黄药材中的抗氧化活性成分，对地黄及熟地黄样品中出现的 14 个倒峰进行 HPLC-FT-MS 鉴定。质谱信息与参考文献相比较^[26]，抗氧化活性成分鉴定结果见表 2。

3 讨论

本研究结果表明，HPLC-UV-DPPH 在线方法能够快速筛选地黄和熟地黄中主要抗氧化活性成分，

表 1 13 批地黄和熟地黄样品总活性

Table 1 Total activity of 13 batches of *Rehmanniae Radix* and *Rehmanniae Radix Praeparata* samples

样品	总效价/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)		样品	总效价/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	
	地黄	熟地黄		地黄	熟地黄
S01	253.99	222.65	S08	298.31	165.01
S02	143.27	131.57	S09	135.26	193.06
S03	153.34	172.61	S10	154.25	106.58
S04	103.88	100.72	S11	163.41	163.55
S05	228.57	161.66	S12	94.70	214.85
S06	115.89	250.36	S13	231.97	242.06
S07	280.12	245.99			

并能客观地评价地黄和熟地黄的总抗氧化活性及各成分的抗氧化活性。该方法快速、稳定、灵敏、重现性好，能全面地筛选出药材中所有的抗氧化活性成分，可广泛用于中药及其他复杂提取物中抗氧化活性成分的快速筛选，为其质量评价提供一定的依据。地黄药材在炮制后抗氧化成分发生了变化，毛蕊花糖苷的抗氧化活性贡献率降低，峰 7 没有显示抗氧化活性，但新增了 5 个抗氧化活性成分地黄氯化臭乙醛苷、未知成分（14.97 min）、马钱素、去咖啡酰毛蕊花糖苷、6-O-阿魏酰筋骨草苷。在地黄样品中，毛蕊花糖苷对总抗氧化活性贡献率最大，主要影响样品的总抗氧化活性大小。地黄和熟地黄样品的总抗氧化活性主要取决于 5 种成分玉叶金花苷酸、海胆苷、焦地黄苯乙醇苷 A1/A2、毛蕊花糖苷、异毛蕊花糖苷的抗氧化活性。地黄药材炮制前后成分及抗氧化活性的变化与其功效的改变密切相

表 2 14 种抗氧化成分的质谱鉴定结果

Table 2 Identified results of 14 anti-oxidants by HPLC-FT-MS

峰号	t_R /min	分子式	[M-H] ⁻	MS ² 碎片离子 (m/z)	化合物
1	6.28	C ₁₅ H ₂₃ O ₁₀ Cl	397.023 8	379.112 3, 276.903 1, 252.211 2	地黄氯化臭乙醛苷
2	8.44	C ₂₆ H ₂₃ O ₁₀	495.129 1	449.124 1, 287.073 5, 263.073 8, 221.063 6, 179.053 4	—
3	14.97	C ₂₉ H ₃₃ O ₁₄ N ₉	731.210 0	505.149 2, 323.093 5, 263.073 4, 221.063 3	—
4	19.88	C ₁₇ H ₂₆ O ₁₀	389.103 6	372.095 7, 227.052 8, 209.042 5, 139.037 8	马钱素
5	21.10	C ₂₀ H ₃₀ O ₁₂	461.160 3	315.104 1, 297.093 9, 161.043 0, 135.042 9	去咖啡酰毛蕊花糖苷
6	22.29	C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀	375.123 9	315.104 6, 213.073 8, 169.084 4, 151.074 1	玉叶金花苷酸
7	29.79	C ₁₅ H ₂₀ O ₉	343.026 2	299.111 8, 284.085 8, 197.042 4, 182.019 2	丁香酸-4-O- α -L-鼠李糖苷
8	41.21	C ₃₅ H ₄₅ O ₂₀	785.240 0	623.210 3, 461.159 7, 161.021 9	海胆苷
9	45.91	C ₃₆ H ₄₈ O ₂₀	799.256 2	623.210 9, 605.198 7, 461.160 3, 315.103 9	焦地黄苯乙醇苷 A1/A2
10	50.22	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	623.189 5	461.160 1, 315.104 0, 179.032 1, 161.021 8	毛蕊花糖苷
11	52.20	C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅	623.189 8	461.160 2, 315.104 0, 251.052 4, 179.032 2, 161.021 8	异毛蕊花糖苷
12	54.60	C ₃₀ H ₃₈ O ₁₅	637.204 8	491.149 2, 475.177 3, 461.459 9, 443.149 7	焦地黄苯乙醇苷 D/白术苷 A
13	57.13	C ₂₅ H ₃₂ O ₁₂	523.157 2	508.152 8, 361.123 8, 343.113 8, 299.088 7, 193.047 6	6-O-阿魏酰筋骨草苷
14	59.89	C ₃₁ H ₄₀ O ₁₅	651.220 5	505.163 0, 475.175 5, 193.047 7	地黄苷

关, 从某种程度上体现了中药炮制在临床应用上的必要性及中医用药的深刻内涵。

参考文献

[1] Koşar M, Dorman H J D, Başer K H C, *et al.* Screening of free radical scavenging compounds in water extracts of *Mentha* samples using a postcolumn derivatization method [J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(16): 5004-5010.

[2] 王虹, 陈军辉, 赵恒强, 等. 高效液相色谱-质谱-二苯基三硝基苯胍在线筛选与鉴别茶叶中抗氧化活性成分 [J]. *分析化学*, 2009, 37(6): 795-800.

[3] Raudonis R, Jakstas V, Burdulis D, *et al.* Investigation of contribution of individual constituents to antioxidant activity in herbal drugs using postcolumn HPLC method [J]. *Medicina*, 2009, 45(5): 382-394.

[4] Li S Y, Yu Y, Li S P. Identification of antioxidants in essential oil of *Radix Angelicae Sinensis* using HPLC coupled with DAD-MS and ABTS-based assay [J]. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(9): 3358-3362.

[5] Dapkevicius A, van Beek T A, Niederländer H A. Evaluation and comparison of two improved techniques for the on-line detection of antioxidants in liquid chromatography eluates [J]. *J Chromatogr A*, 2001, 912(1): 73-82.

[6] 朱卉, 朱丹妮, 余伯阳. HPLC-CL 联用在线检测消癌平注射液清除 H₂O₂ 及 O₂⁻ 自由基活性 [J]. *中成药*, 2010, 32(8): 1386-1390.

[7] 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.

[8] Ding X P, Zhang C L, Qi J, *et al.* The Spectrum-effect integrated fingerprint of *Polygonum cuspidatum* based on HPLC-diode array detection-flow injection-chemiluminescence [J]. *Chin J Nat Med*, 2013, 11(5): 546-552.

[9] Karaçelik A A, Küçük M, İskefiyeli Z, *et al.* Antioxidant components of *Viburnum opulus* L. determined by on-line HPLC-UV-ABTS radical scavenging and LC-UV-ESI-MS methods [J]. *Food Chem*, 2015, 175(5): 106-114.

[10] He L, Zhang X, Xu H, *et al.* Subcritical water extraction of phenolic compounds from pomegranate (*Punica granatum* L.) seed residues and investigation into their antioxidant activities with HPLC-ABTS⁺ assay [J]. *Food Bioprod Process*, 2012, 90(2): 215-223.

[11] 张雷, 丁晓萍, 戚进, 等. HPLC-DPPH 在线联用技术评价茶的抗氧化活性 [J]. *中国药科大学学报*, 2012, 43(3): 236-240.

[12] Sun L Q, Ding X P, Qi J, *et al.* Antioxidant anthocyanins screening through spectrum-effect relationships and DPPH-HPLC-DAD analysis on nine cultivars of introduced rabbiteye blueberry in China [J]. *Food Chem*, 2012, 132(2): 759-765.

[13] Çelik S E, Özyürek M, Güçlü K, *et al.* Determination of

- antioxidants by a novel on-line HPLC-cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) assay with post-column detection [J]. *Anal Chim Acta*, 2010, 674(1): 79-88.
- [14] Le G J, Guffond D, Hamon E, *et al.* Combined microplate-ABTS and HPLC-ABTS analysis of tomato and pepper extracts reveals synergetic and antagonist effects of their lipophilic antioxidative components [J]. *Food Chem*, 2017, 223(5): 62-71.
- [15] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [16] 高 森, 李正翔, 赵 鹏, 等. 高效液相色谱指纹图谱在熟地黄质量稳定性中的应用研究 [J]. *中国医院用药评价与分析*, 2013, 13(10): 908-910.
- [17] 曾 艳, 贾正平, 张汝学. 地黄化学成分及药理研究进展 [J]. *中成药*, 2006, 28(4): 609-611.
- [18] 李鹏飞, 苗明三. 熟地黄的现代研究及应用现状分析 [J]. *中医学报*, 2014, 29(2): 252-254.
- [19] 李建军, 李静云, 王 莹, 等. 地黄药用研究概述 [J]. *生物学教学*, 2013, 38(3): 4-7.
- [20] 李红伟, 孟祥乐. 地黄化学成分及其药理作用研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2015, 38(2): 218-228.
- [21] 王晓飞, 焦海胜, 李玉民. HPLC-柱后生物活性检测在线联用技术在天然活性成分筛选中的应用 [J]. *中草药*, 2013, 44(8): 1047-1051.
- [22] Bandonien D, Murkovic M. The detection of radical scavenging compounds in crude extract of borage (*Borago officinalis* L.) by using an on-line HPLC-DPPH method [J]. *J Biochem Biophys Methods*, 2002, 53(1/3): 45-49.
- [23] 耿丹丹, 董 琦, 谭 亮, 等. HPLC-DAD-ESI/MSⁿ-DPPH 在线筛选与鉴别丹参和康定鼠尾草中抗氧化活性成分 [J]. *分析测试学报*, 2015, 34(3): 314-320.
- [24] 宋子荣, 谭梓骏, 陈西松, 等. 地黄提取工艺的优化 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2006, 12(1): 8-9.
- [25] Peng W, Zeng Q, Li D, *et al.* Multiple on-line HPLC coupled with biochemical detection methods to evaluate bioactive compounds in *Danshen* injection [J]. *Biomed Chromatogr*, 2016, 30(11): 1854-1860.
- [26] 宋青青, 赵云芳, 张 娜, 等. 生地黄 HPLC 指纹图谱的建立及其 HPLC-ESI-MS 分析 [J]. *中草药*, 2016, 47(23): 4247-4252.