

文旦柚皮中黄酮的提取鉴定及抗氧化性研究

摘要: 柚皮除含有水分、维生素等营养物质外,还含有多种对人体健康有益的天然有机化合物,如黄酮类化合物、香精油、天然色素、膳食纤维等。质量占比达 43%~48%的柚皮在食用果肉后通常被丢弃,造成天然化合物资源巨大浪费。文旦是我国柚类市场主要品种,本研究通过溶剂法提取文旦柚皮中总黄酮,运用 LC-MS 法对所得总黄酮进行定性分析,并对其中主要黄酮类化合物——柚皮苷和橙皮苷进行定量研究,同时运用 DPPH 法对文旦柚皮总黄酮进行抗氧化能力检测。从 6.0g 文旦柚皮中提取得到 0.97g 浸膏,LC-MS 检测得到 11 种黄酮类化合物,其中柚皮苷含量为 1.11mg NA/g DW、橙皮苷含量为 0.55mg HE/g DW, DPPH 自由基清除率 SC_{50} 为 1.75 mg/mL。实验结果表明,文旦柚皮中总黄酮含量丰富,代表性化合物明确,是有效的天然抗氧化剂来源,所得数据为文旦柚皮天然资源综合开发提供了理论依据。

关键词: 文旦; 果皮; 黄酮类化合物; LC-MS 定性定量分析; 抗氧化性

Extraction, Identification and Antioxidant Activity of Flavonoids from Peels of Wendan

Abstract: In addition to water, vitamins and minerals, pomelo peels also contain a variety of natural organic compounds that are beneficial to human health, such as flavonoids, essential oils, natural pigments, dietary fibers and the like. Wendan is a main variety in China's pomelo market. The peels accounting for 43%~48%, is usually discarded after eating pulp, resulting in the waste of natural compound resources. In this study, the total flavonoids in wendan peels were extracted by solvent, and were qualitatively analyzed by LC-MS. The main flavonoids, naringin and hesperidin were quantitatively studied. Then DPPH method was used to test the antioxidant activity of the total flavonoids. As a result, 0.97 g of the total flavonoids were extracted from 6.0 g Wendan peels, and 11 flavonoids were detected by LC-MS. The content of naringin was 1.11 mg NA/g DW and the content of hesperidin was 0.55mg HE/g DW respectively. In DPPH test, the total flavonoids showed ability of scavenging DPPH free radical at $SC_{50} = 1.75\text{mg/mL}$. The result shows that the total flavonoids in Wendan peels are rich and the representative compounds are clear. It is an effective source of natural antioxidants. The data is useful for the comprehensive development of natural resources in Wendan peels.

Key Words: Wendan; Peels; flavonoids; qualitative and quantitative analysis by LC-MS; antioxidant

1 引言

柚 (*Citrus maxima* (Burm.) Merr.), 又名香栾、朱栾、内紫等,为芸香科(Rutaceae) 柑橘属常绿乔木。文旦,原产于福建省漳州市,与坪山柚、沙田柚、暹罗柚并称为世界四大名柚。其肉质脆嫩,酸甜适中,有香气,品质优,产量大,在我国柚类市场上占据重要地位。在整个柚子中,柚皮质量占比 43%~48%,除含有水分、维生素、矿物质这些人体必需的营养物质外,还含有多种对人体健康有益的天然有机化合物,如黄酮类化合物、香精油、天然色素等^[1]。但通常柚皮在食用果肉后被丢弃,缺乏合理利用,造成天然有机化合物资源的浪

费。

黄酮类化合物 (Flavonoids) 泛指两个苯环通过中央三个碳原子相互连接而形成的一系列化合物, 以苷类形式和游离形式广泛存在于植物界, 主要包括黄酮 (Flavone)、黄酮酮 (Flavanone)、黄酮醇 (Flavanols) 与异黄酮 (Isoflavones) 等^[2]。研究表明, 黄酮类物质具有抑菌抗炎^[3,4]、抗细胞氧化^[5]、抗癌抗肿瘤^[6,7]以及防治心血管疾病^[8]等多种生理活性功能。已有研究表明, 柚皮中黄酮类化合物主要是二氢黄酮类, 如柚皮苷、新橙皮苷和柚皮芸香苷等, 其中柚皮苷占 80%以上^[9]。

目前国内外对柚皮中黄酮类化合物的提取方法和生理活性虽有一些研究^[9-13], 但针对我国主要柚类——文旦开展的研究仍然较少。在此, 本实验拟采用乙醇提取法提取文旦果皮中总黄酮, 利用 LC-MS (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry) 对其进行定性和定量分析, 采用 DPPH 法测定其抗氧化活性。研究结果可提高文旦果皮的综合利用率, 提高附加值, 减少天然资源浪费, 还有利于环境保护。

2 实验部分

2.1 实验原理

2.1.1 乙醇提取法

溶剂提取法是天然产物有效成分提取中应用最普遍的方法, 它根据植物中各种成分在不同溶剂中的溶解度不同进行提取。具有操作简便、设备简单、成分不易被破坏等优点。其中, 乙醇提取法是一种较为常用的方法^[14]。乙醇渗入植物细胞的能力较强, 对亲水、亲脂性成分均有较好的溶解性, 可用于文旦柚皮中总黄酮的提取^[15]。

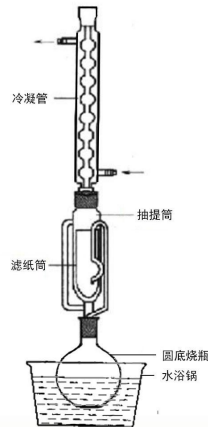


图 1 乙醇提取法实验装置示意图

2.1.2 液相色谱-质谱联用技术

液相色谱-质谱法 (Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, LC-MS) 将应用范围极广的分离方法——液相色谱法 (Liquid Chromatography, LC) 与能提供化合物分子量和结构信息的质谱法 (Mass Spectrometry, MS) 相结合, 是一种重要的现代分析技术。

本实验采用高效液相色谱-三重四级杆质谱的方法。它以液相色谱作为分离系统, 质谱为检测系统。样品在色谱部分与流动相实现分离, 经离子化后, 通过质谱仪的质量分析器将离子碎片按质量数分开, 最后经过检测器得到质谱图。该方法可以在缺少标准品的情况下对提取物中微量成分进行结构分析, 具有灵敏度高, 选择性强, 分析快速, 定量重现性好等特点, 是目前最受关注的分析检测技术^[16]。

(1) 定性分析

对于未知化合物的定性分析,使用多级质谱将准分子离子碰撞活化得到子离子谱,再由子离子来推测化合物的结构;同时还可通过分离富集制备或者定向合成等途径获得单体,再进行 NMR、IR、X-ray 衍射等分析确证其结构^[17]。

(2) 定量分析

LC-MS 定量分析方法与 HPLC 法类似,采用外标法或内标法。本实验采用外标法,外标法是按梯度添加一定量的标准品(对照品)于空白溶剂中制成不同浓度对照样品,与未知试样平行地进行样品处理,然后依浓度梯度进样检测标准品溶液和未知样品,以峰面积绘制成标准曲线,从而推算出未知试样中被测组分浓度的定量方法^[18]。

2.1.3 DPPH 法测定抗氧化活性

活性氧或活性氮的过量积累会加速机体衰老,引起机体病变。物质对活性氧和活性氮的清除作用可以缓解氧化应激,故称之为抗氧化。

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 是一种稳定的氮中心的自由基,其无水甲醇溶液呈紫色,在 517nm 波长处出现最大吸收。当向溶液中加入自由基清除剂 R 时,其电子与 DPPH 发生配对结合,使 DPPH 自由基数量减少,从而造成溶液在最大吸收波长处的吸光度变小,溶液颜色变浅。实验通过在 517nm 波长下检测样品吸光度的变化就能表达清除 DPPH 自由基的效果,以此评价样品清除 DPPH 自由基的能力^[19]。

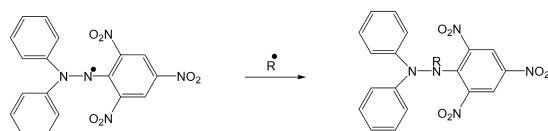


图 2 DPPH 法测定物质抗氧化性原理

2.2 试剂及材料

文旦柚皮,2018 年 10 月采自福建省漳州市,经漂洗、自然风干后备用。

乙醇(AR),甲醇(AR),甲醇(GR),乙腈(GR),甲酸(GR),高纯水(GR),氯仿(AR),2,6-二叔丁基对甲苯酚(BHT)(AR),1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical(DPPH)(AR)(北京化工厂)。

沸石,滤纸,96 孔板。

2.3 仪器和表征方法

FA1004N 电子分析天平(上海精密科学仪器有限公司);RE52AA 旋转蒸发器(上海亚荣生化仪器厂);高效液相色谱-三重四极杆质谱仪(Agilent Technologies 1260 Infinity, USA);Espire 酶标仪(PerkinElmer, USA);各种玻璃仪器;各型号移液枪与移液枪枪头(10, 200, 1000 μ L)(北京麦瑞博生物科技有限公司);恒温水浴锅(HS-2)。

2.4 实验方法

2.4.1 总黄酮提取

依据热源高度固定 500mL 圆底烧瓶,加入 2 粒沸石,装好索式提取器。准确称取 6.0g 磨好的文旦皮,用滤纸包好,放入提取器内,量取 300mL70%的乙醇加入圆底烧瓶。装好回流冷凝管,通入冷凝水,放入 90 $^{\circ}$ C 的水浴锅中充分回流 2h,至黄酮类物质基本提取完全,获得粗提液。

粗提液冷却待用,同时将纸包内柚皮进行减压抽滤,抽滤过程中加少量 25%乙醇溶液洗涤柚皮,收集滤液。并与冷却粗提液混合,得柚皮总黄酮提取液。将提取液在旋转蒸发器中蒸馏,温度设为 60 $^{\circ}$ C,除去其中的乙醇等挥发性物质,至无醇味。然后将上述无醇味提取液倒入分液漏斗中,少量多次加入氯仿,以除去溶液中的脂溶性物质。每次均充分振荡,待完全分层后,收集上层溶液,将合并后的溶液在通风橱内风干,得到浸膏,称重。

提取率(%)=浸膏恒重(g)/柚皮质量(g)

用甲醇溶解所得浸膏,作为后续实验样品待测液。

取三份柚皮样品按以上操作内容分别完成 1 次，所得结果以 Mean ± SD 形式表示。

2.4.2 总黄酮定性分析和代表性黄酮定量分析

2.4.2.1 检测条件

(1) 色谱条件

色谱柱：C18(250mm×4.6mm,5μm,SN10609405) Hypersill Gold 柱 (Thermo Scientific, USA)；流动相：A 为 0.5%甲酸水，B 为乙腈-甲醇 (1:1)；流速：1mL/min，注射体积为 3μL；在 200-600nm 范围内进行检测，载气为高纯氮气。

(2) 质谱条件

电喷雾离子化 ESD 源：离子源温度 300°C，正离子检测；扫描范围 m/z：200-1000Da；锥孔电压 30V。

2.4.2.2 黄酮的定性分析

将所得黄酮化合物的质谱图与数据库及标准品图谱比对，确定化合物结构。以上操作内容重复 3 次。

2.4.2.3 代表性黄酮的定量研究 (外标法)

精密称取 10mg 柚皮苷 (Narirutin, NA) 和 10mg 橙皮苷 (Hesperidin, HE) 标品，溶解，加入 10 mL 容量瓶内，甲醇定容，摇匀，得 2mg/mL 标准品混合溶液，备用。

所得结果以柚皮苷当量每毫克/文旦柚皮干重每克，橙皮苷当量每毫克/文旦柚皮干重每克表示，即 mg NA/g DW、mg HE/g DW。

(1) 标准曲线的建立

分别量取 1024、512、256、128、64、32、16μg/mL 混合标准品溶液，按照 2.4.2.1 中的条件绘制标准曲线，以标准品混合溶液浓度 (μg/mL) 为横坐标，各化合物峰面积 (mAU) 为纵坐标，绘制标准曲线。

(2) 方法学考察

稳定性考察：准确移取一定量的样品溶液置于分析瓶中，一式 3 份，放置 1、2、4、8、16h 后，按照 2.4.2.1 中的条件进样测定峰面积，并计算其相对标准偏差 (RSD)。

精密度考察：准确移取一定量的样品溶液置于分析瓶中，平行 3 组，每组重复 3 次，按照 2.4.2.1 中的条件进样测定峰面积，计算日内精密度、日间精密度和相对标准偏差 (RSD)。

重复性考察：准确移取一定量的样品溶液，一式 3 份，分别置于分析瓶中，按照 2.4.2.1 中的条件进样测定峰面积，并计算其相对标准偏差 (RSD)。

加标回收率考察：精确称取 5mg 柚皮苷 (NA) 和 5mg 橙皮苷 (HE) 标品，分别置于 5mL 的容量瓶中，用甲醇溶解，得到 1mg/mL 柚皮苷和 1mg/mL 橙皮苷标准品溶液，备用。准确移取一定量的样品溶液，一式 3 份，分别加入 200μL 1mg/mL 柚皮苷、150μL 1mg/mL 橙皮苷标准品溶液，充分混合后置于分析瓶中，按照 2.4.2.1 中的条件进行进样，采用外标一点法计算柚皮苷和橙皮苷的回收率，并计算其相对标准偏差 (RSD)。

以上结果均采用所得结果以浓度 (μg/mL) 表示。

(3) 样品含量的测定

精确移取一定量的样品溶液置于分析瓶中，按照 2.4.2.1 中的条件进样，分别得到柚皮苷、橙皮苷的选择离子的峰面积 (Y)，采用外标一点法计算文旦皮中柚皮苷、橙皮苷的含量，以上操作内容重复 3 次，结果采用 Mean± SD 表示。

2.4.3 柚皮总黄酮抗氧化活性检测

取 2.4.1 的待测样品溶液六份，经计算加入适量甲醇，依次稀释得 0.05、0.1、0.15、0.2、0.25 和 0.3mg/mL 的抗氧化活性测试液备用；将 DPPH 配成 0.062mM 的甲醇溶液。分别取 100μL 上述各梯度浓度测试液与 100μL DPPH 甲醇溶液共同加入 96 孔板中，每个浓度样品液平行三孔，避光室温 (27°C) 反应 30min 后，于 517nm 处测定反应体系吸光度。BHT 作

阳性对照，以甲醇为空白对照^[14]。实验平行 3 次，总黄酮清除 DPPH 自由基的能力按下式计算：

$$SC_{50} \text{ 清除率 } (\%) = [1 - (A_i - A_j) / A_0] \times 100\%$$

式中， A_0 指空白对照（甲醇+DPPH 溶液）的吸光度值； A_i 指样品实验组（样品+DPPH 溶液）的吸光度值； A_j 为样品与甲醇混合溶液的吸光度值。

文旦皮中总黄酮 DPPH 自由基清除能力用半数清除浓度 SC_{50} （half maximal scavenging concentration, mg/mL）表示，即样品对 DPPH 自由基清除率达 50% 时的浓度。最终结果表示为 Mean (n=3) \pm SD，实验数据处理采用 SPSS17.0 进行。

3 结果与讨论

3.1 文旦柚皮中总黄酮提取率

根据 2.4.1 方法，从 6.0g 柚皮中得到文旦浸膏为 0.97g，提取率为 16.13%。（所得结果为 3 份样品提取实验平均值）

3.2 文旦柚皮中总黄酮定性和代表性黄酮定量分析结果

3.2.1 定性分析结果

3.2.1.1 总黄酮色谱结果

根据 2.4.2.1 条件进样，得样品溶液的色谱图如图 3 所示。

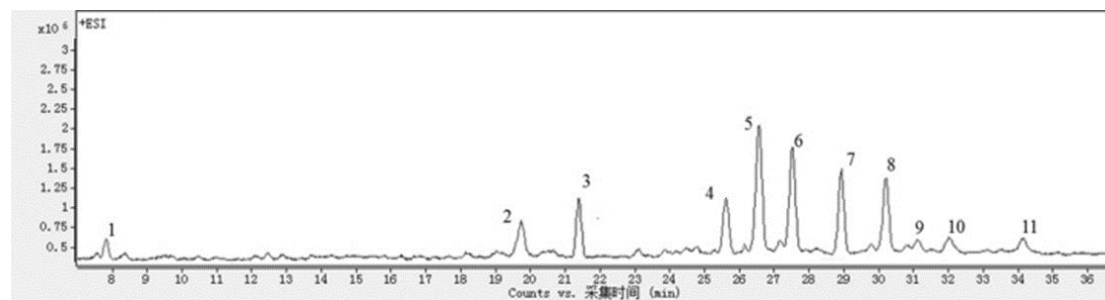


图 3 文旦柚皮总黄酮色谱图

表 1 文旦柚皮总黄酮化学成分

峰编号	保留时间 (min)	分子式	主要碎片 (m/z)			化合物	参考文献
			1	2	3		
1	7.81	C ₁₆ H ₈ O ₃	177.24	121.1	133.12	7-methoxycoumarin	[20]
2	19.73	C ₁₆ H ₁₀ O ₅	398.1	282.28	163.04	Unknown	
3	21.47	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	611.16	465.1	303.05	Rutin	[21]
4	25.61	C ₂₃ H ₃₄ O ₁₅	573.18	424.21	282.19	Genipin- β -gentiobioside	[22]
5	26.68	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄	581.19	419.13	273.08	Narirutin	[21]
6	27.55	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	611.2	449.15	303.09	Hesperidin	[23]
7	28.91	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	611.19	449.15	303.09	Neohesperidin	[22]
8	30.23	C ₂₁ H ₄₂ O ₁₅	557.24	445.14	261.12	Unknown	
9	31.14	C ₁₁ H ₆ O ₃	187.06	159.04	143.05	Angelicin	[22]
10	32.08	C ₂₁ H ₂₅ O ₁₀	439.23	352.34	221.19	Unknown	
11	34.17	C ₁₅ H ₁₆ O ₃	245.12	198.06	159.04	Dimethylallyl-methoxycoumarin	[21]

从文旦皮总黄酮共检测出 11 种化合物，分析结果见表 1。经对比文献的质谱数据，发现其中 8 种为已知化合物，3 种为未知化合物。部分结构如图 4 所示，其中柚皮苷 (Narirutin) 和橙皮苷 (Hesperidin) 色谱峰的积分面积相对较高。

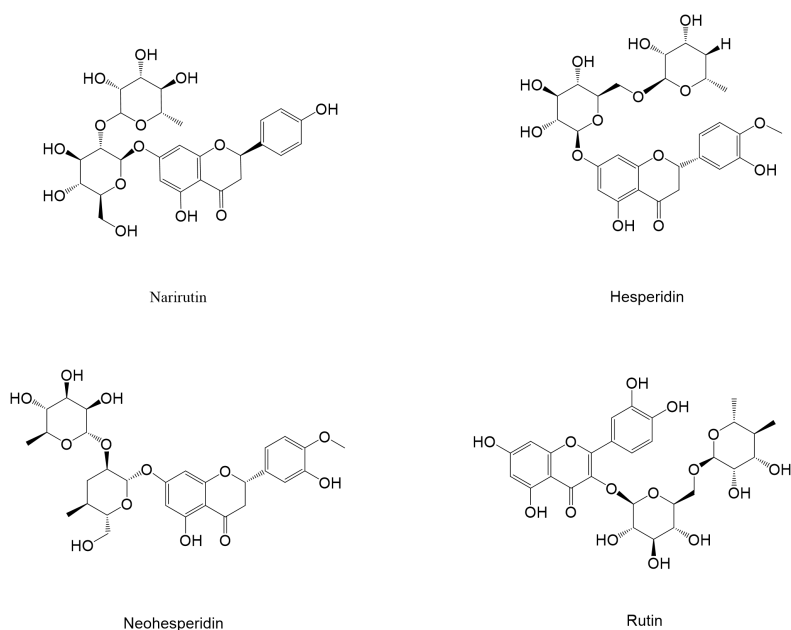


图 4 主要黄酮的结构式

3.2.1.2 代表性黄酮质谱

经 LC-MS 分析检测得到两种代表性黄酮类化合物的质谱图如下：

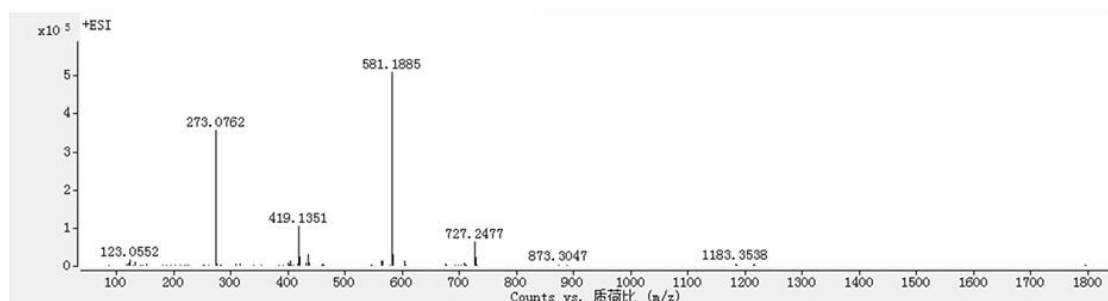


图 5 文旦柚皮中柚皮苷质谱图

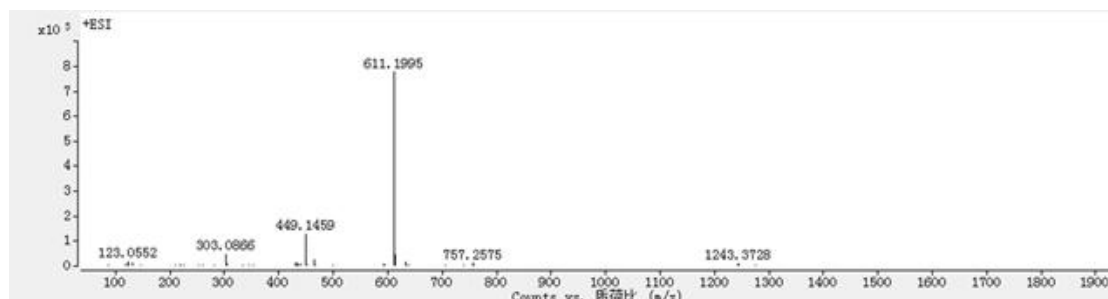


图 6 文旦柚皮中橙皮苷质谱图

3.2.2 定量分析结果

3.2.2.1 标准曲线

根据 2.4.2.1 的分析条件，分别用柚皮苷标准品的浓度 ($\mu\text{g/mL}$)、橙皮苷标准品的浓度

($\mu\text{g/mL}$) 为横坐标, 峰面积 (mAU) 为纵坐标制作标准曲线, 如图 7、8 所示, 柚皮苷标准曲线回归方程为: $y=28628x+323101$, $R^2=0.9997$ 。橙皮苷标准曲线回归方程为: $y=17843x+135997$, $R^2=0.9997$ 。

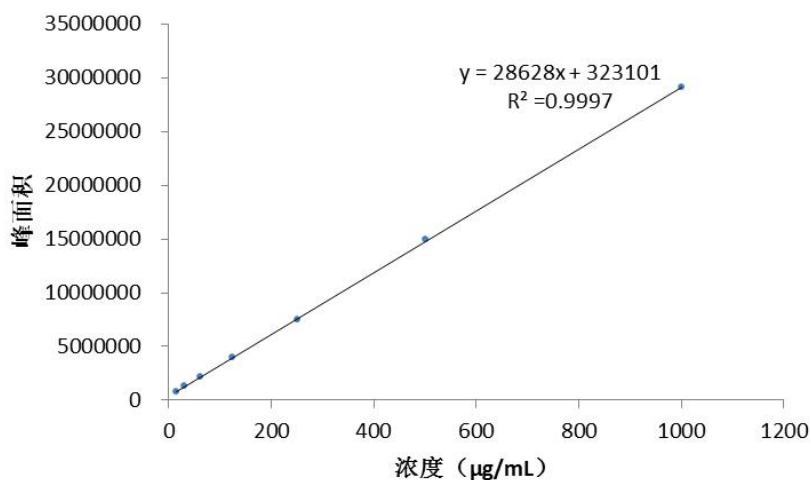


图 7 柚皮苷标准曲线

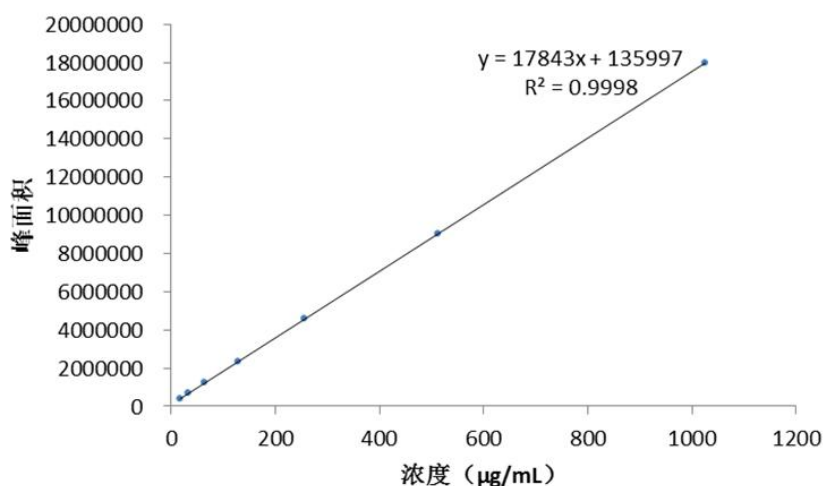


图 8 橙皮苷标准曲线

3.2.2.2 方法学考察

(1) 稳定性考察

表 2 柚皮苷和橙皮苷的稳定性考察结果

时间 (h)	1	2	4	8	16	平均值	RSD
柚皮苷	748.04	767.09	738.96	769.24	810.18	766.70	3.58%
橙皮苷	341.58	327.51	324.92	342.35	310.72	329.42	3.98%

(2) 精密度考察

表 3 柚皮苷和橙皮苷的日间精密度及日内精密度考察结果

化合物	日内			日间		
	浓度($\mu\text{g/mL}$)	均值($\mu\text{g/mL}$)	RSD	浓度($\mu\text{g/mL}$)	均值($\mu\text{g/mL}$)	RSD

	776.06			814.14		
柚皮苷	825.69	814.14	4.15%	815.66	814.33	0.15%
	840.67			813.2		
	330.69			349.06		
橙皮苷	354.58	349.06	4.68%	358.22	354.13	1.32%
	361.91			355.12		

(3) 重复性考察

表 4 柚皮苷和橙皮苷的重复性考察结果

化合物	1	2	3	平均值 (μg/mL)	RSD
柚皮苷	866.64	875.61	885.57	875.94	1.08%
橙皮苷	374.47	388.12	378.52	380.37	1.84%

(4) 加标回收率考察

表 5 柚皮苷和橙皮苷的加标回收率考察结果

化合物	取样量/mg	样品中含量/mg	加样量/mg	测得量/mg	回收率	平均回收率	RSD
	17.87	0.2185	0.2	0.4036	96.44%		
	17.94	0.2117	0.2	0.4295	104.32%		
柚皮苷	18.17	0.2299	0.2	0.4087	95.07%	99.18%	4.07%
	17.84	0.2108	0.2	0.4004	97.47%		
	17.90	0.2185	0.2	0.4293	102.58%		
	17.96	0.1577	0.15	0.2982	96.91%		
	18.27	0.1487	0.15	0.3060	102.44%		
橙皮苷	17.88	0.1564	0.15	0.2932	95.69%	97.58%	2.99%
	18.03	0.1605	0.15	0.3038	97.84%		
	18.20	0.1526	0.15	0.2876	95.04%		

3.2.2.3 代表性黄酮定量分析结果

根据 2.4.2.1 实验方法测得文旦柚皮中柚皮苷的含量为 1.11mg NA/g DW, 橙皮苷的含量为 0.55mg HE/g DW。(所得结果为三次提取实验所得样品的平均值)

3.3 柚皮总黄酮抗氧化能力检测

根据 2.4.3 实验方法测得文旦柚皮中总黄酮 $SC_{50}=1.75\text{mg/mL}$, 相较于阳性对照 BHT ($SC_{50}=0.11\text{mg/mL}$) 清除效果较明显, 具有一定的抗氧化能力。(所得结果为三次提取实验所得样品的平均值)

4 结论

文旦柚皮中还含有较丰富的总黄酮类化合物, 提取率为 16.13%。经 LC-MS 联用技术分离分析, 确定所得总黄酮中含 11 种化合物, 其中 8 种为黄酮及其相关化合物。两种主要黄酮——柚皮苷和橙皮苷含量分别为 1.11mg NA/g DW、0.55mg HE/g DW。

DPPH 实验结果表明, 对比阳性对照 BHT, 文旦柚皮总黄酮具有一定的抗氧化能力。文献报道长期食用 BHT 会引发癌症^[24], 故柚皮中的黄酮可作为天然抗氧化剂, 替代化学合成抗氧化剂, 具有成为天然食品添加剂的潜质。

5 创新点

1.首次采用 LC-MS 技术研究文旦柚皮总黄酮, 并定量其中柚皮苷和橙皮苷。

- 2.综合天然有机、仪器分析等知识与技能，完成天然资源现代化研究。
- 3.本实验有效培养了高年级学生化学综合实验创新研究能力。

参考文献:

- [1] 贾冬英,姚开,谭敏. 柚果皮中生理活性成分研究进展[J]. 食品与发酵工业,2001,27(11):74-78.
- [2] 路晓庆,杨芮,李妍正,李卓玉,王伏生,张恒虎. 黄酮类物质的生物功能及作用机制研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2018,16(22), 3283.
- [3] 冯颖, 王建国, 孟宪军, 张奇, 王晶晶. 无梗五加果黄酮类化合物生物活性研究[J]. 食品研究与开发, 2008(1), 30.
- [4] 王怀玲. 蓝莓多酚化合物抗衰老活性及作用机制研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2018.
- [5] 秦晶晶,钱慧琴,赵媛,魏婧,魏琬絮,闫福林. 荞麦叶大百合总黄酮提取工艺及抗氧化活性研究[J]. 食品研究与开发, 2019(13), 100.
- [6] 张齐. 桑叶黄酮的提取及黄酮类成分桑色素的抗癌活性研究[D]. 合肥: 合肥工业大学, 2018.
- [7] MUHAMMAD I, ABDUR R, TAREQ A I. Luteolin, a flavonoid, as an anticancer agent: A review[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2019, 112, 108612.
- [8] 郭鹏美,刘宇,景宜馨,宋奇颖,董苗苗,董丽娜,张明升. 芹菜素对舒张大鼠基底动脉的作用及机制研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2018,34(9),1100.
- [9] 邓婷婷,刘素纯,贺建华. 柚皮提取物有效成分的研究概况[J]. 中国食物与营养,2008(06), 16.
- [10] 杨晓泉,张海德,李琳. 柚皮黄酮类抗氧化物质的纯化及其降血脂作用的研究[J]. 营养学报, 2004, 26, 378.
- [11] 聂国伟. 柚皮中黄酮物质的提取工艺研究[J]. 天津农业科学,2014,20(8):29-31,47.
- [12] 许玉荣,盛璇,郭晶晶,姜怀德,梁尚栋,李桂林. 柚皮苷对高糖引起血管内皮损伤的保护作用与CX3CL1及抗氧化有关[J]. 中国药理学通报, 2016,32(11), 1608.
- [13] 王思远,陈智毅,张岩. 柚皮中黄酮类活性物质的研究进展[J]. 农产品加工, 2017(17), 67.
- [14] 徐阳阳. 不同提取方法对灵芝活性成分提取率及抗氧化活性的影响[D]. 福建农林大学,2014.
- [15] 郑培君,程海涛,王小博. 柚子皮中的总黄酮提取工艺研究[J]. 湖北农业科学,2018,57(1):104-108.
- [16] 尹华,王新宏. 仪器分析[M]. 北京: 人民卫生出版社,2016:360-362.
- [17] 姚彤,金希儒,毛煦. HPLC-MS/MS 法同时测定毛樱桃叶中 7 种黄酮类成分的含量[J]. 沈阳药科大学学报,2017,34(3):221-228.
- [18] Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. Rockville, MD: US Department of Health and Human Services, FDA, Center for Drug Evaluation and Research ; 2001 .
- [19] 史柳芝,史恒芝,黄锁义. 鸡骨草黄酮体外抗活性氧自由基作用的研究[J]. 天然产物研究与开发,2014,26(2):252-254.
- [20] 郝元元.LC-MS/MS 法测定柚子皮中香豆素类物质组成及含量[J].食品研究与开发,2019(16):146-152.
- [21] Zengin G, Paksoy M Y, Aumeeruddy M. Z. New insights into the chemical profiling, cytotoxicity and bioactivity of four Bunium species[J]. Food Research International. 2019. doi:10.1016/j.foodres.2019.05.013
- [22] Wu H, Li X, Yan X. An untargeted metabolomics-driven approach based on LC - TOF/MS and LC - MS/MS for the screening of xenobiotics and metabolites of Zhi-Zi-Da-Huang decoction in rat plasma[J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2015, 115:315-322.
- [23] Li W, Wang Z, Wang Y, Jiang C, Liu Q, Sun Y, Zheng Y. Pressurised liquid extraction combining LC - DAD - ESI/MS analysis as an alternative method to extract three major flavones in Citrus reticulata "Chachi" (Guangchenpi). Food Chemistry,2012,130(4),1044 - 1049.

[24] Chung J G, Lu H F, Hsia T C. Effects of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene on DNA adduct formation and arylamine N-acetyltransferase activity in human bladder tumour cells[J]. *Journal of applied toxicology*, 2002, 22(1):37-44.