

SPE-HPLC-DAD 法同时检测柑橘药用资源中 黄烷酮类和川陈皮素成分

谢 辉¹, 陈 亚¹, 雷爱玲¹, 朱春燕¹, 李杨梅¹, 白玉婷¹, 孙 鹏^{1*}, 李贵节^{1,2*}

¹重庆第二师范学院生物与化学工程学院 重庆市功能性食品协同创新中心, 重庆 400067;

²西南大学柑桔研究所 中国农业科学院柑桔研究所 国家柑桔工程技术研究中心, 重庆 400712

摘要:为检测柑橘类 5 种药用资源中芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、柚皮素和橙皮素等 5 个黄烷酮物质和川陈皮素的含量。实验用 70% 乙醇水溶液分别浸提化橘红、陈皮、青皮、橘络和橘核, 提取液经稀释后利用 C₁₈ 固相萃取柱除杂和浓缩, 再以 0.5% 醋酸水溶液和甲醇为流动相进行反相梯度洗脱, 用串联二极管阵列检测器 (DAD) 扫描紫外光谱做定性分析, 并分别在 283、285、290、335 nm 波长处做定量检测。在该条件下 6 个类黄酮成分均实现基线分离; 外标法定量, 线性相关性好 ($R^2 \geq 0.9998$); 加标回收率为 95.83% ~ 103.56%, 相对标准偏差为 2.90% ~ 8.78%。含量分析结果显示: 芸香柚皮苷 10.49 mg/g、柚皮素 0.327 mg/g、橙皮素 0.129 mg/g 在青皮中含量最高, 橙皮苷 10.78 mg/g、川陈皮素 1.74 mg/g 在陈皮中含量最高, 柚皮苷 19.20 mg/g 在化橘红中含量最高。该方法适用于柑橘药用资源中微量类黄酮成分的准确定性和定量检测。

关键词:柑橘药用资源; 高效液相色谱; 固相萃取; 川陈皮素; 黄烷酮

中图分类号: R284.2; O657.3

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2019)8-1365-07

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2019.8.009

Simultaneous determination of flavanones and nobiletin in citrus medicinal resources by using SPE-HPLC-DAD methods

XIE Hui¹, CHEN Ya¹, LEI Ai-ling¹, ZHU Chun-yan¹, LI Yang-mei¹, BAI Yu-ting¹, SUN Peng^{1*}, LI Gui-jie^{1,2*}

¹School of Biological and Chemical Engineering, Chongqing University of Education, Chongqing Collaborative Innovation Center for Functional Food, Chongqing 400067, China;

²Citrus Research Institute of Southwest University & Chinese Academy of Agricultural Sciences, National Citrus Engineering Research Center, Chongqing 400712, China

Abstract: Contents of five flavanones such as narirutin, naringin, hesperidin, naringenin and hesperetin as well as nobiletin in five citrus medicinal resources were analyzed. Huajuhong, Chenpi (dried tangerine peel), Qingpi, Juluo and Juhe were extracted with 70% ethanol aqueous solution; extract solution was diluted and then cleaned and concentrated by C₁₈ solid phase extraction column. A reverse-phase HPLC gradient elution with 0.5% acetic acid (aq.) and methanol as mobile phase was developed for separation; a diode array detector (DAD) was hyphenated to scan UV spectra for the qualitative analysis; quantitation was achieved respectively at 283, 285, 290 and 335 nm. Under above conditions, the six flavonoids were base-isolated; the external standard method for quantitation showed good linear correlation ($R^2 \geq 0.9998$); recovery rate was between 95.83% - 103.56%; the relative standard deviation was between 2.90% - 8.78%. The results of sample content analysis showed that Qingpi had the highest concentration of narirutin 10.49 mg/g, naringenin 0.327 mg/g and hesperetin 0.129 mg/g; Chenpi had the highest concentration of hesperidin 10.78 mg/g and nobiletin 1.74 mg/g; Huajuhong had the highest concentration of naringin 19.20 mg/g. This method is suitable for accurate qualitative and quantitative detection of flavonoids in citrus medicinal resources.

收稿日期: 2019-03-07 接受日期: 2019-06-13

基金项目: 重庆市教育委员会科学技术研究项目 (KJQN201801613); 国家柑桔工程技术研究中心开放项目 (NCERC2019004); 重庆第二师范学院大学生科研项目 (XK20170220, KY20180256); 重庆市功能性食品协同创新中心科研项目 (ccicff-srp-201608)

* 通信作者 Tel: 86-23-62658125; E-mail: sunpeng@cque.edu.cn, liguijie@cric.cn

Key words: citrus medicinal resources; high performance liquid chromatography; solid phase extraction; nobiletin; flavanone

柑橘属于芸香科柑橘亚科植物^[1],很多品种具有药用价值,常见中药材包括陈皮、青皮、化橘红、橘络及橘核等。陈皮(*Citri Reticulatae Pericarpium*)为晒干的成熟橘皮,入药以陈为佳具有理气和中、燥湿化痰、安胃和中、降逆止呕等功效^[2]。青皮(*Citri Reticulatae Pericarpium Viride*),即橘子未成熟的绿色干燥外皮,亦有用幼小果实晒干而成,具有破气散结、疏肝止痛的作用^[3,4]。化橘红(*Exocarpium Citri Grandis*)为广东地方柚的变种,具有利气消痰、宽中散结的功效^[5,6]。橘络(*Citri Reticulatae Retinervis*)即橘瓣上的白色丝络,具有通血脉、理气止痛及化痰的功效。橘核(*Citri Reticulatae Semen*)为橘子的种子,具有理气、止痛的功效^[7]。

柑橘果实中含有大量的类黄酮物质,常见成分包括属于黄烷酮类物质的芸香柚皮苷、橙皮苷、柚皮苷、橙皮素、柚皮素和属于多甲氧基黄酮类的川陈皮素^[8]。已有研究表明,芸香柚皮苷、橙皮苷、柚皮苷等黄烷酮糖苷具有抗脂质过氧化、清除氧自由基、抗炎、抗癌、抗菌、抗病毒、延缓衰老、预防动脉粥样硬化等多种作用^[9-11];而川陈皮素也有较强的抗肿瘤、抗真菌、抗动脉粥样硬化和降低血清胆固醇等药理活性^[12,13]。提取柑橘类黄酮的常用方法有碱提取酸沉淀法、溶剂提取法、超声波辅助提取、加热回流提取等方法;分离纯化的常用手段包括柱层析法、大

孔树脂吸附法、高速逆流色谱技术等方法^[14]。固相萃取(SPE)是近年来广泛应用于食品、生物、药学、环境等众多领域的样品前处理技术。SPE常用于处理组成复杂的液体样品,能够实现对样品中不挥发和半挥发性目标物的萃取、净化和浓缩的要求,具有去除干扰物质、溶剂用量少、操作简单快速等优良性能^[15-20]。本研究选取了陈皮、青皮、化橘红、橘络、橘核等常用的柑橘药材作为检测对象,采用乙醇浸提柑橘药材中的川陈皮素和黄烷酮等目标物质,运用SPE进一步去除杂质和富集浓缩,采用高效液相色谱串联二极管阵列检测器(high performance liquid chromatography-diode array detector, HPLC-DAD)进行分离和分析检测,进而了解目标类黄酮成分在柑橘不同药用资源中的分布情况,以期为进一步研究其功能性和药理作用提供数据基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

陈皮、青皮、化橘红、橘络和橘核购自重庆万家燕大药房,由重庆第二师范学院重庆市功能性食品协同创新中心赵欣教授鉴定。甲醇、乙酸(色谱纯)上海阿拉丁有限公司;无水乙醇(分析纯)重庆川东化工(集团)有限公司。芸香柚皮苷、橙皮苷、柚皮苷、橙皮素、柚皮素及川陈皮素标准对照品(纯度98%)上海源叶生物科技有限公司,其物质结构如图1所示。

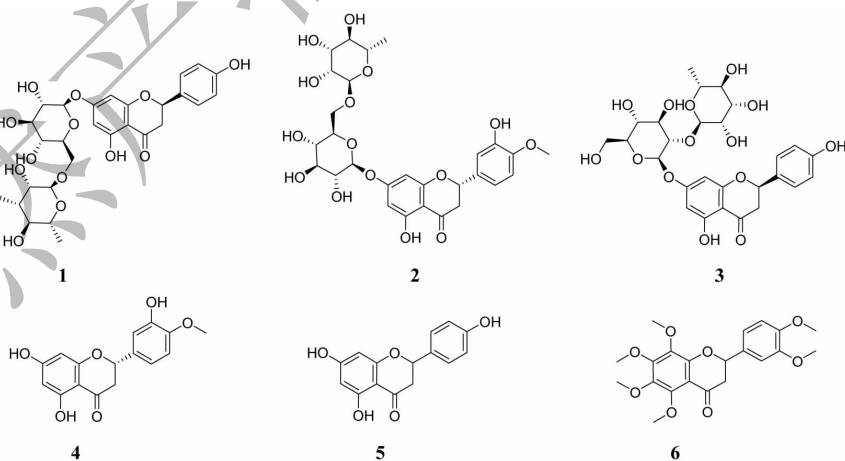


图1 6个柑橘类黄酮标准物质结构式

Fig. 1 Chemical structures of six citrus flavonoids

注:1-芸香柚皮苷;2-橙皮苷;3-柚皮苷;4-橙皮素;5-柚皮素;6-川陈皮素。

Note: 1-Narirutin; 2-Hesperidin; 3-Naringin; 4-Hesperetin; 5-Naringenin; 6-Nobiletin.

1.2 仪器与设备

Ultimate 3000 高效液相色谱仪,配备二极管阵

列检测器(DAD),德国 Thermo Scientific 公司;HyperSep C₁₈ SPE 小柱,德国 Thermo Scientific 公司;

0.22 μm 有机相微孔滤头,天津市津腾实验设备有限公司。

1.3 试验条件

1.3.1 标准工作溶液的配制

分别称取适量芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、柚皮素、橙皮素、川陈皮素标准品,用甲醇定容为 1.0 mg/mL 的储备液;再用甲醇稀释,配制浓度分别为 10.0、15.0、20.0、30.0、100.0、200.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的标准工作溶液及相同浓度的混合标准液。

1.3.2 样品处理

样品粉碎后过 60 目筛,取约 1.0 g 细粉,精密称量,加入 20 mL 70% (体积分数)乙醇,浸提 1 h 后过滤。将过滤后的液体稀释至 5%,稀释液以 1 mL/min 流速通过甲醇活化后的固相萃取柱,再通过超纯水清洗除杂。柱上吸附的目标物质用 5 mL 甲醇洗脱,洗脱液过 0.22 μm 微孔滤膜后备用。

1.3.3 色谱及检测条件

色谱柱:Thermo Scientific Accucore C_{18} (4.6 mm \times 150 mm, 2.6 μm);流动相:A 甲醇,B 0.5% 乙酸水溶液,流动相梯度见 2.2 分离条件的选择;定量检测波长:283、285、290、335 nm;柱温 30 $^{\circ}\text{C}$;流速 0.50

mL/min;进样量 5 μL 。

2 结果与讨论

2.1 浸提液稀释对 C_{18} 固相萃取效果的影响

利用 C_{18} SPE 前处理的原理为分配层析。柑橘类黄酮都含有极性较弱的母环结构,根据相似相溶的原理,它们依据取代基的不同易分布在中弱极性的物质中。当乙醇体积分数为 70% 的样品提取液通过 SPE 柱时,由于流动相与 C_{18} 固定相极性接近,大部分黄酮类物质和川陈皮素会继续保留在乙醇溶液中,仅少量保留在 SPE 柱上。降低乙醇体积分数,得到的稀释液极性升高,则柑橘类黄酮物质更倾向于保留在极性更弱的固定相表面,从而能够实现固相萃取和浓缩。根据上述原理,将陈皮浸提液稀释至乙醇体积分数为 20%、10%、5%,分别通过 SPE 柱,最终测得保留的类黄酮含量见表 1。结果表明,5% 体积分数乙醇稀释液中黄酮和川陈皮素被 SPE 收集保留量最高,效果最好。继续稀释时,类黄酮的溶解性显著降低,稀释液呈现明显浑浊状态,导致 SPE 对类黄酮成分的保留严重降低,且结果重复性差(结果未显示)。

表 1 C_{18} SPE 对不同乙醇浓度陈皮稀释液中类黄酮物质的收集保留量

Table 1 Collection and retention of Chenpi flavonoids in different ethanol concentration dilutions by C_{18} SPE

名称 Name	乙醇体积分数 Ethanol volume fraction	芸香柚皮苷 Narirutin	柚皮苷 Naringin	橙皮苷 Hesperidin	柚皮素 Naringenin	橙皮素 Hesperetin	川陈皮素 Nobiletin
陈皮类黄酮 Chenpi flavonoids (mg/g)	30%	3.18 \pm 0.25	0.114 \pm 0.02	7.30 \pm 0.05	0.078 \pm 0.01	0.011 \pm 0.01	1.18 \pm 0.02
	10%	4.72 \pm 0.22	0.136 \pm 0.02	8.03 \pm 0.06	0.082 \pm 0.01	0.018 \pm 0.01	1.20 \pm 0.03
	5%	5.85 \pm 0.23	0.145 \pm 0.01	10.45 \pm 0.05	0.089 \pm 0.01	0.023 \pm 0.01	1.73 \pm 0.03

2.2 色谱分离条件的选择

6 种物质都含有苯并吡喃酮结构,性质较为相似,因此采用梯度洗脱的方式进行分离。考虑到黄酮类物质即芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、柚皮素和橙皮素中含有易电离的酚羟基,因此在流动相中加入乙酸抑制电离,从而改善峰型。实验发现,用甲醇和 0.05% 乙酸水溶液作为流动相,各物质不能达到基线分离,而且色谱峰仍有拖尾现象;改用甲醇和 0.5% 乙酸水溶液 (pH = 3.03) 后,峰形得到明显改善,柑橘药用资源样品中的黄酮类物质能够实现良好分离。经优化后的洗脱程序见表 2,在该条件下分离 6 种物质混合标准品和样品的紫外光谱图如图 2 所示。

2.3 样品峰定性和定量检测波长选择

在 2.2 所述分离条件下,用 DAD 扫描各物质在 190 ~ 400 nm 间的紫外吸收,得到 5 个黄酮类物质及川陈皮素的紫外光谱图(图 3)。将样品物质峰的保留时间和紫外光谱图与标准物质峰对比,实现

表 2 HPLC 流动相梯度洗脱程序

Table 2 HPLC mobile phase gradient elution procedure

洗脱时间 Elution time (min)	流动相组成 Mobile phase composition	
	A 甲醇 A Methanol (%)	B 0.5% 醋酸 B 0.5% acetic acid (%)
0 ~ 10	40	60
10 ~ 22	40 ~ 100	60 ~ 0
22 ~ 25	100	0

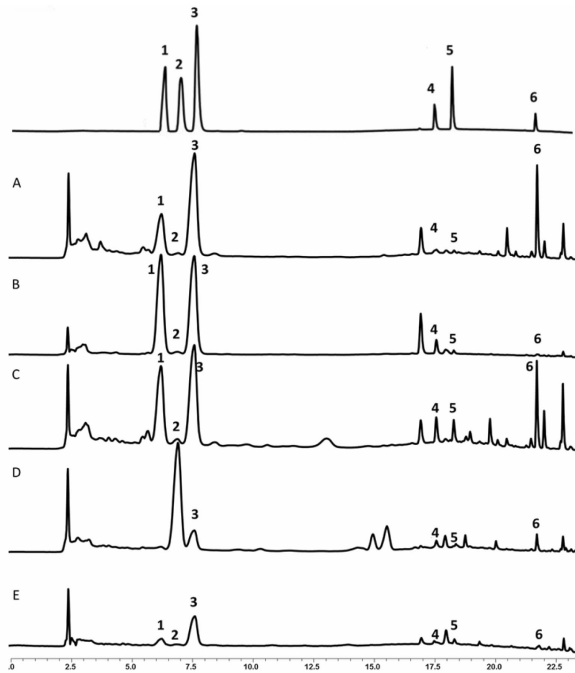


图2 柑橘类黄酮混合标准品色谱图和
柑橘药用资源样品色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of the mixed flavonoid standard solution and citrus medicinal resources samples

注:1-芸香柚皮苷;2-柚皮苷;3-橙皮苷;4-柚皮素;5-橙皮素;6-川陈皮素;A-陈皮;B-橘络;C-青皮;D-化橘红;E-橘核;显示波长:285 nm。Note: 1-Narirutin; 2-Naringin; 3-Hesperidin; 4-Naringenin; 5-Hesperetin; 6-Nobiletin; A-Chenpi; B-Juluo; C-Qingpi; D-Huajuhong; E-Juhe, ; Ultraviolet wavelength: 285 nm.

对样品峰的定性分析,同时作峰纯度检测,以确认各

目标物质峰没有或仅有微量其他成分共流出。由图3还可知:芸香柚皮苷在283 nm处有最大吸收,橙皮苷、柚皮苷在285 nm处有最大吸收,橙皮素、柚皮素在290 nm处有最大吸收,而川陈皮素在335 nm处有最大吸收。因此分别选择283、285、290、335 nm为上述6个物质的定量检测波长。

2.4 线性关系和检测限

将各标注物质储备液分别稀释至10.0、15.0、20.0、30.0、100.0、200.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$,测量不同浓度的标样所对应的峰面积,计算回归方程。测定仪器信噪比(S/N),当各标准溶液稀释至信噪比 $3 < S/N < 10$ 时,以该溶液浓度计算仪器检出限($S/N = 3$)和定量限($S/N = 10$)。6种物质的回归方程、相关系数、检出限和定量限如表3所示。

2.5 重复性、稳定性和精密度

取同一批实验样品按照1.3.2进行样品处理,配制试样6份,按照表2的流动相洗脱程序进行含量测定,进行精密度和重复性实验。结果显示各物质RSD在0.49%~2.55%(表4),表明精密度和重复性良好。

将陈皮样品提取液放置于室温下,分别在24、48、72 h测定各类黄酮成分的含量,以研究其稳定性。如表5所示,提取液中芸香柚皮苷浓度呈缓慢地上升趋势,72 h升高了约1.7%;柚皮苷含量在72 h内呈缓慢下降趋势,约降低了0.02 mg/g。橙皮苷、柚皮素和橙皮素含量变化趋势不明显,而川陈皮素的含量在72 h内保持稳定。

表3 回归方程、相关系数及检测限

Table 3 Regression equation, correlation coefficient and detection limit

组分 Group	回归方程 Regression equation	相关系数 Correlation coefficient	检出限 Detection limit ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	定量限 Quantitation limit ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
芸香柚皮苷 Narirutin	$A = 3.8 \times 10^4 C - 0.45 \times 10^{-2}$	0.999 9	0.811	2.703
柚皮苷 Naringin	$A = 5.88 \times 10^4 C - 0.1 \times 10^{-2}$	0.999 9	0.124	0.413
橙皮苷 Hesperidin	$A = 6.38 \times 10^4 C - 0.28$	0.999 8	0.001	0.004
橙皮素 Hesperetin	$A = 2.76 \times 10^5 C - 5.74 \times 10^{-2}$	0.999 9	0.024	0.079
柚皮素 Naringenin	$A = 1.22 \times 10^5 C - 0.46 \times 10^{-1}$	0.999 9	0.031	0.104
川陈皮素 Nobiletin	$A = 1.30 \times 10^5 C - 0.51 \times 10^{-2}$	0.999 9	0.158	0.528

注:A为峰面积,单位mAU;C为浓度,单位 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

Note: A is the peak area in mAU; C is the concentration in $\mu\text{g}/\text{mL}$.

2.6 加标回收率实验

准确称取相同质量的同一批次陈皮样品两份,一份用来测定本底含量,另一份加入已知量的川陈皮素和黄烷酮类物质标准品,按照1.3.2项下的方

法制备供试品溶液,按2.1、2.2项下条件测定,通过实际测得加入标准物质的量除以已知加入量计算回收率,并计算相对标准偏差,结果如表6所示,各物质的回收率为95.83%~103.56%。

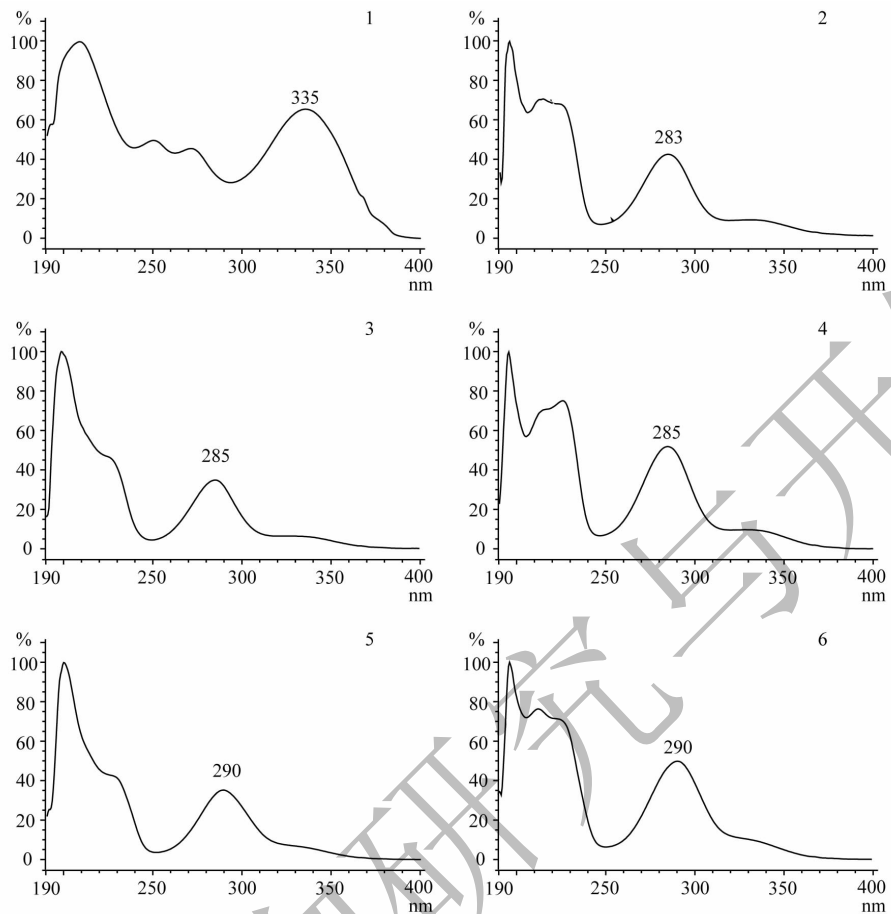


图3 6个类黄酮标准品的紫外光谱图

Fig. 3 UV spectra of six flavonoids

注:1-川陈皮素;2-芸香柚皮苷;3-橙皮苷;4-柚皮苷;5-橙皮素;6-柚皮素;横坐标为波长,单位 nm;纵坐标为紫外信号的相对响应值。

Note: 1-Nobiletin; 2-Narirutin; 3-Hesperidin; 4-Naringin; 5-Hesperetin; 6-Naringenin; the abscissa is the wavelength in nm; the ordinate is the relative response of the ultraviolet signal.

表4 重复性实验结果

Table 4 Repeatability test results

组分 Group (mg/g)	1	2	3	4	5	6	RSD (%)
芸香柚皮苷 Narirutin	6.108	6.083	6.1	6.178	6.176	6.129	0.66
柚皮苷 Naringin	0.136	0.138	0.139	0.140	0.142	0.139	1.60
橙皮苷 Hesperidin	12.507	12.479	12.499	12.657	12.657	12.560	0.64
柚皮素 Naringenin	0.101	0.102	0.101	0.102	0.101	0.102	0.49
橙皮素 Hesperetin	0.019	0.019	0.020	0.020	0.020	0.019	2.55
川陈皮素 Nobiletin	1.739	1.703	1.744	1.740	1.748	1.735	0.93

2.7 柑橘药用资源类黄酮含量

将5种柑橘药用资源按照1.3.2和1.3.3处理和分析,结果如表7所示。所选柑橘药用资源均含

有芸香柚皮苷、橙皮苷、柚皮素、橙皮素等4个黄酮类成分和川陈皮素;除橘核外,其他4种柑橘药用资源中都检出了柚皮苷。不同药用资源所含优势黄

表 5 稳定性实验结果
Table 5 Stability test results

组分 Group (mg/g)	24 h	48 h	72 h
芸香柚皮苷 Narirutin	6.10 ± 0.11	6.17 ± 0.12	6.21 ± 0.10
柚皮苷 Naringin	0.14 ± 0.02	0.13 ± 0.01	0.12 ± 0.01
橙皮苷 Hesperidin	12.50 ± 0.5	12.48 ± 0.4	12.48 ± 0.5
柚皮素 Naringenin	0.10 ± 0.02	0.12 ± 0.01	0.12 ± 0.01
橙皮素 Hesperetin	0.02 ± 0.01	0.022 ± 0.01	0.022 ± 0.01
川陈皮素 Nobiletin	1.70 ± 0.03	1.70 ± 0.02	1.70 ± 0.02

烷酮化合物的类别有所差异。陈皮、青皮、橘络和橘核中的优势成分是芸香柚皮苷和橙皮苷,其中以青皮中芸香柚皮苷含量最高(10.49 mg/g),约为含量最低的橘核的 40 倍;陈皮中的橙皮苷含最高(10.78

mg/g),是含量最低的橘核的 10.5 倍、化橘红的 3.6 倍。化橘红的优势黄烷酮物质为柚皮苷,其含量也为 5 种柑橘药用资源中最高的,达到 19.20 mg/g,是含量最低的陈皮的 137 倍;橘核中未检出柚皮苷。

表 6 加标回收率
Table 6 Spiking recovery

组分 Group	样品本底含量 Background content (mg)	已知加标量 Known scalar quantity (mg)	测得加标量 Measured amount (mg)	回收率 Recovery rate (%)	RSD (%)
芸香柚皮苷 Narirutin	5.86	5.00	5.18	103.56	3.27
橙皮苷 Hesperidin	10.78	10.00	9.96	99.60	4.75
柚皮苷 Naringin	0.14	0.10	0.097	96.80	3.29
柚皮素 Naringenin	0.103	0.10	0.096	95.83	2.90
橙皮素 Hesperetin	0.021	0.10	0.096	96.00	8.78
川陈皮素 Nobiletin	1.74	2.00	2.02	100.78	5.41

表 7 5 种柑橘药用资源中黄烷酮类成分和川陈皮素的含量
Table 7 Flavanone glycosides and nobiletin content of 5 citrus medicinal resources.

组分 Group	含量 Content (mg/g)				
	陈皮 Chenpi	青皮 Qingpi	化橘红 Huajuhong	橘络 Juluo	橘核 Juhe
芸香柚皮苷 Narirutin	5.86 ± 0.20	10.49 ± 0.21	0.41 ± 0.05	9.04 ± 0.22	0.26 ± 0.01
柚皮苷 Naringin	0.14 ± 0.03	0.41 ± 0.02	19.20 ± 0.53	0.15 ± 0.01	ND
橙皮苷 Hesperidin	10.78 ± 0.23	9.54 ± 0.14	2.99 ± 0.11	6.58 ± 0.32	1.03 ± 0.11
柚皮素 Naringenin	0.103 ± 0.02	0.327 ± 0.01	0.326 ± 0.02	0.144 ± 0.01	0.040 ± 0.01
橙皮素 Hesperetin	0.021 ± 0.01	0.129 ± 0.05	0.026 ± 0.01	0.013 ± 0.01	0.010 ± 0.011
川陈皮素 Nobiletin	1.74 ± 0.14	1.41 ± 0.08	0.52 ± 0.05	0.023 ± 0.01	0.013 ± 0.01

3 结论

本研究开发了一套同时准确分析检测柑橘药用资源中黄烷酮类成分和川陈皮素等类黄酮物质含量的方法。采用 70% 乙醇浸提,将提取液稀释后通过

固相萃取除杂并浓缩,采用高效液相色谱分离 6 种目标物质,利用紫外光谱结合保留时间做定性分析及色谱峰纯度检验,采用外标法在各物质的最大波长处测定其含量。结果表明:样品稀释液乙醇体积

分数为 5% 时,利用 SPE 富集各类黄酮成分效率最高。对陈皮、青皮、化橘红、橘络和橘核等 5 种柑橘药用资源进行了分析,结果表明:青皮中芸香柚皮苷含量最高(10.49 mg/g),化橘红中柚皮苷含量最高(19.20 mg/g),陈皮中的橙皮苷含最高(10.78 mg/g);而柚皮素、橙皮素、川陈皮素在各柑橘药用资源中含量较低。该方法的加标回收率为 95.83% ~ 103.56%,RSD 为 0.49% ~ 2.55%,具有良好的精密度和重现性。该方法适用于常规 HPLC 对柑橘药用资源中类黄酮的定性和定量检测。

参考文献

- 1 Tan ZY. China fruit tree records: Citrus volume officially published[J]. South China Fruits(中国南方果树),2010,39(1):66.
- 2 Li WW, Hang GW. Research progress of tangerine peel flavonoids[J]. Med Inno China(中国医学创新),2014,11:154-156.
- 3 Chen H, Liu CY, Li CY. Advances in studies on chemical constituents and pharmacologic effects of *Pericarpium citri reticulatae* viride [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药),2001,32:1051-1052.
- 4 Xu R, Zhong FL, Wu DF. Research of Chinese medicine green skin herbal[J]. J Chin Med Mater(中药材),2013,36:1018-1023.
- 5 Wang YH. Research progress on orange-red[J]. World Sci Tech-Mod Tradit Chin Med Mater Med(世界科学技术-中医药现代化),2017,19:1076-1082.
- 6 Zhang K, Zhang SS, Zhang BX. Research progress of flavonoids chemical composition in *Citri grandis* exocarpium [J]. Med Res Edu(医学研究与教育),2017,34(5):60-65.
- 7 Cui GJ, Liu F, He Q. Traits and medicinal value of Juye, Juluo and Juhe[J]. Capit Med(首都医药),2013,3(5):44.
- 8 Song YP, Chen HF, Tan SS, et al. A comparative study on content of hesperidin, nobiletin, tangeretin and synephrine in *pericarpium citri reticulatae* from different varieties[J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药),2017,9:19-22.
- 9 Tripoli E, Guardia ML, Giammanco S, et al. Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review[J]. Food Chem,2006,104:466-479.
- 10 Huang YS, Ho SC. Polymethoxy flavones are responsible for the anti-inflammatory activity of citrus fruit peel [J]. Food Chem,2009,119:868-873.
- 11 Li YW, Zhu B, Liu ZQ. Prediction of potential pharmacodynamics target of nobiletin and analysis of its multi-dimensional pharmacological action [J]. J Jingtangshan Univ: Nat Sci(井冈山大学学报:自科版),2018,39(5):73-80.
- 12 Wang JX, Yu HW, Hu RS. Research progress of Nobiletin [J]. J Anhui Agri Sci(安徽农业科学),2011,39:7731-7733.
- 13 Wang GF, Wang XC, Xiao L, et al. Anti-tumor effects of citrus flavonoid nobiletin [J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药),2007,38:1694-1697.
- 14 Zhang QH, Jiang YH, Gong QF, et al. Analysis of flavonoids from *Fructus aurantii* of Zhang-band processed products [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药),2010,21:2536-2537.
- 15 Farajzadeh MA, Mohebbi A. Development of magnetic dispersive solid phase extraction using toner powder as an efficient and economic sorbent in combination with dispersive liquid-liquid microextraction for extraction of some widely used pesticides in fruit juices [J]. J Chrom A,2017,1532(12):10-19.
- 16 Mojtaba MS, Kiran S, Fraser JF, et al. An improved liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method for quantification of dexmedetomidine concentrations in samples of human plasma [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci,2018,1073:118-122.
- 17 Huang MF, Su XS, Jiao BN, et al. Research progress of determination, separation and purification technologies for citrus polymethoxylated flavones [J]. Food Sci(食品科学),2009,30:277-283.
- 18 Tamás K, Wachter-Kiss E, Kormány R. Hydrazine determination in allopurinol using derivatization and SPE for sample preparation [J]. J Pharma and Biomed Analyt, 2018, 152(35):25-30.
- 19 Bermejo A, Llos MJ, Cano A. Analysis of bioactive compounds in seven citrus cultivars [J]. Food Sci Technol Int, 2011,17(1):55-62.
- 20 Zhou JS, Chen XQ, Jiang XY. Determination of flavonoids in *Marchantia paleacea* by reverse phase HPLC with solid-phase extraction [J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2012,24(2):191-194.