

# HPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup>/PCD-CL 偶联技术 分离鉴定和在线检测枳壳中抗氧化活性 成分

## LCMS-IT-TOF-027

**摘要：**建立一种对枳壳中化学成分快速分离鉴定及其抗氧化活性成分的在线检测方法。应用 HPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup>-CL 和柱后衍生化的方法对枳壳中化合物进行快速分离鉴定并在线检测其抗氧化活性成分。从枳壳药材中分离并鉴定了 26 个化合物，包括 2 个黄酮醇、4 个黄酮、13 个二氢黄酮和 7 个多甲氧基黄酮；其中 16 个首次从枳壳中分离鉴定，6 个（化合物 4、6、8、9、14、15）首次从该属植物中分离鉴定，18 个化合物具有抗氧化活性。该方法能快速准确分离鉴定枳壳中的化学成分，并首次应用鲁米诺-铁氰化钾系统在线检测抗氧化活性成分，可作为中药材成分分析和活性物质检测的一个有效方法。

**关键词：**枳壳；黄酮；分离鉴定；抗氧化活性；HPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup>/PCD-CL；鲁米诺-铁氰化钾

枳壳为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种的干燥未成熟果实。具有理气宽中，行滞消胀等功效。黄酮类化合物是枳壳药材中的主要成分，且具有良好的抗氧化、抗炎、抗病毒等多种生物活性。目前对于枳壳的黄酮类成分分析和含量测定方法主要有 HPLC、HPLC-DAD-ESI-MS、UPLC-PAD-Q-TOF/MS，其发挥药理作用的活性成分尚不明确。采用 HPLC-MS 的方法是鉴定枳壳中的主要黄酮类成分的有效方法，但随着柱后衍生技术在黄酮类化合物的结构鉴定中广泛应用，尤其是 PCD 与 HPLC-MS 的技术联用，弥补了仅靠化合物的裂解规律对阐明化合物结构的不足，为进一步明确中药材中的化学成分提供了方法基础。

活性氧 (ROS) 作为机体的正常代谢产物，在疾病的发生和发展过程中起着重要的作用，如 DNA 损伤、诱发肿瘤的形成、炎症的发生等。目前，DPPH、ABTS、CL 等方法已应用于寻找对活性氧具有清除作用的化合物，以期发现中药材中新的抗氧化剂成分。但用上述方法对各个单一化合物进行抗氧化活性评价并不能反应中药材的整体药理作用，且通过提取分离获得各成分耗时费力。检测抗氧化活性的几种在线方法如 HPLC-CUPRAC（抗氧化剂的铜离子还原能力）、HPLC-ABTS、HPLC-ABTS-CL、HPLC-CL 和 HPLC-DAD-ESI-MS<sup>n</sup>-CL，用于检测化合物清除 ABTS 自由基、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 等的的能力，但仍不能评价化合物清除超氧阴离子的能力。铁氰化钾-鲁米诺发光系统是研究化合物清除超氧阴离子的理想模型，但其应用于复杂样品的在线检测缺乏研究。

目前，对枳壳药材的在线活性检测方法尚未见报道，因此，建立一种同时分离、鉴定和检测枳壳中生物活性成分的分析方法显得十分必要。该分析方法，利用 HPLC 分离枳壳中的化学成分，DAD、MS 检测器和 PCD 系统准确鉴定化合物结构、CL 检测器在线检测其药理活性物质，仪器具体配置见图 1。这种新的在线检测方法准确、可靠、稳定，可应用于中药材的多成分分析及质量、药理活性评价。

## 实验部分

### 2.1 仪器及试剂

岛津 LC-ESI-IT-TOF 液相质谱联用仪 (LC-20AD<sub>XR</sub> 高压泵, CTO-20AC 柱温箱, SPD-M20A 二极管阵列检测器, SIL-20AC 自动进样器, CBM-20A 控制器, DGU-20A<sub>5</sub> 自动脱气机, 离子阱-飞行时间质谱仪, LCMSsolution 工作站); 超声波提取器 (KQ-250DE, 昆山市超声仪器有限公司); 电子天平 (Sartorius, 赛多利斯科学仪器 (北京) 有限公司); UV7500 紫外可见分光光度计 (上海天美科学仪器有限公司), 荧光分光光度计 (RF-10A, Shimadzu), 可控温化学反应室 (CRB 6A Chemical reaction box, Shimadzu)。色谱柱: Diomonsil<sup>TM</sup> C18 柱 (250 mm × 4.6 mm, 5 μm)

枳壳 (北京同仁堂药店, 经北京大学药学院天然药物系王弘副教授鉴定为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium L* 的干燥未成熟果实)。

乙腈 (天津赛孚瑞科技有限公司, HPLC 级), 甲醇 (北京化工厂, 分析纯), 超纯水, 鲁米诺 (分析纯, 苏州工业园区亚科化学试剂有限公司), 铁氰化钾、氢氧化钠 (分析纯, 北京北化精细化学品有限责任公司), EDTA (分析纯, 苏州工业园区亚科化学试剂有限公司), 甲酸、硼酸、盐酸、醋酸钠 (Wako, Japan), 氯化铝 (分析纯, 北京化学试剂有限公司)。

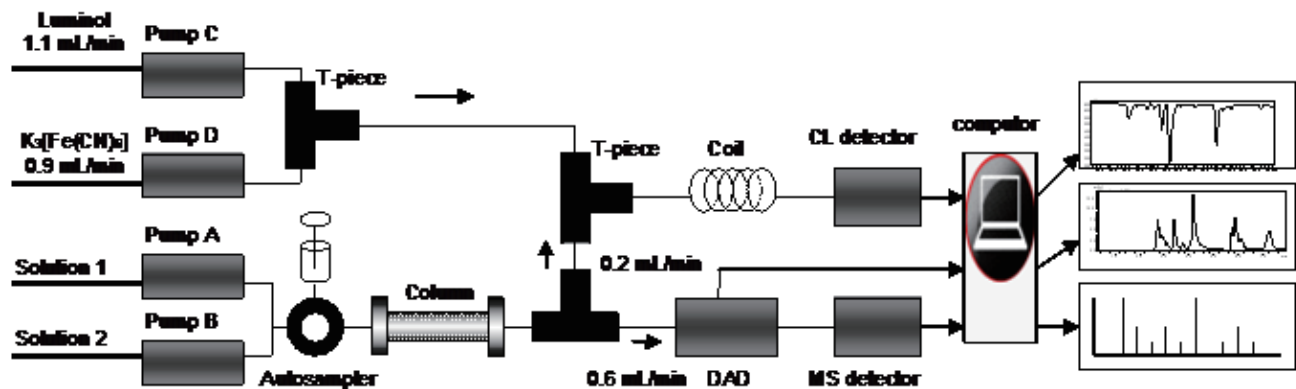


图 1 HPLC-DAD-MS-CL 检测系统原理

### 2.2 CL 溶液的制备

配制含  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 NaOH (pH=13) 的  $10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的鲁米诺贮备液, 避光保存并放置在冰箱中至少 7 天后使用。取该贮备液适量, 用  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 NaOH (pH=13) 稀释定容, 得  $3 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的鲁米诺反应液 (含  $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 EDTA)。另外, 配制含  $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 NaOH (pH=13) 的  $3 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的铁氰化钾溶液 (含  $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的 EDTA)。以上各反应液在实验过程中均避光保存。

### 2.3 供试品溶液的制备

取枳壳药材粉末 1g (过 60 目), 精密称定, 置具塞锥形瓶中, 精密加入甲醇 50 mL, 超声提取 30 min, 放冷称定, 用甲醇补足减失质量, 滤过, 取续滤液并经  $0.45 \mu\text{m}$  微孔滤膜滤过, 进样 5 微升进行 HPLC 分析。

### 2.4 HPLC-DAD-ESI-IT-TOF-MS<sup>n</sup>/PCD-CL 分析条件

#### 2.4.1 HPLC 分析条件

采用上述色谱柱，用乙腈（含 0.02% 甲酸，流动相 A）和水（含 0.02% 甲酸，流动相 B）二元梯度洗脱，洗脱程序见表 1，柱温：40℃；检测波长：280 nm；流速：0.8 mL/min；进样量：5 μL。

表 1 HPLC 梯度洗脱条件

Time (min)	Mobile Phase A (% , v/v)	Mobile Phase B(% , v/v)
0.00	5	95
20.00	25	75
50.00	90	10

#### 2.4.2 ESI-IT-TOF-MS<sup>n</sup> 分析条件

毛细管温度 200℃，负离子模式下的喷雾电压 -3.5 kV，端盖加速电压 3.5V，碰撞能 50%，氮气流速 1.5 L/min，检测器电压 1.70 kV。CID 所使用的碰撞气为高纯氩气。使用三氟醋酸钠 (2.5 mM) 进行质量数校正，校正范围为 50-1000 Da，数据分析采用 Predictor 数据分析软件。

#### 2.4.3 PCD 系统条件

根据文献报道，采用以下柱后衍生试剂：醋酸钠和醋酸钠/硼酸；氯化铝和氯化铝/盐酸。具体操作条件见表 2。

表 2 加入紫外位移试剂的 PCD 实验条件

UV shift reagent	Pump 1	Flow 1	Pump 2	Flow 2	pH	Temperature (°C)
AlCl <sub>3</sub>			0.3M AlCl <sub>3</sub>		5	90
AlCl <sub>3</sub> /HCl	0.01M	0.8	0.3M AlCl <sub>3</sub> /HCl	0.8	3.5	90
NaOAc	NaOH	ml·min <sup>-1</sup>	0.5M NaOAc	ml·min <sup>-1</sup>	8	50
NaOAc/H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>			0.1M NaOAc-0.7 M H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> =1:1		6	50

#### 2.4.4 CL 分析条件

检测池容积：12 μL，发射波长：425 nm，信号放大倍数：1，反应线圈温度：25℃。管路部分均以 PEEK 管连接，柱后液体分流比 DAD:CL=0.2:0.6，通过调整 T 型管连接的 PEEK 管内径和长度和测量各部分流出液的流速实现分流。鲁米诺 (1.1 mL/min) 和铁氰化钾 (0.9 mL/min) 溶液经液相泵泵出后，立即与柱后分流液混合流经反应线圈 (0.25 mm，10 m) 后进入 CL 检测器。根据流经线圈的反应时间和 CL 检测器流速调节鲁米诺和铁氰化钾的流速，以保证分流比 (DAD:CL=0.2:0.6)。

## 结果与讨论

#### 3.1 HPLC-DAD-MS/PCD-CL 条件的优化

梯度程序中，流动相酸度和有机相比例的变化会导致化学发光强度的变化，为使色谱条件能同时满足分离度要求和 DAD、MS、CL 的检测，并获得足够的化学发光强度和平稳的化学发光基线，流动相中水和乙腈均采用 0.02% 甲酸 (V/V) 并建立了上述洗脱程序。实验表明，酸度的增加会降低 CL 反应的 pH，进一步降低发光强度。为获得适

合检测枳壳中自由基清除剂 CL 条件, 我们考察了影响 CL 检测的不同因素, 首先比较了鲁米诺 ( $1 \times 10^{-2}$ 、 $1 \times 10^{-3}$ 、 $1 \times 10^{-4}$ 、 $2 \times 10^{-4}$ 、 $3 \times 10^{-4}$ 、 $4 \times 10^{-4}$ 、 $5 \times 10^{-4}$ 、 $10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 和铁氰化钾 ( $1 \times 10^{-2}$ 、 $1 \times 10^{-3}$ 、 $1 \times 10^{-4}$ 、 $2 \times 10^{-4}$ 、 $3 \times 10^{-4}$ 、 $4 \times 10^{-4}$ 、 $5 \times 10^{-4}$ 、 $10^{-5} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 的浓度, 实验表明鲁米诺和铁氰化钾浓度的升高会增加 CL 的发光强度, 二者浓度均为  $3 \times 10^{-4} \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  时基线较为平稳; 考虑到化学发光对碱性条件的要求, 比较了不同的 pH 值的溶液 (pH=10、11、12、13), pH=13 时, 在线检测的发光强度大和基线平稳, 优选 pH=13 作为化学发光的 pH; 对二者的流速比 (总流速 =2, 从 0.8:1.2 到 1.2:0.8) 和反应温度 (20-30 ) 进行了比较, 流速比为 1.1:0.9 时发光强度最大, 较低的温度可适当提高发光强度, 当温度为 25 时发光系统可灵敏检测枳壳中的活性成分; 固定线圈长度时, 同时增加鲁米诺和铁氰化钾的流速可获得不同反应时间下 CL 的发光强度, 实验表明, 总流速大于 1.6 时, 可获得较平稳的基线, 总流速在 2.4 以上时, 对发光强度的增加和基线漂移的改善并不明显, 且因柱后流出液的相对比例变小而不利于抗氧化活性的检测, 综合考虑, 确定了上述流速比; 对鲁米诺 - 铁氰化钾发光系统的发射光谱进行扫描, 选择最大发射波长  $EM_{\max} = 425 \text{ nm}$  作为 CL 检测波长。

### 3.2HPLC-DAD-MS/PCD 鉴定枳壳中的化学成分

通过 ESI-IT-TOF-MS<sup>n</sup> 给出的质谱碎片结构信息、裂解规律和柱后衍生化得到的化学位移信息, 并结合文献报道, 对枳壳进行结构鉴定, 共鉴定了枳壳中 26 个化合物的结构。具体 MS 和 PCD 信息见表 3 和表 4。

表 3 正、负离子模式分析各化学成分的 LC-MS<sup>n</sup> 特征

NO.	RT (min)	(+)ESI-MS <sup>n</sup> data (Observed)	(-)ESI-MS <sup>n</sup> data (Observed)
1	20.324	595.1626→577.1532→457.1126	593.1506→473.1084→353.0661
2	20.959	625.1751→607.1669→487.1220	
3	21.77	743.2382→581.1871→273.0840	
4	24.782	597.1817→289.0772	
5	25.115	611.1623→465.0877→303.0487	
6	25.427	597.1817→289.0772	
7	26.294	433.1190→397.0895→283.0635	
8	27.673	463.1277→397.0973→313.0698	
9	27.058	597.1855→435.1314→273.0794	
10	28.208	581.1841→419.1372→273.0774	579.1685→271.0607→151.0093
11	29.003	581.1851→419.1388→273.0792	579.1685→271.0607→151.0093
12	29.525	611.1957→449.1494→303.0900	609.1726→301.0715→242.0654
13	30.168	611.1952→449.1444→303.0875	609.1726→489.1397→301.0712
14	30.956	653.1718→347.0767→332.0532	651.1561→345.0610→330.0223
15	32.088	667.1808→521.1370→359.1181	
16	33.156	595.2099→433.1513→287.0937	593.1822→285.0776→164.0166
17	33.604	595.2090→433.1496→287.0947	593.1822→473.1415→285.0776
18	35.494	273.0761→147.0457	271.0616→151.0097→107.0216
19	36.952	303.0870→177.0566→145.0322	301.0722→242.0733→199.0470
20	37.854	373.1287→343.0818→163.0759	
21	38.943	403.1393→373.1287→358.0689	
22	39.45	373.1287→343.0818→163.0759	
23	41.454	403.1393→373.1287→358.0689	
24	43.217	433.1499→403.1393→373.1287	
25	44.428	373.1287→343.0818→168.0059	
26	45.348	389.1236→359.0767→341.0661	

表 4 各化合物的紫外吸收位移值

NO.	RT (min)	UV spectra		AlCl <sub>3</sub>		AlCl <sub>3</sub> /HCl		NaOAc		NaOAc/H <sub>3</sub> B O <sub>3</sub>	
		II	I	II	I	II	I	II	I	II	I
1	20.324	271	334	300	379	301	378	282	333	281	343
2	20.959	275	339	281	352	278	378	284	371	296	369
3	21.770	284	332	306	374	305	381	284	363	284	347
4	24.782	284	325	302	375	301	377	285	361	283	325
5	25.115	265	351	276	392	275	376	272	372	266	389
6	25.427	284	325	302	372	303	370	288	350	282	325
7	26.294	276	330	276	324	275	370	281	364	279	325
8	27.673	273	325	278	325	275	370	278	365	279	325
9	27.058	285	330	302	376	304	370	287	349	283	389
10	28.208	283	329	303	376	303	376	284	356	282	325
11	29.003	282	328	303	376	303	376	284	356	283	329
12	29.525	284	326	302	376	301	376	285	356	283	327
13	30.168	283	326	302	375	301	374	285	356	283	325
14	30.956	275	342	303	374	304	374	274	-	278	388
15	32.088	282	326	282	324	304	370	282	354	281	332
16	33.156	282	330	303	366	301	370	282	360	282	325
17	33.604	282	330	303	373	301	376	282	360	282	331
18	35.494	287	324	305	370	307	367	324	-	281	325
19	36.952	284	324	308	375	311	367	319	-	286	324
20	37.854	271	336	270	331	270	330	270	332	270	334
21	38.943	276	324	275	324	273	324	-	325	275	324
22	39.45	278	324	277	325	273	330	272	330	-	325
23	41.454	270	333	269	336	269	335	269	336	269	336
24	43.217	254	343	255	344	254	344	254	344	254	342
25	44.428	271	323	269	326	270	324	270	324	269	325
26	45.348	281	341	289	354	289	355	288	-	280	345

所鉴定化合物均具有黄酮类化合物的特征 UV 谱，根据 UV 光谱的特点，结合质谱和柱后衍生化数据，鉴定的化合物可分成 3 类，即：黄酮醇类、黄酮类和二氢黄酮类化合物。

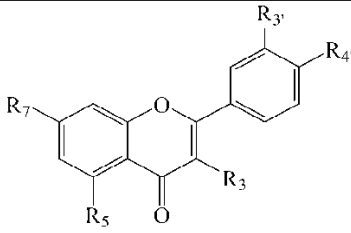
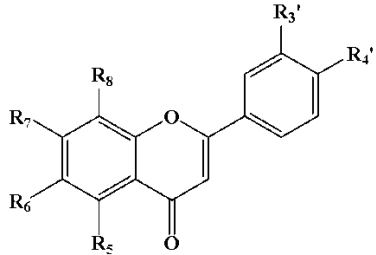
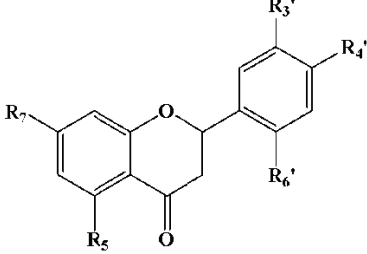
黄酮苷元的 C 环容易发生裂解，其中包括 RDA 裂解，裂解产生的碎片可以明确黄酮化合物 A 环和 B 环的取代基和数量。

所鉴定的黄酮苷类化合物有单糖苷和双糖苷两类，单糖苷均为葡萄糖苷，双糖苷分别为芸香糖苷、新橙皮糖苷和槐糖，其中芸香糖苷和新橙皮糖苷均为 1 分子葡萄糖和 1 分子鼠李糖连接而成，其中芸香糖苷因 1-6 位连接直接失去糖生成黄酮苷元。新橙皮糖苷因 1-2 连接则先在糖部分连续脱掉一些特殊的离子碎片，然后形成黄酮苷元，所以根据两种糖的裂解加以区分。

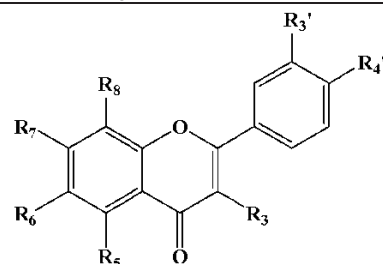
在正离子模式下，黄酮氧苷的裂解方式与黄酮碳苷有很明显的区别。在 MS<sup>1</sup> 质谱图中，碳苷一般都先失去水分子，如果邻位存在羟基结构，会连续失去水分子。碳苷很容易生成 [M-90]<sup>+</sup>、[M-120]<sup>+</sup>、[M-150]<sup>+</sup> 的碎片离子，不同的取代位置这些离子的相对丰度都不尽相同，所以可以很好区分糖苷的取代类型和位置。同时黄酮碳苷在正离子模式下不易生成苷元离子，得到的都是在碳苷位置上生成 [M-150]<sup>+</sup> 离子，这与黄酮氧苷有很明显的差别。

根据表 3 和表 4 的实验数据，结合各化合物的紫外吸收，共鉴定出如下化合物的结构，见表 5。

表 5 已鉴定的化合物结构

Flavanols									
N O.	RT (min)	Trivial name	R <sub>3'</sub>	R <sub>4'</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>	MW(Da)
5	25.115	Rutin	OH	OH	-O-Rutinose	OH	OH	H	610.1534
Flavones									
N O.	RT (min)	Trivial name	R <sub>3'</sub>	R <sub>4'</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>	MW(Da)
1	20.324	6,8-Di-C-glucopyranocylapigenin	H	OH	OH	-Glu	OH	-Glu	594.1585
2	20.959	6,8-Di-C-glucopyranocyl Diosmetin	OH	OCH <sub>3</sub>	OH	-Glu	OH	-Glu	624.1690
7	26.294	Isovitexin	H	OH	OH	-Glu	OH	H	432.1056
8	27.673	3'-Methoxyl isovitexin	OCH <sub>3</sub>	OH	OH	-Glu	OH	H	462.1162
Flavanones									
NO	RT (min)	Trivial name	R <sub>3'</sub>	R <sub>4'</sub>	R <sub>6'</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>7</sub>	MW(Da)	
3	21.77	Naringenin-7-O-triglycoside	H	OH	H	OH	-O- Triglycoside	742.2320	
4	24.782	圣草次苷	OH	OH	H	OH	-O-Rutinose	596.1741	
6	25.427	新圣草苷	OH	OH	H	OH	-O-Neohesperidose	596.1741	
9	27.058	Naringenin-7-O-sophorose	H	OH	H	OH	-O-Sophorose	596.1741	

10	28.208	Narirutin	H	OH	H	OH	-O-Rutinose	580.1 792
11	29.003	Naringin	H	OH	H	OH	-O-Neohesperidose	580.1 792
12	29.525	Hesperidin	OH	OC H <sub>3</sub>	H	OH	-O-Rutinose	610.1 898
13	30.168	Neohesperidin	OH	OC H <sub>3</sub>	H	OH	-O-Neohesperidose	610.1 898
15	32.088	7-O-6?- Malonylnaringin	H	OH	H	OH	6?-malonyneohesp eridose	666.1 796
16	33.156	Poncirin	H	OC H <sub>3</sub>	H	OH	-O-Rutinose	594.1 949
17	33.604	Neoponcirin	H	OC H <sub>3</sub>	H	OH	-O-Neohesperidose	594.1 949
18	35.494	Naringenin	H	OH	H	OH	OH	272.0 685
19	36.952	Hesperitin	OH	OC H <sub>3</sub>	H	OH	OH	302.0 790



NO	RT (min)	Trivial name	R <sub>3'</sub>	R <sub>4'</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>	MW( Da)
20	37.854	Isosinense tin	OCH 3	OCH <sub>3</sub>	H	OCH 3	H	OCH <sub>3</sub>	OCH 3	372.1 268
21	38.943	Gossypeti n hexamethy l	OCH 3	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH 3	H	OCH <sub>3</sub>	OCH 3	402.1 315
22	39.45	Auranetin	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	H	OCH 3	OCH <sub>3</sub>	OCH 3	372.1 268
23	41.454	Nobiletin	OCH 3	OCH <sub>3</sub>	H	OCH 3	OCH 3	OCH <sub>3</sub>	OCH 3	402.1 315
24	43.217	3',4',3,5,6 ,7,8-Hexa- methoxyfl avone	OCH 3	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH 3	OCH 3	OCH <sub>3</sub>	OCH 3	432.1 420
25	44.428	Tangeritin	H	OCH <sub>3</sub>	H	OCH 3	OCH 3	OCH <sub>3</sub>	OCH 3	372.1 268
26	45.348	7-Hydroxy 1-4',3,5,6, 8-Pentame thoxyflavo ne	H	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	OCH 3	OCH 3	OH	OCH 3	388.1 158

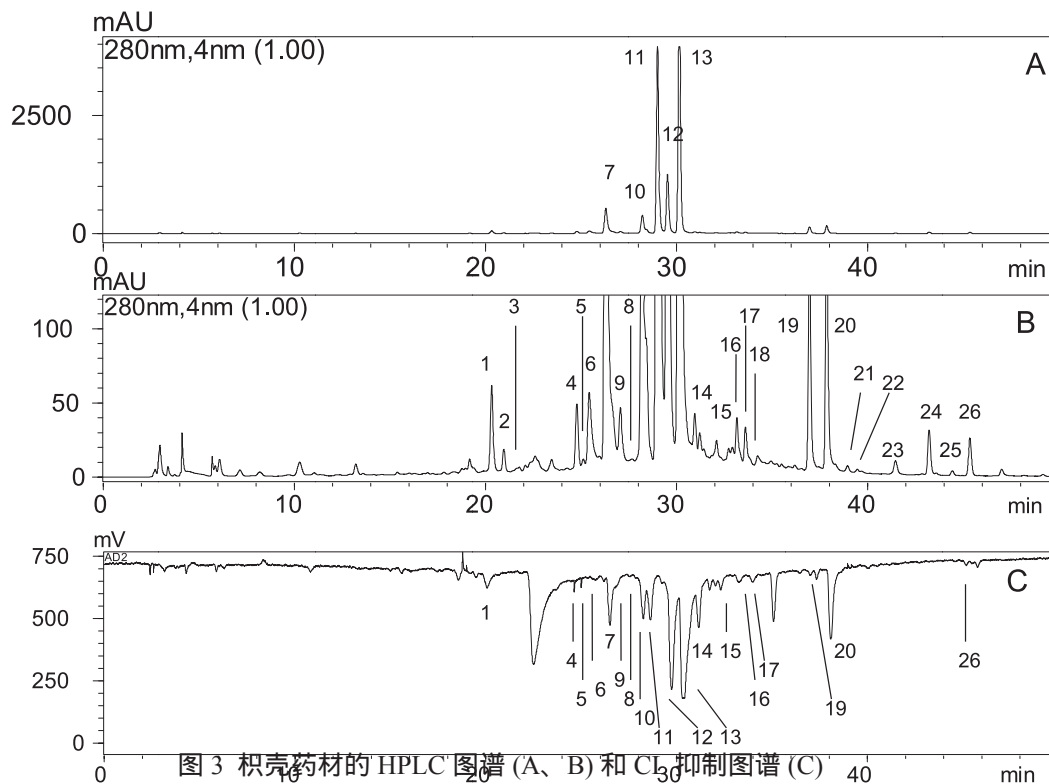
### 3.3 HPLC-DAD-MS-CL 在线检测枳壳中的的自由基清除剂 (抗氧化剂)

枳壳药品经 HPLC-DAD-MS-CL 在线检测系统分析后, 相应的抗氧化活性成分和液相色谱图见图 2 所示, 从图 2 可以看出, CL 谱上共有 18 个负色谱峰与枳壳药材的液相色谱相对应, 表明它们是具有 CL 抑制作用的抗氧化活性成分, 各物质的抑制 CL 能力与 CL 谱上的负峰强度成比例。将各个物质的抗氧化能力定义为其自由基清除率 (FRCR), 并以下式表示:

$$\text{FRCR}(\%) = \frac{(\text{ICLb} - \text{ICLs})}{\text{BICL}} \times 100$$

式中, ICLb 表示化学发光的基线强度, ICLs 表示样品中各物质的抑制后发光强度。各个物质的自由基清除率 (FRCR) 和所占 HPLC 峰面积百分率见图 3。

由图 2 和图 3 可以看出, 在 DAD 检测显示的相对较小的峰, 如化合物 5 和 8, 在 CL 抑制图谱中显示出较强的抑制活性, 这些物质在枳壳药材的 HPLC 指纹图谱中可能被忽略掉, 但它们在 CL 图谱中显示相对较大的自由基清除作用, 在评价枳壳药材的药理作用方面应当给予重视。本文建立的抗氧化剂在线检测系统共从枳壳药材中检出 18 个抗氧化活性物质, 并阐明了结构。HPLC 和 CL 图谱中, 尚有部分色谱峰并未阐明, 但 DAD 和 MS 检测器显示它们中的大部分也均为黄酮类成分, 在后续的研究工作中可采用其他方法继续深入探讨。



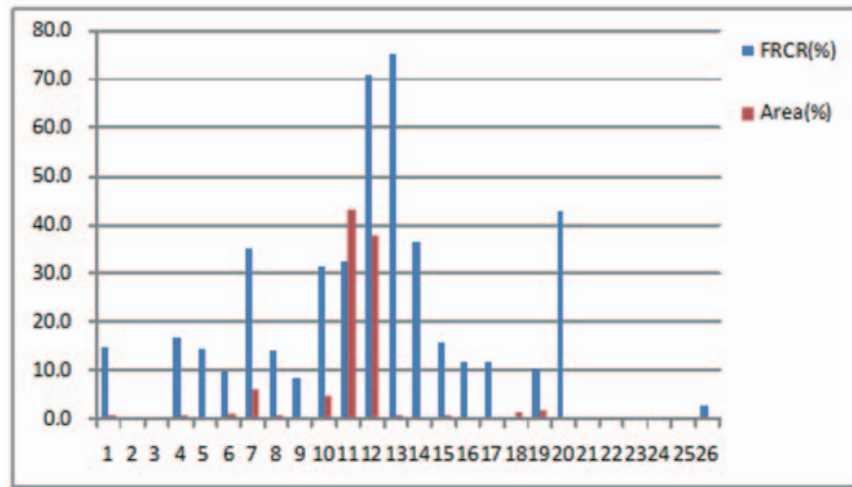


图 4 枳壳中各化合物的 FRCR 和所占峰面积百分率

## 结论

应用本文所建立的方法，共从枳壳药材中准确鉴定了 26 个黄酮类化合物的结构，包括 2 个黄酮醇、4 个黄酮、13 个二氢黄酮和 7 个多甲氧基黄酮；并应用鲁米诺 - 铁氰化钾系统在线检测出其中 18 个化合物具有超氧阴离子清除能力，弥补了前人所建立的检测方法不能在线评价药材中清除超氧阴离子能力的不足。本方法可准确应用于枳壳药材的抗氧化活性成分分析，其他药材中的化学成分的结构鉴定和自由基清除能力有待进一步深入研究。

HPLC 可对复杂样品实现良好的分离，MS 的应用有利于研究化合物的裂解规律，PCD 技术在准确判断黄酮类化合物类型和取代位置的同时，也提高了化合物结构鉴定的准确性，鲁米诺 - 铁氰化钾 CL 系统可用于评价化合物的超氧阴离子自由基清除能力，本文所建立的 HPLC-DAD-MS<sup>n</sup>/PCD-CL 在线检测方法将 HPLC、MS、PCD 和 CL 结合起来，提高了中药材中化学成分鉴定的速度和准确性，并可同时在线检测多种化合物的抗氧化活性，本方法快速、准确、易操作，为中药材的成分分析和药理作用评价提供了分析方法基础。

## 致谢

感谢国家 973 项目（项目编号：2006CB504707）的资助和岛津企业管理（中国）有限公司的技术和经费支持。