



不同品种柑橘果实的类黄酮分离纯化及其抗氧化活性研究

朱泰霖[†], 王慧心[†], 陈杰标, 王岳, 曹锦萍, 李鲜, 孙崇德*

(浙江大学果实品质生物学实验室/农业农村部园艺植物生长发育与品质调控重点开放实验室/园艺产品冷链物流工艺与装备国家地方联合工程实验室/园艺植物整合生物学研究与应用浙江省重点实验室, 杭州 310058)

摘要 为了解析并纯化不同种类柑橘的主要抗氧化活性物质,比较不同品种柑橘提取物的抗氧化活性,选取‘玉环文旦’(柚类)‘胡柚’(葡萄柚类)‘伦晚脐橙’(甜橙类)‘代代’(酸橙类)‘椪柑’(橘类)和‘瓯柑’(柑类)等代表性品种,建立各品种主要抗氧化物质的分段分离方法和高纯度纯化体系,并对从中提取的分别富含黄酮、黄酮及多甲氧基黄酮的3个分段产物和15个纯化单体进行体外化学抗氧化能力评价。结果表明:6个柑橘品种的不同分段产物及纯化单体的化学抗氧化能力差异较大,其中,富含黄酮及黄酮的分段产物具有较强的抗氧化能力,而以多甲氧基黄酮为主的分段产物抗氧化能力较差。从柚类品种‘玉环文旦’中纯化得到新西兰牡荆苷、野漆树苷和柚皮苷,纯度分别为98.72%、95.78%、99.56%;从葡萄柚类品种‘胡柚’中纯化得到柚皮芸香苷-4'-O-葡萄糖苷、圣草次苷、新圣草次苷,纯度分别为98.42%、98.74%、99.17%;从甜橙类品种‘伦晚脐橙’中纯化得到柚皮芸香苷,纯度为98.12%;从橘类品种‘椪柑’中纯化得到橙皮苷,纯度为98.00%;从柑类品种‘瓯柑’中纯化得到新橙皮苷、枸橼苷、异甜橙黄酮、甜橙黄酮、川陈皮素、橘皮素、5-去甲基川陈皮素,纯度分别为98.56%、98.03%、98.76%、98.77%、99.15%、99.20%、97.63%。各单体中新圣草次苷、圣草次苷、橙皮苷及新橙皮苷的抗氧化能力较强,川陈皮素和橘皮素的抗氧化能力较弱。

关键词 柑橘; 类黄酮; 纯化; 抗氧化

中图分类号 S 666 **文献标志码** A

Separation and purification of flavonoids from different citrus fruits and their antioxidant activities. *Journal of Zhejiang University (Agric. & Life Sci.)*, 2021,47(6):704–718

ZHU Tailin[†], WANG Huixin[†], CHEN Jiebiao, WANG Yue, CAO Jinping, LI Xian, SUN Chongde*
(Laboratory of Fruit Quality Biology/Key Laboratory of Horticultural Plant Growth, Development and Quality Improvement, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Horticultural Products Cold Chain Logistics Technology and Equipment National-Local Joint Engineering Laboratory/Zhejiang Provincial Key Laboratory of Integrative Biology of Horticultural Plants, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract Representative varieties of six different citrus types including ‘Yuhuan Wendan’ (pomelo), ‘Huyou’ (grapefruit), ‘Lunwan navel orange’ (sweet orange), ‘Daidai’ (bitter orange), ‘Ougan’ (mandarin) and ‘Ponkan’

基金项目: 国家重点研发计划政府间国际科技创新合作专项(2017YFE0122300);国家自然科学基金(32072132, 3210932);浙江省重点研发计划(2021C02018);农业农村部科研杰出人才及其创新团队(果实营养与人类健康创新团队)项目;中国博士后科学基金(2021M692833);中央高校基本科研业务费专项资金(2020XZZX003-03)。

*通信作者(Corresponding author): 孙崇德(<https://orcid.org/0000-0002-2874-0292>), E-mail: adesun2006@zju.edu.cn

第一作者(First author): 朱泰霖(<https://orcid.org/0000-0002-2250-4459>), E-mail: flannery@zju.edu.cn; 王慧心(<https://orcid.org/0000-0003-3734-7094>), E-mail: 22016155@zju.edu.cn。†共同第一作者

收稿日期(Received): 2021-06-15; 接受日期(Accepted): 2021-11-01

(tangerine) were selected as materials. The main antioxidant active substances of different citrus varieties were identified and purified. The antioxidant activities of citrus extracts from different varieties were compared. By establishing a step-fraction extraction method and purification system, compositions of flavones, flavanones and polymethoxylated flavonoids were purified simultaneously, and 15 monomers were acquired. The results showed that the chemical antioxidant capacities of different segmented products and purified monomers were quite different. The fraction products dominated by flavonoids and flavanones had strong antioxidant capacities, while the fraction products dominated by polymethoxylated flavonoids had poor antioxidant capacities. The flavonoids from the pomelo variety 'Yuhuan Wendan' and purities were vicenin-2 (98.72%), rhoifolin (95.78%) and naringin (99.56%); the flavonoids from the grapefruit variety 'Huyou' and purities were narirutin-4'-O-glucoside (98.42%), eriocitrin (98.74%) and neoeriocitrin (99.17%); the flavonoid from the sweet orange variety 'Lunwan navel orange' and purity was narirutin (98.12%); the flavonoid from the tangerine variety 'Ponkan' and the purity was hesperidin (98.00%); the flavonoids from the mandarin variety 'Ougan' and purities were neohesperidin (98.56%), poncirin (98.03%), isosinensetin (98.76%), sinensetin (98.77%), nobiletin (99.15%), tangeretin (99.20%) and 5-demethylnobiletin (97.63%). Among the purified monomers, the antioxidant capacities of neoeriocitrin, eriocitrin, hesperidin and neohesperidin were stronger, and they were poorer for nobiletin and tangeretin.

Key words citrus; flavonoids; purification; antioxidation

柑橘(*Citrus* spp.)是芸香科(Rutaceae)柑橘属(*Citrus*)植物,在我国拥有悠久的种植历史和丰富的种质资源。如今,我国柑橘种植逐渐趋于规模化,柑橘加工业也在不断发展。据统计,世界柑橘总产量的33%被用于果汁生产,而商业衍生产品(如鲜榨果汁、脱水产品、果酱和调味剂)需消耗大量果实并产生大量废弃物。由加工业产生的柑橘废料估计超过6 000万t/a,其中柑橘果皮占比为40%~50%^[1-3]。而柑橘果皮中富含的胡萝卜素、精油、果胶、类黄酮、柠檬苦素等生物活性物质,具有抗氧化^[4]、抗过敏^[5]、抗炎^[6]、抗癌^[7-8]、降血压^[9]、降血脂^[9-10]等生物活性。对柑橘果皮等加工废弃物进行合理利用,既可减少产品浪费,避免对环境污染,又可用于天然活性成分的研究开发。

柑橘类黄酮是柑橘中一种多酚类次生代谢产物,种类多样,具有品种特异性和组织特异性;通常,柑橘果皮中的类黄酮含量高于果肉^[11]。迄今已从柑橘中鉴定出250多种类黄酮^[12]。根据类黄酮的基本结构、官能团种类及位置,柑橘中的类黄酮主要有以下7类:黄烷酮、黄酮、黄酮醇、黄烷醇、多甲氧基黄酮、异黄酮和花色苷^[13]。虽然类黄酮在不同柑橘品种中存在种类及含量上的差异,但黄烷酮和多甲氧基黄酮是柑橘中最重要的类黄酮^[14]。在不同柑橘品种中,黄烷酮的种类和含量差异较大:在柚类果皮中,含量最为丰富的是柚皮苷,而在葡萄柚

果皮中,除柚皮苷外,还有较多的橙皮苷、新橙皮苷、圣草次苷、新圣草次苷等;在宽皮柑橘中,橘类中的主要黄烷酮为柚皮芸香苷和橙皮苷,其中橙皮苷含量远高于柚皮芸香苷;在橙类中,酸橙中主要的黄烷酮是柚皮苷与新橙皮苷,而在甜橙中占主导地位的则是柚皮芸香苷和橙皮苷,且2种物质含量相近;柑类中的'瓠柑'则比较特殊,与其他柑橘品种相比,其主要的黄烷酮是新橙皮苷^[15]。多甲氧基黄酮是一类特殊的类黄酮,主要分布在柑橘油胞中,而在果肉等其他果实组织中几乎没有^[16]。柑橘中主要存在的多甲氧基黄酮为川陈皮素和橘皮素。有研究表明,与其他类黄酮相比,多甲氧基黄酮在温州蜜柑等普通栽培品种中含量较少,但在'瓠柑'等特色果实中含量较高^[17]。柑橘果实中的黄酮类化合物有抗氧化、抗癌、抗炎等功能,不同柑橘种类或品种果实中的黄酮类化合物因结构不同,其抗氧化活性具有较大差异。黄烷酮组分和单体具有较强的自由基清除能力和金属离子还原作用,而多甲氧基黄酮组分和单体仅在细胞评价体系中表现出较强的抗氧化能力,其化学抗氧化能力较弱^[17]。本研究以柚类、葡萄柚类、甜橙类、酸橙类、橘类和柑类的代表性品种为材料,通过建立分段分离和半制备色谱纯化方法,对不同品种柑橘果实的类黄酮提取物进行纯化,并对柑橘分段产物和单体进行抗氧化评价,旨在为柑橘类黄酮的分离纯化和开发利用提

供技术储备和支撑。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

本研究所采用的 6 个试验材料于 2019 年采自浙江衢州、台州、金华、温州及湖北宜昌(表 1)。果实采摘时均处于商品成熟期,于采收后 24 h 内运至浙江大学果树科学研究所实验室,挑选出大小相对一致、色泽均匀、无机械伤及病虫害的果实,用清水进行清洗,将果皮分离后立即在液氮中冷冻,然后于真空冷冻干燥机内冷冻干燥 72 h,储存于-40 ℃冰箱中,备用。

表 1 果实材料、采收地点和采收日期			
Table 1 Fruit materials, harvest places and harvest dates			
品种 Variety	种类 Type	采收日期 Harvest date	采收地点 Harvest place
胡柚 Huyou (HY)	葡萄柚类	2019-11-12	浙江衢州
玉环文旦 Yuhuan Wendan (YHWD)	柚类	2019-12-10	浙江台州
伦晚脐橙 Lunwan navel orange (LW)	甜橙类	2019-06-12	湖北宜昌
代代 Daidai (DD)	酸橙类	2019-11-12	浙江金华
瓯柑 Ougan (OG)	柑类	2019-12-12	浙江温州
椪柑 Ponkan (PG)	橘类	2019-11-12	浙江衢州

1.2 主要仪器与试剂

真空冷冻干燥机(FM 25EL-85,美国 VirTis 公司),超声波药品处理机(JBT/C-YCL500T/3P,山东省济宁市金百特电子有限责任公司),高速冷冻离心机(5810R,德国 Eppendorf 公司),旋转蒸发器(Laborota 4000-efficient,德国 Heidolph 公司),低温冷却循环泵(DLSB-2005,杭州大卫科教仪器有限公司),真空浓缩仪(Concentrator plus,德国 Eppendorf 公司),固相萃取柱(Sep-pak® C18,美国 Waters 公司),固相萃取系统(SBAB-57265,美国 Supelco 公司),超高效液相色谱系统(2695 泵-2996 二极管阵列检测器,美国 Waters 公司),超高效液相色谱(1290 Infinity,美国 Agilent 公司),三重四级杆质谱联用系统[Agilent 6460,电喷雾(electrospray ionization, ESI)离子源,美国安捷伦公司],半制备型高效液相色谱仪(2535 四元泵-2998 二极管阵列检测器-2707 自动进样器,美国 Waters 公司),酶标仪(Synergy

H1,美国 Biotek 公司)。

试验中所用色谱级甲醇、乙腈购自美国 Sigma-Aldrich 公司,所用水均为双蒸水,用于超高效液相色谱 (ultra-high performance liquid chromatography, UPLC)及半制备型高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)的样品在进样前均经过 0.22 μm 过滤器过滤,其他分析级试剂均购自中国医药集团(上海)股份有限公司,甜橙黄酮标准品购自云南西力生物技术股份有限公司,新西兰牡荆苷、野漆树苷、圣草次苷、新圣草次苷、柚皮芸香苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、枸橼苷、异甜橙黄酮、川陈皮素、橘皮素、5-去甲基川陈皮素标准品均购自上海源叶生物科技有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 不同品种柑橘果实类黄酮粗提液的制备

分别称取 6 个柑橘品种各 50 g 冷冻干燥果皮粉末,按照料液质量体积比 1:20 加入 80% 乙醇 1 000 mL,超声波辅助提取 30 min,8 000 r/min 离心 10 min,重复 3 次后合并上清液。取 1 mL 上清液置于真空浓缩仪上旋转蒸发至无有机相溶液,溶于 1 mL 色谱级甲醇中,经过滤膜过滤后用 UPLC 检测鉴定类黄酮,重复 3 次。将剩余上清液于 37 ℃条件下减压旋转蒸发以去除乙醇相,然后加水定容至 600 mL。

1.3.2 柑橘类黄酮的 UPLC 分析

利用 Waters 2695-2996 型 UPLC 系统进行类黄酮分析,以 Waters Acquity UPLC HSS T3 (1.8 μm, 2.1 mm×150 mm)液相色谱柱为固定相,流动相为水(流动相 A)和乙腈(流动相 B)。梯度洗脱程序:0~0.5 min,2%~20% B;0.5~2.5 min,20% B;2.5~8.5 min,20%~28% B;8.5~10.5 min,28%~50% B;10.5~15.0 min,50%~98% B;15.0~15.5 min,98%~2% B;15.5~16.0 min,2% B。扫描波长为 200~600 nm,流速为 0.4 mL/min,柱温为 30 ℃,进样体积为 2 μL。

将标准品用色谱级甲醇配成 1 mg/mL 的母液,然后按 2⁰,2⁻¹,2⁻²,⋯,2⁻⁷ 8 个浓度梯度稀释,各取 2 μL 进行 UPLC 检测。以峰面积为横坐标、标准品浓度为纵坐标绘制标准曲线。

1.3.3 不同品种柑橘果实类黄酮分段产物的富集

首先进行固相萃取柱的动态试验,以确定不同品种柑橘果实的最佳上样量、洗脱浓度和洗脱体

积。用2倍柱体积(bed volume, BV)甲醇将Sep-pak® C18固相萃取柱活化,然后用5 BV水将其平衡。上样后用20 BV的蒸馏水冲洗去杂,随后用不同浓度的甲醇洗脱液对不同粗提液进行洗脱,每个柑橘品种均可得到3个不同组分的洗脱液。在37℃条件下,利用旋转蒸发仪将洗脱液蒸至无有机相,分别得到各分段产物粉末。

1.3.4 类黄酮的进一步纯化及鉴定

通过固相萃取柱对供试柑橘果实类黄酮进行初步分离后,进一步通过半制备型HPLC(2535四元泵-2998二极管阵列检测器-2707自动进样器)纯化各分段产物粉末。

分段产物I及分段产物II的色谱条件。以SunFire™ prep C18 OBDTM制备柱(5 μm, 19 mm×250 mm)为固定相;流动相为水(流动相A)和甲醇(流动相B)。梯度洗脱程序:0~10 min, 10%~40% B; 10~40 min, 40%~60% B; 40~60 min, 60%~80% B; 60~80 min, 80%~100% B; 80~90 min, 100% B; 90~95 min, 100%~10% B。扫描波长为200~600 nm,流速为3 mL/min,柱温为25℃,进样体积为300 μL,进样质量浓度为100 mg/mL。分段产物III的色谱条件:以SunFire™ prep C18 OBDTM制备柱(5 μm, 19 mm×250 mm)为固定相;流动相为水(流动相A)和乙腈(流动相B)。梯度洗脱程序:0~5 min, 10%~60% B; 5~20 min, 60%~80% B; 20~34 min, 80%~86% B; 34~44 min, 86% B; 44~48 min, 86%~100% B; 48~50 min, 100% B; 50~53 min, 100%~10% B。扫描波长为200~600 nm,流速为5 mL/min,柱温为25℃,进样体积为200 μL,进样质量浓度为100 mg/mL。分管收集单体后,利用UPLC-ESI-串联质谱法(UPLC-ESI-tandem mass spectrometry, UPLC-ESI-MS/MS)对分离物质进行鉴定,使用UPLC-二极管阵列检测器(UPLC-diode array detector, UPLC-DAD)系统通过标准曲线法对单体纯度进行测定。

采用UPLC-串联三重四极杆飞行时间(UPLC-triple quadrupole-time of flight, UPLC-Triple-TOF) 5600+液质联用仪进行质谱分析:正负离子扫描模式;扫描范围100~1 500 m/z ;雾化气1和雾化气2均为379.2 kPa;气帘气241.3 kPa;离子源温度600℃(正),550℃(负);离子源电压5 500 V(正),4 500 V(负);一级扫描中,去簇电压100 V,聚焦电

压10 V;二级扫描中,使用飞行时间质谱-一级预扫描和触发的二级扫描-信息依赖扫描离子积累模式(time of flight mass spectrometer-product ion-information dependent acquisition, TOF MS-Product Ion-IDA)采集质谱数据,诱导碰撞解离(collision-induced dissociation, CID)能量为(40±20) eV,进样前,用校正液传输系统(calibration delivery system, CDS)泵做质量轴校正,使质量轴误差小于 2×10^{-6} 。

1.3.5 体外化学抗氧化能力评价

对从不同柑橘品种中分离纯化得到的分段产物和15种单体进行化学抗氧化活性检测。根据本课题组前期报道的方法^[18]进行并稍作修改。

1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical, DPPH)法:取2 μL适当稀释(稀释后浓度如附表1和附表2所示, <http://www.zjujournals.com/agr/CN/10.3785/j.issn.1008-9209.2021.06.152>)的分段产物及纯化单体溶液加到96孔板中,随后加入198 μL现配的60 μmol/L的DPPH溶液,在室温条件下避光反应2 h,用酶标仪测定其在517 nm波长下的吸光度,以6-羟基-2,5,7,8-四甲基色烷-2-羧酸(6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, Trolox)为对照作标准曲线,计算各品种分段产物及纯化单体对DPPH自由基的清除能力,抗氧化活性以水溶性维生素E当量来表示,试验重复3次。

铁离子还原抗氧化能力(ferric ion reducing antioxidant power, FRAP)法。FRAP工作液的配比:以适量双蒸水溶解无水乙酸钠(NaAc),再加入用乙酸调节pH为3.6的300 mmol/L的NaAc缓冲溶液、10 mmol/L三吡啶基三嗪(tripyridyltriazine, TPTZ)溶液、20 mmol/L的氯化铁(FeCl_3)溶液,三者以10:1:1的体积比混合。取适当稀释(稀释后浓度如附表2所示)的10 μL分段产物及纯化单体溶液与90 μL FRAP工作液混合,加到96孔板中,在室温条件下避光反应5 min,用酶标仪测定其在593 nm波长下的吸光度,以Trolox为对照作标准曲线,计算各品种分段产物及纯化单体对FRAP铁离子的还原能力,抗氧化活性以水溶性维生素E当量来表示,试验重复3次。

2,2'-联氮-双-3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸[2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), ABTS]法。ABTS工作液的配比:将7 mmol/L的

ABTS溶液和2.6 mmol/L的过硫酸钾($K_2S_2O_8$)溶液按照1:1的体积比混合,在室温条件下避光反应12 h后用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)稀释至 $D(734\text{ nm})\approx 0.63$ 的ABTS工作液。取适当稀释(稀释后浓度如附表1和附表2所示)的10 μL 分段产物及纯化单体溶液与200 μL ABTS工作液混合,加到96孔板中,在室温条件下避光反应5 min后测定其在734 nm波长下的吸光度,以Trolox为对照作标准曲线,计算ABTS自由基清除能力,抗氧化活性以水溶性维生素E当量来表示,试验重复3次。

氧化自由基吸收能力(oxygen radical absorbance capacity, ORAC)法:在96孔板中加入25 μL 适当稀释(稀释后浓度如附表1和附表2所示)的分段产物及纯化单体溶液,再加入以PBS溶解的150 μL 40 nmol/L荧光素钠溶液,于37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下避光反应10 min后,加入25 μL 150 mmol/L 2,2'-偶氮(2-甲基丙基脒)二盐酸盐[2, 2'-azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride, AAPH]溶液,测定荧光强度(激发波长485 nm,发射波长535 nm,读数间隔2 min,总时长2 h)。使用25 μL PBS为阴性对照,以不含AAPH的孔作为初始荧光值读数孔。以空白样品与样品之间荧光素钠衰减曲线下面积(area under the curve, AUC)的差异作为计算结果。其中第 n 次读数的相对荧光值(f_n)=第 n 次荧光值(F_n)/初始荧光值(F_0), $AUC=2\times(f_0+f_1+\cdots+f_n)-f_n-f_0$, 净面积(net AUC)= $AUC_{\text{样品}}-AUC_{\text{AAPH}^+}$ 。以Trolox为对照作标准曲线,计算ORAC当量,抗氧化活性以水溶性维生素E当量来表示,试验重复3次。

1.3.6 数据处理与统计学分析

试验设置3个生物学重复,用SPSS 20.0软件进

行数据分析,结果表示为平均值 \pm 标准差,使用GraphPad Prism 8.0软件作图。

2 结果与分析

2.1 固相萃取柱的动态试验结果

在固相萃取过程中,样品的上样体积主要由样品的浓度和萃取柱本身的吸附能力决定。根据各柑橘品种类黄酮组分特征,最终确定‘胡柚’‘玉环文旦’‘伦晚脐橙’‘代代’‘瓯柑’‘椪柑’的最佳上样体积分别为10、12、14、6、12、14 BV。各品种分段产物用甲醇洗脱液洗脱的结果表明:分段产物I的最佳洗脱浓度和洗脱体积分别为25%、4 BV, 24%、6 BV, 35%、4 BV, 30%、5 BV, 26%、5 BV, 40%、6 BV;分段产物II的最佳洗脱浓度分别为40%、40%、50%、40%、50%、45%,洗脱体积均为6 BV;分段产物III的最佳洗脱浓度和洗脱体积均为80%、4 BV。

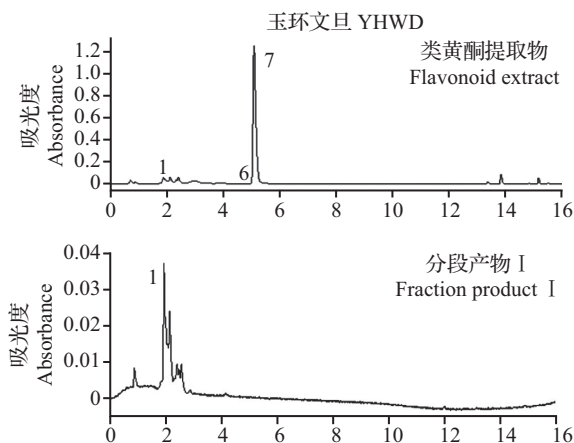
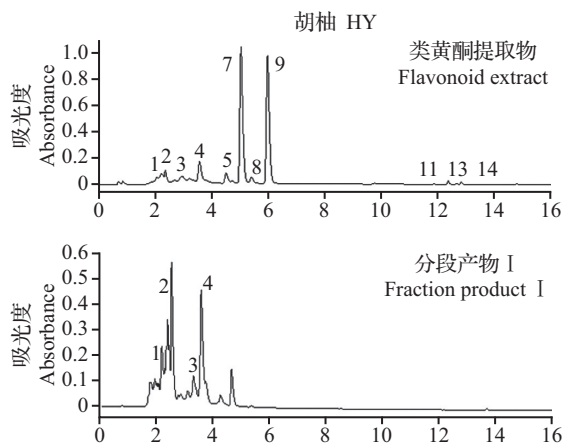
2.2 固相萃取柱的初步富集及半制备型HPLC的纯化结果

通过固相萃取柱的初步富集将各柑橘品种中的类黄酮均分为3个分段产物,每一分段产物中的物质相对于粗提物的液相图而言较为集中,且3个分段产物的回收率均在46.55%以上(图1~3)。

利用半制备型HPLC对6个柑橘品种的各分段产物进一步纯化,按照出峰顺序收集流出液,于37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下真空离心浓缩后得到粉末,进行UPLC检测。

2.3 不同品种柑橘果实的纯化物质鉴定及其纯度检测结果

通过UPLC图谱分析,由半制备型HPLC纯化后



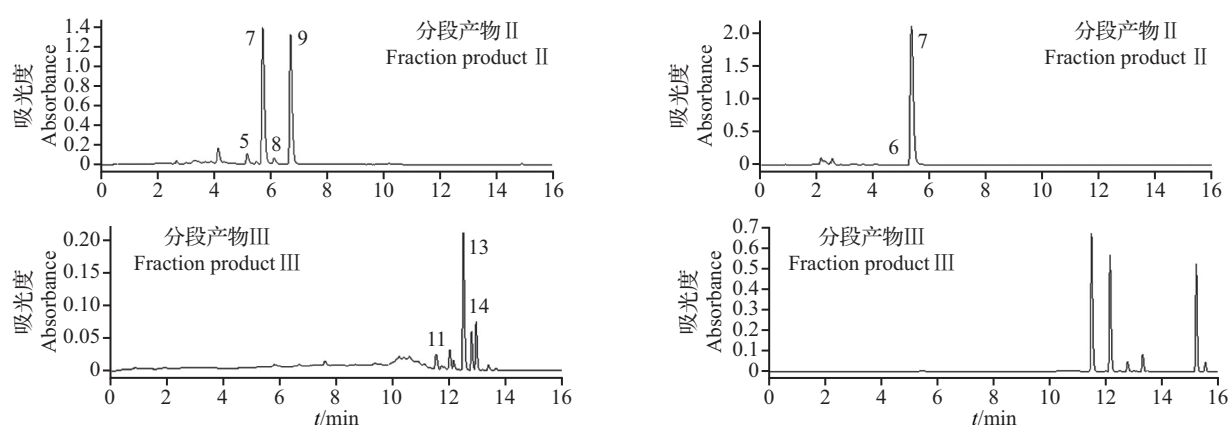


图1 ‘胡柚’‘玉环文旦’果皮的类黄酮提取物及其各分段产物液相色谱图

Fig. 1 Liquid chromatograms of the flavonoid extracts of ‘Huyou’ (HY) and ‘Yuhuan Wendan’ (YHWD) peels and their fraction products

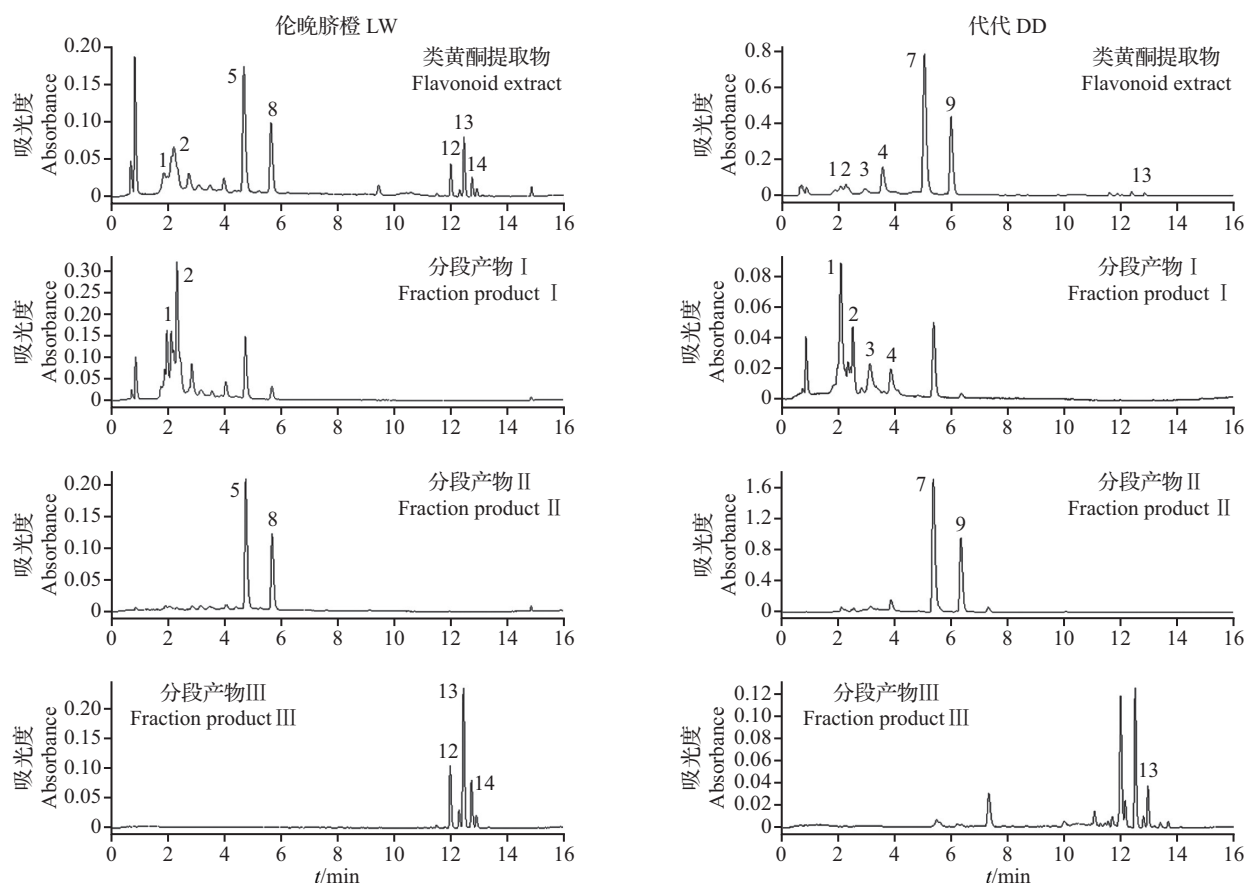


图2 ‘伦晚脐橙’‘代代’果皮的类黄酮提取物及其各分段产物液相色谱图

Fig. 2 Liquid chromatograms of the flavonoid extracts of ‘Luwan navel orange’ (LW) and ‘Daidai’ (DD) peels and their fraction products

的单体可以通过出峰时间和紫外线(ultra violet, UV)吸收图谱进行初步判断,进一步通过UPLC-ESI-MS/MS分析进行物质结构鉴定,结果如图4所示。

峰1的质荷比为593.15[M-H]⁻,在二级质谱片段中,503.12[M-H-C₃H₆O₃]⁻、473.11[M-H-

C₄H₈O₄]⁻、383.08[M-H-C₃H₆O₃-C₄H₈O₄]⁻为典型的离子碎片,这与新西兰牡荆苷的报道^[19]相符。

峰2的质荷比为741.23[M-H]⁻,在二级质谱片段中,579.18[M-H-Glc]⁻、459.12[M-H-Glc-C₈H₈O]⁻离子碎片与柚皮芸香苷-4'-O-葡萄糖苷的

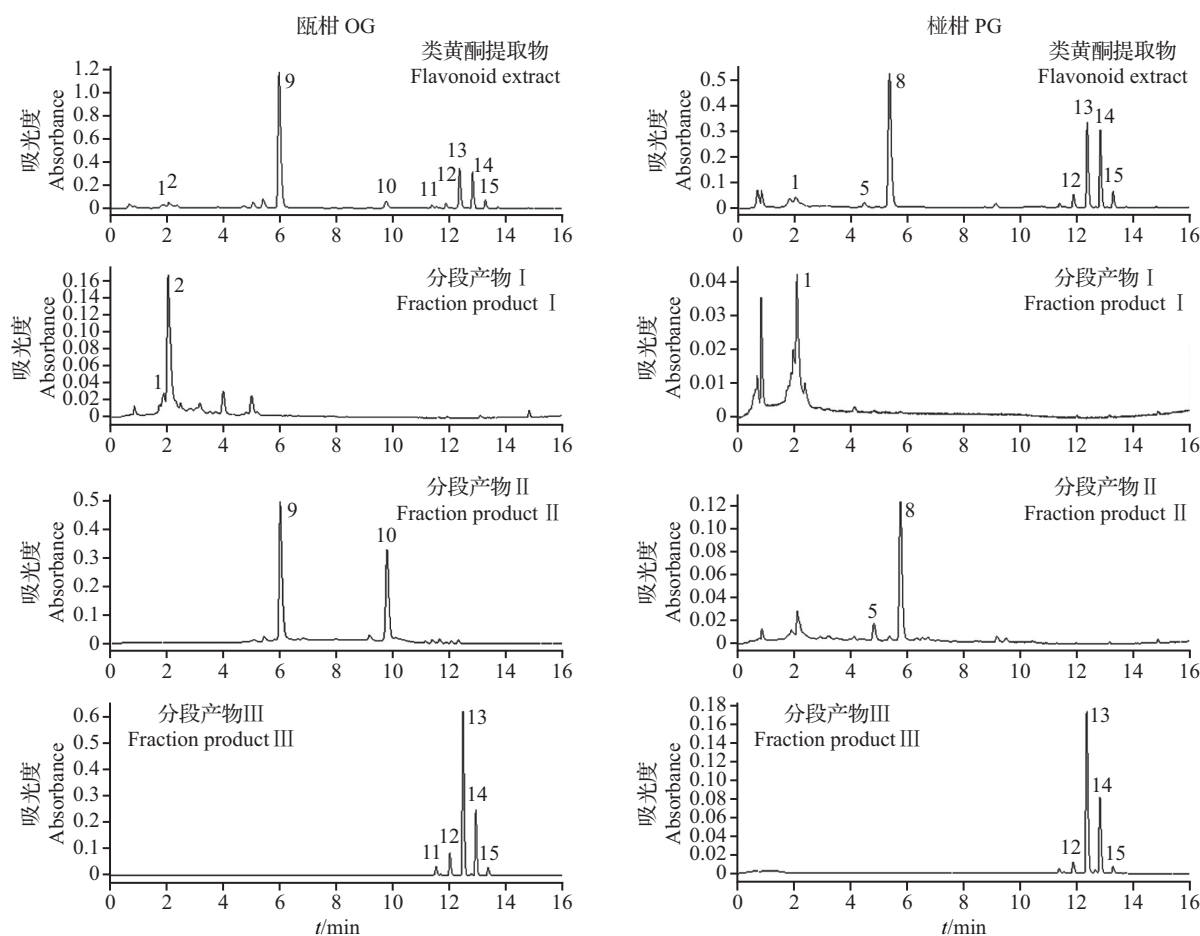


图3 ‘瓯柑’‘椪柑’果皮的类黄酮提取物及其各分段产物液相色谱图

Fig. 3 Liquid chromatograms of the flavonoid extracts of ‘Ougan’ (OG) and ‘Ponkan’ (PG) peels and their fraction products

报道^[20]相符。

峰3的质荷比为595.00[M-H]⁻,具有典型的286.90[M-H-Rha-Glc]⁻离子碎片,与圣草次苷的报道^[21]相符。

峰4的质荷比为595.00[M-H]⁻,具有典型的150.80[M-H-Glc-Rha-C₈H₈O₂]⁻、286.80[M-H-Rha-Glc]⁻、458.90[M-H-C₈H₈O₂]⁻离子碎片,与新圣草次苷的特征碎片^[20]相符。

峰5的质荷比为578.90[M-H]⁻,有458.70[M-H-C₈H₈O]⁻、270.90[M-H-Rha-Glc]⁻、150.90[M-H-Glc-Rha-C₈H₈O]⁻特征碎片,与柚皮芸香苷的报道^[20]一致。

峰6的质荷比为577.16[M-H]⁻,具有典型的268.04[M-H-Rha-Glc]⁻离子碎片,符合对野漆树苷的描述^[20]。

峰7的质荷比为579.00[M-H]⁻,具有458.90[M-H-C₈H₈O]⁻、150.80[M-H-Glc-Rha-C₈H₈O]⁻特征碎片,可确定为柚皮苷^[22]。

峰8的质荷比为609.19[M-H]⁻,具有301.07[M-H-Rha-Glc]⁻特征碎片,与橙皮苷的报道^[21]相符。

峰9的质荷比为609.00[M-H]⁻,具有300.80、146.90特征峰的离子碎片,与新橙皮苷的报道^[23]相符。

峰10的质荷比为593.10[M-H]⁻,其具有的284.80[M-H-Rha-Glc]⁻、481.00特征峰的离子碎片与枸橼苷的报道^[24]一致。

峰11的质荷比为373.20[M+H]⁺,其具有的343.20特征峰的离子碎片与异甜橙黄酮的报道^[23]一致。

峰12的质荷比为373.20[M+H]⁺,其具有的343.10、313.10特征峰的离子碎片与甜橙黄酮的报道^[23]一致。

峰13的质荷比为403.10[M+H]⁺,具有373.10[M+H-2CH₃]⁺特征碎片,可确定为川陈皮素^[25]。

峰14的质荷比为373.20[M+H]⁺,具有343.10

$[M+H-2CH_3]^+$ 特征碎片,与橘皮素的报道^[26]相符。

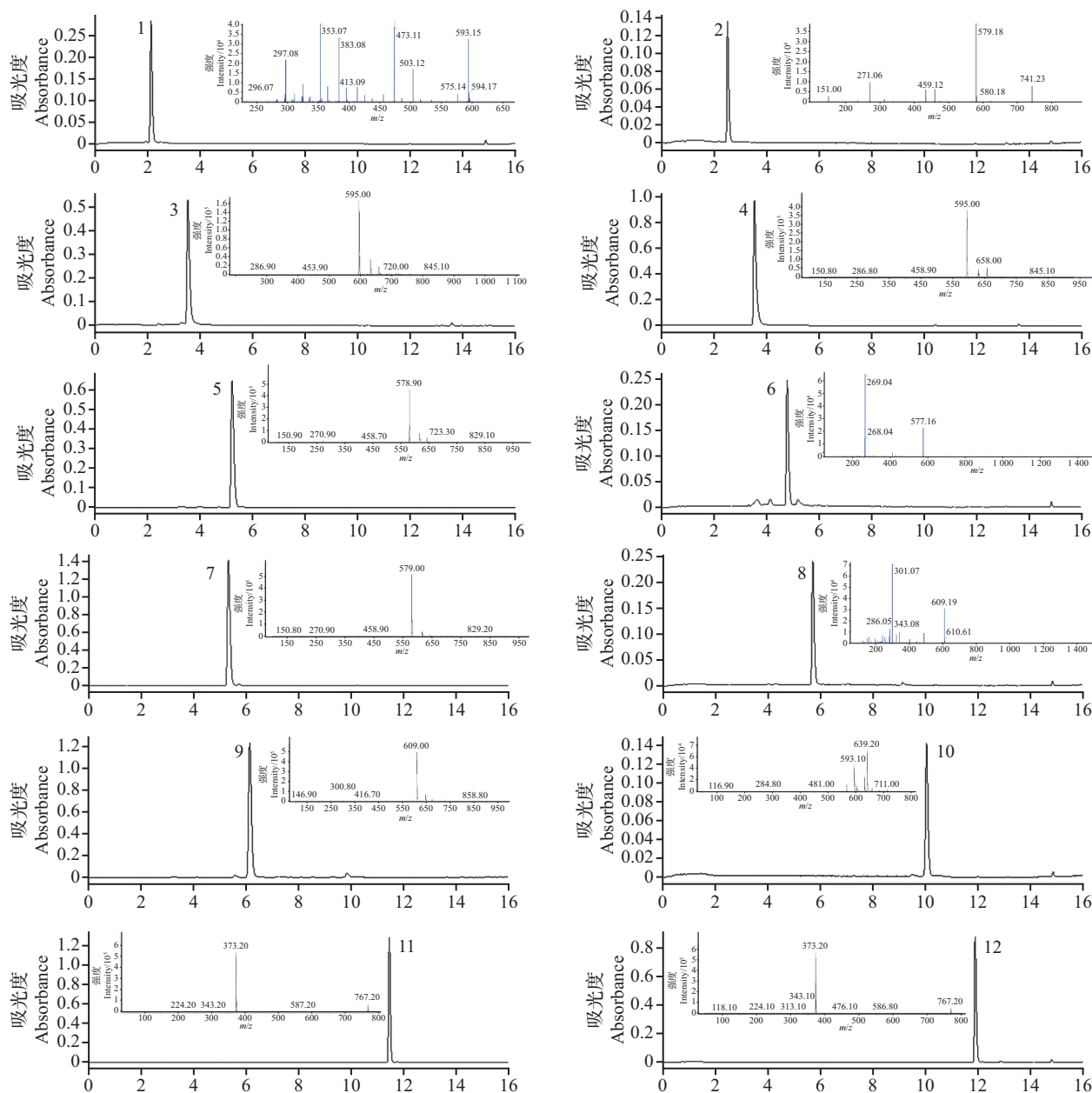
峰15的质荷比为389.10 $[M+H]^+$,其具有的373.10 $[M+H-CH_3]^+$ 特征碎片与5-去甲基川陈皮素的报道^[25]相符。

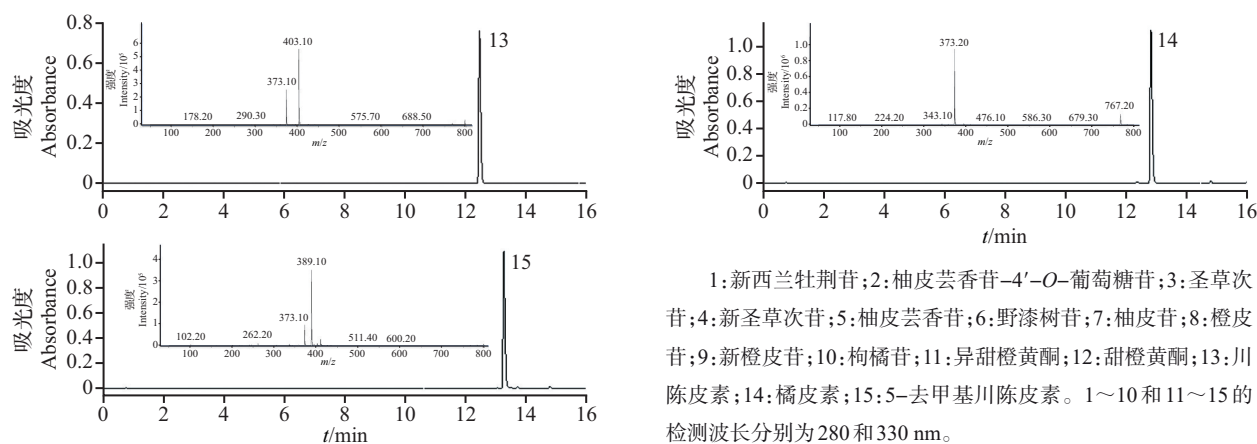
使用UPLC峰面积标准曲线法对15种化合物进行纯度分析,从各品种中纯化出的单体纯度均可达到95%以上。其中:‘玉环文旦’中的特色物质为柚皮苷,最终纯度为99.56%,从该品种中纯化得到的新西兰牡荆苷、野漆树苷的最终纯度可达到98.72%、95.78%;从‘胡柚’中纯化得到的柚皮芸香苷-4'-O-葡萄糖苷、圣草次苷、新圣草次苷的纯度分别为98.42%、98.74%、99.17%;从‘伦晚脐橙’中得

到的柚皮芸香苷的纯度为98.12%;从‘椪柑’中纯化得到的橙皮苷的纯度为98.00%。此外,研究发现,新橙皮苷在‘胡柚’和‘瓯柑’中均大量存在,但是在‘瓯柑’中由于其他物质的干扰较少,并且‘瓯柑’中存在大量的多甲氧基黄酮,所以选择从‘瓯柑’中纯化新橙皮苷、枸橼苷、异甜橙黄酮、甜橙黄酮、川陈皮素、橘皮素、5-去甲基川陈皮素,其纯度分别为98.56%、98.03%、98.76%、98.77%、99.15%、99.20%、97.63%。

2.4 不同品种柑橘果实的分段产物体外化学抗氧化能力测定结果

如图5所示,经过4种评价方法的测定,不同品





1: Vicenin-2; 2: Narirutin-4'-O-glucoside; 3: Eriocitrin; 4: Neoeriocitrin; 5: Narirutin; 6: Rhoifolin; 7: Naringin; 8: Hesperidin; 9: Neohesperidin; 10: Poncirin; 11: Isosinensetin; 12: Sinensetin; 13: Nobiletin; 14: Tangeretin; 15: 5-demethylnobiletin. The detection wavelengths are 280 and 330 nm for 1-10 and 11-15, respectively.

图4 利用半制备型HPLC纯化得到的15个单体的UPLC色谱图和UPLC-ESI-MS/MS质谱图

Fig. 4 UPLC chromatograms and UPLC-ESI-MS/MS spectra of 15 monomers purified by semi-preparative HPLC

种的类黄酮分段产物的抗氧化活性存在一定的差异性。

在对DPPH自由基清除能力方面,‘椪柑’和‘胡柚’分段产物I和II的自由基清除能力高于‘代代’‘瓯柑’‘玉环文旦’和‘伦晚脐橙’。其中‘椪柑’和‘胡柚’的分段产物I自由基清除能力最强,分别为0.078和0.077 g/g。同时,‘椪柑’和‘胡柚’分段产物II的自由基清除能力显著强于除‘代代’分段产物I外的其他各分段产物。在6个品种中,各品种的分段产物I的自由基清除能力均显著高于分段产物II和分段产物III。‘胡柚’‘伦晚脐橙’‘代代’‘瓯柑’和‘椪柑’的分段产物II则强于分段产物III。仅有‘玉环文旦’的分段产物III的自由基清除能力强于分段产物II,但仍然弱于分段产物I。

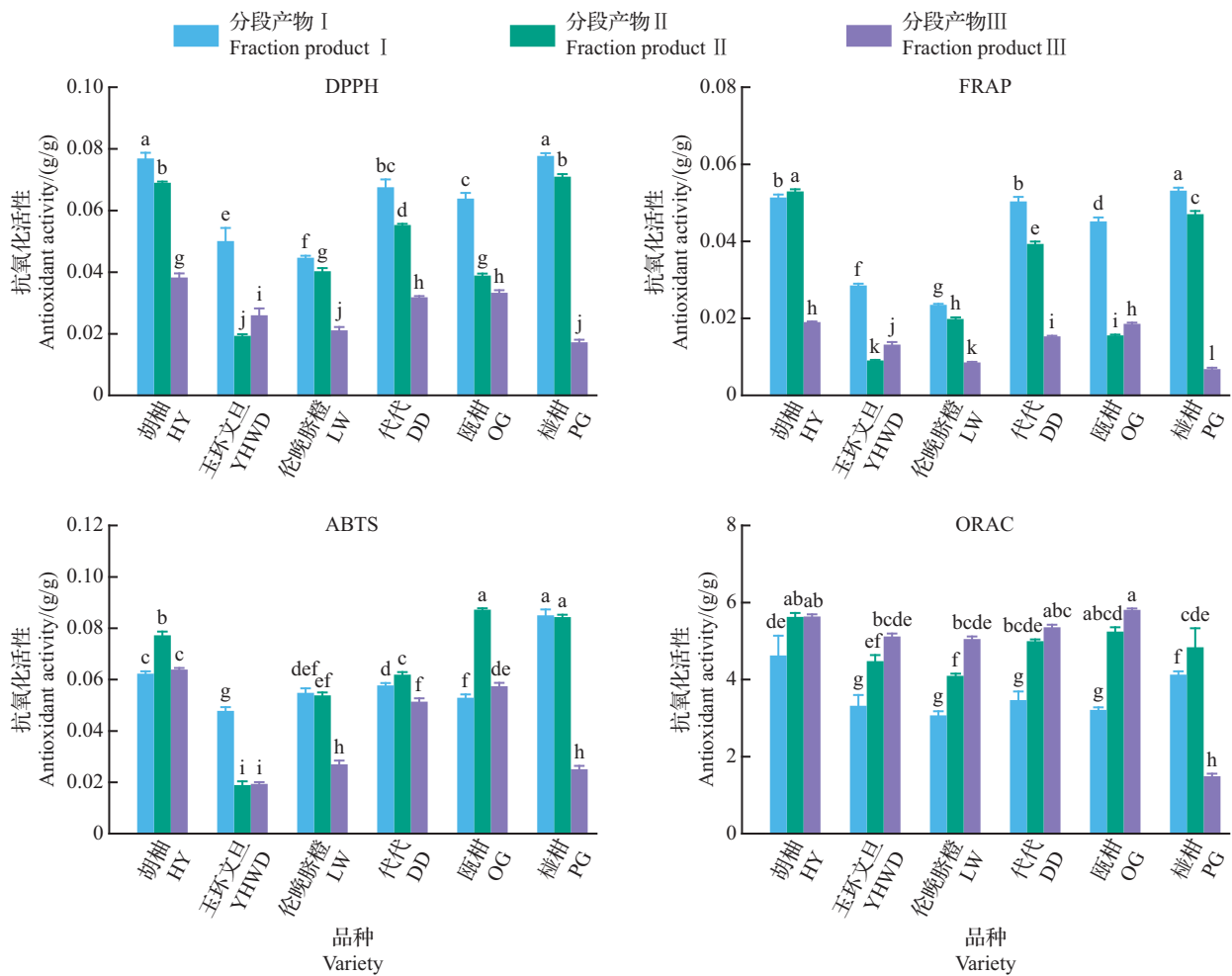
对于FRAP,‘椪柑’分段产物I(0.053 g/g)及‘胡柚’分段产物II(0.053 g/g)表现出较强的铁离子还原能力;除此之外,‘胡柚’和‘代代’的分段产物I的铁离子还原能力显著强于其他各分段产物。在‘伦晚脐橙’‘代代’和‘椪柑’3个品种中,分段产物I与分段产物II的还原能力显著强于分段产物III。在‘玉环文旦’和‘瓯柑’中,分段产物III的铁离子还原能力强于分段产物II,但均不如分段产物I。

在对ABTS自由基清除能力方面,‘瓯柑’分段产物II(0.087 g/g)‘椪柑’分段产物I(0.085 g/g)与分段产物II(0.084 g/g)表现出较强的抗氧化活

性。在‘椪柑’和‘伦晚脐橙’2个品种中,分段产物I与分段产物II间无明显差异,但均显著强于相应的分段产物III。‘玉环文旦’的分段产物I显著强于分段产物II和分段产物III。在‘胡柚’‘代代’和‘瓯柑’中,分段产物II的自由基清除能力显著高于其分段产物I和分段产物III。其次,‘代代’的分段产物I抗氧化活性较强,‘瓯柑’中则是分段产物III较强,‘胡柚’的分段产物I和分段产物III间无明显差异。

对于ORAC,各柑橘品种表现的抗氧化活性与上述3种方法差别较大。抗氧化能力较强的为‘瓯柑’分段产物III(5.816 g/g)‘胡柚’分段产物III(5.642 g/g)‘胡柚’分段产物II(5.632 g/g)‘代代’分段产物III(5.363 g/g)及‘瓯柑’分段产物II(5.251 g/g);除‘椪柑’外,各品种的抗氧化活性最强的为分段产物III,其次为分段产物II,最弱的为分段产物I。在‘椪柑’中,分段产物II的抗氧化活性最强,分段产物III最弱。

为了综合评价各柑橘品种不同分段产物的抗氧化能力,本试验采用综合抗氧化能力(antioxidant potency composite, APC)指数来进行评定。APC指数=(该方法测定值/该方法测定最大值)×100%,最终使用的APC指数为4种抗氧化方法APC指数得分的平均值。6个柑橘品种的分段产物的APC指数如表2所示,18个分段产物的抗氧化APC指数整体变化范围在22.47%~93.47%之间。其中,抗氧化能



短栅上不同小写字母表示在 $P < 0.05$ 水平差异有统计学意义。

Different lowercase letters above the bars indicate significant differences at the 0.05 probability level.

图5 不同柑橘品种分段产物的抗氧化活性评价

Fig. 5 Evaluation of antioxidant activities of fraction products of different citrus varieties

力较强的为‘胡柚’分段产物 II (APC 综合指数为 93.47%)、‘椪柑’分段产物 I (APC 综合指数为 92.12%)、‘椪柑’分段产物 II (APC 综合指数为 90.00%)、‘胡柚’分段产物 I (APC 综合指数为 86.71%)。除‘玉环文旦’和‘胡柚’外,其余柑橘品种的分段产物 I 和分段产物 II 的 APC 指数相近,均高于分段产物 III。‘玉环文旦’中分段产物 I 的抗氧化能力最强,分段产物 II 的抗氧化能力最弱,而‘胡柚’中抗氧化能力表现为分段产物 II > 分段产物 I > 分段产物 III。

2.5 不同品种柑橘果实的纯化单体体外化学抗氧化能力测定结果

对不同柑橘品种的分段产物进行抗氧化活性测定后发现,各品种的分段产物 I 和分段产物 II 抗氧化活性较强,分段产物 III 的主要活性物质成分为

多甲氧基黄酮,其自由基清除能力和铁离子还原能力相对较弱。为了进一步探究各分段产物中所含成分的抗氧化能力,本试验对从各个品种中分离纯化得到的单体进行抗氧化活性检测,结果如图 6 所示。在 DPPH 和 FRAP 方法中,抗氧化能力最强的均为圣草次苷和新圣草次苷,其次为橙皮苷和新橙皮苷;在 ABTS 方法中,新圣草次苷 (2.04 g/g)、圣草次苷 (0.38 g/g) 及新橙皮苷 (0.24 g/g) 的抗氧化能力显著强于其他物质;在 ORAC 方法中,抗氧化能力排序为橙皮苷 (4.82 g/g) > 圣草次苷 (4.58 g/g) > 新圣草次苷 (4.50 g/g) > 新西兰牡荆苷 (4.02 g/g) > 野漆树苷 (4.00 g/g)。对 4 种方法进行综合比较发现:抗氧化能力较强的多为黄烷酮类化合物,而多甲氧基黄酮的抗氧化能力较弱;但是在 FRAP 及 ABTS 的测定方法中,5-去甲基川陈皮素的值高于其他的

表2 不同柑橘品种分段产物抗氧化活性的 APC 指数

Table 2 APC indexes of antioxidant activities of fraction products of different citrus varieties %

品种 Variety	分段产物 Fraction product	APC 指数 APC index				APC 综合指数 APC comprehensive index
		DPPH	FRAP	ABTS	ORAC	
胡柚 HY	I	99.00	96.74	71.42	79.67	86.71
	II	88.84	99.64	88.57	96.84	93.47
	III	49.31	35.92	73.29	97.01	63.88
玉环文旦 YHWD	I	64.50	53.77	54.86	57.17	57.57
	II	24.97	17.13	21.73	77.11	35.23
	III	33.57	24.93	22.31	88.09	42.22
伦晚脐橙 LW	I	57.57	44.33	62.91	52.92	54.43
	II	51.88	37.46	61.74	70.61	55.42
	III	26.87	16.24	31.06	87.02	40.30
代代 DD	I	86.94	94.79	66.17	59.75	76.91
	II	71.19	74.02	70.96	86.07	75.56
	III	41.05	28.88	58.94	92.22	55.27
瓯柑 OG	I	82.25	85.05	60.69	55.39	70.84
	II	50.09	29.35	100.00	90.29	67.43
	III	42.95	35.06	65.82	100.00	60.96
椪柑 PG	I	100.00	100.00	97.43	71.06	92.12
	II	91.40	88.61	96.62	83.33	90.00
	III	22.29	12.98	28.84	25.76	22.47

多甲氧基黄酮及大多数黄烷酮的值。

同样,本试验通过计算抗氧化活性 APC 指数来综合评价纯化单体的抗氧化能力,结果如表 3 所示。在 15 种纯化单体中,新圣草次苷(APC 综合指数为 93.52%)、圣草次苷(APC 综合指数为 78.43%)、橙皮苷(APC 综合指数为 29.47%)3 种黄烷酮类物质抗氧化能力较强。在其余的纯化单体中,APC 综合指数范围在 5%~25% 之间的有 8 种物质,包括 2 种黄酮、5 种黄烷酮及 1 种多甲氧基黄酮,剩余 4 种多甲氧基黄酮的抗氧化活性则较弱。

3 讨论

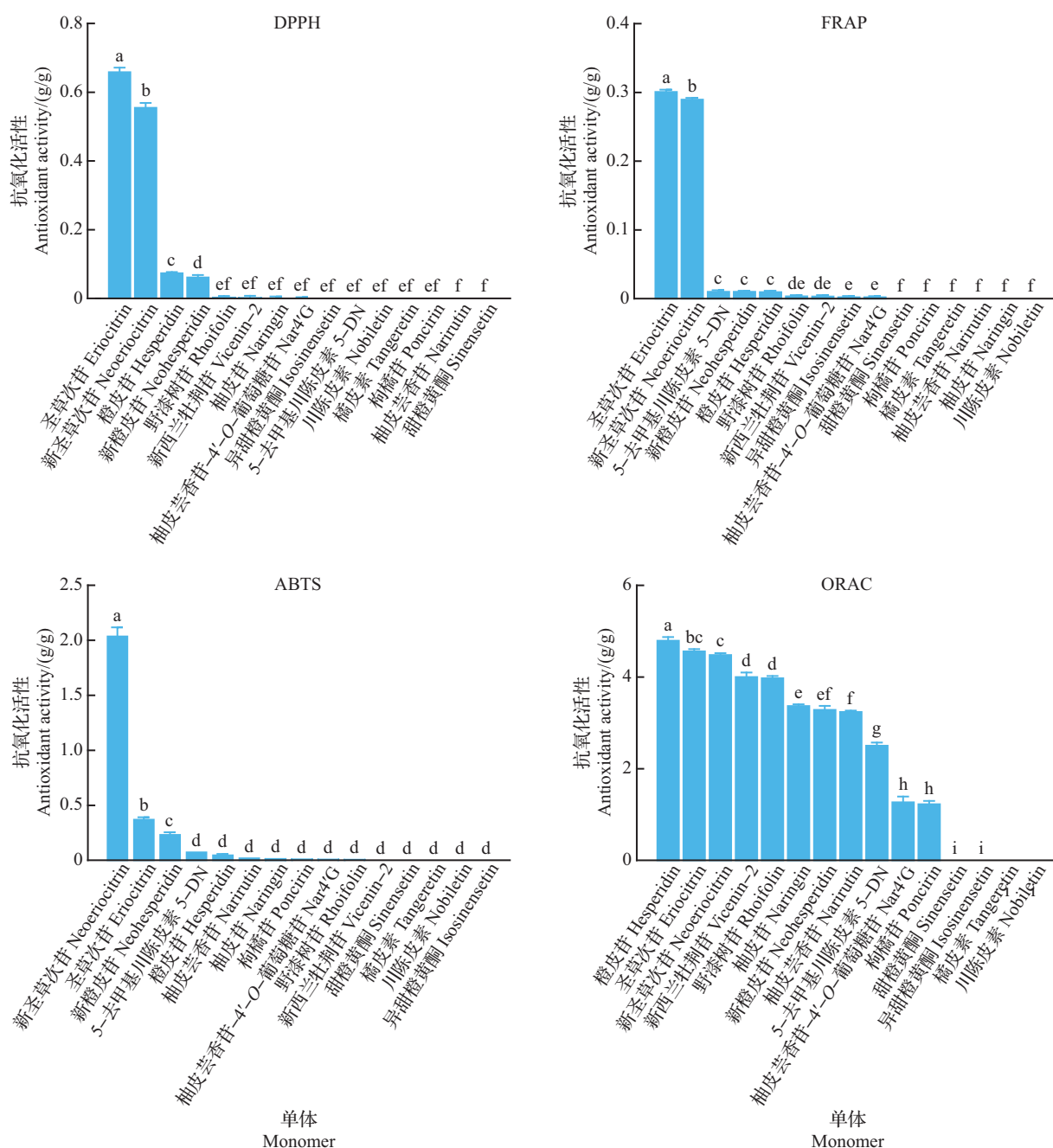
3.1 不同品种柑橘果实中类黄酮的分离纯化

根据类黄酮在不同柑橘品种中的分布特征,本研究采取“分段富集和逐一纯化”的策略,建立了具有针对性的分离纯化体系。分段富集是对单体分离纯化的预处理,有利于后续纯化实验的参数选择,并有利于缩短总体分离和纯化的时间。在前人的分离纯化研究中,研究者利用 HPD100 型树脂与制备型高效液相色谱联用技术,从‘大红袍’红橘中纯化出 5 种纯度均在 95% 以上的多甲氧基黄酮单

体,总纯化时间超过 10 h,并消耗大量有机试剂^[27]。而本研究采用固相萃取代替树脂进行前处理,整体分离纯化时间仅需要 5~6 h,不仅缩短了富集时间,也便于进行多种类黄酮的纯化。针对类黄酮分段富集产物,本研究建立的基于半制备型高效液相色谱技术的柑橘果实的类黄酮单体分离纯化体系,从 6 个柑橘品种的分段富集产物中共分离纯化得到 15 种单体,其中有 4 种单体首次从柑橘果实中分离纯化得到,分别是 从柚类果实中纯化得到的新西兰牡荆苷,从葡萄柚品种中纯化得到的柚皮芸香苷-4'-O-葡萄糖苷和圣草次苷,以及从柑类品种中纯化得到的异甜橙黄酮。

3.2 不同品种柑橘果实的分段产物及纯化单体的化学抗氧化能力评价

本研究发现,富含黄酮和黄烷酮的分段产物的化学抗氧化能力强于富含多甲氧基黄酮的分段产物。在 15 种单体中,抗氧化能力较强的依次为 新圣草次苷、圣草次苷、橙皮苷及新橙皮苷,而川陈皮素、橘皮素等抗氧化能力较弱。化学抗氧化能力与类黄酮的结构密切相关:首先,当其具有大量的酚羟基时,与自由基结合可提供活泼的氢,形成更加稳定的酚类自由基,继而打断链式反应;其次,在一



短栅上不同小写字母表示在 $P<0.05$ 水平差异有统计学意义。

Nar4'G: Narirutin 4'-O-glucoside; 5-DN: 5-demethylnobiletin. Different lowercase letters above the bars indicate significant differences at the 0.05 probability level.

图6 不同柑橘品种纯化单体的抗氧化活性评价

Fig. 6 Evaluation of antioxidant activities of purified monomers of different citrus varieties

定条件下,类黄酮的邻位酚羟基与金属离子螯合,进而抑制脂质过氧化发生。前人研究表明,类黄酮的抗氧化活性不仅与酚羟基的数量和取代位置有关,也与C环上2,3位双键的有无有关^[28],这也证实了本研究纯化单体中的新西兰牡荆苷和野漆树苷2种黄酮也具有一定的抗氧化能力的结论。川陈皮

素等多甲氧基黄酮的结构特点是苯环上的羟基高度甲氧基化,酚羟基较少,从而导致其体外化学抗氧化活性较差,这可能与其分子平面结构与亲脂性被改变有关。然而,5-去甲基川陈皮素的抗氧化活性强于大多数的多甲氧基黄酮,与其他多甲氧基黄酮相比,其5位的酚羟基可能发挥了主要作用。

表 3 不同柑橘品种纯化单体的抗氧化活性 APC 指数

Table 3 APC indexes of antioxidant activities of purified monomers of different citrus varieties

%

单体 Monomer	APC 指数 APC index				APC 综合指数 APC comprehensive index
	DPPH	FRAP	ABTS	ORAC	
新圣草次苷 Neocitricin	84.28	96.28	100.00	93.50	93.52
圣草次苷 Eriocitrin	100.00	100.00	18.56	95.14	78.43
橙皮苷 Hesperidin	11.54	3.63	2.70	100.00	29.47
新橙皮苷 Neohesperidin	9.67	3.81	11.80	68.61	23.48
新西兰牡荆苷 Vicenin-2	0.76	1.53	0.59	83.50	21.60
野漆树苷 Rhoifolin	0.90	1.65	0.72	82.95	21.55
柚皮苷 Naringin	0.41	0.24	1.08	70.42	18.05
柚皮芸香苷 Narirutin	0.00	0.26	1.36	67.72	17.34
5-去甲基川陈皮素 5-demethylnobiletin	0.00	3.86	4.01	52.43	15.07
柚皮芸香苷-4'-O-葡萄糖苷 Narirutin 4'-O-glucoside	0.33	1.18	0.85	26.81	7.29
枸橼苷 Poncirin	0.00	0.35	0.87	25.93	6.79
异甜橙黄酮 Isosinensetin	0.00	1.20	0.00	0.11	0.33
甜橙黄酮 Sinensetin	0.00	0.43	0.24	0.42	0.27
橘皮素 Tangeretin	0.00	0.29	0.18	0.00	0.12
川陈皮素 Nobiletin	0.00	0.21	0.11	0.00	0.08

柑橘果实的类黄酮分段产物及单体在不同的评价体系下发挥着不同的抗氧化效果。柑橘类黄酮对 DPPH 和 ABTS 自由基的清除能力相似,而对 ORAC 抗氧化能力具有一定的差异。前 2 种方法中抗氧化能力较强的分段产物 I 在 ORAC 的抗氧化评价体系中表现出了较低水平,这可能是由于 ORAC 的评价方法更偏重于水溶性物质,样品的溶解度对试验结果存在一定的影响。前人研究中也发现了相似结果^[15],说明不同评价方法对抗氧化能力指标会产生不同的影响。

4 结论

本研究利用超声波辅助提取、固相萃取与半制备型 HPLC 相结合的方式,建立了从不同柑橘品种中分离纯化其主要类黄酮的体系。利用固相萃取完成了柑橘类黄酮粗提物中黄酮组分(分段产物 I)、黄烷酮组分(分段产物 II)和多甲氧基黄酮组分(分段产物 III)的富集。利用半制备型 HPLC 从各分段产物中纯化得到了纯度高于 95% 的 2 种黄酮(新西兰牡荆苷、野漆树苷)、8 种黄烷酮(柚皮芸香苷-4'-O-葡萄糖苷、圣草次苷、新圣草次苷、柚皮苷、柚皮芸香苷、橙皮苷、新橙皮苷、枸橼苷)及 5 种多甲氧基黄酮(异甜橙黄酮、甜橙黄酮、川陈皮素、

橘皮素、5-去甲基川陈皮素)。但此分离体系仍然存在回收率较低的问题,如何在保证纯度的同时提高单体的回收率尚待进一步研究。

柑橘类黄酮的化学抗氧化能力与其结构有关。各柑橘品种的不同分段产物及单体间的抗氧化活性差异较大,黄酮及黄烷酮分段产物的化学抗氧化能力强于富含多甲氧基黄酮的分段产物。纯化单体中,新圣草次苷、圣草次苷、橙皮苷及新橙皮苷的化学抗氧化能力较强,川陈皮素和橘皮素的化学抗氧化能力较弱。关于柑橘类黄酮的抗氧化构效关系及作用机制有待通过细胞或动物模型深入探索,同时,类黄酮单体之间是否存在协同或拮抗关系及其在体内的效应是否相同也有待进一步研究。

参考文献(References):

- [1] MAHATO N, SINHA M, SHARMA K, et al. Modern extraction and purification techniques for obtaining high purity food-grade bioactive compounds and value-added co-products from citrus wastes. *Foods*, 2019,8(11):523. DOI:10.3390/foods8110523
- [2] CASTRO L D, DOLORES M. Towards a comprehensive exploitation of agrofood residues: olive tree-olive oil as example. *Comptes Rendus Chimie*, 2014,17(3):252-260. DOI: 10.1016/j.crci.2013.11.010
- [3] ROCÍO C, SONIA M C, ALBERTO M, et al. Evaluation of the effect of high pressure on total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activity of citrus peels.

- Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2015, 31:37–44. DOI:10.1016/j.ifset.2015.07.005
- [4] SHARMA K, MAHATO N, LEE Y R. Extraction, characterization and biological activity of citrus flavonoids. *Reviews in Chemical Engineering*, 2018,35(2):265–284. DOI: 10.1515/revce-2017-0027
- [5] MAHATO N, SHARMA K, SINHA M, et al. Citrus waste derived nutra-/pharmaceuticals for health benefits: current trends and future perspectives. *Journal of Functional Foods*, 2018,40:307–316. DOI:10.1016/j.jff.2017.11.015
- [6] GAO Z, GAO W, ZENG S L, et al. Chemical structures, bioactivities and molecular mechanisms of citrus polymethoxyflavones. *Journal of Functional Foods*, 2018,40:498–509. DOI:10.1016/j.jff.2017.11.036
- [7] XIAN W, SONG M Y, QIU P J, et al. Synergistic chemopreventive effects of nobiletin and atorvastatin on colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 2017,38(4):455–464. DOI:10.1093/carcin/bgx018
- [8] SONG M Y, WU X, CHAROENSINPHON N, et al. Dietary 5-demethylnobiletin inhibits cigarette carcinogen NNK-induced lung tumorigenesis in mice. *Food & Function*, 2017, 8(3):954–963. DOI:10.1039/C6FO01367H
- [9] LI S M, PAN M H, LO C Y, et al. Chemistry and health effects of polymethoxyflavones and hydroxylated polymethoxyflavones. *Journal of Functional Foods*, 2009,1(1):2–12. DOI:10.1016/j.jff.2008.09.003
- [10] 孙崇德. 柑桔柠檬苦素、诺米林、吡啶酮的检测及相关含量与生物活性研究. 杭州:浙江大学,2006.
- SUN C D. Citrus limonin, nomilin, acridinone detection and related content and biological activity research. Hangzhou: Zhejiang University, 2006. (in Chinese with English abstract)
- [11] 张九凯. 瓯柑和胡柚果实黄酮类化合物组分鉴定、分离纯化及生物活性研究. 杭州:浙江大学,2013.
- ZHANG J K. Identification, separation, purification and biological activity of flavonoids in Ougan and Huyou fruits. Hangzhou: Zhejiang University, 2013. (in Chinese with English abstract)
- [12] WANG F, CHEN L, CHEN H P, et al. Analysis of flavonoid metabolites in citrus peels (*Citrus reticulata* “Dahongpao”) using UPLC–ESI–MS/MS. *Molecules*, 2019,24(15):2680. DOI: 10.3390/molecules24152680
- [13] 康亚兰,裴瑾,蔡文龙,等. 药用植物黄酮类化合物代谢合成途径及相关功能基因的研究进展. 中草药,2014,45(9): 1336–1341. DOI:10.7501/j.issn.0253–2670.2014.09.026
- KANG Y L, PEI J, CAI W L, et al. Research progress on flavonoid metabolic synthesis pathway and related function genes in medicinal plant. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2014,45(9):1336–1341. (in Chinese with English abstract)
- [14] DONNA L D, TAVERNA D, MAZZOTTI F, et al. Comprehensive assay of flavanones in citrus juices and beverages by UHPLC–ESI–MS/MS and derivatization chemistry. *Food Chemistry*, 2013,141(3):2328–2333. DOI:10. 1016/j.foodchem.2013.05.034
- [15] 钱井. 柑橘黄酮类化合物组分鉴定与抗氧化活性研究. 杭州:浙江大学,2017.
- QIAN J. Identification and antioxidant activity of citrus flavonoids. Hangzhou: Zhejiang University, 2017. (in Chinese with English abstract)
- [16] CHEN J J, ZHANG H Y, PANG Y B, et al. Comparative study of flavonoid production in lycopene-accumulated and blonde-flesh sweet oranges (*Citrus sinensis*) during fruit development. *Food Chemistry*, 2015,184:238–246. DOI:10. 1016/j.foodchem.2015.03.087
- [17] 王岳. 柑橘果实多甲氧基黄酮分离纯化及其抗氧化能力研究. 杭州:浙江大学,2020.
- WANG Y. Separation and purification of polymethoxy flavonoids from citrus fruits and their antioxidant capacity. Hangzhou: Zhejiang University, 2020. (in Chinese with English abstract)
- [18] 臧文静. 不同品种柑橘果实黄酮类化合物组分鉴定与抗氧化活性研究. 杭州:浙江大学,2019.
- ZANG W J. Identification and antioxidant activity of flavonoids in different citrus fruits. Hangzhou: Zhejiang University, 2019. (in Chinese with English abstract)
- [19] 刘建群,舒积成,张锐,等. 新西兰牡荆苷等4种碳苷黄酮的电喷雾质谱裂解规律研究. 中国实验方剂学杂志,2013,19 (8):72–76.
- LIU J Q, SHU J C, ZHANG R, et al. Study on the electrospray mass spectrometry cleavage law of four carbon glycoside flavonoids including vitexin from New Zealand. *Chinese Journal of Experimental Pharmacology*, 2013,19(8): 72–76. (in Chinese with English abstract)
- [20] ZENG X, SU W W, ZHENG Y Y, et al. UFLC–Q–TOF–MS/MS-based screening and identification of flavonoids and derived metabolites in human urine after oral administration of *Exocarpium Citri Grandis* extract. *Molecules*, 2018,23(4): 895. DOI:10.3390/molecules23040895
- [21] DE BEER D, SCHULZE A E, JOUBERT E, et al. Food ingredient extracts of *Cyclopia subternata* (honeybush): variation in phenolic composition and antioxidant capacity. *Molecules*, 2012,17(12):14602–14624. DOI:10.3390/molecules 171214602
- [22] 谢文斌,熊小婷,席绍峰,等. 超高效液相色谱–四极杆串联飞行时间质谱法鉴定育发化妆品中4种植物功效成分. 分析测试学报,2016,35(2):164–171. DOI:10.3969/j.issn.1004–4957.2016.02.006
- XIE W J, XIONG X T, XI S F, et al. Identification of four plant functional ingredients in hair-raising cosmetics by ultra performance liquid chromatography–quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Instrumental Analysis*, 2016,35(2):164–171. (in Chinese with English abstract)
- [23] BAI Y, ZHENG Y Y, PANG W J, et al. Identification and comparison of constituents of *Aurantii Fructus* and *Aurantii Fructus Immaturus* by UFLC–DAD–triple TOF–MS/MS. *Molecules*, 2018,23(4):803. DOI:10.3390/molecules23040803
- [24] ZHAO X J, GUO P M, PANG W H, et al. A rapid UHPLC–

- QqQ-MS/MS method for the simultaneous qualitation and quantitation of coumarins, furocoumarins, flavonoids, phenolic acids in pummelo fruits. *Food Chemistry*, 2020,325:126835. DOI:10.1016/j.foodchem.2020.126835
- [25] ABAD-GARCÍA B, GARMÓN-LOBATO S, BERRUETA L A, et al. On line characterization of 58 phenolic compounds in *Citrus* fruit juices from Spanish cultivars by high-performance liquid chromatography with photodiode-array detection coupled to electrospray ionization triple quadrupole mass spectrometry. *Talanta*, 2012,99:213–224. DOI:10.1016/j.talanta.2012.05.042
- [26] FERRERES F, GIL-IZQUIERDO A, ANDRADE P B, et al. Characterization of C-glycosyl flavones O-glycosylated by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2007,1161(1/2):214–223. DOI:10.1016/j.chroma.2007.05.103
- [27] 寇广宁. 柑橘属植物(*Citrus* L.)多甲氧基黄酮含量检测、单体纯化及其抗疲劳机理研究. 重庆:西南大学,2019.
- KOU G N. *Citrus* (*Citrus* L.) polymethoxy flavonoids content detection, monomer purification and anti-fatigue mechanism research. Chongqing: Southwest University, 2019. (in Chinese with English abstract)
- [28] 胡春. 黄酮类化合物的抗氧化性质. 中国油脂,1996,21(4):18–21.
- HU C. Antioxidant properties of flavonoids. *China Oils and Fats*, 1996,21(4):18–21. (in Chinese with English abstract)

《浙江大学学报(农业与生命科学版)》简介

《浙江大学学报(农业与生命科学版)》是浙江大学主办的全国性、综合性、学术性期刊。主要刊登农业基础科学与应用科学研究论文。内容涵盖农业和生命科学各个领域,包括作物遗传育种·种质资源,植物保护,生理生态,作物栽培,土壤肥料,园艺,农产品的贮藏·保鲜·加工,畜牧·兽医,以及生命科学方面的专论,研究论文,快讯等。读者对象主要是国内外农业科学研究人员,农业院校的教师和研究生,以及综合性大学等有关农业科学的研究与管理人员。本刊近年的影响因子、总被引频次2项重要指标均名列全国农业高校学术期刊的前列。2001年入选中国期刊方阵;2004年在教育部全国高校科技期刊评比中荣获一等奖,以及全国优秀农业期刊评比一等奖;2005年获第三届国家期刊奖百种重点期刊奖;2006年再次荣获全国农业期刊评比一等奖,首届中国高校优秀科技期刊奖;荣获中信所2008年度“中国百种杰出学术期刊”称号;2009年荣获“高校科技期刊优秀编辑质量奖”;2010年获“第三届中国高校精品科技期刊奖”;2011年获“第二届中国精品科技期刊”和第二届“RCCSE中国权威学术期刊”称号;2012年获“第四届中国高校精品科技期刊奖”;2014年获“第五届中国高校优秀科技期刊奖”和“第三届中国精品科技期刊”;2016、2018和2020年获“中国高校百佳科技期刊”等。本刊现为北京大学图书馆中文核心期刊,中国科学引文数据库(CSCD)核心期刊,中国科技核心期刊。目前,本刊被美国《化学文摘》(CA)、英国《国际农业与生物科学研究中心文摘》(CABI)、俄罗斯《文摘杂志》(AJ)、英国《动物学记录》(ZR)、英国《食品科技文摘》(FSTA)、联合国粮农组织农业索引(AGRIS)、美国《乌利希期刊指南》(Ulrichsweb)、瑞典《开放获取期刊目录》(DOAJ)、荷兰《文摘与引文数据库》(Scopus),以及中国科学引文数据库、《中国学术期刊文摘》、中国期刊网《中国学术期刊(光盘版)》数据库、万方数据资源系统数字化期刊群数据库等国际国内重要检索系统收录。

《浙江大学学报(农业与生命科学版)》为双月刊,A4开本,132页,国内外公开发行。国内统一连续出版物号:CN 33-1247/S;国际标准连续出版物号:ISSN 1008-9209;邮发代号:32-48;国外发行代号:BM4108。定价每本30.00元/人民币,全年定价180.00元/人民币。

地址:浙江省杭州市天目山路148号浙江大学出版社内

邮编:310028

网址:<http://www.zjujournals.com/agr>

电话:0571-88272801

电子邮箱:zdxbsnb@zju.edu.cn