

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

耿丹丹^{1,2}, 董琦¹, 谭亮¹, 迟晓峰¹, 许旭^{1,2}, 胡风祖^{1*}

(1. 中国科学院西北高原生物研究所, 青海 西宁 810008; 2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 本研究建立了在线高效液相色谱-质谱-二苯基三硝基苯肼(HPLC-DAD-ESI/MSⁿ-DPPH)快速筛选和鉴别丹参和康定鼠尾草中抗氧化活性成分和含量的方法。经液相色谱、质谱和文献报道综合分析鉴定出丹参和康定鼠尾草中的3种抗氧化活性化合物,分别为咖啡酸、异迷迭香酸苷和迷迭香酸。比较了热回流、超声辅助提取和快速溶剂萃取的提取效果,并对色谱条件进行优化。在优化条件下,这3种化合物均可有效分离,并在1.7~35.3 μg/mL范围内线性关系良好,相关系数为0.9995~0.9998,检出限为0.05~1.85 μg/mL,定量下限为0.18~6.16 μg/mL,平均回收率为96.6%~97.2%,相对标准偏差为1.1%~1.3%。运用该方法测定丹参和鼠尾草样品中这3个化合物的含量分别为:咖啡酸0.303, 0.254 mg/g; 异迷迭香酸苷1.019, 1.401 mg/g; 迷迭香酸17.279, 8.104 mg/g。本方法简便、快速、准确、重现性好,适用于从复杂天然产物中快速筛选与鉴别抗氧化活性成分。

关键词: 丹参; 康定鼠尾草; 抗氧化活性成分; HPLC-DAD-ESI/MSⁿ-DPPH 在线筛选

中图分类号: O657.72; TQ460.72 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2015)03-0314-07

On-line Screening and Identification of Free Radical Scavenging Compounds in *Salvia miltiorrhiza Bunge* and *Salvia prattiiHemsl.* by HPLC – DAD – ESI/MSⁿ – DPPH

GENG Dan-dan^{1,2}, DONG Qi¹, TAN Liang¹, CHI Xiao-feng¹, XU Xu^{1,2}, HU Feng-zu^{1*}

(1. Northwest Institute of Plateau Biology, Chinese Academy of Sciences, Xining 810008, China; 2. University of Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China)

Abstract: A new method was used for the rapid screening and identification of free radical scavengers in the extracts of *Salvia miltiorrhiza Bunge* and *Salvia prattiiHemsl.*, and the determination of the content of the analytes in the samples based on HPLC – DAD – ESI/MSⁿ – DPPH was developed. The three compounds were identified to be caffeic acid, salviaflaside and rosmarinic through comprehensive analysis of HPLC spectra, MS spectra and literature data. The extraction effects of the hot reflux, ultrasonic assisted extraction and accelerated solvent extraction(ASE) were compared and the chromatographic conditions were optimized. Under the optimized conditions, three compounds could be effectively separated. Good linear relationships were obtained for three compounds in the concentration range of 1.7 – 35.3 μg/mL, with correlation coefficients of 0.9995 – 0.9998. The detection limits were in the range of 0.05 – 1.85 μg/mL, and the quantitation limits were in the range of 0.18 – 6.16 μg/mL. The average recoveries of three compounds were between 96.6% and 97.2%, with relative standard deviations of 1.1% – 1.3%. The method was applied in the determination of three compounds contents in *Salvia miltiorrhiza Bunge* and *Salvia prattiiHemsl.*, with caffeic acid: 0.303, 0.254 mg/g; salviaflaside: 1.019, 1.401 mg/g; rosmarinic: 17.279, 8.104 mg/g. The method is convenient, fast, accurate and reproducible. Otherwise, it gives a powerful tool for the

收稿日期: 2014-10-16; 修回日期: 2014-11-20

基金项目: 中国科学院仪器功能开发项目(yg2012086)

* 通讯作者: 胡风祖, 研究员, 研究方向: 天然产物化学, Tel: 0971-6132750, E-mail: hufz@nwipb.cas.cn

rapid screening and identification of free radical scavenging compounds in complex natural products.

Key words: *Salvia miltiorrhiza* Bunge; *Salvia prattii*Hemsl.; antioxidant activity compounds; on-line HPLC-DAD-ESI/MSⁿ-DPPH

丹参(*Salvia miltiorrhiza* Bunge)和康定鼠尾草(*Salvia prattii*Hemsl.)均为唇形科(Labiatae)鼠尾草属(*Salvia* Linn.)植物,丹参为临床常用中药,具有活血祛瘀、调经止痛等效用^[1]。丹参和康定鼠尾草中含有大量酚酸类化合物,具有很好的抗氧化活性^[2]。杨菲等^[3]利用“一测多评”法测定了丹参中原儿茶醛和迷迭香酸等酚酸类化合物含量;章林等^[4]利用Folin-Ciocalteu法对鼠尾草中总多酚的含量进行测定;然而大多研究仅针对其中的总酚酸做了离线抗氧化活性的研究,对其异迷迭香酸苷的含量测定以及酚酸类化合物的在线筛选尚未见报道。

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)是一种很稳定的氮中心的自由基,可以捕获其它自由基,在517 nm下有最大吸收。当DPPH接受1个电子被氧化后,其吸收度的降低程度代表物质的抗氧化能力。目前,HPLC-DAD-DPPH自由基法在线筛选体系已成为筛选天然植物中抗氧化活性成分的主要方法之一^[5-7]。本研究在HPLC-DAD-DPPH在线抗氧化成分筛选基础上,结合质谱分析,对丹参和康定鼠尾草中的天然抗氧化活性成分进行快速筛选和鉴定。与传统植物中天然抗氧化活性成分的筛选方法相比,该方法可以充分利用液相色谱-质谱联用的优势,准确定向、快速、高效地对植物中抗氧化活性成分进行筛选和鉴定,以利于资源的充分利用。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

Agilent 1100 HPLC-MSD液相色谱-质谱联用仪,配有二极管阵列(DAD)检测器,电喷雾(ESI)离子源(美国Agilent公司);Agilent 1260高效液相色谱仪,配有UV检测器(美国Agilent公司);ASE350快速溶剂萃取仪(美国Dionex公司);AG135型精密电子天平(瑞士Mettler Toledo公司);KQ-100E型超声波清洗机(昆山超声仪器有限公司);优普UPE-II-40L型超纯水机(上海优普实业有限公司);IKA旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);PEEK盘管(15 m×0.254 mm);单向阀;定比分流阀(美国IDEX Health & Science公司);

二苯基三硝基苯肼(DPPH,批号:101408373,德国Sigma公司);咖啡酸(供含量测定用,批号:110885-200102,中国食品药品检定研究院),迷迭香酸(纯度>97%,批号:E-0074,上海同田生物技术股份有限公司);异迷迭香酸苷^[14](实验室自制,从丹参根的60%乙醇提取物中分离制备得到,通过3个TLC不同溶剂系统展开均为1个斑点,HPLC鉴定其纯度>96%);甲醇(色谱纯);冰乙酸(分析纯)。

实验样品经中国科学院西北高原生物研究所卢学峰副研究员鉴定为唇形科鼠尾草属丹参和康定鼠尾草的根。

1.2 抗氧化成分在线筛选与鉴别流程

HPLC-DAD-DPPH在线筛选丹参和鼠尾草中抗氧化活性成分及鉴别装置流程见图1。样品提取液经HPLC1色谱柱分离,流出液通过定比分流阀被分成大小两部分,小流速部分进入DAD检测器和质谱仪,实现各成分的紫外吸收检测以及各成分的在线质谱分析;大流速部分进入PEEK混合池,与HPLC2泵入的DPPH自由基溶液混合,样品中的抗氧化活性成分与DPPH自由基溶液反应后进入UV检测器,在517 nm下在线检测由于自由基的清除作用而形成的负峰;对比DAD检测器获得的色谱图与UV检测器得到的负峰色谱图,可分辨所分析的化合物是否具有抗氧化活性。再结合质谱结果,即可实现样品中抗氧化活性化合物的在线快速筛选。

1.3 抗氧化成分的在线筛选与鉴别条件

HPLC1工作条件:色谱柱:Diamonsil-C₁₈(2)(250 mm×4.6 mm,5 μm);流动相:0.5%冰乙酸(A)-甲醇(B),梯度洗脱:0~10 min,30%~35% B;10~20 min,35%~40% B;20~32 min,40% B;32~50 min,40%~90% B;50~55 min,90% B;55~60 min,90%~30% B;柱温:25

℃; 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 330 nm; 进样量: 5 μ L。HPLC1 色谱柱后分流至质谱的流速为 0.3 mL/min, 另一路液体的流速为 0.7 mL/min。

HPLC2 工作条件: 反应环: PEEK 盘管(15 m \times 0.254 mm); 流动相: DPPH 溶液(24.7 μ g/mL), 等度洗脱; 流速: 0.45 mL/min; 检测波长 517 nm。

质谱工作条件: 离子源: 电喷雾 ESI, 负离子电离模式; 雾化气: N_2 ; 雾化气压力: 40 psi; 干燥气体流速: 9 L/min; 干燥气体温度: 325 $^{\circ}$ C。

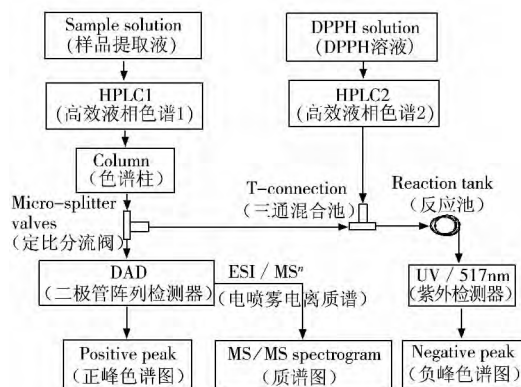


图 1 抗氧化活性成分在线筛选与鉴别流程

Fig. 1 The process of on-line screening and identification of free radical scavenging compounds

1.4 供试品溶液及 DPPH 溶液的制备

分别称取 0.5 g 丹参和鼠尾草样品, 精密称定, 加入适量硅藻土混合均匀, 置于 34 mL 不锈钢萃取池中。萃取条件为: 压力 10 MPa, 温度 70 $^{\circ}$ C, 静态萃取时间 10 min, 冲洗溶剂体积为池容积的 60%, 氮气吹扫时间为 100 s, 静态循环 2 次。收集甲醇提取液于旋转蒸发仪上蒸干后, 用流动相定容于 25 mL 容量瓶中, 0.45 μ m 滤膜过滤, 备用。

称取 DPPH 标准品, 精密称定, 配制成浓度为 24.7 μ g/mL 的甲醇溶液。置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中保存待用。

1.5 对照品溶液的制备

称取咖啡酸、异迷迭香酸苷和迷迭香酸对照品适量, 精密称定, 各置于 25 mL 容量瓶中, 用甲醇溶解并稀释至刻度, 摇匀, 得到浓度为 0.085 mg/mL 的咖啡酸、0.058 mg/mL 的异迷迭香酸苷和 0.147 mg/mL 的迷迭香酸对照品溶液。精密量取各对照品溶液适量, 用甲醇配制成一定浓度的混合对照品溶液, 待用。

2 结果与讨论

2.1 丹参与康定鼠尾草抗氧化活性成分的在线筛选

2.1.1 在线筛选参数的确定 考察了不同的 DPPH 流速(0.2 ~ 0.8 mL/min)、反应环的长度(2 ~ 25 m)、DPPH 浓度(12.3 ~ 197 μ g/mL) 对负峰信噪比的影响, 并在单因素实验基础上对在线筛选参数进行了响应面(Design - Expert 8.0.6) 优化。结果表明: 当 DPPH 流速为 0.45 mL/min, 反应环长度为 15 m, DPPH 浓度为 24.7 μ g/mL 时, 负峰峰形较好, 背景噪音最小, 基线平稳, 信噪比较大。

2.1.2 色谱条件的优化 根据酚酸类化合物含量测定的相关文献^[8-9] 可知, 以乙腈 - 水体系为流动相时, 色谱峰很难分开, 以甲醇 - 水为流动相时, 分离效果明显改善, 但色谱峰峰形仍较差。由于酚酸类化合物在溶液中显弱酸性, 流动相的 pH 值和样品溶解液对化合物的峰形和分离度均会产生影响^[10-11], 因此本实验考察了纯水 - 甲醇、0.05% 乙酸水 - 甲醇、0.1% 乙酸水 - 甲醇、0.2% 乙酸水 - 甲醇和 0.5% 乙酸水 - 甲醇作为流动相对丹参和康定鼠尾草中酚酸类化合物色谱峰的影响^[12]; 采用纯甲醇或者流动相作为样品溶解液考察溶解液对丹参和康定鼠尾草样品色谱峰的影响, 所得色谱图见图 2。由图 2 可知, 随着流动相中乙酸比例的增大, 色谱峰变窄, 峰形有很大改善; 且采用流动相作为样品溶解液时, 干扰物质明显减少。

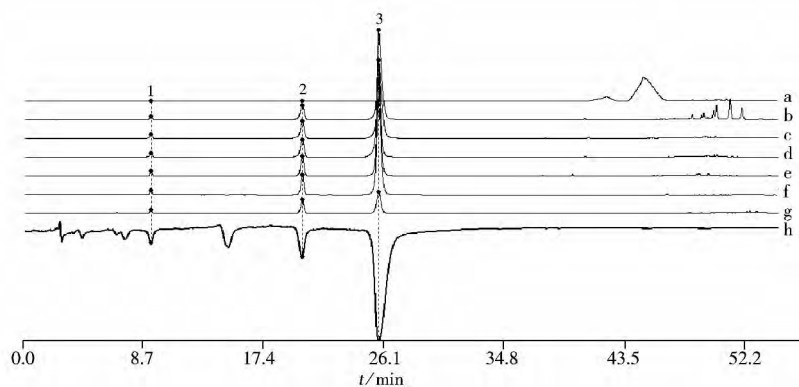


图2 丹参和康定鼠尾草样品的 HPLC 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of *Salvia miltiorrhiza* Bunge and *Salvia prattiHemsl.*

1. caffeic acid, 2. salviaflaside, 3. rosmarinic; mobile phase: a. water + MeOH, b. 0.5% acetic acid + MeOH, c. 0.05% acetic acid + MeOH, d. 0.1% acetic acid + MeOH, e. 0.2% acetic acid + MeOH, f. 0.5% acetic acid + MeOH (*Salvia miltiorrhiza* Bunge), g. 0.5% acetic acid + MeOH (*Salvia prattiHemsl.*), h. 0.5% acetic acid + MeOH (negative peak); the chromatogram of b was dissolved by MeOH and chromatograms of a, c, d, e, f, g and h were dissolved by mobile phase

2.1.3 丹参与康定鼠尾草中抗氧化成分提取方式的选择 考察了热回流提取、超声辅助提取和快速溶剂萃取3种提取方式对样品提取效率的影响,其提取条件及咖啡酸、异迷迭香酸苷和迷迭香酸的含量见表1。其中快速溶剂萃取(ASE)法是指在密闭容器内于一定温度(50~200℃)和压力(1000~3000psi或10.3~20.6MPa)条件下,在短时间内用有机溶剂提取固体或半固体样品的一种新型样品前处理方法^[13]。与超声、微波、回流、超临界萃取等成熟方法相比,ASE法具有溶剂用量少、提取时间短、萃取效率高、操作简单方便、安全和自动化程度高等优点,因此本实验采用该法提取样品中的抗氧化活性成分。

表1 提取方式与样品中咖啡酸、异迷迭香酸苷和迷迭香酸含量(n=3)

Table 1 Extraction condition and contents of caffeic acid, salviaflaside and rosmarinic in samples(n=3)

Extraction mode	Extraction time (h)	Solvent consumption (mL)	Solvent extraction and filtration	Content of compound (mg/g)		
				Caffeic acid	Salviaflaside	Rosmarinic
Heat reflux extraction	1.5	20	No	0.282*, 0.238	0.929*, 1.350	15.277*, 7.917
Ultrasound assisted extraction	1.0	20	No	0.199*, 0.183	0.889*, 0.671	16.303*, 4.298
Accelerated solvent extraction (ASE)	0.3	<15	Yes	0.303*, 0.254	1.019*, 1.401	17.279*, 8.104

* contents of caffeic acid, salviaflaside and rosmarinic in *Salvia miltiorrhiza* Bunge

2.2 抗氧化成分的 ESI-MS 鉴别

在 ESI 负离子模式下,对雾化器压力、干燥气流、干燥气温度等条件进行优化,实验结果显示,随着雾化压力的增大,酚酸类化合物的质谱检测信号由弱变强,且噪音变小;而干燥气流太小时易造成样品溶剂不能充分挥发,气流太大会使样品吹散,检测灵敏度降低,选择 9 L/min 时可获得较好的质谱信号;同时还考察了干燥气温度对质谱信号的影响,在 325℃ 下,质谱结果较好^[14]。图3为该实验条件下,康定鼠尾草样品的总离子流图。

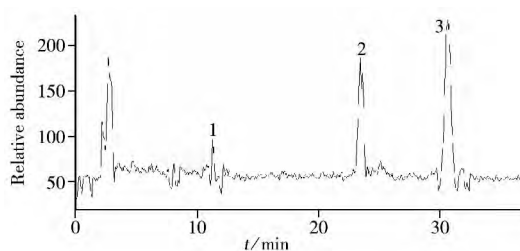


图3 康定鼠尾草样品的总离子流图

Fig. 3 Total ion chromatogram of *Salvia prattiHemsl.*

1. caffeic acid, 2. salviaflaside, 3. rosmarinic

采用液质联用色谱仪得到样品中 1~3 号色谱峰的二级质谱图(见图 4), 由图可知其准分子离子峰以及碎片离子。根据 $[M-H]^-$ 的相对分子质量以及二级谱图, 并结合 DAD 光谱图以及相关参考文献可知, 1~3 号色谱峰分别为咖啡酸、异迷迭香酸苷和迷迭香酸^[15]。丹参和康定鼠尾草中抗氧化活性成分的鉴定结果见表 2。

由化合物 1 的 $[M-H]^-$ 离子 m/z 179.0 可推断为咖啡酸, 由二级质谱碎片离子可推断其裂解方式^[16]。化合物 2, 3 均产生相同的 $[M-H]^-$ 离子 m/z 359, 据此可以断定它们可能为同一类成分。通过对 ESI/MSⁿ 质谱中的碎片离子分析发现: 分子离子 m/z 521 与碎片离子 m/z 359 为母子关系, 母离子是由分子离子失去 1 个质量数为 162 的中性碎片(即脱水六碳糖基)所得, 说明该化合物存在 1 分子葡萄糖。由此可知, 化合物 2 是由化合物 3 的糖苷键断裂产生, 根据相关参考文献可知化合物 3 为迷迭香酸, 化合物 2 为异迷迭香酸苷^[17]。

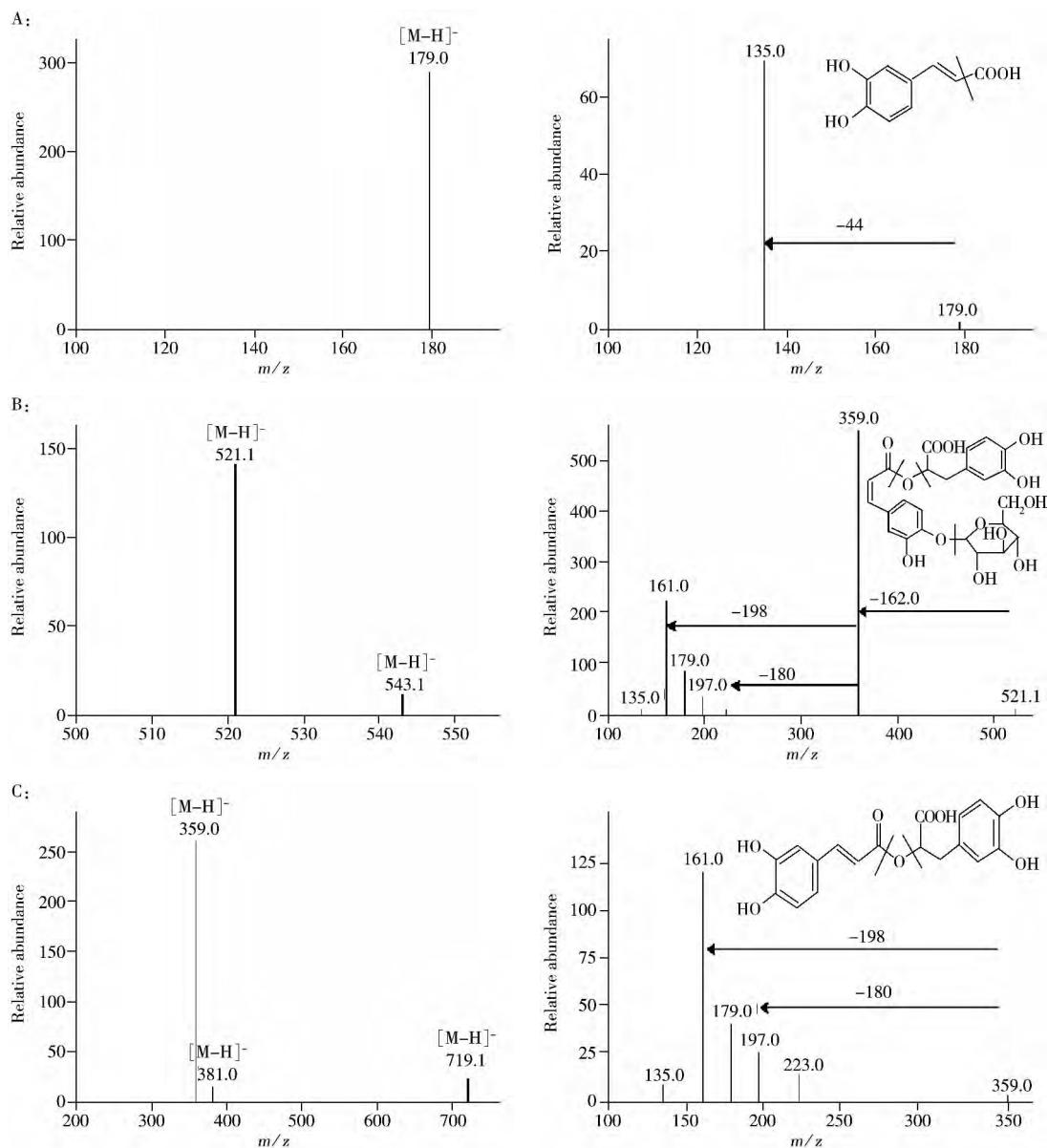


图 4 咖啡酸 (A)、异迷迭香酸苷 (B) 和迷迭香酸 (C) 的 HPLC/ESI-MS 负离子模式质谱信息

Fig. 4 Mass spectrometric signals of caffeic acid (A), salviaflaside (B) and rosmarinic (C) using HPLC/ESI-MS with negative ion mode
left: MS spectrum; right: MS/MS spectrum

表2 丹参和康定鼠尾草中抗氧化活性成分的鉴定结果

Table 2 Free radical scavenging compounds in *Salvia miltiorrhiza* Bunge and *Salvia pratti*Hemsl.

No.	t_R (min)	Selected ion	Experimental value(m/z)	Product ions (m/z)	Calculated value(m/z)	Formula	Compound	Reference
1	10.156	[M-H] ⁻	179.0	135.0	180.15	C ₉ H ₈ O ₄	Caffeic acid	[12]
2	23.171	[M-H] ⁻	521.1	197.0, 179.0, 161.0	522.00	C ₂₄ H ₂₆ O ₁₃	Salviaflaside	[13-14]
3	30.231	[M-H] ⁻	359.0	359.0, 197.0, 179.0, 161.0	360.33	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	Rosmarinic	[13-14]

2.3 方法学验证

2.3.1 线性关系、检出限及定量下限 分别精密吸取“1.5”配制的混合对照品溶液0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mL于5 mL容量瓶中,用甲醇稀释至刻度,摇匀。按照“1.3”色谱条件测定峰面积。分别以目标组分的进样浓度(x , $\mu\text{g/mL}$)为横坐标,色谱峰面积(y)为纵坐标绘制标准曲线,得回归方程分别为:咖啡酸: $y = 25.98x - 52.70$ ($r^2 = 0.9995$); 异迷迭香酸苷: $y = 28.75x - 38.40$ ($r^2 = 0.9997$); 迷迭香酸: $y = 9.52x - 54.67$ ($r^2 = 0.9998$)。表明咖啡酸、异迷迭香酸苷和迷迭香酸的质量浓度分别在1.7~13.6, 2.9~23.2, 4.4~35.3 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好。

采用逐级稀释对照品溶液的方法确定检出限和定量下限。以信噪比 $S/N \geq 3$ 及 $S/N \geq 10$ 分别确定咖啡酸、异迷迭香酸苷和迷迭香酸的检出限分别为0.05, 0.13, 1.85 $\mu\text{g/mL}$, 定量下限分别为0.18, 0.43, 6.16 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.3.2 精密度与重现性 对方法的重复性进行了考察,取同一供试品溶液,重复进样6次,分别测定3个负峰的峰面积,计算各负峰峰面积的相对标准偏差(RSD)。结果显示,3个负峰峰面积的RSD值均小于2.5%,说明本实验所用仪器精密度良好。

分别称取6份丹参和康定鼠尾草样品0.5 g,精密称定,按“1.4”方法制备,并按“1.3”方法测定峰面积和负峰面积,计算各峰峰面积和负峰面积的RSD值,结果显示,各峰峰面积和负峰面积的RSD值均小于5.0%,表明此方法的重复性良好。

2.3.3 回收率实验 采用加标回收法,称取已知含量的丹参样品粉末9份,每份0.25 g,精密称定,按低、中、高3个浓度分别精密加入对照品溶液,每一浓度平行3份,按“1.4”制成加标供试品溶液,按“1.3”色谱条件测定样品中咖啡酸、异迷迭香酸苷和迷迭香酸的含量,并计算其回收率,结果见表3。由表3中数据计算可得,咖啡酸、异迷迭香酸苷和迷迭香酸的平均回收率分别为96.7%, 96.6%和97.2%, RSD值分别为1.1%, 1.1%和1.3%。

表3 回收率实验结果

Table 3 Result of recovery

Caffeic acid				Salviaflaside				Rosmarinic			
Content (mg/g)	Added (mg)	Found (mg)	Recovery (%)	Content (mg/g)	Added (mg)	Found (mg)	Recovery (%)	Content (mg/g)	Added (mg)	Found (mg)	Recovery (%)
0.075	0.038	0.110	98.2	0.251	0.125	0.359	95.6	4.251	2.150	6.280	98.1
0.076	0.038	0.108	95.4	0.255	0.125	0.371	97.7	4.320	2.150	6.400	99.5
0.075	0.038	0.109	96.8	0.253	0.125	0.363	96.1	4.285	2.150	6.240	97.0
0.074	0.075	0.145	97.2	0.250	0.250	0.481	96.3	4.233	4.300	8.120	95.2
0.075	0.075	0.142	95.0	0.251	0.250	0.477	95.3	4.251	4.300	8.310	97.2
0.076	0.075	0.147	97.5	0.255	0.250	0.489	96.9	4.320	4.300	8.340	96.8
0.075	0.113	0.183	97.5	0.253	0.375	0.613	97.7	4.285	6.450	10.510	97.9
0.075	0.113	0.181	96.5	0.253	0.375	0.618	98.5	4.285	6.450	10.330	96.2
0.076	0.113	0.182	96.7	0.255	0.375	0.603	95.8	4.320	6.450	10.450	97.0

2.4 抗氧化活性成分的含量测定

按照“1.4”方法制成丹参和康定鼠尾草供试品溶液,对其含量进行测定,结果见表1。结果表明,丹参和康定鼠尾草中3个化合物含量分别为:咖啡酸0.303, 0.254 mg/g; 异迷迭香酸苷1.019, 1.401 mg/g; 迷迭香酸17.279, 8.104 mg/g。数据显示,丹参和康定鼠尾草中迷迭香酸的含量最高,其次为异迷迭香酸苷,咖啡酸的含量最低。

3 结 论

本研究基于在线 HPLC - DAD - ESI/MSⁿ - DPPH 快速筛选抗氧化活性成分的方法,建立了丹参和康定鼠尾草中抗氧化活性成分的在线筛选与鉴别以及含量测定方法。筛选出3个具有明显抗氧化活性的化合物,通过 HPLC - ESI/MSⁿ在线鉴别出这3个化合物分别为咖啡酸、异迷迭香酸苷和迷迭香酸,并利用高效液相色谱法对其进行含量测定。本方法操作简便,重复性好,与传统的天然产物中复杂成分的分离与鉴别模式相比,更适用于从复杂的天然产物中快速筛选并鉴别出有效的抗氧化活性成分,大大提高了抗氧化活性成分的筛选效率。

参考文献:

- [1] Zheng G C, Shi Z K. *Chin. Pharm. J.* (郑国墀, 柿泽宽. 中国药学杂志), **1989**, 24(1): 6-9.
- [2] Xiang Z J, Zhao G R, Yuan Y J, Guo Z X. *Chin. Tradit. Herbal Drugs*(向志军, 赵广荣, 元英进, 郭治昕. 中草药), **2006**, 37(2): 211-213.
- [3] Yang F, Wang Z M, Zhang Q W, Feng W H. *China J. Chin. Mater. Med.* (杨菲, 王智民, 张启伟, 冯伟红. 中国中药杂志), **2011**, 36(17): 2372-2378.
- [4] Zhang L, Leng X J, Huang M. *Sci. Technol. Food Ind.* (章林, 冷雪娇, 黄明. 食品工业科技), **2012**, 33(19): 143-146.
- [5] Damašius J, Veskutonis P R, Kaškonienė V, Maruška A. *Anal. Methods*, **2014**, (6): 2774-2778.
- [6] Zhang Y P, Shi S Y, Xiong X, Chen X Q, Peng M J. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2012**, (402): 2965-2976.
- [7] Niu Y R, Yin L L, Luo S H, Dong J, Wang H, Hashi Y K, Chen S Z. *Phytochem. Anal.*, **2013**, (24): 59-68.
- [8] Liu L M, Peng J D, Wang L F. *J. South Univ.: Nat. Sci. Ed.* (刘丽敏, 彭敬东, 王丽峰. 西南大学学报: 自然科学版), **2008**, 30(3): 20-24.
- [9] Li X P, Li J R, Yang J R. *J. Chin. Inst. Food Sci. Technol.* (李学鹏, 励建荣, 杨建荣. 中国食品学报), **2008**, 8(6): 116-120.
- [10] Jia M, Zhang L X, Zhang Y H. *J. Instrum. Anal.* (贾明, 张丽霞, 张元湖. 分析测试学报), **2013**, 32(3): 302-307.
- [11] Kong X H, Fu X L, Le A S, He Q. *J. Instrum. Anal.* (孔祥虹, 付兴隆, 乐爱山, 何强. 分析测试学报), **2011**, 30(10): 1157-1162.
- [12] Luo F, Fei X Q, Fang X Z, Wang Y P, Wang J Y. *J. Instrum. Anal.* (罗凡, 费学谦, 方学智, 王亚萍, 王金元. 分析测试学报), **2011**, 30(6): 696-700.
- [13] Richter B E, Jones B A, Ezzell J L, Porter N L. *Anal. Chem.*, **1996**, 68: 1033-1039.
- [14] Wang H, Chen J H, Zhao H Q, Wang L L, Zhang D L, Wang X R, Yang D F. *Chin. J. Anal. Chem.* (王虹, 陈家辉, 赵恒强, 王磊磊, 张道来, 王小如, 杨东方. 分析化学), **2009**, 37(6): 795-800.
- [15] Xing Z Z, Meng Q Y, Lu Y L, Zhang H X, Shen X H, Liu W J. *Food Sci.* (邢珍珍, 孟庆艳, 卢亚玲, 张红喜, 申雪花, 刘文杰. 食品科学), **2013**, 34(12): 203-207.
- [16] Zeng G F, Xiao H B, Liu J X, Liang X M. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **2006**, 20: 499-506.
- [17] Lin L M, Xu Z D, Yao J X, Liu J Y, Li C, Wang Z M. *Chin. Pharm. J.* (林丽美, 许招懂, 姚江雄, 刘菊妍, 李春, 王智民. 中国药学杂志), **2012**, 47(15): 1204-1206.