

基于1,1-二苯基-2-三硝基苯肼检测中药抗氧化成分的方法及其原理研究进展

邱妍川^{1*}, 韦丽佳¹, 李琳², 何静^{1#} (1.重庆医药高等专科学校药学院, 重庆400016; 2.中国药科大学药学院, 南京211198)

中图分类号 R285.5 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2016)19-2718-04

DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2016.19.39

摘要 目的:了解基于1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)检测中药抗氧化成分的方法及其原理的研究进展,为寻找天然抗氧化剂提供参考。方法:以“1,1-二苯基-2-三硝基苯肼”“中药抗氧化成分”“1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical 2,2-diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl)hydrazyl”“Antioxidant ingredients”“Traditional Chinese medicine”等为关键词,组合检索2000年1月—2016年3月在PubMed、Science direct、中国知网、维普、万方数据库中基于DPPH检测中药抗氧化成分方法及其原理的文献并进行综述。结果:共查阅到相关文献249篇,其中有效文献36篇。整理出DPPH-紫外分光光度法、DPPH-酶标仪法、DPPH-薄层色谱法、DPPH-电化学法、DPPH-电子顺磁共振(ESR)法、色谱技术联用法、流动注射分析法、高速逆流色谱法等8种筛选中药抗氧化成分的方法,分别利用了DPPH在特定波长下吸光度变化比例、酶联免疫反应显色与吸光度值大小关系、薄层色谱显色、电化学性质、电子顺磁共振技术、色谱技术、连续流动分析技术、液-液分配色谱技术。结论:基于DPPH筛选中药抗氧化成分方法众多。其中DPPH与新型色谱技术联用法受到研究人员关注,成为了目前广泛应用的检测中药抗氧化成分的方法。

关键词 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼;中药;抗氧化成分;方法;原理;检测

现代医学研究表明,过多的自由基可造成心血管疾病、肿瘤和衰老,由于抗氧化剂具清除自由基的作用,因此合理地使用抗氧化剂可有效地预防和治疗某些疾病、延缓衰老^[1]。合成的抗氧化剂往往具有一定的毒副作用^[2],因此,寻找高效、价廉、低毒甚至无毒的天然抗氧化剂成为当前研究的热点之一。1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH)是一种稳定的长寿命自由基,基于DPPH检测抗氧化成分的方法作为常用方法之一,具有较好的稳定性、可操作性、灵敏性,被广泛用于自由基清除能力的定量分析^[3-4]。笔者以“1,1-二苯基-2-三硝基苯肼”“中药抗氧化成分”“1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical 2,2-diphenyl-1-(2,4,6-trinitrophenyl)hydrazyl”“Antioxidant ingredients”“Traditional Chinese medicine”等为关键词,组合检索2000年1月—2016年3月在PubMed、Science Direct、中国知网、维普、万方数据库中关于基于DPPH检测中药抗氧化成分方法的相关文献。结果,共查阅到相关文献249篇,其中有效文献36篇。整理出DPPH-紫外分光光度法、DPPH-酶标仪法、DPPH-薄层色谱法、DPPH-电化学法、DPPH-电子顺磁共振(ESR)法、色谱技术联用、流动注射分析(FIA)法、高速逆流色谱(HSCCC)法等8种检测中药抗氧化成分的方法及其原理,以为检测天然抗氧化剂提供理论基础。

1 基于DPPH检测中药抗氧化成分的方法及原理

1.1 DPPH-紫外分光光度法(漂白法)

DPPH是一种很稳定的以氮原子为中心的自由基,在517 nm波长处有特征吸收。其醇溶液呈深紫色,加入受试物后,在测定体系中DPPH自由基减少而引起吸光度值变化,通过吸光度值的变化比例可计算被抗氧化剂有效清除的自由基的量。由于该方法具有简单、灵敏、重现性好等优点,自20世纪50年代发展以来,被广泛应用于抗氧化剂的检测,属于经典方法^[5-10]。具体步骤如下:(1)配制DPPH溶液,绘制DPPH工作曲线。(2)

配制不同浓度的样品溶液,使之与某一浓度的DPPH溶液混合。(3)摇匀,反应一段时间(一般为30 min)后用溶剂作参比,于517 nm波长处测定吸光度值。(4)计算自由基清除率(K)= $[1 - (A_t - A_s)/A_0] \times 100\%$ (A_t 为样品与DPPH混合后的吸光度值; A_s 为样品与溶剂混合后的吸光度值; A_0 为DPPH与溶剂混合后的吸光度值)。(5)DPPH的原始质量浓度减少至50%的样品添加量即为半数抑制浓度(IC_{50}),计算 IC_{50} 及自由基清除能力(AE)= $1/IC_{50}$ 。根据 AE 的大小判断抗氧化剂清除自由基能力的大小, AE 越大,表明其清除自由基能力越强;反之则越弱。(6)选取常用抗氧化剂,如2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚(BHT)、丁基羟基茴香醚(BHA)、维生素C、维生素E、儿茶素等,同法处理,作为阳性对照试验。

1.2 DPPH-酶标仪法

酶标仪是对酶联免疫检测(ELISA)试验结果进行读取和分析的专业仪器。酶联免疫反应是通过偶联在抗原或抗体上的酶催化显色底物进行的,与DPPH的反应结果以颜色显示,通过显色的深浅即吸光度值的大小就可以判断标本中待测抗原或抗体的浓度。Yasmeen H等^[11]利用酶标仪测定了茶树体外抗氧化作用。葛飞等^[12]应用此法对大豆豆渣不同极性提取物的自由基清除活性进行了定量研究。与其他类型的DPPH检测法相比,此法简便、快速、所需样品量小,尤其适合一些微量物质,如天然提取或合成的单体测定^[13]。

1.3 DPPH-薄层色谱法

DPPH为稳定的自由基,能够强烈地吸收517 nm波长的光而呈紫色,与自由基清除剂反应时,其孤电子被配对,此时其吸收光发生蓝移而呈现黄色^[14]。根据薄层板上黄色斑点颜色的深浅,可对抗氧化活性成分清除自由基的活性进行定性研究。Rana A等^[15]应用此法定性检测了蓝花楹精制提取物的抗氧化活性。

1.4 DPPH-电化学法

自由基清除剂的作用机制大多是基于其电化学性质,且电化学法是一种具有多种表征功能、灵敏、简便的分析方法。然而迄今为止,仅有少量文献报道了DPPH的电化学性质,而

* 讲师,硕士。研究方向:药物制剂与分析。电话:023-61969020。E-mail:32444271@qq.com

通信作者:副教授,硕士。研究方向:药物制剂。电话:023-61969212。E-mail:hejingt@126.com

采用电化学方法研究天然产物清除 DPPH 的报道则更少。Amatatongchai M 等^[16]采用碳纳米管修饰玻碳电极,建立了安培检测 DPPH 自由基抗氧化能力的方法。熊双丽等^[17]利用生物传感器测定了 BHA 的抗氧化特性。庆伟霞等^[18]首次利用循环伏安法、差示脉冲伏安法对 4 种黄酮类化合物清除 DPPH 的能力进行了考察,为检测高活性的天然抗自由基活性物质提供了参考。该方法适用于药品、食品、生物制品及材料等的分析检测。

1.5 DPPH-ESR 法

DPPH 自由基是相对稳定的自由基,但其醇溶液易受光照和温度等外界因素的影响,稳定性弱于抗氧化剂。此外, DPPH 与抗氧化剂的作用产物 DPPH-H 在 517 nm 波长下的吸收微弱,导致测定结果偏小。因此,用分光光度计法测定抗氧化剂的抗氧化能力易受外界环境与反应产物的干扰。20 世纪 80 年代新发展的 ESR 法在检测上具有一定的专一性,能够有效排除体系本身带来的误差,该方法在定性分析上具有明显优势。滕道祥等^[19]采用 ESR 检测纯化前后的牛蒡多酚对 DPPH 自由基的清除作用,结果表明随着牛蒡多酚质量浓度的升高, DPPH 自由基在 ESR 图谱中谱信号强度逐渐降低,是直接检测、研究含有未成对电子的顺磁性物质的方法,但该方法定量检测重复性较差^[20]。

1.6 色谱技术联用

传统的漂白法、ESR 法以及电化学法在抗氧化活性检测时,往往建立在分离纯化可得到较高纯度化合物的基础上。分离纯化一方面增加了工作量,费时费力;另一方面,分离纯化的过程容易造成微量组分的丢失,引起某些抗氧化剂活性的降低甚至丧失。正是因为这些原因,迫切需要发展在线检测抗氧化活性成分的方法。目前,在线检测抗氧化活性成分的方法主要分为柱后反应和柱前反应两类。柱后反应联用技术包括高效液相色谱(HPLC)-DPPH 在线检测法、HPLC-二极管阵列检测器(DAD)-DPPH 偶联 HPLC-电喷雾电离(ESI-MS)在线检测法、HPLC-DAD-DPPH 偶联 HPLC-固相萃取-核磁共振(HPLC-SPE-NMR)在线检测法、毛细管电泳(CE)-DPPH 在线检测法等,现介绍如下。

1.6.1 HPLC-DPPH 在线检测法 HPLC-DPPH 在线检测法的实验装置示意图见图 1。这种方法是利用色谱柱将复杂混合物分离后直接与 DPPH 作用,在 517 nm 波长处检测,具有抗氧化活性的化合物与 DPPH 单电子配对减弱其吸收,表现为倒峰,倒峰的面积与清除作用的强度有关。此法快速、直观、准确、简单易行、重现性好。王小淙等^[21]应用此法对黄芩根、茎、叶提取物进行了在线抗氧化活性的检测。

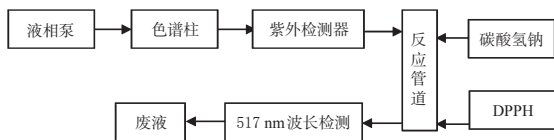


图 1 HPLC-DPPH 在线检测法实验装置示意图

研究发现,当流动相 pH=2.2 时, DPPH 吸收值明显降低;当流动相 pH=6.6 时, DPPH 甲醇溶液会出现浑浊的现象。本装置在柱后反应的前端加入一定量的碳酸氢钠,以中和 HPLC 流动相中加酸对 DPPH 溶液的影响,使 HPLC 分析植物提取物时具有更广的范围;另外,清除剂直接作用于 DPPH 自由基,反应时间为 30 s 时,清除作用即可完成,其抑制率随时间的延长变化不大^[22]。

1.6.2 HPLC-(DAD)-DPPH 偶联 HPLC-ESI-MS 在线检测法

HPLC-(DAD)-DPPH 偶联 HPLC-ESI-MS 在线检测法的试验装置示意图见图 2。粗提物溶液进入 HPLC 1 系统,经色谱柱对粗提物溶液中的各成分进行分离。柱后流出液通过分流装置按一定比例分流成两路,一路进入高分辨率 MS 仪,实现各成分的在线 MS 分析,得到分子质量、分子式等大量的成分鉴定信息;另一路进入 DAD,可直接实现各成分的紫外吸收检测,能提供各成分的光谱吸收信息,生成化学成分特征指纹图谱 1;此外进入 DAD 的溶液还有一路可经 DAD 1 进入混合池, HPLC 2 系统将稳定的自由基溶液 DPPH 引入混合池中与流出液中的天然产物成分混合,天然产物化学成分和自由基混合物进入反应池(温度可控)发生反应,反应物进入紫外检测器,采用自由基的特征吸收波长进行在线检测(抗氧化活性成分流入即可形成负峰),最终可以得到负峰抗氧化特征指纹图谱 2。比对指纹图谱 1 和指纹图谱 2 中的各峰,即可筛选、鉴定出粗提物中的抗氧化活性成分。王虹等^[23]利用该方法对金银花药材中抗氧化活性成分进行了筛选、鉴别。Nuengchamnong N 等^[24]在对 *Orthosiphon grandiflorus* 水提物中的抗氧化活性物质筛选时应用的方法与上述方法极为相似,只是少了混合池前的 DAD,并将单级 MS 改为多级 MS。

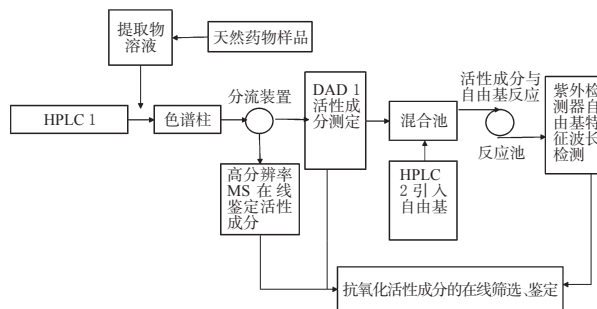


图 2 HPLC-(DAD)-DPPH 偶联 HPLC-ESI-MS 在线筛选法实验装置示意图

1.6.3 HPLC-(DAD)-DPPH 偶联 HPLC-SPE-NMR 在线检测法

HPLC-(DAD)-DPPH 偶联 HPLC-SPE-NMR 在线检测法的实验装置示意图见图 3。混合样品经色谱柱分离后流经 DAD,产生化学成分特征指纹图谱 1。组分在流出 DAD 后被分流成两路,一路先进入固相萃取小柱实现对组分的峰捕捉,被捕捉的峰先用氦气吹干,然后用氘代乙腈洗脱进入 NMR 检测仪,实现各成分的在线核磁分析,得到组分的结构信息;另一路进入混合池与泵入的 DPPH 反应,然后反应产物进入紫外检测器,采用自由基的特征吸收波长进行在线检测(抗氧化活性成分流入即可形成负峰),最终得到负峰抗氧化特征指纹图谱 2。比对指纹图谱 1 和指纹图谱 2 中的各峰,即可筛选、鉴定出粗提物中的抗氧化活性成分。Exarchou V 等^[25]利用该方法实现了对一些药用植物甲醇提取物中抗氧化物质的快速筛选和鉴别。Goulas V 等^[26]在此方法的基础上,在 NMR 检测仪的后面接上了质谱仪,使得组分在行核磁扫描后直接进行质谱扫描,极大地丰富了样品的结构信息。

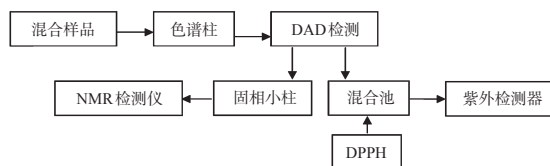


图 3 HPLC-(DAD)-DPPH 偶联 HPLC-SPE-NMR 在线筛选法在线检测法实验装置示意图

1.6.4 CE-DPPH在线检测法 Maruška A等^[27]通过设计一系列的接口,建立了CE-DPPH在线检测法的实验装置,详见图4。依靠DPPH贮液池的流体静压力提供动力维持DPPH的流速,使其与经过毛细管分离的样品组分在接口处混合、反应,然后进入紫外检测器检测,具有抗氧化活性的组分会产生倒峰。CE具有灵敏度高、分辨率高、速度快等优点,成为近年来发展最迅速的分离分析方法之一。但是,CE还是一种尚处于发展阶段的技术,理论研究和实际应用仍处于起步阶段,应用的广泛性不及HPLC。近年来,应用此法进行抗氧化剂检测的研究非常有限。

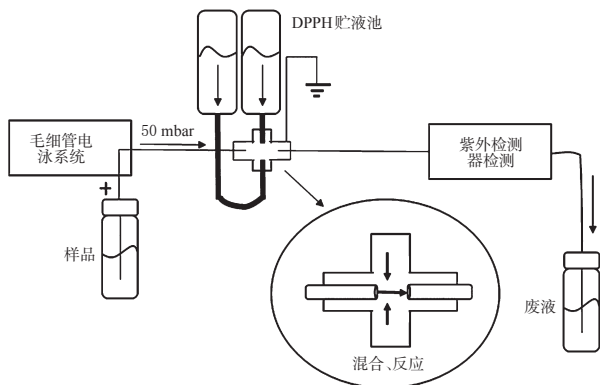


图4 CE-DPPH在线筛选法在线检测法实验装置示意图

1.6.5 柱前反应联用技术 柱前反应联用技术与柱后反应联用技术的主要区别在于前者是先将样品与DPPH反应后再进行色谱分离、吸光度测定,后者是先将样品进行色谱分离后再与DPPH反应后测定吸光度。罗永东等^[28]利用DPPH-HPLC法对金银花黄酮部位抗氧化动力学进行了研究。Sun LQ等^[29]利用DPPH-HPLC法对某种蓝莓中的花青素类抗氧化剂进行了检测。此外,有报道应用DPPH-HPLC-DAD-飞行时间质谱(TOF/MS)法来快速检测金银花药材的抗氧化活性成分^[30]。由于柱前反应后需对反应体系进行离心、过滤等处理,其自动化程度不如可进行在线检测的柱后反应法高,故应用远不及柱后反应广泛。但Li YJ等^[31]通过研究发现,为检测4种甘草中天然抗氧化剂所建立的HPLC串联四极杆飞行时间质谱法(DPPH-HPLC-Q-TOF-MS)(柱前反应法)比HPLC-DPPH法(柱后反应法)有更高的灵敏度和分辨率。

1.7 FIA法

FIA法是1974年丹麦化学家Ruzicka J和Hansen EH提出的一种新型的连续流动分析技术。这种技术是将一定体积的试样溶液注入到一个流动的、非空气间隔的试剂溶液(或水)载流中,被注入的试样溶液流入反应盘管,形成一个区域,并与载流中的试剂混合、反应,再进入到流通检测器进行测定分析及记录。由于试样溶液在严格控制的条件下在试剂载流中分散,因此,只要试样溶液注射方法在管道中存留时间、温度和分散过程等条件相同,不要求反应达到平衡状态就可以按照比较法,由标准溶液所绘制的工作曲线测定试样溶液中被测物质的浓度。FIA法中最简单、较常用的是单道FIA法,其实验装置见图5。Mrazek N等^[32]用这种简单的单道FIA系统,将样品溶液注入混有DPPH的载流中进行反应,通过反应池后,在520 nm波长处检测其吸光度的降低值,即倒峰的大小,从而分析样品的抗氧化活性。Magalhães LM等^[33]也用类似的方法进行了对抗氧化物质的快速检测研究。

1.8 HSCCC法

HSCCC是一种独特的不用固态载体的液-液分配色谱技

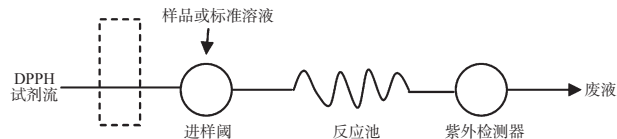


图5 单道FIA法在线检测法实验装置示意图

术,是一种能实现连续有效分离的实用分离制备技术。该方法可采用多种多样的溶剂系统对任何极性范围的样品进行分离,一般都有很高的回收率。由于其与一般的色谱分离方式不同,可实现梯度洗脱和反相洗脱,亦可进行重复进样,因此特别适用于制备性分离,制备的产品纯度高、制备量大,应用前景十分广阔。将HSCCC法与DPPH-HPLC法结合,可以弥补HPLC不能分离对某些结构相似化合物的不足。Zhang Y等^[34]在对*Selaginella sinensis*中的抗氧化物进行研究时,先让样品溶液与DPPH反应,处理后注入HPLC,各馏分再经HSCCC分离,得到纯度更高的组分-DPPH结合物,便于进一步进行质谱分析。Du QZ等^[35]在对*Mucuna sempervirens*中的抗氧化物进行研究时,则先利用HSCCC对样品进行预分离,收集多个馏分,不同馏分的抗氧化活性通过DPPH-紫外分光光度法进行检测,根据其抗氧化活性的大小,将这些馏分合并为7组,再分别通过制备HPLC进行分离制备。

2 结语

DPPH检测法是检测天然植物提取物或化合物抗氧化活性的重要方法,其主要利用抗氧化成分对DPPH自由基的清除能力进行定量分析。上述8种筛选中药抗氧化成分的方法分别利用了DPPH在特定波长下吸光度变化比例、酶联免疫反应显色与吸光度值大小关系、薄层色谱显色、电化学性质、电子顺磁共振技术、色谱技术、连续流动分析技术、液-液分配色谱技术。漂白法作为传统方法应用广泛,但受到DPPH浓度、反应条件等多种因素影响^[36],且其与ESR法、电化学法均对中药提取物纯度要求较高。随着现代技术的发展,与新型色谱技术联用、FIA法、HSCCC法受到越来越多研究者的关注,为快速筛选中药中的抗氧化活性成分提供了有力的支持。其中,最受关注的与新型色谱联用技术,成为目前国内外应用广泛的DPPH自由基测定方法。但这3种方法研究尚未完全成熟,其中与新型色谱联用技术由于液相色谱分离部分与活性检测部分的衔接转换困难,常用的液相色谱会造成整个体系压力偏高^[20],因此需要对实验设施进行较大幅度改进才能实现,限制了该方法大规模的推广应用,尚需进一步研究优化。

参考文献

- [1] Huang D, Ou B, Prior RL. The chemistry behind antioxidant capacity assays[J]. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(6): 1841.
- [2] 黄晓东,李绍中,高新义.豆渣提取物抗氧化稳定性的研究[J].*中国调味品*, 2006(4): 36.
- [3] Musa KH, Abdullah A, Al-Haiqi A. Determination of DPPH free radical scavenging activity: application of artificial neural networks[J]. *Food Chem*, 2016, 194(5): 705.
- [4] 杨艳芳,朱艳平,肖梦媛,等.罗汉果叶不同溶剂提取物对DPPH自由基的清除作用研究[J].*中国药房*, 2012, 23(19): 1729.
- [5] Grajeda-Iglesias C, Salas E, Barouh N, et al. Antioxidant activity of protocatechuates evaluated by DPPH, ORAC, and CAT methods[J]. *Food Chem*, 2016, 194(5): 749.
- [6] 勾明玥,刘良,张春枝.采用DPPH法测定26种植物的抗

- 氧化活性[J].食品与发酵工业,2010,36(3):148.
- [7] Kalaivani T, Mathew L. Free radical scavenging activity from leaves of *Acacia nilotica* (L.) Wild. ex Delile, an Indian medicinal tree[J]. *Food Chem Toxicol*, 2010, 48(1): 298.
- [8] Lucas-Abellán C, Mercader-Ros MT, Zafrilla MP, *et al.* Comparative study of different methods to measure antioxidant activity of resveratrol in the presence of cyclodextrins[J]. *Food Chem Toxicol*, 2011, 49(6):1 255.
- [9] Bicas JL, Neri-Numa IA, Ruiz A LTG, *et al.* Evaluation of the antioxidant and antiproliferative potential of bioflavors[J]. *Food Chem Toxicol*, 2011, 49(7):1 610.
- [10] Elingold I, Isollabella MP, Casanova MB, *et al.* Mitochondrial toxicity and antioxidant activity of a prenylated flavonoid isolated from *Dalea elegans*[J]. *Chem Biol Interact*, 2008, 171(3):294.
- [11] Yasmeen H, Hasnain S. In vitro antioxidant effect of *Camellia sinensis* on human cell cultures[J]. *Pak J Pharm Sci*, 2015, 28(5):1 573.
- [12] 葛飞, 桂琳, 陶玉贵. 大豆渣粗提物清除 DPPH 自由基活性及其协同效应的研究[J]. 大豆科学, 2010, 29(1): 113.
- [13] 高月红, 郑建普, 朱春赟. 抗氧化能力检测方法评估及微型化[J]. 中国药学杂志, 2008, 43(24):1 863.
- [14] 陈安徽, 李春如, 樊美珍. 蝉拟青霉代谢产物清除 DPPH 自由基和抗真菌活性的研究[J]. 菌物学报, 2008, 27(3): 405.
- [15] Rana A, Bhangalia S, Singh HP. A new phenylethanoid glucoside from *Jacaranda mimosifolia*[J]. *Nat Prod Res*, 2013, 27(13):1 167.
- [16] Amatongchai M, Laosing S, Chailapakul O, *et al.* Simple flow injection for screening of total antioxidant capacity by amperometric detection of DPPH radical on carbon nanotube modified-glassy carbon electrode[J]. *Talanta*, 2012, 97(8):267.
- [17] 熊双丽, 卢飞, 史敏娟, 等. DPPH 自由基清除活性评价方法在抗氧化剂筛选中的研究进展[J]. 食品工业科技, 2012, 33(8):380.
- [18] 庆伟霞, 赵东保, 李明静, 等. 电化学方法研究几种黄酮类化合物对 DPPH 的清除作用[C]//第九届全国电分析化学学术会议论文摘要集. 南京:中国化学会, 2006:146.
- [19] 滕道祥, 马利华, 秦卫东. 牛蒡多酚的分离纯化及清除 DPPH 自由基的研究[J]. 合肥工业大学学报, 2011, 34(5):762.
- [20] 傅金娣. 天然抗氧化活性成分快速筛选新方法研究[D]. 杭州:浙江大学, 2009.
- [21] 王小淞, 陈波, 姚守拙. HPLC-DPPH 在线法筛选黄芩提取物中抗氧化活性成分[J]. 中草药, 2009, 40(S1):224.
- [22] 陆曦. 黄酮类化合物抗氧化活性构效关系[J]. 食品科学, 2006, 27(12):233.
- [23] 王虹, 陈军辉, 赵恒强. 高效液相色谱-质谱-二苯基三硝基苯肼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.
- [24] Nuengchamnong N, Kritasilp K, Ingkaninan K, *et al.* Characterisation of phenolic antioxidants in aqueous extract of *orthosiphon grandiflorus* tea by LC-ESI-MS/MS coupled to DPPH assay[J]. *Food Chem*, 2011, 127(3): 1 287.
- [25] Exarchou V, Fiamegos YC, Beek TA, *et al.* Hyphenated chromatographic techniques for the rapid screening and identification of antioxidants in methanolic extracts of pharmaceutically used plants[J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1 112(1/2):293.
- [26] Goulas V, Gomez-Caravaca AM, Exarchou V, *et al.* Exploring the antioxidant potential of *Teucrium polium* extracts by HPLC-SPE-NMR and on-line radical-scavenging activity detection[J]. *LWT-Food Sci Technol*, 2012, 46(1):104.
- [27] Maruška A, Stankevicius M, Stanius Z. Coupling of capillary electrophoresis with reaction detection for the on-line evaluation of radical scavenging activity of analytes[J]. *Procedia Chem*, 2010, 2(1):54.
- [28] 罗永东, 罗永明. DPPH-HPLC 法研究金银花黄酮部位抗氧化效应动力学[J]. 江西中医学院学报, 2011, 23(2):47.
- [29] Sun LQ, Ding XP, Qi J, *et al.* Antioxidant anthocyanins screening through spectrum-effect relationships and DPPH-HPLC-DAD analysis on nine cultivars of introduced rabbit eye blueberry in China[J]. *Food Chem*, 2012, 132(2):759.
- [30] Dan T, Li HJ, Chen J, *et al.* A rapid and simple method for screening of natural antioxidants from Chinese herb *Flos Lonicerae Japonicae* by DPPH-HPLC-DAD-TOF/MS[J]. *J Sep Sci*, 2008, 31(20):3 519.
- [31] Li YJ, Chen J, Li Y, *et al.* Screening and characterization of natural antioxidants in four *Glycyrrhiza* species by liquid chromatography coupled with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 2011, 1 218(45):8 181.
- [32] Mrazek N, Watla-iad K, Deachathai S, *et al.* Rapid antioxidant capacity screening in herbal extracts using a simple flow injection-spectrophotometric system[J]. *Food Chem*, 2012, 132(1):544.
- [33] Magalhaes LM, Santos M, Segundo MA, *et al.* Flow injection based methods for fast screening of antioxidant capacity[J]. *Talanta*, 2009, 77(5):1 559.
- [34] Zhang Y, Shi S, Wang Y, *et al.* Target-guided isolation and purification of antioxidants from *Selaginella sinensis* by off-line coupling of DPPH-HPLC and HSCCC experiments[J]. *J Chromatogr B*, 2011, 879(2):191.
- [35] Du QZ, Li B. Identification of antioxidant compounds of *Mucuna sempervirens* by high-speed counter-current chromatographic separation-DPPH radical scavenging detection and their oestrogenic activity[J]. *Food Chem*, 2012, 132(4):1 181.
- [36] Zhang Z, Kong F, Ni H, *et al.* Structural characterization, α -glucosidase inhibitory and DPPH radical dot scavenging activities of polysaccharides from guava[J]. *Carbohydrate Polymers*, 2016, 144(12):106.

(收稿日期:2016-01-24 修回日期:2016-05-18)
(编辑:刘明伟)