

UPLC-DPPH-PAD-ESI-TOF/MS 在线联用技术快速筛选丹参中的抗氧化成分

张敏敏, 程素盼, 赵志国, 刘 倩, 刘 伟, 王 晓, 赵恒强*

齐鲁工业大学 (山东省科学院), 山东省分析测试中心, 山东省中药质量控制技术重点实验室, 山东 济南 250014

摘要: **目的** 建立超高效液相色谱- (1,1-二苯基-2-三硝基苯肼)-二极管阵列检测器-电喷雾飞行时间质谱联用技术 (UPLC-DPPH-PAD-ESI-TOF/MS) 快速筛选鉴别天然产物中抗氧化成分的方法, 并用于丹参中抗氧化成分的快速发现。**方法** 采用 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 柱 (100 mm×3.0 mm, 1.8 μm), 以乙腈-0.2%甲酸水进行梯度洗脱, 体积流量 0.35 mL/min 实现丹参提取物的快速分析。柱后流出液与另一路 DPPH 溶液 (0.3 mL/min) 通过三通阀注入 PEEK 反应线圈 (内径 0.25 mm, 长度 10 m) 混合反应后流入检测器检测, 检测波长为 254 和 517 nm, 通过 517 nm 下产生的负峰所对应的样品色谱峰来筛选丹参中的抗氧化成分。**结果** 采用 UPLC 技术在低体积流量下实现样品的高效分离, 避免了高体积流量引起的基线噪音、显著提高了在线筛选方法的分辨率和灵敏度, 降低了溶剂消耗。采用该方法在丹参提取物中共筛选出 31 个抗氧化活性成分, 采用 PAD-ESI-TOF/MS 初步鉴定出 11 种, 活性验证实验表明, 咖啡酸、丹酚酸 B、丹酚酸 A、丹参素均具有较好抗氧化活性, 其中, 咖啡酸的 DPPH 半数清除浓度 (IC₅₀) 值为 29.00 μmol/L, 明显优于阳性对照维生素 C。**结论** 该方法分离速度快、分辨率和灵敏度较高、溶剂消耗低, 为复杂天然产物中抗氧化成分的快速发现研究提供了方法和技术支持。

关键词: 超高效液相色谱; 抗氧化; 在线筛选; 丹参; 咖啡酸; 丹酚酸; 丹参素

中图分类号: R284.1

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2020)11-2908-06

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.11.008

Rapid discovery of antioxidants in *Salvia miltiorrhiza* by UPLC-DPPH-PDA-ESI-TOF/MS online technique

ZHANG Min-min, CHENG Su-pan, ZHAO Zhi-guo, LIU Qian, LIU Wei, WANG Xiao, ZHAO Heng-qiang

Shandong Analysis and Test Center, Shandong Key Laboratory of Quality Control Technology of Traditional Chinese Medicine, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250014, China

Abstract: **Objective** To establish a method for rapid screening and identifying antioxidants in natural products by ultra high performance liquid chromatography-(1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine)-photo diode array-electrospray-time-of-flight mass spectrometry (UPLC-DPPH-PDA-ESI-TOF/MS) and apply it to the rapid discovery of antioxidants from *Salvia miltiorrhiza* extracts. **Methods** The Waters ACQUITY UPLC system and a Waters ACQUITY UPLC HSS T3 column (100 mm × 3.0 mm, 1.8 μm; Waters Technologies, USA) were used to elute the sample at a low flow rate of 0.35 mL/min, which could achieve the rapid separation of *S. miltiorrhiza* extracts. The elution was joined with DPPH solution (0.3 mL/min) and reacted in the PEEK coil, and then flew into the detector. The anti-oxidation components in *S. miltiorrhiza* extracts were quickly screened by comparing the chromatograms at 517 nm and 254 nm. **Results** The UPLC technology was adopted to realize the efficient separation of samples at low volume flow rate, which avoided the baseline noise caused by high volume flow rate, significantly improved the resolution and sensitivity of the online screening method, and reduced the solvent consumption. The results showed that 31 antioxidant active compounds were screened from *S. miltiorrhiza* extracts, and 11 of them were identified by PAD-ESI-TOF/MS. Activity verification

收稿日期: 2019-02-18

基金项目: 山东省自然科学基金资助项目 (ZR2017LH071); 山东省自然科学基金资助项目 (ZR2017LH069); 现代农业产业技术体系建设专项资金资助 (CARS-21); “十三五”重大专项生态种植项目 (SQ2017YFC170295); “十三五”重点研发计划 (2017YFC1702701); 山东省泰山学者岗位资助项目 (郭兰萍); 山东省科学院先导专项 (郭兰萍)

作者简介: 张敏敏, 硕士, 主要从事中药分析与质量控制研究。Tel: 18766160751 E-mail: zhangminminff@163.com

***通信作者** 赵恒强, 博士, 副研究员, 主要从事中药分析与质量控制研究。Tel: (0531)82605319 E-mail: hqzhao2007@163.com

experiments showed that caffeic acid, salvianolic acid B, salvianolic acid A and danshensu had better antioxidant activity. The IC_{50} value of caffeic acid was $29.00 \mu\text{mol/L}$, which was significantly better than the positive control (vitamin C). **Conclusion** The method is rapid and efficient, which provides methods and technical support for the rapid discovery of antioxidant components from complex natural products.

Key words: UPLC; antioxidant; online screening; *Salvia miltiorrhiza* Bge.; caffeic acid; salvianolic acid; danshensu

自由基,是指化合物的分子在光热等外界条件下,共价键发生均裂而形成的具有不成对电子的原子或基团,自由基在人体中也在不断产生^[1]。过剩的自由基会引起癌症、心血管疾病等多种慢性疾病以及多种与衰老有关的疾病^[2]。因此,清除体内过剩自由基对于此类疾病的治疗和人们的日常保健起着重要作用。近年来,具有自由基清除作用的抗氧化剂的研究已成热点,特别是来源于天然产物的天然抗氧化剂更以其高安全性、强环保性等优势成为科学研究中的重要目标^[3]。

目前,天然抗氧化活性成分发现的基本流程以分离-纯化-活性验证为主线,该方法在抗氧化成分的发现中发挥了重要作用^[4-5]。同时也可以看到,该方法耗时长、耗能高、效率低、较为盲目。另外,某些化合物由于含量较低和分离纯化过程中活性不稳定等因素易造成假阳性。近年来,研究者们开发了多种集色谱分析和活性筛选于一体的高效、快速的抗氧化成分发现技术^[6-7]。其中,高效液相色谱-(1,1-二苯基-2-三硝基苯肼, DPPH)在线抗氧化筛选技术具有高效、快速、灵敏、重现性好,集色谱分析和活性筛选于一体等优点,目前已广泛应用于天然产物中抗氧化成分的筛选中。本课题组也开展了基于 HPLC-DPPH 技术的抗氧化成分的筛选研究,并用于木瓜、厚朴、忍冬茶藨子叶状丛菌等天然产物中抗氧化成分的快速发现^[8-10]。通过调研文献可以看出,目前该在线筛选技术多采用 HPLC 用于研究样品的色谱分离^[11-12]。然而,由于受到 HPLC 分离效果和体积流量等的影响,易造成 HPLC-DPPH 在线抗氧化技术分辨率低、时间长、压力波动大、噪音高、溶剂消耗大等,严重影响该方法的推广和应用。UPLC 技术是在 HPLC 基础上发展的,以亚二微米填料为固定相的色谱技术,具有高柱效、高灵敏度、较低时间消耗和较低洗脱液等优点^[13],目前已广泛用于各种天然产物的高效、快速分析^[14]。UPLC 技术与 DPPH 联用对于提高在线抗氧化筛选技术的分离速度、分辨率和灵敏度以及降低溶剂消耗等方面将发挥重要作用。

丹参为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge.

的干燥根和根茎,其性苦、微寒,具有活血祛瘀、痛经止痛、清心除烦、凉血消痈等功效^[15]。中医临床上广泛用于治疗胸痹心痛、脘腹胁痛、心烦不眠、月经不调等各项疾病^[16]。现代药物研究表明,丹参中的主要成分为水溶性的丹酚酸类和脂溶性的丹参酮类,具有抗炎、抗病毒和抗氧化等多种生物活性^[17]。丹参中抗氧化成分的快速发现,对于深入研究其药理活性及进一步开发利用具有重要意义。

本研究通过色谱条件和在线筛选条件的系统优化,建立了基于 UPLC-DPPH 技术的抗氧化活性成分快速筛选技术体系,并通过高分辨 TOF/MS 技术对活性成分进行初步鉴别,为复杂基质天然产物中抗氧化成分的快速分析研究提供技术支持,具体流程图见图 1。

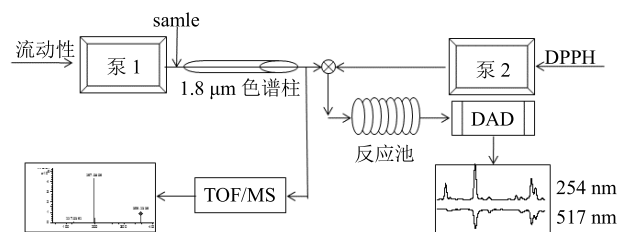


图 1 丹参抗氧化成分筛选流程图

Fig. 1 Flow chart of antioxidants screening from *S. miltiorrhiza*

1 仪器与材料

沃特世 ACQUITY UPLC 系统(美国沃特世公司);赛默飞 Unimates3000 系列高效液相色谱系统(美国赛默飞世尔科技有限公司);高速离心机(上海安亭科学仪器厂);帝肯 M20 系列多功能酶标仪(瑞士帝肯集团有限公司);布鲁克 IMPACT II ESI-Q-TOF-MS 质谱仪(美国布鲁克公司);MICROTEST™ 96 孔酶标板(美国狄金森公司);SB-5200D 系列高功率超声波清洗仪(宁波新芝公司)。

DPPH 购买于 Sigma 公司;乙腈(色谱纯)购于 Merck 公司;丹参样品购于济南漱玉平民大药房,经齐鲁工业大学(山东科学院山东省分析测试中心)王晓教授鉴定为唇形科植物丹参 *Salvia miltiorrhiza* Bge.;甲醇为色谱纯;其他试剂均为分析纯;实验用水为超纯水(美国 Millipore Q-Plus 系统)。

对照品丹酚酸 A (批号 DST191205-008)、丹酚酸 B (批号 DST190918-009)、丹参素 (批号 DST191201-015)、咖啡酸 (批号 DST191030-013)、维生素 C (批号 DST191115-045) 购于上海源叶生物科技有限公司, 质量分数均大于 98%。

2 方法

2.1 溶液的制备

2.1.1 样品溶液制备

精密称定丹参粉末 1.0 g, 加入 70% 甲醇 100 mL, 超声提取 30 min, 提取液抽滤, 减压蒸干后用 50% 甲醇复溶, 过 0.22 $\mu\text{mol/L}$ 微孔滤膜备用。

2.1.2 DPPH 在线筛选溶液制备

精密称定 DPPH, 采用 80% 乙腈配制成浓度为 6×10^{-5} mol/L 的 DPPH 自由基溶液, 置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

2.1.3 对照品溶液制备

分别精密称定各对照品 1.0 mg 于 1.0 mL 量瓶中, 溶解后用甲醇定容, 配成质量浓度为 1.0 mg/mL 的对照品溶液, 备用。

2.2 样品的 HPLC 分离

采用沃特世 ACQUITY 超高效液相色谱系统完成样品的液相分离分析。色谱条件: Waters ACQUITY UPLC HSS T3 柱 (100 mm $\times$ 3.0 mm, 1.8 μm); 流动相为水含 0.2% 甲酸 (A) - 乙腈 (B); 梯度洗脱: 0~10 min, 5%~18% B; 10~20 min, 18%~20% B; 20~30 min, 20%~24% B; 30~40 min, 24%~35% B; 40~50 min, 35%~45% B; 50~60 min, 45%~51% B; 60~70 min, 51%~70% B; 70~80 min, 70%~100% B; 体积流量 0.35 mL/min; 检测波长 254 nm; 柱温 26.5 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.3 在线抗氧化活性筛选

利用赛默飞 U3000 双三元液相色谱系统完成丹参提取液在线抗氧化筛选。各馏份利用右泵经最优化的色谱条件进样分析, 样品经过色谱柱分离后与左泵泵出的 DPPH 溶液混合, 混合液在反应池中反应后流入 DAD 检测器进行检测。鉴于 DPPH 在波长 517 nm 处的特征峰随 DPPH 自由基被抗氧化活性成分清除后形成倒峰。对比样品最佳吸收波长下和 DPPH 自由基特征波长下的 HPLC 图谱确定筛选出抗氧化活性成分。

2.4 质谱分析

电喷雾正负离子全扫描检测; 全扫描范围 m/z 50~1 500; 毛细管电压: 3.5 kV; 喷雾气压 200 kPa; 干燥气体积流量 8.0 L/min; 干燥气温度 200 $^{\circ}\text{C}$, 通

过以上质谱条件对丹参提取液中的抗氧化成分进行质谱鉴别分析。

2.5 活性验证

将各化合物对照品溶液稀释到 7 个不同质量浓度 (0.50、0.20、0.10、0.05、0.025、0.01、0.005 mg/mL), 作为待测样品备用。

取待测溶液 50 μL , 0.10 mg/mL DPPH 溶液 100 μL 加入到 96 孔板中混匀, 作为样品组, 室温避光孵育 30 min 后在酶标仪 517 nm 下测定吸光度 (A) 值。对照组包含 50 μL 甲醇水和 100 μL 0.10 mg/mL DPPH 溶液, 空白组包含 150 μL 甲醇。按照公式计算 DPPH 自由基清除率。以清除率为纵坐标 (Y), 质量浓度为横坐标 (X) 绘制标准曲线, 计算各对照品 DPPH 自由基半数清除浓度 (IC_{50}) 值。

$$\text{清除率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{样本}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

$A_{\text{对照}}$ 、 $A_{\text{样本}}$ 、 $A_{\text{空白}}$ 分别为对照组、实验组、空白组的 A 值

3 结果与分析

3.1 色谱条件优化

丹参中成分复杂多样且各化合物的极性具有较大差异, 需选用极性适用性范围广、分离跨度较大的乙腈-水体系对样品进行色谱分离分析。对于复杂的混合体系来说, 普通 HPLC 的分离时间较长且分离效果较差。本研究选用超高效液相色谱系统结合高效色谱柱进行提取样本的 UPLC 分离分析。考察了 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 柱 (100 mm $\times$ 3.0 mm, 1.8 μm ; Waters Technologies, 美国), Waters ACQUITY UPLC HSS T3 柱 (50 mm $\times$ 3.0 mm, 1.8 μm ; Waters Technologies, 美国) 和 Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 柱 (100 mm $\times$ 3.0 mm, 1.7 μm ; Waters Technologies, 美国) 3 根不同的色谱柱对该组分的分离效果。结果表明, 利用 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 柱 (100 mm $\times$ 3.0 mm, 1.8 μm ; Waters Technologies, 美国) 进行分离时, 出峰数量较多、分离度较好、峰型较尖锐, 因此选用该色谱柱对丹参提取物进行色谱分离。另外本研究考察了 4 个不同柱温 (25、26.5、30、35 $^{\circ}\text{C}$) 对分离效果的影响。结果表明, 柱温为 26.5 $^{\circ}\text{C}$ 时, 出峰较多, 分离度较好。考察了 4 个不同体积流量 (0.20、0.30、0.35、0.40 mL/min) 对分离效果的影响。结果表明, 体积流量在 0.35 mL/min 时, 峰型较为尖锐, 分离度较好。经过初步的梯度洗脱, 多个化合物被分离出来。为了改善峰型和分离度, 经过优化在水相中加入 0.2% 甲酸可以得到较好的峰型和分离度。利用最优化的色谱条件进

样分析,得到丹参提取液的 UPLC 图谱(图 2)。由图 2 可知,丹参提取液中含有许多微量活性成分,本研究建立的 UPLC 分析方法可以在较短的时间内对丹参中的微量活性成分进行较灵敏、较全面的分析检测。

3.2 在线筛选条件优化

本研究所用抗氧化成分在线筛选条件是在前期建立的在线抗氧化筛选模型基础上进行了适当修改^[9]。针对不同的筛选样本,其中活性成分类型、含量以及活性强弱具有较大差异,其相应的色谱分离溶剂体系和体积流量等会对筛选方法灵敏度、基线稳定性造成较大影响,因此,有必要对 DPPH 在

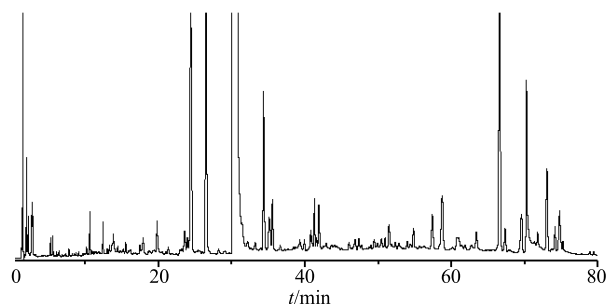


图 2 丹参提取物的 UPLC 图谱 (254 nm)

Fig. 2 UPLC chromatogram of *S. miltiorrhiza* extract (254 nm)

线筛选条件进行系统优化。本研究对 DPPH 溶剂类型、DPPH 浓度、DPPH 体积流量和反应池规格(内径、长度)等因素进行优化。

由于该样品色谱分离时流动相为乙腈-水体系,为了保证基线稳定、降低噪音以达到增加相对灵敏度的效果,研究对比考察了 3 种不同体积分数(50%、80%、100%)的乙腈-水作为 DPPH 泵送溶剂对筛选基线的影响。实验结果表明,采用 80%乙腈水为溶剂时基线较为平稳、噪音小。

通过对比 DPPH 溶液浓度(6×10^{-4} 、 6×10^{-5} 、 6×10^{-6} mol/L)和体积流量(0.2、0.3、0.4、0.5 mL/min)对筛选效果的影响,结果表明随着 DPPH 浓度和体积流量的增大,方法灵敏度有逐渐增加趋势,但较高的浓度和体积流量会造成基线波动,影响筛选效果,因此,选择 DPPH 溶液浓度 6×10^{-5} mol/L,体积流量为 0.3 mL/min 作为最适浓度和体积流量用于后续筛选。

反应池规格会影响反应时间的长短,从而影响筛选效果。本实验对反应池内径(0.18、0.25 mm)和长度(5、10、20 m)进行优化分析。研究结果表明,反应管越长、内径越大,产生 DPPH 倒峰的

响应越高,但同时较长的反应时间会造成色谱分离度下降,方法分辨率降低。综合考虑以上因素,最终确定内径为 0.25 mm,长度为 10 m 的 PEEK 管为该筛选试验实验最适反应池。

按照最优化的筛选条件对丹参提取物进行在线抗氧化成分筛选,结果见图 3。由图 3 可知,该提取物中共筛选出 31 个具有抗氧化活性的化合物。活性较明显的化合物多集中在前 50 min,根据反相色谱柱洗脱出峰极性规律特征可知,这些化合物极性相对较强,结合文献资料初步推断为酚酸类成分。

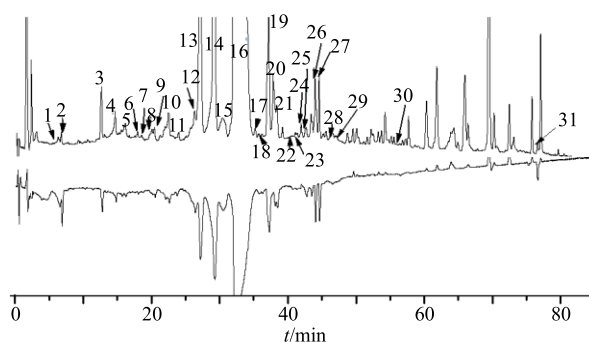


图 3 丹参抗氧化成分 UPLC-DPPH 筛选

Fig. 3 UPLC-DPPH screening chromatogram of antioxidants from *S. miltiorrhiza*

3.3 质谱鉴别

本研究利用 ESI-TOF-MS 对筛选出的抗氧化活性化合物进行初步定性分析。按最优的 UPLC 条件和 ESI-TOF-MS 条件对该提取物进行液质分析,得到各化合物的离子碎片信息。根据质谱数据和参考文献对筛选出的抗氧化活性成分进行鉴别^[18-20],结果见表 1。

由表 1 可知,通过质谱分析,本研究在丹参提取物中初步鉴别出 11 个活性化合物。结合各类化合物的特征可以看出丹参中筛选出的抗氧化成分以酚酸类为主。

3.4 活性验证

通过化合物体外 DPPH 自由基清除实验来对化合物单体进行活性评价。本研究测定其中 4 个化合物的 DPPH 自由基清除活性,并计算其 IC_{50} 值(表 2)。结果表明这 4 个化合物均具有较好的抗氧化活性,且在一定范围内呈现良好的量效关系。其中咖啡酸对 DPPH 自由基的 IC_{50} 值为 29.00 μ mol/L, IC_{50} 值最小,表明其抗氧化活性最好,且与阳性对照维生素 C 的抗氧化活性测定值对比可知,咖啡酸活性较

表 1 丹参中抗氧化成分鉴别

Table 1 Identification of antioxidant components in *S. miltiorrhiza*

峰号	化合物	分子式	正离子	负离子	UV/nm
2	丹参素 ^a	C ₉ H ₁₀ O ₅	199.058 7 [M+H] ⁺ , 221.040 4 [M+Na] ⁺	197.033 4 [M-H] ⁻	280
3	咖啡酸 ^a	C ₉ H ₈ O ₄	181.047 7 [M+H] ⁺	179.025 7 [M-H] ⁻	242, 323
4	原紫草酸	C ₁₈ H ₁₄ O ₈	359.071 5 [M+H] ⁺	357.042 4 [M-H] ⁻	238, 328
10	丹酚酸 H/紫草酸	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₂	539.110 0 [M+H] ⁺ , 561.091 8 [M+Na] ⁺	537.071 7 [M-H] ⁻	248, 285
13	迷迭香酸 ^a	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	361.086 0 [M+H] ⁺ , 383.064 0 [M+Na] ⁺	359.055 0 [M-H] ⁻	224, 328
14	丹酚酸 G/A ^a	C ₂₆ H ₂₂ O ₁₀	341.059 6 [M+H] ⁺		228, 252, 309
16	丹酚酸 B ^a	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₆	719.147 5 [M+H] ⁺	717.100 9 [M-H] ⁻	228, 285, 309
17	丹参二醇 A/B/C	C ₁₈ H ₁₆ O ₅	313.107 1 [M+H] ⁺ , 335.088 9 [M+Na] ⁺		242, 285
19	丹酚酸 E	C ₃₆ H ₃₀ O ₁₆	719.147 7 [M+H] ⁺	717.099 2 [M-H] ⁻	233, 285, 309
20	丹参二醇 A/B/C	C ₁₈ H ₁₆ O ₅	313.106 4 [M+H] ⁺ , 335.088 4 [M+Na] ⁺	311.066 5 [M-H] ⁻	271, 328
26	丹参二醇 A/B/C	C ₁₈ H ₁₆ O ₅	313.143 0 [M+H] ⁺		252

a 表示该化合物已经过对照品验证

a means the compounds has been verified by standard

表 2 丹参中抗氧化成分活性验证

Table 2 Verification of antioxidant activity of compounds screened from *S. miltiorrhiza*

化合物	IC ₅₀ /(μmol·L ⁻¹)	清除率/% ^a
丹酚酸 B	78.68	5.24
丹酚酸 A	128.28	4.28
丹参素	228.29	8.32
咖啡酸	29.00	69.86
维生素 C	52.29	51.70

^a 表示样品质量浓度为 10 mg·L⁻¹ 时对 DPPH 的清除率^a indicates DPPH clearance at a sample concentration of 10 mg·L⁻¹

好。对比各化合物的 IC₅₀ 值得出抗氧化活性顺序为咖啡酸>维生素 C>丹酚酸 B>丹酚酸 A>丹参素。

4 讨论

本研究建立了基于 UPLC-DPPH-PAD-ESI-TOF/MS 技术的在线抗氧化成份快速筛选方法,并用于丹参提取物中抗氧化活性成分的快速筛选。该方法筛选速度快、分辨率和灵敏度高、溶剂消耗低,采用该方法在丹参提取物中筛选出 31 种具有抗氧化活性的成分,采用高分辨质谱鉴别出 11 种,对其 4 种成分进行了活性实验。本研究为复杂基质天然产物中抗氧化活性成分的快速发现提供了方法和技术支持。

参考文献

- [1] 王璐,孙莉琼,苏航,等. 联用技术在自由基清除物筛选中的应用 [J]. 中草药, 2012, 43(5): 1032-1036.
- [2] 向志军,赵广荣,元英进,等. 复方丹参的体外抗氧化活性研究 [J]. 中草药, 2006, 37(2): 211-213.

- [3] 王旭,赵月,李婷婷,等. 天然抗氧化剂对玉米油稳定性的影响 [J]. 食品科学, 2018, 39(16): 7-12.
- [4] 栗雯. 高速逆流色谱分离纯化中草药广金钱草和连翘活性成分的研究 [D]. 长沙: 中南大学, 2014.
- [5] Pan C L, Lu H T. Preparative separation of quercetin, ombuin and kaempferide from *Gynostemma pentaphyllum* by high-speed countercurrent chromatography [J]. *J Chromatogr Sci*, 2019, 57(3): 265-271.
- [6] Koleva I I, Niederkander H A, Van Beek T A. Application of ABTS radical cation for selective on-line detection of radical scavengers in HPLC eluates [J]. *Anal Chem*, 2001, 73(14): 3373-3381.
- [7] Bandoniene D, Murkovic M. On-line HPLC-DPPH screening method for evaluation of radical scavenging phenols extracted from apples (*Malus domestica* L.) [J]. *J Agric Food Chem*, 2002, 50(9): 2482-2487.
- [8] Zhang M M, Cheng S P, Liang Y, et al. Rapid purification of antioxidants from *Magnolia officinalis* by semi-prep-HPLC with a two-step separation strategy guided by on-line HPLC-radical scavenging detection [J]. *J Chromatogr B Anal Tech Biomed Life Sci*, 2018, 1100: 140-147.
- [9] Zhang M M, Zhao R X, Zhou S D, et al. Chemical characterization and evaluation of the antioxidants in *Chaenomeles* fruits by an improved HPLC-TOF/MS coupled to an on-line DPPH-HPLC method [J]. *J Environmental Sci Health, Part C*, 2018, 36(1): 43-62.
- [10] Zhao H Q, Zhang M M, Liu Q, et al. A comprehensive

- screening shows that ergothioneine is the most abundant antioxidant in the wild macrofungus *Phylloporia ribis* Ryvarden [J]. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*, 2018, 36(2): 98-111.
- [11] 裴世春, 徐玖亮, Byunghun U M, 等. HPLC-ABTS⁺在线法筛选细叶杜香叶部抗氧化活性成分 [J]. 食品科学, 2012, 33(19): 88-91.
- [12] Ou Z Q, Schmierer D M, Rades T, *et al.* Application of an online post-column derivatization HPLC-DPPH assay to detect compounds responsible for antioxidant activity in *Sonchus oleraceus* L. leaf extracts [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2013, 65(2): 271-279.
- [13] Klimczak I, Gliszczyńska-Świąło A. Comparison of UPLC and HPLC methods for determination of vitamin C [J]. *Food Chem*, 2015, 175: 100-104.
- [14] 张 杨, 冯宝民, 卢 轩. UPLC/Q-TOF-MS 联用技术在药物分析中的应用进展 [J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29(11): 1992-1996.
- [15] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [16] 田宇红, 王喆之, 强小利. HPLC 法测定 12 种不同形态丹参脂溶性成分 [J]. 光谱实验室, 2010, 27(1): 87-89.
- [17] 曾慧婷, 宿树兰, 沙秀秀, 等. 丹参茎叶提取物抗氧化活性物质基础与量效关系研究 [J]. 中草药, 2017, 48(22): 4688-4694.
- [18] 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.
- [19] Cao J, Wei Y J, Qi L W, *et al.* Determination of fifteen bioactive components in *Radix et Rhizoma Salviae Miltiorrhizae* by high-performance liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometric detection [J]. *Biomed Chromatogr*, 2008, 22(2): 164-172.
- [20] Peng W B, Zeng Q H, Li D P, *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.