

HPLC-ABTS-DAD-ESI-TOF/MS 在线筛选柴银颗粒抗氧化成分及指纹图谱研究

郭焕滢^{1,2}, 胡思萌^{1,2}, 关永霞³, 纪文华^{1,2}, 张贵民³, 赵恒强^{1,2*}, 王 晓^{1,2*}

- 齐鲁工业大学(山东省科学院)山东省分析测试中心 山东省大型精密分析仪器应用技术重点实验室, 山东 济南 250014
- 齐鲁工业大学(山东省科学院)药学院 山东省高等学校天然药物活性成分研究重点实验室, 山东 济南 250014
- 鲁南制药集团股份有限公司 中药制药共性技术国家重点实验室, 山东 临沂 276006

摘要: 目的 建立 HPLC-ABTS-DAD-ESI-TOF/MS 在线筛选、鉴别柴银颗粒抗氧化活性成分的方法, 并探讨抗氧化活性成分指纹图谱联合多成分定量用于柴银颗粒质量评价的可行性。方法 采用 Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5.0 μm), 以甲醇-0.2%甲酸水溶液为流动相, 梯度洗脱, 体积流量为 0.8 mL/min, 柱温为 25 °C, 在 280 nm 下实现柴银颗粒提取物的色谱分析。柱后通过三通与 ABTS 溶液混合进入反应线圈, ABTS 体积流量为 0.6 mL/min, 反应管内径为 0.25 mm, 长度为 10 m。通过检测 ABTS 在 734 nm 下产生倒峰所对应的色谱峰, 筛选出抗氧化成分。结果 在柴银颗粒中筛选出 44 种抗氧化成分, 采用 DAD-ESI-Q-TOF/MS 初步鉴别出 37 种。活性验证表明, 连翘酯苷 A、木犀草苷、黄芩苷、绿原酸、葛根素均具有较好的抗氧化活性, 其中, 连翘酯苷 A 半数清除浓度(IC₅₀)为(11.08±1.21) μmol/L, 优于阳性对照抗坏血酸。对该 5 种活性成分进行了含量测定。以筛选出的抗氧化成分为共有峰, 建立了柴银颗粒抗氧化成分指纹图谱; 相似度分析表明, 不同批次样品相似度均在 0.99 以上。结论 建立的抗氧化成分在线筛选、鉴别方法分析速度快、灵敏度高, 可以快速辨识柴银颗粒中的抗氧化成分。由此建立的抗氧化活性成分指纹图谱, 把化学成分与生物活性相关联, 为中成药的整体质量评价研究提供方法与思路支持。

关键词: 柴银颗粒; HPLC-ABTS; 抗氧化成分; 在线筛选; 指纹图谱; 多成分测定; 连翘酯苷 A; 木犀草苷; 黄芩苷; 绿原酸; 葛根素

中图分类号: R283.6 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)16-5484-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.16.011

On-line screening of antioxidant components and fingerprint of Chaiyin Granules by HPLC-ABTS-DAD-ESI-TOF/MS

GUO Huanying^{1,2}, HU Simeng^{1,2}, GUAN Yongxia³, JI Wenhua^{1,2}, ZHANG Guimin³, ZHAO Hengqiang^{1,2}, WANG Xiao^{1,2}

- Shandong Key Laboratory for Applied Technology of Sophisticated Analytical Instruments, Shandong Analysis and Test Center, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250014, China
- Shandong Key Laboratory of Natural Medicine Active Ingredients Research, School of Pharmaceutical Sciences, Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250014, China
- State Key Laboratory of Generic Manufacture Technology of Traditional Chinese Medicine, Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi 276006, China

Abstract: Objective An on-line HPLC-ABTS-DAD-ESI-TOF/MS method was established to screen and identify the antioxidant components of Chaiyin Granules (柴银颗粒, CG), then the feasibility of the quality evaluation of CG based on the fingerprint of

收稿日期: 2024-02-23

基金项目: 山东省重点研发计划(重大科技创新工程)(2021CXGC010508); 山东省泰山学者项目(tstp20221138); 财政部和农业农村部: 国家现代农业产业技术体系(CARS-21)

作者简介: 郭焕滢(1999—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药分析与质量控制研究。E-mail: ghy13225342642@163.com

*通信作者: 王 晓(1971—), 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 从事中药资源与质量控制研究。E-mail: wangx@sdas.org

赵恒强(1980—), 男, 博士, 副研究员, 硕士生导师, 从事中药分析与质量控制研究。E-mail: hqzhao2007@163.com

antioxidant components combined with multi-component quantification was discussed. **Methods** A Phenomenex Luna C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5.0 μm) with gradient elution (methanol-0.2% formic acid aqueous solution) at a flow rate of 0.8 mL/min, column temperature of 25 °C was used. The HPLC chromatogram of CG extract was detected at 280 nm. The eluates were mixed with the ABTS solution through a tee joint and entered the reaction coil. The flow rate of ABTS was 0.6 mL/min, the inner diameter of the reaction tube was 0.25 mm, and the length was 10 m. The antioxidant components were screened out by detecting the chromatographic peak corresponding to the inverted peak generated by ABTS at 734 nm. **Results** Forty-four antioxidant components were screened from CG, and 37 components were preliminarily identified by DAD-ESI-Q-TOF/MS. The activity verification showed that forsythoside A, luteoloside, baicalin, chlorogenic acid and puerarin all had suitable antioxidant activities, and the IC₅₀ of forsythoside A was (11.08 ± 1.21) μmol/L, which was better than the positive control ascorbic acid. The contents of the five active components were determined. The fingerprint for the antioxidant components of CG was established, taking the screened antioxidant components as common peaks. Similarity analysis showed that the similarity of different batches of samples was all above 0.99. **Conclusion** The on-line screening and identification method of antioxidant components established in this study is fast and sensitive, which can quickly identify antioxidant components in CG. The fingerprint of antioxidant components established by this study associates chemical elements with biological activity, which provides methods and ideas support for the overall quality evaluation of Chinese patent medicines.

Key words: Chaiyin Granules; HPLC-ABTS; antioxidant components; on-line screening; fingerprint; multi-component determination; forsythoside A; luteoloside; baicalin; chlorogenic acid; puerarin

柴银颗粒源于明代陶华所著《伤寒六书》中的柴葛解肌汤以及清代名医吴鞠通所著《温病条辨》中的银翘散^[1],是由柴胡、金银花、黄芩、葛根、荆芥、青蒿、连翘、桔梗、苦杏仁、薄荷、鱼腥草 11 味中药组成的复方制剂^[2],具有清热解毒、利咽止咳、退热抗炎之功效^[3-5]。中医临床上广泛用于流感的治疗,在新型冠状病毒的预防和治疗中亦发挥了重要作用^[6-10]。然而,至今为止,历版《中国药典》中仍然没有收载柴银颗粒的质量标准。目前,研究者们也陆续开展了柴银颗粒质量标准研究^[11-18],但主要针对少数几个成分进行含量测定,不能全面反映和评价该制剂的整体质量,且成分与活性的关联研究鲜有报道。

流感病毒侵入宿主细胞后引发炎症,导致体内产生大量自由基,引发组织细胞氧化损伤,甚至凋亡。同时进一步增加宿主上皮细胞对流感病毒的易感性促进病毒传播^[19-22]。抑制病毒感染导致的氧化应激损伤是一种有效的治疗流感病毒感染策略之一。目前为止,有关柴银颗粒中抗氧化成分组成研究未见报道,基于柴银颗粒中抗氧化成分的特征指纹用于其质量评价研究有待探讨。

近年来,一些基于 LC-MS 的抗氧化成分快速筛选方法,如 HPLC 柱后在线反应 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼 (1,1-diphenyl-2-trinitrophenylhydrazine, DPPH)、2,2'-联氮-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二胺盐 [2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt, ABTS] 等联用技术,具有高选择性、高通量等优点,得到了快速发展^[23-26],其

中, HPLC-ABTS 在线筛选方法表现出较快的反应速度、响应灵敏度和选择性,已被用于复杂基质食品、植物提取物等中微量抗氧化活性成分的快速鉴别^[27-28]。基于此,本研究开展了基于 HPLC-ABTS-DAD-ESI-Q-TOF/MS 技术的柴银颗粒中抗氧化成分的在线快速筛选研究,在此基础上建立了柴银颗粒的抗氧化活性成分指纹图谱,并对 5 种成分(绿原酸、葛根素、连翘酯苷 A、木犀草苷、黄芩苷)进行了活性验证和含量测定,探讨了抗氧化活性成分指纹图谱联合多指标成分定量用于其质量控制的可行性。研究结果为柴银颗粒的整体质量控制和评价提供了方法和技术支持。

1 仪器与试剂

UltiMate 3000 型高效液相色谱仪,配置自动进样器、四元泵、柱温箱、二极管阵列检测器,德国 Thermo Fisher 公司; Bruker Impact II ESI-Q-TOF 型系列高分辨质谱仪,德国 Bruker 公司; SQP 型万分之一电子分析天平,美国 Sartorius BSA 公司; Millipore Q-Plus 型超纯水处理系统,美国 Millipore 公司; Tecan Infinite M20 型系列酶标仪,瑞士 Tecan 集团有限公司; PX125DZH 型十万分之一电子天平,美国 OHAUS (中国) 有限公司; SBL-10DT 型恒温超声波清洗机,宁波新芝生物科技股份有限公司。

ABTS 购买于 Sigma 公司; 对照品绿原酸 (批号 B20782, 质量分数 ≥ 98%)、连翘酯苷 A (批号 B20727, 质量分数 ≥ 98%) 购于上海源叶生物科技有限公司; 对照品黄芩苷 (批号 110715-200514, 质量分数 ≥ 98%) 购于中国食品药品检定研究院; 对

照品木犀草苷(批号 MUST-16012405, 质量分数 99.77%) 购于成都曼斯特生物科技有限公司; 葛根素, 实验室自制, 经波谱数据鉴定, 质量分数 $\geq 98\%$ 。

药品中柴胡、金银花、黄芩、葛根、荆芥、青蒿、连翘、桔梗、苦杏仁、薄荷、鱼腥草 11 种中药对照药材均购自济南建联大药房, 经齐鲁工业大学山东省分析测试中心王晓研究员鉴定, 柴胡为伞形科柴胡属植物柴胡 *Bupleurum chinensie* DC. 的干燥根、金银花为忍冬科忍冬属植物忍冬 *Lonicera japonica* Thunb. 的干燥花蕾或带初开的花、黄芩为唇形科黄芩属植物黄芩 *Scutellaria baicalensis* Georgi 的干燥根、葛根为豆科葛属植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥根、荆芥为唇形科荆芥属植物荆芥 *Schizonepeta tenuifolia* Briq. 的干燥地上部分、青蒿为菊科蒿属植物黄花蒿 *Artemisia annua* L. 的干燥地上部分、连翘为木樨科连翘属植物连翘 *Forsythia suspensa* (Thunb.) Vahl 的干燥果实、桔梗为桔梗科桔梗属植物桔梗 *Platycodon grandiflorus* (Jacq.) A. DC. 的干燥根、苦杏仁为蔷薇科杏属植物山杏 *Prunus armeniaca* L. var. *ansu* Maxim. 的干燥成熟种子、薄荷为唇形科薄荷属植物薄荷 *Mentha haplocalyx* Briq. 的干燥地上部分、鱼腥草为三白草科蕺菜属植物蕺菜 *Houttuynia cordata* Thunb. 的干燥地上部分, 均符合《中国药典》2020 年版相关要求。柴银颗粒, 浅棕黄色至黄棕色的颗粒, 8 g \times 10 袋, 山东鲁南厚普制药有限公司生产, 10 批药品批号分别为 22201281 (1)、22201281 (2)、22201281 (3)、22201281 (4)、2220321 (1)、2220321 (2)、2220321 (3)、2220881 (1)、2220881 (2)、2220881 (3), 分别编号 S1~S10, 购自济南市各大药店。

甲醇、乙腈为色谱纯, 德国 Merck 公司; 甲酸为色谱纯, 天津市科密欧化学试剂有限公司; 水为密理博超纯水, 18 M Ω ; 其余试剂均为分析纯。

2 方法与结果

2.1 溶液的制备

2.1.1 供试品溶液 精密称定柴银颗粒 0.30 g, 置于具塞三角瓶中, 加入 30 mL 甲醇, 超声提取 30 min (功率 300 W、室温), 取上清液, 经 0.22 μm 微孔滤膜滤过, 即得供试品溶液。

2.1.2 对照品储备溶液 分别精密称取绿原酸、葛根素、连翘酯苷 A、木犀草苷、黄芩苷对照品 1.00、0.90、0.90、1.10、1.00 mg, 置于 1 mL 量瓶中, 甲

醇溶解并定容至刻度线, 配制质量浓度分别为 1.00、0.90、0.90、1.10、1.00 mg/mL 的对照品储备溶液, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 即得。

2.1.3 阴性样品溶液 按处方比例、《中国药典》2020 年版一部及相关文献^[3,29]规定的工艺, 分别制备缺金银花、黄芩、葛根、连翘等药材的阴性样品, 按“2.1.1”项下方法制备, 即得各阴性样品溶液。

2.2 HPLC-DAD-ESI-Q-TOF/MS 分析条件

2.2.1 色谱条件 色谱柱为 Phenomenex Luna C₁₈ 柱 (250 mm \times 4.6 mm, 5.0 μm); 流动相为 0.2% 甲酸水溶液-甲醇, 梯度洗脱程序: 0~5 min, 7%~13% 甲醇; 5~20 min, 13%~22% 甲醇; 20~35 min, 22%~25% 甲醇; 35~41 min, 25%~28% 甲醇; 41~51 min, 28%~30% 甲醇; 51~57 min, 30%~32% 甲醇; 57~85 min, 32%~38% 甲醇; 85~113 min, 38%~52% 甲醇; 113~118 min, 52%~53% 甲醇; 118~130 min, 53%~70% 甲醇; 130~140 min, 70%~80% 甲醇; 140~145 min, 80%~85% 甲醇; 145~150 min, 85%~100% 甲醇; 150~160 min, 100% 甲醇; 进样量 5 μL ; 检测波长 280 nm; 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$; 体积流量为 0.8 mL/min。

2.2.2 质谱条件 进入高分辨电喷雾飞行时间质谱仪 (ESI-Q-TOF/MS) 的流动相采用三通分流至 0.4 mL/min; 电喷雾离子源 (ESI) 正、负离子模式; 全扫描范围 m/z 100~2 000; 喷雾气压 310.28 kPa; 干燥气体积流量 10.0 L/min; 温度 325 $^{\circ}\text{C}$; 毛细管电压 4.0 kV; 裂解电压 100 V; 锥孔电压 60 V。

2.3 柴银颗粒抗氧化活性成分在线筛选

2.3.1 HPLC-ABTS 抗氧化活性成分在线筛选条件 利用赛默飞 U3000 和普源 L3000 液相色谱系统共同完成柴银颗粒提取液在线抗氧化筛选。采用 U3000 系统, 根据本研究优化后的色谱条件对柴银颗粒提取物样品进行分析, 柱后流出液与普源液相泵出的 ABTS 溶液经三通进入反应线圈混合, 在反应线圈反应后流入 DAD 检测器检测。

ABTS 阳离子自由基 (ABTS⁺) 测定法利用清除过硫酸钾与 ABTS 反应生成的 ABTS⁺ 生色团自由基 ($\lambda=734$ nm)。柴银颗粒中的抗氧化剂活性成分将 ABTS⁺ 还原为 ABTS, 同时伴随着吸光度的下降。在 734 nm 波长下检测 ABTS 的特征吸收, 当样品中具有自由基清除活性的色谱峰与 ABTS 自由基在线圈中反应后, 会造成 ABTS 响应下降, 形成倒峰。倒峰对应的色谱峰被认为具有抗氧化活性,

对比样品在最佳吸收波长下的色谱图和 ABTS 自由基特征波长下产生的倒峰,即可筛选出柴银颗粒具有抗氧化功能的活性成分。

2.3.2 活性指纹共有峰的指认 柴银颗粒提取物中抗氧化成分的 HPLC-ABTS 筛选结果如图 1 所示。采用 ESI-Q-TOF/MS 技术快速鉴定了筛选出的柴银颗粒中抗氧化活性成分。对比了电喷雾离子源分别

在正、负 2 种模式下各化合物的分析效果。结果表明,大多数成分在负离子模式下具有较高的质谱信号。根据精确的相对分子质量测量结果、特征诊断碎片离子、紫外检测信号、相应的标准对照品以及文献报道的柴银颗粒中化学成分信息进行综合推断完成鉴定。初步鉴别了 37 种,结果见表 1。

2.3.3 抗氧化活性验证 ABTS 自由基阳离子

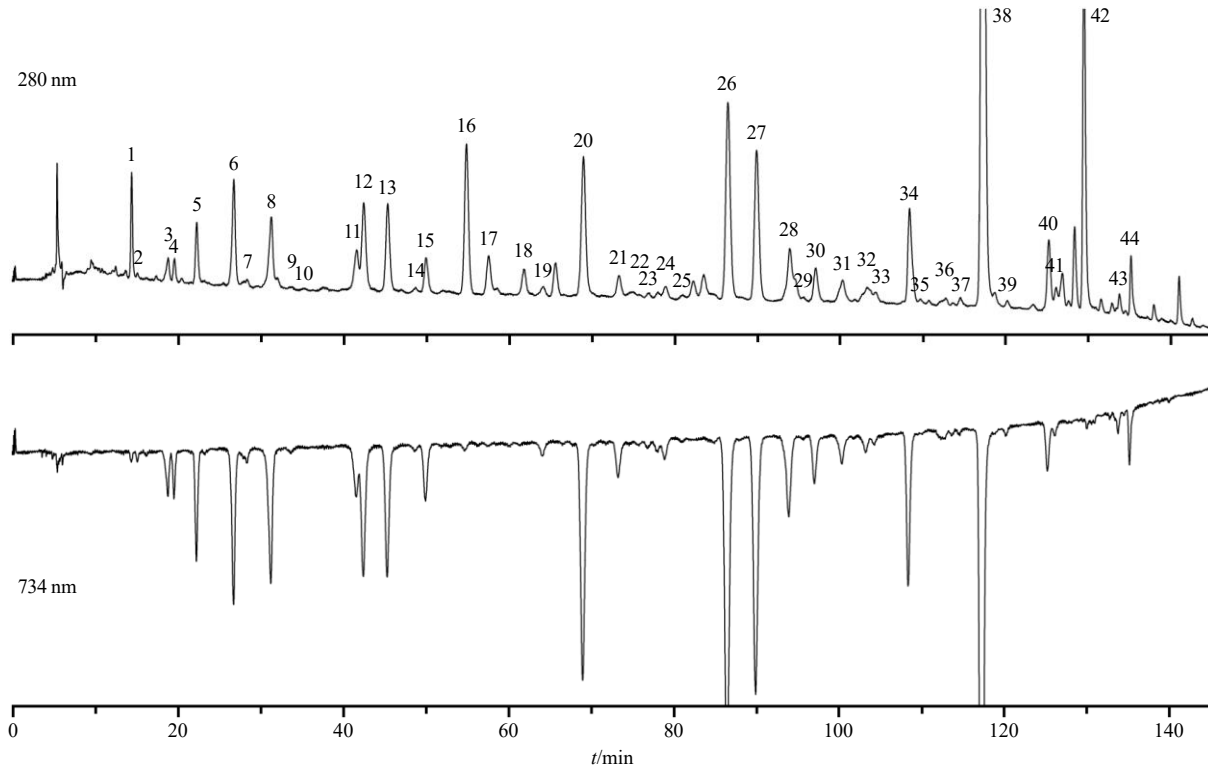


图 1 HPLC-ABTS 在线筛选柴银颗粒中抗氧化成分

Fig. 1 HPLC-ABTS on-line screening of antioxidant components in Chaiyin Granules

表 1 柴银颗粒提取物中抗氧化活性成分质谱鉴定结果

Table 1 Identification of antioxidant components from Chaiyin Granules extract

| 峰号 | t_R / min | λ_{max} /nm | 离子模式 | 实测值 (m/z) | 理论值 (m/z) | 误差 ($\times 10^{-6}$) | MS/MS 碎片离子 (m/z) | 分子式 | 化合物 |
|----|----------------|---------------------|-----------------------|------------------|------------------|----------------------------|---------------------------------|--|------------|
| 1 | 13.98 | 294 | [M-H] ⁻ | 193.050 4 | 193.049 5 | 4.66 | 134.562 4 | C ₁₀ H ₁₀ O ₄ | 阿魏酸 |
| 2 | 15.08 | 247 | [M-H] ⁻ | 333.119 4 | - | - | 395.155 9, 205.035 6, 142.051 1 | - | 未知 |
| 3 | 18.81 | 254 | [M-H] ⁻ | 389.108 5 | - | - | 315.073 6, 251.114 9, 235.926 9 | - | 未知 |
| 4 | 19.59 | 252 | [M-H] ⁻ | 405.140 0 | 405.139 1 | 2.22 | 243.954 5 | C ₁₇ H ₂₆ O ₁₁ | 莫诺昔 |
| 5 | 22.28 | 252 | [M-H] ⁻ | 197.045 4 | 197.044 5 | 4.57 | 219.027 5, 179.035 0 | C ₉ H ₁₀ O ₅ | 未知 |
| 6 | 26.76 | 191, 302, 326 | [M-H] ⁻ | 353.088 0 | 353.086 7 | 3.68 | 191.056 6, 179.035 0 | C ₁₆ H ₁₈ O ₉ | 5-O-咖啡酰奎宁酸 |
| | | | [2M-H] ⁻ | 707.182 4 | 707.181 8 | 0.85 | | | |
| 7 | 28.37 | 255 | [M-H] ⁻ | 375.130 0 | 375.128 6 | 3.73 | 443.117 6, 511.104 4, 579.093 5 | C ₁₆ H ₂₄ O ₁₀ | 马钱苷酸 |
| | | | [M+HCOO] ⁻ | 421.135 4 | 421.134 1 | 3.09 | | | |
| 8 | 31.29 | 265 | [M-H] ⁻ | 461.166 2 | 461.165 3 | 1.95 | 339.233 3 | C ₂₀ H ₃₀ O ₁₂ | 连翘酯苷 E |
| 9 | 33.78 | 256 | [M-H] ⁻ | 387.126 8 | 387.128 6 | -4.65 | 248.960 7, 205.071 9 | C ₁₇ H ₂₄ O ₁₀ | 断马钱子苷半缩醛内酯 |
| 10 | 35.49 | 191 | [M+HCOO] ⁻ | 502.155 9 | 502.155 5 | 0.80 | 570.143 3, 456.150 6 | C ₂₀ H ₂₇ NO ₁₁ | 苦杏仁苷 |

表 1 (续)

| 峰号 | t_R / min | λ_{max} /nm | 离子模式 | 实测值 (m/z) | 理论值 (m/z) | 误差 ($\times 10^{-6}$) | MS/MS 碎片离子 | 分子式 | 化合物 |
|----|----------------|---------------------|-----------------------|------------------|------------------|----------------------------|---------------------------------|---|------------------------|
| 11 | 41.61 | 191, 254 | [M-H] ⁻ | 431.097 4 | 431.097 2 | 0.46 | 161.023 2, 145.027 5 | C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀ | 3'-羟基葛根素 |
| 12 | 42.45 | 300, 326 | [M-H] ⁻ | 353.087 6 | 353.086 7 | 2.55 | 191.056 2, 135.045 1 | C ₁₆ H ₁₈ O ₉ | 绿原酸 |
| 13 | 45.37 | 191, 253, 328 | [M-H] ⁻ | 353.088 1 | 353.086 7 | 3.97 | 191.057 0, 179.035 3, 135.044 9 | C ₁₆ H ₁₈ O ₉ | 4-O-咖啡酰奎宁酸 |
| 14 | 48.74 | 257 | [M-H] ⁻ | 455.167 3 | - | - | 431.192 6, 335.124 9, 179.035 7 | - | 未知 |
| 15 | 49.99 | 254 | [M-H] ⁻ | 389.108 4 | 389.107 8 | 1.54 | 209.047 0 | C ₁₆ H ₂₂ O ₁₁ | 断氧化马钱苷酸 |
| 16 | 54.90 | 252, 306 | [M-H] ⁻ | 415.103 1 | 415.102 3 | 1.93 | 371.134 5, 146.961 1 | C ₂₁ H ₂₀ O ₉ | 葛根素 |
| 17 | 57.59 | 190, 254 | [M-H] ⁻ | 337.092 3 | 337.091 8 | 1.48 | 191.056 0, 163.039 9 | C ₁₆ H ₁₈ O ₈ | 3-O-对羟基肉桂酰奎宁酸或其异构体 |
| 18 | 61.83 | 255 | [M-H] ⁻ | 367.103 1 | 367.102 4 | 1.91 | 193.050 4, 163.039 9 | C ₁₇ H ₂₀ O ₉ | 3-O-阿魏酰奎宁酸 |
| 19 | 64.20 | 191, 258 | [M-H] ⁻ | 415.104 1 | 415.102 4 | 4.10 | 325.076 2, 295.065 8 | C ₂₁ H ₂₀ O ₉ | 大豆苷 |
| | | | [M+HCOO] ⁻ | 461.109 1 | 461.107 8 | 2.82 | | | |
| 20 | 69.05 | 255, 328 | [M-H] ⁻ | 623.197 1 | 623.197 0 | 0.16 | 461.167 2, 179.949 8 | C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅ | 连翘酯苷 I 或其异构体 |
| 21 | 73.35 | 262 | [M-H] ⁻ | 403.124 3 | 403.123 5 | 1.98 | 223.061 5, 179.056 5 | C ₁₇ H ₂₄ O ₁₁ | 断氧化马钱子苷 |
| 22 | 75.77 | 191, 262 | [M-H] ⁻ | 577.155 2 | 577.155 2 | 0.00 | 433.097 8, 269.248 2 | C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄ | 野漆树苷 |
| 23 | 77.04 | 259 | [M-H] ⁻ | 463.087 7 | 463.087 1 | 1.30 | 342.107 5, 301.126 1 | C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂ | 金丝桃苷 |
| 24 | 79.05 | 258 | [M-H] ⁻ | 609.181 5 | 609.181 4 | 0.16 | 447.911 2, 179.673 0 | C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅ | 橙皮苷 |
| 25 | 81.08 | 191, 273 | [M-H] ⁻ | 519.186 7 | 519.186 1 | 1.16 | 357.134 0 | C ₂₆ H ₃₂ O ₁₁ | (+)-松脂素-β-D-吡喃葡萄糖苷 |
| | | | [M+HCOO] ⁻ | 565.191 5 | 565.191 6 | -0.18 | | | |
| 26 | 86.53 | 254, 328 | [M-H] ⁻ | 623.197 2 | 623.197 0 | 0.32 | 163.039 2 | C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅ | 异连翘酯苷 A 或其异构体 |
| 27 | 89.99 | 254, 330 | [M-H] ⁻ | 623.197 0 | 623.197 0 | 0.00 | 461.166 9, 179.949 4 | C ₂₉ H ₃₆ O ₁₅ | 连翘酯苷 A |
| 28 | 93.98 | 257 | [M-H] ⁻ | 515.118 5 | 515.118 4 | 0.19 | 353.088 4, 335.167 9 | C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂ | 异绿原酸 A |
| 29 | 95.85 | 260 | [M-H] ⁻ | 547.144 5 | 547.144 6 | -0.18 | 457.112 7, 427.103 6 | C ₂₆ H ₂₈ O ₁₃ | 白杨素 6-C-阿拉伯糖苷 8-C-葡萄糖苷 |
| 30 | 97.16 | 257 | [M-H] ⁻ | 447.092 7 | 447.092 2 | 1.12 | 283.265 5 | C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁ | 木犀草苷 |
| 31 | 100.40 | 191, 264 | [M-H] ⁻ | 588.376 4 | - | - | 543.151 2, 288.701 2, 173.002 0 | - | 未知 |
| 32 | 103.26 | 260 | [M-H] ⁻ | 609.145 2 | 609.145 0 | 0.33 | 301.128 2, 193.051 0 | C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆ | 芦丁 |
| 33 | 104.26 | 264 | [M-H] ⁻ | 547.146 1 | 547.144 6 | 2.74 | 367.062 2, 337.070 1 | C ₂₆ H ₂₈ O ₁₃ | 白杨素 6-C-葡萄糖苷 8-C-阿拉伯糖苷 |
| 34 | 108.49 | 255, 328 | [M-H] ⁻ | 515.118 1 | 515.118 4 | -0.58 | 353.087 1, 335.168 1 | C ₂₅ H ₂₄ O ₁₂ | 异绿原酸 C |
| 35 | 109.79 | 262 | [M+HCOO] ⁻ | 579.206 6 | 579.207 2 | -1.04 | 309.030 8, 129.975 9 | C ₂₇ H ₃₄ O ₁₁ | 连翘苷 |
| 36 | 113.76 | 260 | [M-H] ⁻ | 723.500 7 | - | - | 507.114 0, 248.960 2 | - | 未知 |
| 37 | 114.66 | 264 | [M-H] ⁻ | 447.092 5 | 447.092 2 | 0.67 | 283.370 7 | C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁ | 紫云英苷 |
| 38 | 117.35 | 192, 278, 316 | [M-H] ⁻ | 445.078 0 | 445.076 5 | 3.37 | 269.046 1, 225.731 4 | C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁ | 黄芩苷 |
| 39 | 120.32 | 191, 260 | [M-H] ⁻ | 253.050 5 | 253.049 5 | 3.95 | 209.060 8 | C ₁₅ H ₁₀ O ₄ | 白杨素 |
| 40 | 125.34 | 192, 280 | [M-H] ⁻ | 445.077 1 | 445.076 5 | 1.35 | 383.124 3, 269.045 4 | C ₂₁ H ₁₈ O ₁₁ | 芹菜素 7-O-葡萄糖醛酸 |
| 41 | 126.22 | 273 | [M-H] ⁻ | 475.087 1 | 475.087 1 | 0.00 | 371.124 9, 301.034 8 | C ₂₂ H ₂₀ O ₁₂ | 6-O-甲基黄芩苷 |
| 42 | 129.59 | 275 | [M-H] ⁻ | 459.092 3 | 459.092 2 | 0.22 | 283.061 0, 174.955 9 | C ₂₂ H ₂₀ O ₁₁ | 汉黄芩苷 |
| 43 | 133.88 | 264 | [M+H] ⁺ | 318.260 0 | - | - | 219.161 7, 129.094 2 | - | 未知 |
| 44 | 135.27 | 276 | [M-H] ⁻ | 269.045 4 | 269.044 4 | 3.72 | 248.960 5, 197.046 0 | C ₁₅ H ₁₀ O ₅ | 黄芩素 |

(ABTS^{•+})清除活性实验是根据 Li 等^[30]的实验稍作修改进行的。将 ABTS 溶液 (7.0 mmol/L, H₂O) 和过硫酸钾 (4.9 mmol/L, H₂O) 在 4 °C 避光反应 12~16 h, 稀释 ABTS^{•+}储备液至在 734 nm 处吸光度为 0.70±0.02, 制备 ABTS^{•+}工作液。将各对照品溶液稀释至一系列质量浓度, 取待测溶液 50 μL, ABTS^{•+}工作液 100 μL 加入到 96 孔板中混匀, 作为样品组, 室温避光孵育 6 min 后在酶标仪 734 nm 下测定吸光度 (A) 值。甲醇作为空白组, 维生素 C 作为阳性对照组, 重复进行 3 次。按照公式计算 ABTS 自由基清除率, 以清除率为纵坐标 (Y), 质量浓度为横坐标 (X) 进行线性拟合, 计算各对照品的 ABTS 自由基半数清除浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC₅₀) 值, 结果如表 2 所示。

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

A_{样品}、A_{空白} 分别为样品组、空白组的 A 值

表 2 抗氧化活性验证结果

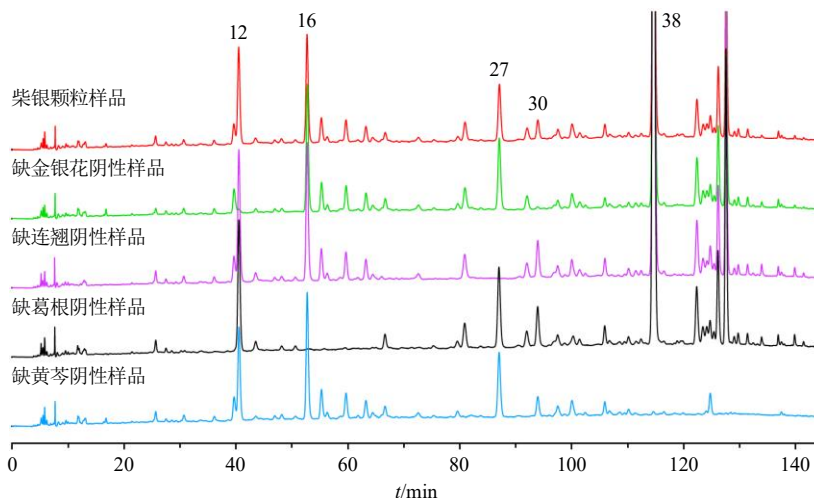
| 化合物 | 抑制率 ^a /% | IC ₅₀ /(μmol·L ⁻¹) |
|--------|---------------------|---|
| 绿原酸 | 52.78 | 31.65±3.37 |
| 葛根素 | 32.62 | 54.35±9.98 |
| 连翘酯苷 A | 79.96 | 11.08±1.21 |
| 木犀草苷 | 53.78 | 26.43±2.12 |
| 黄芩苷 | 55.33 | 30.50±2.54 |
| 维生素 C | 69.14 | 22.99±1.35 |

a-表示样品质量浓度为 40 μmol·L⁻¹ 时对 ABTS 的清除率。

a-scavenging rate of ABTS at concentration of 40 μmol·L⁻¹.

2.4 专属性试验

取供试品溶液及阴性样品溶液, 按照“2.2.1”项下色谱条件进样分析, 结果见图 2, 各色谱峰之间分离度良好, 阴性样品溶液在与供试品溶液相应保留时间位置上无色谱峰出现, 表明该测定方法无



12-绿原酸; 16-葛根素; 27-连翘酯苷 A; 30-木犀草苷; 38-黄芩苷。
12-chlorogenic acid; 16-puerarin; 27-forsythoside A; 30-cynaroside; 38-baicalin.

图 2 阴性样品溶液 HPLC-DAD 图

Fig. 2 HPLC-DAD chromatograms of negative sample solution

干扰, 方法专属性良好。

2.5 方法学考察

2.5.1 线性关系考察 精密吸取 5 种对照品溶液, 分别配制为一系列质量浓度, 按照“2.2.1”项下色谱条件进样测定。以各对照品质量浓度为横坐标 (X), 峰面积为纵坐标 (Y) 绘制标准曲线, 进行线性回归, 得回归方程。分别以信噪比为 3 倍和 10 倍作为检测限和定量限。结果见表 3, 5 种成分标准曲线的 R² 均大于 0.999 0, 表明各成分在其相应质量浓度范围内线性关系良好。

2.5.2 精密度考察 取同一批 (批号 22201281) 供

试品溶液, 按“2.2.1”项下色谱条件连续进样 6 次, 结果显示绿原酸、葛根素、连翘酯苷 A、木犀草苷、黄芩苷峰面积的 RSD 分别为 1.76%、0.56%、2.19%、2.77%、0.69%, 结果表明仪器分析精密度良好。

2.5.3 稳定性试验 取同一批 (批号 22201281) 供试品溶液, 分别于 0、3、6、12、18、24 h 按“2.2.1”项下色谱条件进样测定, 结果测得绿原酸、葛根素、连翘酯苷 A、木犀草苷、黄芩苷峰面积 RSD 分别为 1.94%、0.63%、0.90%、3.90%、1.23%, 表明供试品溶液在 24 h 内稳定性良好。

2.5.4 重复性试验 取同一批 (批号 22201281) 样

表 3 5 种成分的回归方程、检出限和定量限

Table 3 Regression equations, limit of detection and limit of quantitation of five components

| 化合物 | 回归方程 | R ² | 线性范围/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) | 检出限/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) | 定量限/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) |
|--------|--------------------|----------------|---|--|--|
| 绿原酸 | $Y=0.1388X-0.0088$ | 0.9999 | 0.50~400.00 | 0.148 | 0.494 |
| 葛根素 | $Y=0.1469X-0.0557$ | 0.9997 | 0.45~360.00 | 0.068 | 0.226 |
| 连翘酯苷 A | $Y=0.1459X+0.0430$ | 0.9999 | 0.50~400.00 | 0.090 | 0.301 |
| 木犀草苷 | $Y=0.1583X-0.0008$ | 1.0000 | 0.55~440.00 | 0.115 | 0.383 |
| 黄芩苷 | $Y=0.2986X-0.0206$ | 0.9999 | 0.50~400.00 | 0.146 | 0.488 |

品,按照“2.1.1”项下方法,平行制备6份供试品溶液,按“2.2.1”项色谱条件测定,进行6次平行实验,结果测得绿原酸、葛根素、连翘酯苷A、木犀草苷、黄芩苷峰面积RSD分别为2.92%、1.49%、2.26%、3.25%、1.14%,表明方法重复性良好。

2.5.5 加样回收率试验 取同一批次样品(批号22201281),分别精密称取绿原酸、葛根素、连翘酯苷A、木犀草苷、黄芩苷对照品按照供试品中相应成分含量的80%、100%、120%比例加入,按照“2.1.1”项下方法制备供试品溶液,按“2.2.1”项下色谱条件进样分析,测定各目标化合物峰面积,计算加样回收率,结果5种成分的平均加样回收率分别为94.17%、96.44%、98.29%、94.26%、98.11%,RSD分别为2.01%、3.16%、2.10%、3.45%、1.72%,具有较好的方法准确性。

2.5.6 样品含量测定 取10批次样品,按“2.1.1”项下方法制备供试品溶液,采用“2.2.1”项下色谱条件进样分析,计算样品中绿原酸、葛根素、连翘酯苷A、木犀草苷、黄芩苷成分的质量分数,结果见表4,可得出各组分的占比中黄芩苷最高,平均质量分数为9.880 mg/g;葛根素次之,质量分数为3.678 mg/g;木犀草苷的占比在5种成分中最低,质量分数为0.537 mg/g。

2.6 活性指纹图谱建立及相似度评价

采用本研究建立HPLC-ABTS抗氧化成分在线筛选体系对柴银颗粒提取物进行筛选,初步确定了44个潜在抗氧化成分(图1)。选择样品中具有潜在抗氧化活性,分离度较好且稳定出现的色谱峰,为指纹图谱的共有峰,结合多批次样品分析,构建柴银颗粒的抗氧化活性指纹图谱,结果如图3所示。

通过国家药典委员会“中药色谱指纹图谱相似度评价系统”(2012版)对不同批次柴银颗粒的指纹图谱进行相似度分析。将色谱数据导入中药指纹图谱相似度计算软件,选定上述44个共有峰进行

表 4 10 批柴银颗粒中 5 种成分的质量分数

Table 4 Concentration of five components in 10 batches of Chaiyin Granules

| 批次 | 质量分数/($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$) | | | | |
|-------|--|-------|--------|-------|--------|
| | 绿原酸 | 葛根素 | 连翘酯苷 A | 木犀草苷 | 黄芩苷 |
| S1 | 1.214 | 3.625 | 1.340 | 0.522 | 10.745 |
| S2 | 1.241 | 3.703 | 1.344 | 0.549 | 10.403 |
| S3 | 1.227 | 3.743 | 1.387 | 0.527 | 10.293 |
| S4 | 1.229 | 3.647 | 1.338 | 0.523 | 10.067 |
| S5 | 1.195 | 3.693 | 1.352 | 0.540 | 9.716 |
| S6 | 1.225 | 3.649 | 1.344 | 0.561 | 9.597 |
| S7 | 1.194 | 3.770 | 1.447 | 0.552 | 9.742 |
| S8 | 1.176 | 3.575 | 1.293 | 0.519 | 9.391 |
| S9 | 1.208 | 3.741 | 1.393 | 0.526 | 9.507 |
| S10 | 1.177 | 3.636 | 1.302 | 0.551 | 9.334 |
| 平均值 | 1.209 | 3.678 | 1.354 | 0.537 | 9.880 |
| RSD/% | 0.023 | 0.062 | 0.045 | 0.015 | 0.475 |

谱峰匹配,采用共有模式作为对照指纹图谱,用于不同批次柴银颗粒相似度评价,采用夹角余弦法用于其相似度计算,结果S1~S10的相似度分别为0.9999、0.9999、0.9999、0.9999、0.9999、0.9999、0.9999、0.9999、0.9999、0.9999,即10批柴银颗粒药品的相似度均在0.99以上,较为接近,说明其质量差别较小,不同批次制备工艺较为稳定。

3 讨论

3.1 色谱条件优化

柴银颗粒共由11种中药配伍而成,成分比较复杂。在本研究中对色谱柱类型、流动相系统、梯度洗脱程序、体积流量、柱温和检测波长等色谱条件进行考察以期得到最佳的色谱分离效果。

以柴银颗粒供试品溶液为研究对象,在相同的梯度和流动相条件下,考察了几种采用不同填料色谱柱,包括Xselect™ HSS T3 色谱柱(150 mm×3.0 mm, 3.5 μm)、Agilent Zorbax SB-C₁₈ 色谱柱(250

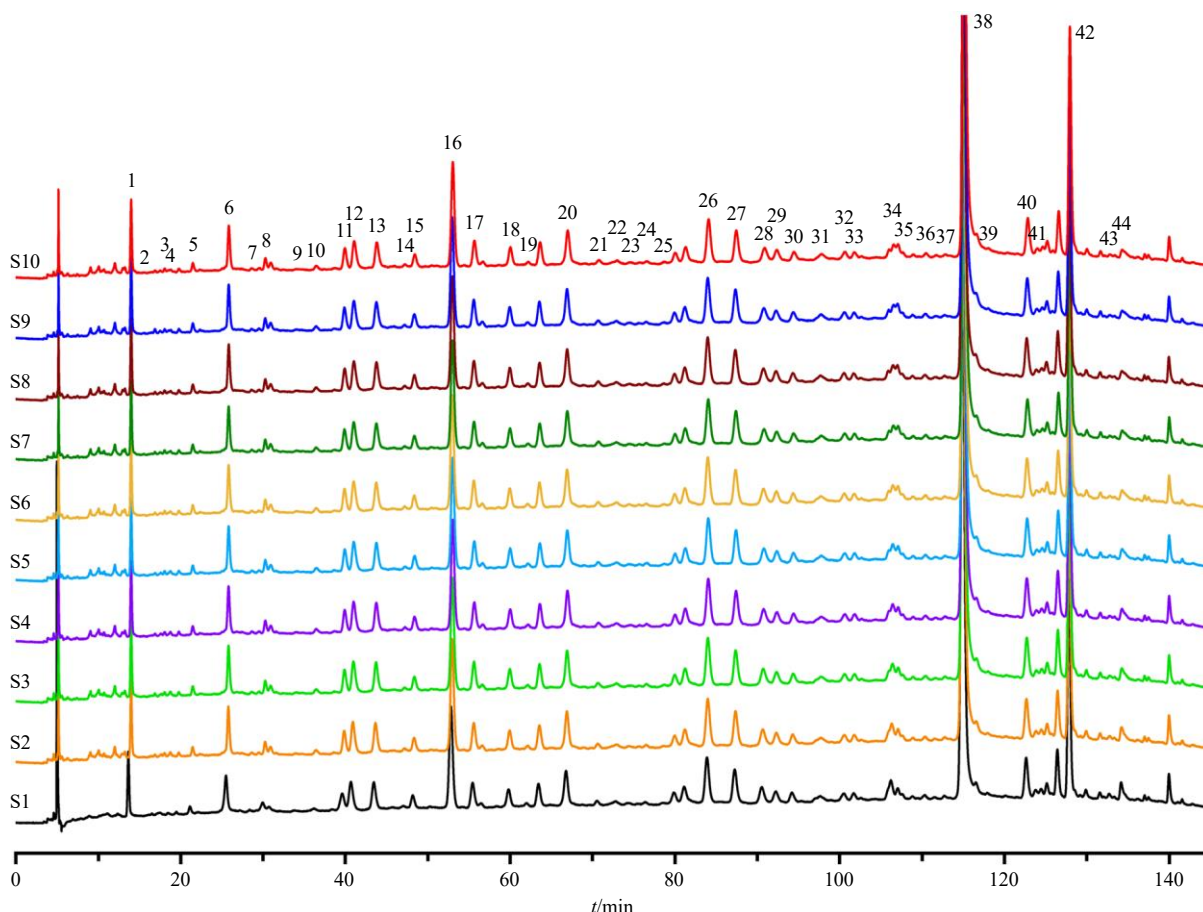


图3 10批柴银颗粒指纹图谱
Fig. 3 Fingerprints of 10 batches of Chaiyin Granules

mm×4.6 mm, 5.0 μm)、Phenomenex Luna C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5.0 μm)、Symmetry C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5.0 μm)、Kromasil 100-5-C₁₈ 色谱柱 (250 mm×4.6 mm, 5.0 μm) 的分离效果。结果表明, 采用 Phenomenex Luna C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5.0 μm) 色谱柱时, 分离效果较好, 色谱峰数目更多, 柱效更高, 峰对称性较好, 可用于进一步分析。

在相同的梯度洗脱模式下对不同流动相组成进行了对比, 比较乙腈-水、甲醇-水分别作为流动相体系的分离效果, 结果发现采用甲醇-水体系, 得到的色谱图中各成分色谱峰保留和分离效果较好、基线平稳。为改善色谱峰形, 减少谱峰拖尾现象, 考察了水相中加入一系列不同体积分数甲酸 (0.2%、0.4%、0.6%、0.8%) 的分离效果。结果表明, 在水相中加入 0.2% 甲酸时, 拖尾现象能较好地改善, 峰形清晰且对称。

对不同流动相体积流量 (0.6、0.8、1.0 mL/min) 以及柱温 (20、25、30 °C) 也进行了对比。结果发

现, 当体积流量为 0.8 mL/min 时柱效较高, 分离时间缩短且不影响分离效果, 故选择其作为恒定体积流量; 发现 25 °C 时成分色谱峰分离度较好, 峰形对称。在上述条件的优化下, 得到最终的液相分析条件。

采用二极管阵列检测器 (DAD) 对供试品溶液进行了全波长扫描 (190~400 nm), 结果显示在 280 nm 波长处样品色谱峰个数较多, 各峰峰间分离度良好且比例适中, 基线比较平稳, 故选择 280 nm 作为检测波长。

3.2 在线筛选条件优化

本研究所用的在线筛选条件采用了课题组早期建立的在线抗氧化筛选模型作为参考^[31], 并对其作了适当的微调。重点针对 ABTS 体积流量和反应池规格 (内径和长度) 等进行优化考察。考察了 ABTS 溶液泵入体积流量 (0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 mL/min) 对产生的倒峰强度和基线稳定性的影响。结果发现, 当泵入流速在一定的范围内增加时, 倒峰峰高会不断上升; 然而体积流量的增高也会造成信号基线会

产生明显波动,从而影响到信号灵敏度。最终选择 ABTS 体积流量为 0.6 mL/min 用于后续筛选研究。

反应管内径和长度会影响反应时间和筛选效果。本研究对不同的反应管内径(0.18、0.25 mm)和长度(5、10、15 m)进行对比优化分析。研究结果表明:反应管内径越小,反应时间变短,倒峰响应下降;反应管增长,反应时间增加,倒峰响应增加,但较长的反应时间也会造成色谱峰展宽,分离度下降。经过综合对比,确定反应管最适内径为 0.25 mm,长度为 10 m。

在本研究优化的筛选条件下,采用 HPLC-ABTS 技术从柴银颗粒提取物中初步筛选出 44 个潜在抗氧化成分(图 1)。根据质谱鉴定结果推断,44 个成分中绿原酸、异绿原酸 A、异绿原酸 C、芦丁、木犀草苷等来源于金银花,这与本课题组前期研究中采用 2D-HPLC-DPPH-ESI-Q-TOF/MS 技术在金银花中筛选出的咖啡酰奎宁酸类、黄酮类等抗氧化成分结果基本一致^[31]。本研究中筛选出的抗氧化活性成分连翘酯苷 A、连翘酯苷 E、连翘苷、黄芩素等,与朱美娟^[32]对双黄连注射液的抗氧化活性评价研究结果相符。

3.3 抗氧化活性验证

柴银颗粒以柴胡轻清宣散,散表泄热为君药;金银花、黄芩、连翘、葛根、青蒿和荆芥,以上 6 味清热解表,宣肺泄热、宣肌退热,同为臣药;薄荷、鱼腥草和苦杏仁,利咽止渴、清肺泄热、化痰止咳,为佐药;桔梗专入肺经,宣肺化痰、利咽止咳,载方中诸药直入肺系,以达表散邪之功而为使药^[3]。基于本研究中筛选并指认出的柴银颗粒中潜在抗氧化成分,并结合柴银颗粒复方配伍原则,优选君药、臣药中每一味中药在《中国药典》2020 年版一部中对应的指标成分,最终选择 5 种抗氧化成分(绿原酸、葛根素、连翘酯苷 A、木犀草苷、黄芩苷)进行体外 ABTS 自由基清除试验验证(表 2)。

结果显示,5 种成分均具有一定的抗氧化活性,且在一定范围内呈现良好的量效关系。对比 IC₅₀ 结果及相同浓度下的抑制率,得出抗氧化活性顺序为连翘酯苷 A>木犀草苷>黄芩苷>绿原酸>葛根素。连翘酯苷 A 清除 ABTS 自由基的活性最高,IC₅₀ 为(11.08±1.21) μmol/L,明显优于阳性对照抗坏血酸的(22.99±1.35) μmol/L。木犀草苷含量低却具有较强的活性,IC₅₀ 为(26.43±2.12) μmol/L,其值与阳性对照抗坏血酸较为接近。绿原酸与黄芩

苷均有较好的活性,IC₅₀ 分别为(31.65±3.37)、(30.50±2.54) μmol/L,且根据本研究含量测定结果显示,连翘酯苷 A、绿原酸与黄芩苷在样品中含量较高,推测可能为其发挥清除自由基的主要成分。同时,本研究结果也进一步表明,柴银颗粒抗氧化活性是其所含多种成分协同作用的结果。

4 结论

本研究建立了 HPLC-ABTS-DAD-ESI-TOF/MS 技术快速筛选柴银颗粒中抗氧化成分的方法,该方法集色谱分离和活性筛选于一体,实现了柴银颗粒提取物中抗氧化成分的快速辨识,并筛选出 44 种抗氧化成分,结合 ESI-Q-TOF/MS 技术初步鉴别了 37 种。

在此基础上建立了柴银颗粒的抗氧化成分指纹图谱,结合相似度分析和 5 种活性成分(绿原酸、葛根素、连翘酯苷 A、木犀草苷、黄芩苷)定量测定,实现了柴银颗粒的质量评价。本研究为中成药中抗氧化成分的快速辨识及整体质量评价研究提供了方法和思路支持。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 戚兴会,张翠云,李艳,等. 响应面法优化柴银颗粒的水煎煮工艺[J]. 现代药物与临床, 2021, 36(11): 2255-2258.
- [2] 赵荣华,郭姗姗,耿子涵,等. 柴银颗粒对冠状病毒肺炎湿毒疫毒袭肺小鼠病证结合模型治疗及作用机制研究[J]. 中国药物警戒, 2021, 18(12): 1123-1128.
- [3] 张贵民,张子成,关永霞,等. 柴银制剂在制备抗冠状病毒药物中的应用及其制备方法: 中国, CN111297969A [P]. 2020-06-19.
- [4] 韩春燕. 柴银退热汤灌肠治疗小儿外感发热 62 例临床观察[J]. 国医论坛, 2021, 36(4): 34-36.
- [5] 陈佳莹. 柴银颗粒的制备工艺和质量标准研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2021.
- [6] 孙元芳,李冰冰,关永霞,等. 基于网络药理学和分子对接技术探讨柴银颗粒抗冠状病毒感染潜在分子机制[J]. 中草药, 2020, 51(19): 4999-5009.
- [7] 倪雯婷,侯林,关永霞,等. 基于 NF-κB 通路探索柴银颗粒治疗甲型 H1N1 流感的作用机制[J]. 中药药理与临床, 2022, 38(6): 47-53.
- [8] Xiong L W, Liu Y, Zhao H W, et al. The mechanism of Chaiyin particles in the treatment of COVID-19 based on network pharmacology and experimental verification[J]. Nat Prod Commun, 2022, 17(8): 1934578X221114853.
- [9] 鲍岩岩,时宇静,郭姗姗,等. 基于对免疫功能的调节

- 探讨柴银颗粒对冠状病毒肺炎疫毒袭肺证的治疗作用 [J]. 中国中药杂志, 2020, 45(13): 3020-3027.
- [10] 杨紫晴, 麻晓, 颜振刚, 等. 柴银颗粒治疗流行性感冒(外感风热证)的临床研究 [J]. 药物评价研究, 2023, 46(9): 1955-1962.
- [11] 关永霞, 庄会芳, 袁晓梅, 等. 柴银口服液超高效液相色谱指纹图谱及 6 组分含量测定研究 [J]. 中国药业, 2022, 31(6): 81-85.
- [12] 李翔, 刘皈阳, 马建丽, 等. HPLC 测定柴银口服液中葛根素的含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(11): 131-133.
- [13] 唐慧慧, 蔡清宇. 高效液相色谱法测定柴银口服液中绿原酸含量 [J]. 解放军药理学学报, 2011, 27(5): 442-443.
- [14] 蔡清宇, 唐慧慧, 康琛, 等. HPLC 测定柴银口服液中连翘苷含量 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(16): 94-95.
- [15] 马桂华, 王瑞成, 徐桂花. HPLC 测定柴银口服液中黄芩苷含量 [J]. 山东医药工业, 2001, 20(5): 9-10.
- [16] 李翔, 刘皈阳, 马建丽, 等. 波长切换 HPLC 法快速测定柴银口服液中绿原酸、葛根素和黄芩苷的含量 [J]. 中国药房, 2014, 25(35): 3327-3329.
- [17] 李翔, 刘皈阳, 马建丽, 等. 柴银口服液快速 HPLC 特征指纹图谱研究 [J]. 中国药师, 2014, 17(1): 38-40.
- [18] 朱日然. HPLC 法同时测定柴银口服液中 5 种成分的含量 [J]. 药学研究, 2015, 34(9): 509-511.
- [19] 周沁阳, 蔡文涛, 陈勇. 中药抗流感病毒活性及作用机制研究新进展 [J]. 中草药, 2019, 50(7): 1719-1726.
- [20] Liu M M, Chen F Z, Liu T, *et al.* The role of oxidative stress in influenza virus infection [J]. *Microbes Infect*, 2017, 19(12): 580-586.
- [21] 王学文. 复方中药制剂对甲型流感病毒感染的抑制作用及其作用机制的研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2017.
- [22] 霍宇航, 张莹, 安苗, 等. 肿节风提取物不同部位对病毒性肺损伤小鼠氧化应激作用研究 [J]. 中药材, 2020, 43(10): 2554-2558.
- [23] 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 Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev*, 2018, 36(1): 43-62.
- [24] Rao S, Santhakumar A B, Chinkwo K A, *et al.* Q-TOF LC/MS identification and UHPLC-Online ABTS antioxidant activity guided mapping of barley polyphenols [J]. *Food Chem*, 2018, 266: 323-328.
- [25] Zhou S D, Xu X, Lin Y F, *et al.* On-line screening and identification of free radical scavenging compounds in *Angelica dahurica* fermented with *Eurotium cristatum* using an HPLC-PDA-Triple-TOF-MS/MS-ABTS system [J]. *Food Chem*, 2019, 272: 670-678.
- [26] Zhang Z Y, Zhang Y Z, Wang L, *et al.* On-line screening of natural antioxidants and the antioxidant activity prediction for the extracts from flowers of *Chrysanthemum morifolium* Ramat [J]. *J Ethnopharmacol*, 2022, 294: 115336.
- [27] Le Grandois 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: 62-71.
- [28] 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: 106-114.
- [29] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 1458-1459.
- [30] Li J, Wang Z, Fan M X, *et al.* Potential antioxidative and anti-hyperuricemic components targeting superoxide dismutase and xanthine oxidase explored from *Polygonatum sibiricum* Red [J]. *Antioxidants*, 2022, 11(9): 1651.
- [31] 张敏敏, 赵志国, 刘倩, 等. 基于离线 2D-HPLC-DPPH-ESI-Q-TOF/MS 联用技术的金银花抗氧化成分系统筛选研究 [J]. 中草药, 2021, 52(11): 3193-3200.
- [32] 朱美娟. 基于“活性成分预测-验证”的双黄连注射液多成分含量测定及指纹图谱成分归属研究 [D]. 天津: 天津中医药大学, 2021.

[责任编辑 郑礼胜]