

# HPLC 同步测定南丰蜜橘成熟过程中 黄酮类物质及其抗氧化活性研究

张杉杉<sup>1</sup>, 张浩<sup>1</sup>, 肖依文<sup>1,2\*</sup>, 马倩<sup>3</sup>, 黄国宇<sup>1</sup>, 朱笃<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>江西科技师范大学生命科学学院 江西省生物加工过程重点实验室, 南昌 330013;

<sup>2</sup>江西师范大学 江西省亚热带植物资源保护与利用重点实验室, 南昌 330022;

<sup>3</sup>浙江东方基因生物制品股份有限公司, 杭州 313300

**摘要:**为评价不同时期南丰蜜橘中黄酮类化合物成分含量与抗氧化活性的相关性,以南丰县产的南丰蜜橘为材料,建立了一种 HPLC 同时测定 11 种类黄酮的方法。采用 DPPH 法和 ABTS 法评价南丰蜜橘的抗氧化活性,建立了一种测定南丰蜜橘中黄酮类化合物含量的高效液相色谱法 (HPLC),该方法相对简单、高效。南丰蜜橘的果皮和果肉的黄酮成分和含量有很大的差异,通过相关性分析可以检测总黄酮、川陈皮素和橘皮素的含量并评价抗氧化活性。本研究为南丰蜜橘抗氧化活性提供实验依据,为其综合利用提供了科学依据。

**关键词:**高效液相色谱法;南丰蜜橘;类黄酮化合物;含量测定;抗氧化

中图分类号:O657.72

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2023)Suppl-0016-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2023.S.003

## Simultaneous determination of flavonoids in Nanfeng tangerine during ripening by HPLC

ZHANG Shan-shan<sup>1</sup>, ZHANG Hao<sup>1</sup>, XIAO Yi-wen<sup>1,2\*</sup>, MA Qian<sup>3</sup>, HUANG Guo-yu<sup>1</sup>, ZHU Du<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Bioprocess Engineering of Jiangxi Province, College of Life Sciences, Jiangxi Science and Technology Normal University, Nanchang 330013, China; <sup>2</sup>Key Laboratory of Protection and Utilization of Subtropical Plant Resources of Jiangxi Province, Jiangxi Normal University, Nanchang 330022, China;

<sup>3</sup>Zhejiang Dongfang Gene Biological Products Co., Ltd., Hangzhou 313300, China

**Abstract:** In order to evaluate the correlation between flavonoid content and antioxidant activity in Nanfeng mandarin at different times, a method for simultaneous determination of 11 flavonoids by HPLC was established using Nanfeng mandarin from Nanfeng County as material. The antioxidant activity of Nanfeng Mandarin was evaluated by DPPH method and ABTS method, and a high performance liquid chromatography (HPLC) method for determining the content of flavonoids in Nanfeng Mandarin was established, which was relatively simple and efficient. The flavonoid composition and content of the peel and pulp of Nanfeng mandarin were very different, and it was found that the content of total flavonoids, chuanchen retinin and hesperidin, and the antioxidant activity could be evaluated by correlation analysis. This study provides an experimental basis for the antioxidant activity of Nanfeng mandarin and provides a scientific basis for its comprehensive utilization.

**Key words:** high performance liquid chromatography; Nanfeng tangerine; flavonoid compounds; content determination; antioxidant

南丰蜜橘 (*Citrus reticulata* Blanco cv. Kinokuni (Rutaceae)) 在我国是一种历史悠久的药食同源的水果, 甘甜可口, 营养丰富, 深受广大消费者的喜爱<sup>[1,2]</sup>。类黄酮是黄酮类化合物的简称, 是诸多具

有相似化学结构和活性物质的总称<sup>[3]</sup>, 广泛存在于植物中, 是柑橘类水果的主要活性物质<sup>[4]</sup>, 具有品种特异性和组织特异性<sup>[5]</sup>。大多数类黄酮与糖结合成苷类存在, 呈黄色或淡黄色, 为南丰蜜橘金黄色起到辅色的作用<sup>[6]</sup>。现代医学证明, 类黄酮有很多药理作用, 如抗过敏、抗菌、抑制血小板聚集、抗炎等<sup>[7-9]</sup>。因此, 通过研究南丰蜜橘中类黄酮的变化,

收稿日期:2022-10-06

接受日期:2023-03-08

\* 通信作者 Tel: 86-791-83832166; E-mail: xyw1152858687@163.

com, zhudu12@163.com

建立有效的检测方法,对其的选育、采摘时间以及深度利用具有指导意义。

类黄酮可用微波辅助提取<sup>[10]</sup>、溶剂提取<sup>[11]</sup>、超临界萃取、超声波辅助双水相提取<sup>[12]</sup>、酶辅助提取<sup>[13]</sup>等方法,而类黄酮的纯化需要有机溶剂萃取、聚酰胺吸附、大孔树脂吸附等纯化方法<sup>[14]</sup>,不但浪费有机溶剂,而且繁琐、耗时,还会导致类黄酮的不可逆吸附。使用 HPLC 操作简单、重现性好、可定性定量,是分析类黄酮比较常见的方法<sup>[15]</sup>。Zhang<sup>[16]</sup>使用 HPLC 检测柑橘中的黄酮,仅使用了 42 min。Ramful<sup>[17]</sup>用 HPLC 检测了 Mauritius 当地 21 种常见的柑橘类水果的黄酮类化合物的含量。本文建立了一种南丰蜜橘类黄酮测定的方法,并探讨了抗氧化活性与类黄酮含量的相关性,为南丰蜜橘的深加工提出科学性建议。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与试剂

南丰蜜橘采摘日期见表 1。

甲醇和乙腈(色谱级,德国默克)、乙酸(分析级,西陇化工)。类黄酮标品:香蜂草苷、柚皮苷、圣草次苷、甜橙黄酮、川陈皮素、新橙皮苷、橙皮苷、柚皮素、橙皮素、橘皮素、芸香柚皮苷均购置 Solarbio 公司;芦丁(批号:AF9022006,纯度:98%,国药集团);L-抗血酸(大连美仑)。

表 1 南丰蜜橘的收集时间

Table 1 Picking date of Nanfeng tangerine

编号 No.	采摘时间 Picking date
E1	2017.09.07
E2	2017.09.22
E3	2017.09.29
E4	2017.10.09
E5	2017.10.19
E6	2017.10.29
E7	2017.11.15
E8	2017.11.27

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 色谱条件

采用 Agilent Eclipse XDB-C<sub>18</sub> (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) 色谱柱;流速为 1.0 mL/min;检测波长 283 nm 和 330 nm;柱温:30 °C;进样量:10 μL,梯度洗脱条件见表 2。

表 2 梯度洗脱条件

Table 2 Gradient elution conditions

时间 Time (min)	乙腈 Acetonitrile (%)	0.04% 乙酸溶液 0.04% acetic acid solution (%)
2	80	20
10	75	25
12	70	30
15	60	40
20	50	50
25	40	60
30	80	20

### 1.2.2 HPLC 测 11 种类黄酮的方法

标准品制备:取标准品各 10.0 mg,用甲醇制成 1 mg/mL 的标准品溶液,保存备用。

用保留时间进行定性,外标法定量。按表 2 条件进行检测,在 283 nm 下对 8 种类黄酮标品(除甜橙黄酮、川陈皮素、橘黄酮外)进行测定,而剩余三种类黄酮标品则在 330 nm 下测定,以峰面积对浓度(mg/L)进行线性回归。

### 1.2.3 样品处理

采摘的南丰蜜橘进行果皮、果肉和果核分离,其中一部分冷冻处理,得到冻干粉,用甲醇溶解后当作液相样品;剩余的部分保存在 -20 °C 冰箱中。

### 1.2.4 抗氧化活性测试

#### 1.2.4.1 DPPH 自由基清除

配制 0.1 mmol/L DPPH 溶液,存放于棕色瓶中备用。将 0.2 mL 稀释的样品提取物加入 3.8 mL DPPH 溶液中。室温下避光反应 30 min,在 517 nm 处检测吸光度。每个样品重复 3 次。

#### 1.2.4.2 ABTS<sup>+</sup> 自由基清除

将 10.0 mL ABTS 原液和 176 μL 过硫酸钾溶液采用涡旋震荡仪,常温避光条件下反应 14 h,得到 ABTS<sup>+</sup> 自由基原液。在 740 nm 处检测吸光度,获得的吸光值为 0.70 ± 0.002。ABTS<sup>+</sup> 自由基原液用 80% 甲醇稀释后常温避光备用。

## 1.3 数据处理

使用 Statistical Package for Social Sciences (15.0 版,2007 年,Chicago, IL, USA) 和 MS Office Excel 2003 (Microsoft Co., Redmond, WA, USA) 分析数据。绘制的数据是三个测量值的平均值 ± 标准偏差。

## 2 结果与分析

### 2.1 类黄酮标准品的标准曲线建立

如图1所示,在283 nm(见图1A)和330 nm(图1B)波长的条件下,可以检测到11种类黄酮标品和

实验样品在采用优化后的条件下,30 min之内可以完全分开,进而根据保留时间来推测每个峰对应的类黄酮。

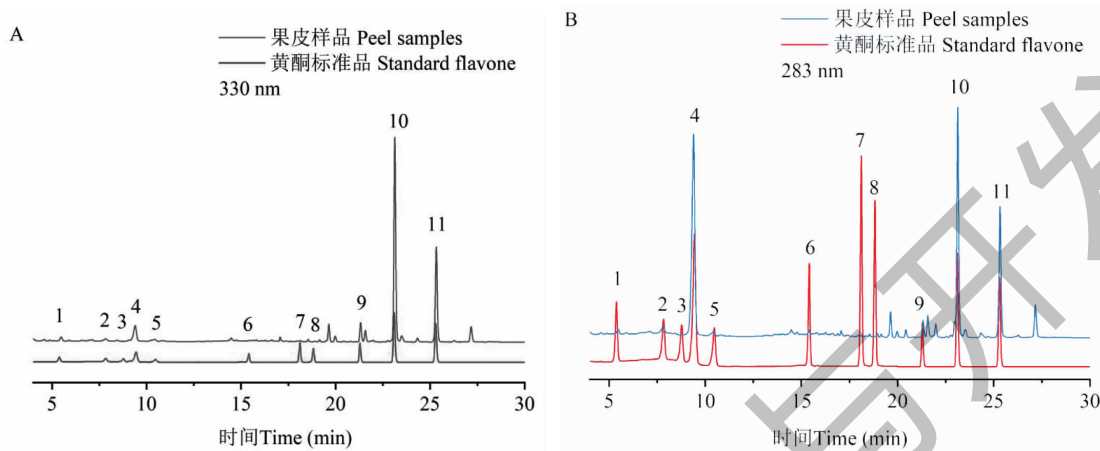


图1 黄酮标准品与果皮样品的色谱对比图

Fig. 1 Flavonoid contents in standards and peel samples

注:1. 圣草次苷;2. 芸香柚皮苷;3. 柚皮苷;4. 橙皮苷;5. 新橙皮苷;6. 香蜂草苷;7. 柚皮素;8. 橙皮素;9. 甜橙黄酮;10. 川陈皮素;11. 橘黄酮  
Note: 1. Eriocitrin; 2. Narirutin; 3. Naringin; 4. Hesperidin; 5. Neohesperidin; 6. Didymin; 7. Naringenin; 8. Hesperetin; 9. Sinensetin; 10. Nobiletin; 11. Tangeretin.

### 2.2 标准曲线、检出限、定量限

标准曲线由浓度( $X$ , mg/L)和峰面积( $Y$ )来制作(见表3)。结果显示各相关系数( $R^2$ )都比0.993大,检出范围为0.01~0.05 mg/L,说明灵敏度高以及线性关系良好,可有效检测蜜橘中11种类黄酮。将不同浓度的类黄酮与标准品混合后,检测5次。对结果行回归分析,制作标准曲线(信噪比3:1,表1)。

### 2.3 加样回收实验

果皮样品中,添加一定量的类黄酮标准品溶液,按“1.2.1”的条件进行测定(见表4),回收率为95.0%~104.0%,且相对标准差为1.58%~4.82%,提示回收率比较高。

### 2.4 精密度试验

为检测仪器的精密度,连续6次进样标准品,相

对标准偏差在0.17%~0.84%之间,显示高精密度。

### 2.5 稳定性试验

将标准品于不同时间(0、6、12、18、24 h)进样分析。各个峰面积的相对标准差值为0.86%~2.28%,显示此法比较稳定。

### 2.6 南丰蜜橘中类黄酮含量及变化分析

南丰蜜橘的果皮和果肉在8个时期类黄酮的种类和含量都有很大的差异(见表5、6)。果皮中检测到8种类黄酮,果肉中只检测到4种,果皮中总黄酮的含量是果肉的3倍。果皮中含量较多的川陈皮素( $9.45 \pm 0.01$  mg/g DW),在果肉中未检测到,橙皮苷是果皮和果肉中含量最多的类黄酮。因此需要根据不同的目的,确定合理的采摘时间,以达到资源的综合利用。

表3 类黄酮的分析结果

Table 3 Analysis results of flavonoids

标准品 Standard	线性方程 Linear equation	相关系数 Correlation coefficient ( $R^2$ )	线性范围 Linear range (mg/L)	定量限 Quantitation limit ( $\mu\text{g/mL}$ )	检测限 Detection limit ( $\mu\text{g/mL}$ )
圣草次苷 Eriocitrin	$y = 8\ 410.3x - 35\ 044.0$	0.996	1~100	0.05	0.02
芸香柚皮苷 Narirutin	$y = 10\ 171.6x - 17\ 183.6$	0.999	1~100	0.03	0.01

续表 3 (Continued Tab. 3)

标准品 Standard	线性方程 Linear equation	相关系数 Correlation coefficient ( $R^2$ )	线性范围 Linear range (mg/L)	定量限 Quantitation limit ( $\mu\text{g/mL}$ )	检测限 Detection limit ( $\mu\text{g/mL}$ )
柚皮苷 Naringin	$y = 9\ 841.4x - 19\ 223.6$	0.997	1 ~ 100	0.03	0.01
橙皮苷 Hesperidin	$y = 12\ 914.2x - 117\ 707.1$	0.999	5 ~ 500	0.04	0.02
新橙皮苷 Neohesperidin	$y = 12\ 564.5x - 27\ 034.2$	0.996	1 ~ 100	0.03	0.01
香蜂草苷 Didymin	$y = 18\ 018.4x - 32\ 304.6$	0.999	1 ~ 100	0.03	0.01
柚皮素 Naringenin	$y = 35\ 457.7x - 42\ 573.1$	0.999	1 ~ 100	0.02	0.01
橙皮素 Hesperetin	$y = 38\ 419.5x - 38\ 051.4$	0.999	1 ~ 100	0.02	0.01
甜橙黄酮 Sinensetin	$y = 39\ 668.7x + 137\ 950.8$	0.995	1 ~ 100	0.07	0.05
川陈皮素 Nobiletin	$y = 32\ 663.6x + 320\ 792.9$	0.994	2 ~ 200	0.16	0.02
橘皮素 Tangeretin	$y = 40\ 683.2x + 266\ 460.9$	0.996	1 ~ 100	0.12	0.05

表 4 类黄酮回收试验 ( $n = 5$ )  
Table 4 Flavonoids recovery test ( $n = 5$ )

类黄酮 Flavonoid	加标前质量浓度 Mass concentration before adding standard ( $\mu\text{g/g}$ )	加标质量浓度 Spiked mass concentration ( $\mu\text{g/g}$ )	加标后质量浓度 Mass concentration after spiking ( $\mu\text{g/g}$ )	平均回收率 The average recovery rate (%)	相对标准差 Relative standard deviation (%)
圣草次苷 Eriocidin	100	50	147.9	100	3.53
		80	182.1		
		150	251.2		
芸香柚皮苷 Narirutin	488.68	200	690.34	101	2.92
		300	800		
		456	935.27		
柚皮苷 Naringin	0	80	76.56	100	3.44
		100	101.56		
		150	152.65		
橙皮苷 Hesperidin	773.1.29	400.0	11 977.8	104	2.14
		600.0	13 845.11		
		800.0	16 025.77		
新橙皮苷 Neohesperidin	99.1	50	148.13	102	3.19
		102.6	204.02		
		160	266		
香蜂草苷 Didymin	134.02	109.4	239.24	101	4.82
		150	285.78		
		200	345.67		
柚皮素 Naringenin	0	100	105.88	101	4.00
		150	149.12		
		200	197.11		
橙皮素 Hesperetin	0	100	104.91	101	3.19
		150	148.1		
		200	200.88		

续表 4(Continued Tab. 4)

类黄酮 Flavonoid	加标前质量浓度 Mass concentration before adding standard ( $\mu\text{g/g}$ )	加标质量浓度 Spiked mass concentration ( $\mu\text{g/g}$ )	加标后质量浓度 Mass concentration after spiking ( $\mu\text{g/g}$ )	平均回收率 The average recovery rate(%)	相对标准差 Relative standard deviation (%)
甜橙黄酮 Sinensetin	209.52	100	300.1	95	3.61
		200	399.81		
		300	502.66		
川陈皮素 Nobiletin	358.473	258.5	6105.68	99	1.58
		350.0	7089.99		
		450.0	8100.67		
橘皮素 Tangeretin	147.2.4	114.5	2618.4	103	4.58
		150.0	3101.09		
		200.0	3499.24		

表 5 果皮中类黄酮含量

Table 5 Flavonoid content in fruit peel

类黄酮 Flavonoid	含量 Content(mg/g DW)							
	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8
圣草次苷 Eriocidin	1.2 ± 0.00	0.9 ± 0.01	1.1 ± 0.02	0.5 ± 0.01	1.8 ± 0.01	1.4 ± 0.01	1.1 ± 0.02	1.2 ± 0.01
芸香柚皮苷 Narirutin	1.1 ± 0.01	1.2 ± 0.00	1.2 ± 0.00	1.0 ± 0.01	2.4 ± 0.01	2.3 ± 0.01	2.0 ± 0.02	2.2 ± 0.01
柚皮苷 Naringin	-	-	-	-	-	-	-	-
橙皮苷 Hesperidin	19.9 ± 0.01	22.6 ± 0.11	16.3 ± 0.00	19.2 ± 0.01	28.1 ± 0.01	24.7 ± 0.05	21.6 ± 0.03	21.7 ± 0.00
新橙皮苷 Neohesperidin	0.7 ± 0.02	0.7 ± 0.01	0.7 ± 0.01	0.9 ± 0.01	1.5 ± 0.02	0.9 ± 0.00	0.9 ± 0.01	0.7 ± 0.01
香蜂草苷 Didymin	0.5 ± 0.00	0.4 ± 0.01	0.5 ± 0.02	0.4 ± 0.02	0.5 ± 0.02	0.4 ± 0.01	0.5 ± 0.01	0.5 ± 0.00
柚皮素 Naringenin	-	-	-	-	-	-	-	-
橙皮素 Hesperetin	-	-	-	-	-	-	-	-
甜橙黄酮 Sinensetin	0.4 ± 0.01	0.4 ± 0.00	0.5 ± 0.01	0.6 ± 0.00	0.6 ± 0.01	0.4 ± 0.01	0.4 ± 0.01	0.4 ± 0.01
川陈皮素 Nobiletin	9.5 ± 0.01	8.4 ± 0.00	8.5 ± 0.01	8.1 ± 0.00	9.2 ± 0.00	6.9 ± 0.00	7.1 ± 0.02	6.2 ± 0.00
橘皮素 Tangeretin	3.5 ± 0.01	3.3 ± 0.00	3.1 ± 0.01	3.2 ± 0.01	3.5 ± 0.01	2.8 ± 0.01	3.0 ± 0.01	2.4 ± 0.00
总类黄酮含量 Total flavonoid content	36.9 ± 0.01	37.8 ± 0.11	31.9 ± 0.01	33.8 ± 0.01	47.5 ± 0.01	39.9 ± 0.04	36.5 ± 0.08	35.3 ± 0.01

注:“-”代表未检出

Note:“-” means not detected.

表 6 果肉中类黄酮含量

Table 6 Flavonoid content in fruit pulp

类黄酮 Flavonoid	含量 Content(mg/g DW)							
	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8
圣草次苷 Eriocidin	0.17 ± 0.00	0.22 ± 0.01	0.20 ± 0	0.24 ± 0.01	0.2 ± 0.01	0.2 ± 0.00	0.2 ± 0.00	0.2 ± 0.00
芸香柚皮苷 Narirutin	1.4 ± 0.02	1.8 ± 0.01	1.4 ± 0.01	1.9 ± 0.02	1.5 ± 0.02	1.9 ± 0.01	1.7 ± 0.01	1.3 ± 0.02
柚皮苷 Naringin	-	-	-	-	-	-	-	-
橙皮苷 Hesperidin	5.5 ± 0.02	6.7 ± 0.02	5.5 ± 0.03	5.6 ± 0.02	6.8 ± 0.01	9.6 ± 0.001	5.9 ± 0.01	5.7 ± 0.01
新橙皮苷 Neohesperidin	-	-	-	-	-	-	-	-
香蜂草苷 Didymin	0.2 ± 0.01	0.3 ± 0.01	0.3 ± 0.00	0.3 ± 0.02	0.3 ± 0.01	0.4 ± 0.01	0.3 ± 0.02	0.3 ± 0.01

续表 6 (Continued Tab. 6)

类黄酮 Flavonoid	含量 Content (mg/g DW)							
	E1	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8
柚皮素 Naringenin	-	-	-	-	-	-	-	-
橙皮素 Hesperetin	-	-	-	-	-	-	-	-
甜橙黄酮 Sinensetin	-	-	-	-	-	-	-	-
川陈皮素 Nobiletin	-	-	-	-	-	-	-	-
橘皮素 Tangeretin	-	-	-	-	-	-	-	-
总类黄酮含量 Total flavonoid content	7.3 ± 0.02	9.0 ± 0.01	7.4 ± 0.02	8.0 ± 0.03	8.8 ± 0.01	11.9 ± 0.01	8.2 ± 0.02	7.4 ± 0.03

注:“-”代表未检出

Note:“-” means not detected

### 2.7 南丰蜜橘样品中类黄酮物质与抗氧化活性分析

用 DPPH 法和 ABTS 法测定南丰蜜橘果皮和果肉的抗氧化活性,图 2 为不同采摘时间的南丰蜜橘果皮和果肉中类黄酮含量及其抗氧化活性的变化。

从图中可以看出在采摘后期总黄酮含量和抗氧化活性呈下降趋势,且果皮的抗氧化活性远高于果肉,可能是与果实成熟过程中合成酶活性减弱以及化合物之间的相互转化相关<sup>[18]</sup>。

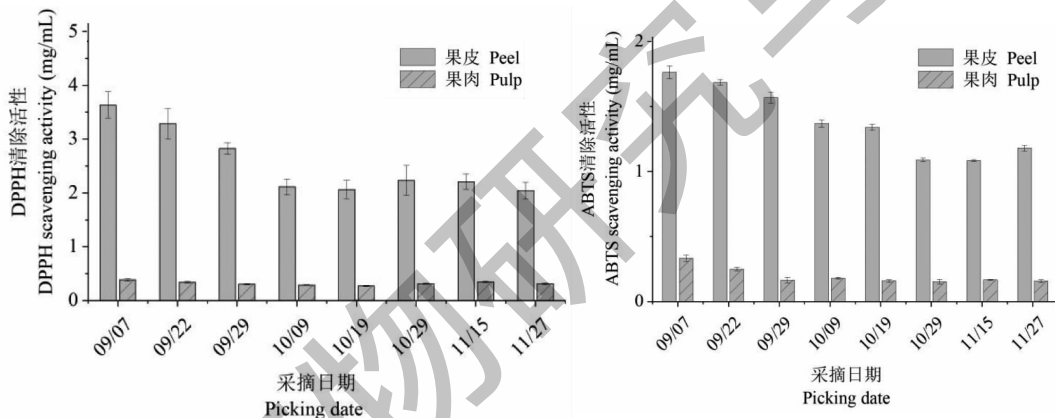


图 2 南丰蜜橘不同时期抗氧化活性

Fig. 2 Antioxidant activity of Nanfeng tangerine in different periods

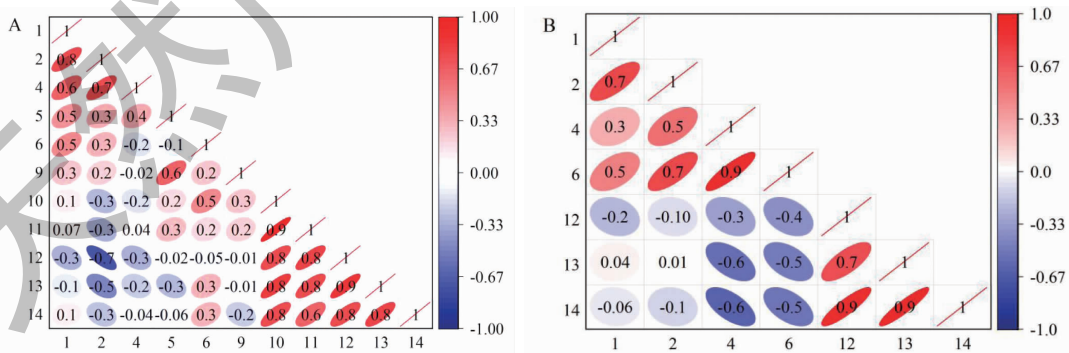


图 3 不同时期类黄酮含量和抗氧化活性的相关性

Fig. 3 Correlation between flavonoids content and antioxidant activity at different stages

注: A. 果皮; B. 果肉; 1. 圣草次苷; 2. 芸香柚皮苷; 3. 柚皮苷; 4. 橙皮苷; 5. 新橙皮苷; 6. 香蜂草苷; 7. 柚皮素; 8. 橙皮素; 9. 甜橙黄酮; 10. 川陈皮素; 11. 橘黄酮; 12. 总黄酮; 13. DPPH 法测定; 14. ABTS 法测定。 Note: A. Peel; B. Pulp; 1. Eriocitrin; 2. Narirutin; 3. Naringin; 4. Hesperidin; 5. Neohesperidin; 6. Didymin; 7. Naringenin; 8. Hesperetin; 9. Sinensetin; 10. Nobiletin; 11. Tangeretin; 12. Total flavonoid; 13. DPPH method determination; 14. ABTS method determination.

用 DPPH 和 ABTS 两种方法评价南丰蜜橘的抗氧化活性。果皮的 DPPH 抗氧化活性为 3.64 ~ 5.40 mg/g, ABTS 抗氧化活性为 6.287 ~ 11.13 mg/g。南丰蜜橘果肉的抗氧化活性为 0.77 ~ 1.81 mg/g, ABTS 抗氧化活性为 1.52 ~ 2.08 mg/g。果皮的抗氧化活性很明显高于果肉,而且 ABTS 得出的抗氧化活性显著比 DPPH 法高,这与先前的研究报道一致。因为这两种方法采用不同的方法来消除自由基,两种方法的机理不一致,样品组成复杂<sup>[19]</sup>。

图 3 显示了南丰蜜橘果皮和果肉中各个时期类黄酮与抗氧化活性的相关性。南丰蜜橘果皮和果肉的 DPPH 和 ABTS 的相关性分别为 0.78 和 0.92,有较高的相关性,说明这两种测试抗氧化性的结果相对一致。而果皮/果肉中的总黄酮与二者的抗氧化活性都高度相关,说明黄酮含量是南丰蜜橘氧化的关键。南丰蜜橘果皮中的川陈皮素和橘皮素与总黄酮和两种抗氧化活性的相关性比较高,也说明这两种黄酮在抗氧化活性方面有重要的作用。

### 3 结论

南丰蜜橘具有很高的食用和药用价值,类黄酮是柑橘中主要的活性物质,对于南丰蜜橘复杂的成分体系来说,指纹图谱反应的化学信息更加充分,结合化学计量方法,能够更加科学地综合评价药物的质量。结合抗氧化活性,分析主要的活性物质。根据抗氧化结果显示,果肉和果皮中的总黄酮含量都和抗氧化活性相关,果皮中的川陈皮素和橘皮素与总黄酮和抗氧化活性相关因此对扩展南丰蜜橘的综合加工利用迫在眉睫,本研究将为南丰蜜橘的深入研究和广泛利用提供科学依据。

### 参考文献

- Peng X, Wang Y, Tang LJ, et al. Yeasts from Nanfeng mandarin plants: occurrence, diversity and capability to produce indole-3-acetic acid [J]. *Biotechnol Biotec Eq*, 2018, 32: 1496-1506.
- Qiu X, Yu L, Wang W, et al. Comparative evaluation of microbiota dynamics and metabolites correlation between spontaneous and inoculated fermentations of Nanfeng tangerine wine [J]. *Front Microbiol*, 2021, 12: 649978.
- Laghari AQ, Memon S, Nelofar A, et al. Extraction, identification and antioxidative properties of the flavonoid-rich fractions from leaves and flowers of *Cassia angustifolia* [J]. *Int J Anal Chem*, 2011, 2: 871-878.
- Hu L, Wang J, Ji X, et al. Selection of non-*Saccharomyces*

- yeasts for orange wine fermentation based on their enological traits and volatile compounds formation [J]. *Int J Food Sci Tech*, 2018, 55: 4001-4012.
- Panwar D, Panesar PS, Chopra HK. Recent trends on the valorization strategies for the management of citrus by-products [J]. *Food rev int*, 2021, 37: 91-120.
- Wang LL, Bian XY, Gao WN, et al. Research progress on extraction and purification technology of plant flavonoids [J]. *Acta Nutr Sin (营养学报)*, 2019, 41: 606-610.
- Wu J, Ye X, Yang S, et al. Systems pharmacology study of the anti-liver injury mechanism of *Citri Reticulatae Pericarpium* [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 618846.
- Tejada S, Pinya S, Martorell M, et al. Potential anti-inflammatory effects of hesperidin from the genus *Citrus* [J]. *Curr Med Chem*, 2017, 24: 4929.
- Xu AH, Xiao YW, He ZY. Use of non-saccharomyces yeast Co-fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* to improve the polyphenol and volatile aroma compound contents in Nanfeng tangerine wines [J]. *J Fungi*, 2022, 8: 128.
- Zhang YQ, Bian SQ, Hu J, et al. Natural deep eutectic solvent-based microwave-assisted extraction of total flavonoid compounds from spent sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) leaves: optimization and antioxidant and bacteriostatic activity [J]. *Molecules*, 2022, 27: 5985-5985.
- Wang RP, Yang ZB, Lv WZ, et al. Extraction and separation of flavonoids and iridoids from *Eucommia ulmoides* leaves using choline tryptophan ionic liquid-based aqueous biphasic systems [J]. *Ind Crop Prod*, 2022, 187: 115465.
- Zang QM, Li QS, Xu YB, et al. Optimization of the extraction process and antioxidant activity of total flavonoids from orange safflower by ultrasonic-assisted two-phase system [J]. *Chem Reagents (化学试剂)*, 2022, 44: 7.
- Liu RX, Chu XL, Su JQ, et al. Enzyme-assisted ultrasonic extraction of total flavonoids from *Acanthopanax senticosus* and their enrichment and antioxidant properties [J]. *Processes*, 2021, 9: 1708-1708.
- Che ZMS, Yeoh JX, Lee SY, et al. Integration of choline chloride-based natural deep eutectic solvents and macroporous resin for green production of enriched oil palm flavonoids as natural wound healing agents [J]. *Antioxidants*, 2021, 10: 1802-1802.
- Sun YQ. *Analytical Chemistry (分析化学)* [M]. Beijing: People's Medical Publishing House, 2002: 272-273.
- Zhang YM, Zhou ZQ, Sun YJ, et al. Simultaneous determination of 18 flavonoids in citrus fruits by high-performance liquid chromatography [J]. *Sci Agric Sin (中国农业科学)*, 2012, 45: 3558-3565.