

基于色谱-质谱联用技术和网络药理学、分子对接分析彭祖寿柑优株果皮化学成分和抗氧化活性

魏静¹, 王宇¹, 董英¹, 钟详健¹, 单东杰¹, 吕芳¹, 石滨², 折改梅^{1*}

(¹北京中医药大学中药学院 北京 102488

²宁夏医科大学 宁夏 750004)

摘要 目的:研究彭祖寿柑优株果皮的化学成分及抗氧化能力,探究抗氧化的潜在作用机制。方法:采用高效液相色谱-二极管阵列-电喷雾-串联质谱法(HPLC-DAD-ESI-MS/MS)与气相色谱-质谱法(GC-MS)表征彭祖寿柑优株果皮的化学成分;采用 DPPH 法、ABTS 法、铁离子还原能力(FRAP)和脂质过氧化(TBARS)能力评价其抗氧化活性;利用网络药理学方法筛选抗氧化相关靶点,进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析,使用 Cytoscape 3.8.2 软件,构建“活性成分-靶点-通路”网络,采用分子对接验证彭祖寿柑优株果皮的主要活性成分与核心靶点的相互作用。结果:HPLC-DAD-ESI-MS/MS 解析出 32 个化合物,GC-MS 解析出 33 个挥发性成分。体外抗氧化试验表明彭祖寿柑优株具有较显著的抗氧化能力。网络药理学及分子对接结果表明,柚皮素等黄酮类成分与 TP53、MAPK3 等靶点对接吻合度较好。结论:初步探究了彭祖寿柑优株多成分、多靶点、多途径干预抗氧化的潜在机制,为将彭祖寿柑优株果皮开发为功能性食品或功能性饲料提供了新的理论依据。

关键词 彭祖寿柑优株果皮; 高效液相色谱-二极管阵列-电喷雾-串联质谱法; 气相色谱-质谱法; 抗氧化; 网络药理学; 分子对接

文章编号 1009-7848(2023)04-0305-19 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2023.04.029

氧化应激是指机体在受到有害刺激时,高活性分子产生的速度大于其清除的速度,使得氧化系统和抗氧化系统失衡,可能引起一系列的免疫功能降低,损害生物膜及其功能,最终引发各种疾病,如动脉粥样硬化、中风、糖尿病、癌症等^[1]。在食品行业中,抗氧化剂是一种重要的食品添加剂,随着化学合成抗氧化剂的安全性逐渐受到质疑,寻找和开发安全性高、无毒的天然抗氧化剂资源愈发重要,成为食品添加剂研究领域的热点之一^[2-3]。

芸香科柑橘属中的橘皮不仅具有防腐抑菌,改良食物理化性质,增强食品风味等作用,还具有预防或改善心血管疾病、癌症和炎症等重要的医学价值^[4-6],这与其富含黄酮类化合物、挥发油、萜类和香豆素类等功能性成分有关,这些天然活性物质大多具有抗氧化作用,能够清除人体内多余的自由基,使机体免受活性氧自由基伤害^[7],是天然的抗氧化剂。当前橘皮用作抗氧化剂的开发应

用受到越来越多的关注,需要不断挖掘新的橘皮资源,以满足食品原料开发或临床需求。彭祖寿柑(*Citrus reticulata* Blanco)优株为彭山县从日本引进,经改良选育而成的桔橙杂交新品种^[8],其果皮厚,包着紧,味清甜纯正,较易剥离,认可度较高,是极有发展前途的优良杂柑新品种^[9]。目前研究主要集中于其栽培技术、资源分布等,未在市场上广泛销售,国内外尚未见其抗氧化活性及相关成分的系统性研究报道。为充分挖掘橘类植物中的抗氧化剂,本研究以彭祖寿柑优株果皮为研究对象,采用高效液相色谱-二极管阵列-电喷雾-串联质谱法(HPLC-DAD-ESI-MS/MS)和气相色谱-质谱法(GC-MS)对彭祖寿柑优株果皮中的化学成分进行表征,采用适用于批量样品操作的 4 种体外抗氧化体系,对其抗氧化活性进行评价。

网络药理学是一门适用于考察多成分复杂体系对机体多靶点活性作用的生物信息学技术,多被用于中药复方的药理学机制研究,也适用于药食同源物品的分析,通过结构相似比对预测其可能作用的疾病靶点,构建“成分-靶点-通路”相互作用网络,探索其主要活性成分及其作用机制^[10]。分子对接是利用计算机进行分子模拟的技术,以

收稿日期: 2022-04-26

基金项目: 桂林市技术创新引导计划项目(2020010902)

第一作者: 魏静,女,硕士生

通信作者: 折改梅 E-mail: shegaimei@126.com

已知结构的蛋白为模板,构建一个结构未知的目标蛋白^[1]。本研究在橘皮原有研究的基础上,结合含有酚类、烯类、萜类和醛类等生物活性物质的挥发性成分,利用网络药理学与分子对接技术筛选抗氧化潜在活性成分并初步阐释作用机制。为彭祖寿柑优株果皮用作抗氧化剂和植物源性有益化合物提供基础数据,为其用于功能性食品的开发、功能性饲料的研制等提供理论依据。本研究思路及方法如图1所示。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

彭祖寿柑优株,桂林相凯农业科技有限公司,经华中农业大学潘志勇副教授鉴定为芸香科植物彭祖寿柑 *Citrus reticulata* Blanco 优株。Wistar 雌性大鼠(动物许可证号 SCXK(京)2016-0006),北京维通利华实验动物技术有限公司。

抗坏血酸、硫酸亚铁、三水合乙酸钠、氢氧化钠、盐酸、冰乙酸、过氧化氢,北京化工厂;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH),上海源叶生物科技有限公司;2,4,6-三吡啶基三嗪(TPTZ)、2,2'-联氮-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS)、硫酸巴比妥酸、三氯乙酸,上海麦克林生化科技有限公司;三氯化铁、过硫酸钾,天津市福晨化学试剂;甲醇、甲酸为色谱级,美国 Fisher Scientific 公司;其它试剂为分析纯级。

1.2 仪器与设备

Agilent 1200 型高效液相色谱仪、Agilent 7890B/5977 GCMSD GC-MS 气质联用仪,美国 Agilent 公司;紫外可见分光光度计(T6 新世纪),北京普析通用仪器有限责任公司;分析天平(CP224C 型,万分之一,Max = 220 g),奥豪斯仪器(常州)有限公司;DB 超声清洗仪(40 kHz,200 W),昆山超声仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 HPLC-DAD-ESI-MS/MS 检测

1.3.1.1 供试品溶液的配制 取彭祖寿柑优株鲜果皮,称取 10.00 g,置 500 mL 圆底烧瓶中,加 200 mL 70%乙醇,80 °C 加热提取 1 h,趁热减压过滤,取滤液经 0.22 μm 微孔滤膜过滤即得。

1.3.1.2 检测条件 色谱条件:色谱柱为 Hypersil

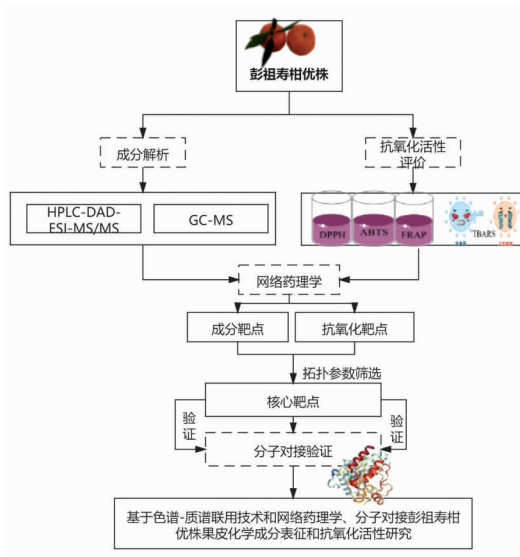


图1 研究思路和方法

Fig.1 Ideas and methods of research

GOLD C18 色谱柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm),流动相为 0.1%甲酸水(A)-甲醇水(B)溶液。梯度洗脱(0~10 min,78% A;10~25 min,78%~60% A;25~40 min,60% A;40~45 min,60%~30% A;45~90 min,30% A),柱温 25 °C,体积流量 0.7 mL/min,检测波长 240,283,330 nm,进样量 10 μL。

质谱条件:电喷雾离子源(ESI),正负离子模式,离子扫描范围设置为 m/z 50~1 000;裂解电压 80 V;碰撞能量 10 eV。

1.3.2 GC-MS 检测

1.3.2.1 挥发油的提取 取彭祖寿柑优株鲜果皮,称取 800 g,置于 2 000 mL 圆底烧瓶中,加水 1 600 mL,电热套加热,按《中国药典》2015 版第四部 2204“挥发油测定法”甲法提取 3 h 至无挥发油增加,收集挥发油,静置分层后吸出油层待用^[12]。

1.3.2.2 检测条件 气相色谱条件:安捷伦气相色谱柱为 HP-5MS 色谱柱(30 m × 0.25 mm × 0.25 μm);载气为高纯度氦气;进样量 1 μL;分流比为 10:1。程序升温条件:60 °C,保持 3 min,以 1 °C/min 升温至 80 °C,保持 3 min,以 5 °C/min 升温至 250 °C。

质谱条件:离子源为 EI 源;电子能量 70 eV;四极杆温度 150 °C;离子源温度为 230 °C;扫描质量范围 m/z 30~550。

1.3.3 体外抗氧化活性研究

1.3.3.1 样品溶液配制 取适量彭祖寿柑优株果皮,打粉烘干后准确称取 2.00 g 粉末加入 40 mL 80%乙醇,超声提取 30 min,过滤,得彭祖寿柑优株果皮提取液,备用。

1.3.3.2 DPPH 自由基清除能力测定 DPPH 自由基清除能力测定参照文献[13]报道的方法适当改进。以抗坏血酸溶液为标样做标准曲线。分别准确吸取不同浓度的溶于 80%乙醇的抗坏血酸溶液,置于 10 mL 比色管中,加入 3.5 mL DPPH 自由基溶液,振荡摇匀,避光反应 30 min,以 DPPH 自由基溶液为对照,以 80%乙醇溶液调零,在波长 517 nm 处测吸光度,平行 3 次。样品溶液用 80%乙醇稀释至适当倍数,同抗坏血酸方法测定,按式(1)计算 DPPH 自由基清除率,抗氧化能力用抗坏血酸当量表示。

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

式中, A_i ——样品组吸光度; A_j ——对照组吸光度; A_0 ——空白组吸光度。

1.3.3.3 ABTS·⁺自由基清除能力测定 ABTS·⁺自由基清除能力测定参照文献[14]~[15]的方法。取 ABTS 和乙酸钠,配制 7 mmol/L ABTS 溶液;称取过硫酸钾配制成 2.45 mmol/L 溶液,将 ABTS 溶液与过硫酸钾溶液按 1:1 的体积比摇匀混合得 ABTS 储备液,避光反应 16 h。使用前用 20 mmol/L 乙酸钠(pH 4.5)将 ABTS 储备液稀释为工作液,使其在 734 nm 波长处的吸光度为 0.700±0.005。以抗坏血酸溶液为标样做标准曲线。分别准确吸取不同浓度的溶于 80%乙醇的抗坏血酸溶液 0.1 mL,置于 10 mL 比色管中,加入 4.9 mL ABTS 自由基工作液,振荡混匀,反应 10 min。以 ABTS 自由基工作液为对照,以 80%乙醇溶液调零,于 734 nm 波长处测定吸光度。样品溶液用 80%乙醇稀释至适当倍数,同抗坏血酸方法测定,抗氧化能力用抗坏血酸当量表示,清除率计算同公式(1)。

1.3.3.4 铁离子还原能力测定 铁离子还原能力测定参照文献[15]和[16]的方法。称取 5.1 g 乙酸钠置于 250 mL 容量瓶中,加入 20 mL 冰醋酸,加水定容至 250 mL,再加入适量 1 mmol/L 氢氧化钠溶液,调节至 pH 值为 3.6,制成醋酸-醋酸钠缓冲液;称取 TPTZ 0.0312 g,置 10 mL 容量瓶中,加 40

mmol/L 盐酸溶液定容配成 10 mmol/L 溶液;称取 0.1625 g FeCl₃,置 50 mL 容量瓶中,加水定容配成 20 mmol/L 溶液;将上述 3 种溶液以 10:1:1 的体积比混合均匀,即得 FRAP 工作液。

标准曲线的绘制:取 FeSO₄ 溶液,用 80%乙醇稀释至一系列不同浓度的溶液(100~2 000 μmol/L)。分别准确吸取 200 μL 溶液于 10 mL 比色管中,加入 3.8 mL FRAP 工作液,振荡混匀,在 37 °C 条件下反应 10 min。以 80%乙醇溶液调零,在波长 593 nm 处测定吸光度。样品溶液同 FeSO₄ 溶液的测定方法。清除率计算同公式(1),抗氧化能力以毫摩尔硫酸亚铁当量每克干物质计(mmol FeSO₄/g)。

1.3.3.5 TBA 比色法测定 MDA 含量 断头处死大鼠(250~270 g),迅速取出肝脏置于预冷至 4 °C 的生理盐水中,洗去表面残血,用滤纸吸干,制成 10%肝匀浆生理盐水液。

参照文献[17]~[18]报道的试验方法适当改进。在 TCA-盐酸中加入 0.3 mL 0.68%硫代巴比妥酸(在 0.125 mol/L 盐酸中加入 168 mg/mL 三氯乙酸),即得 TBARS 测定终止液。取 0.2 mL 不同质量浓度的样品溶液(0.2~2 mg/mL)与 10%的肝脏匀浆混合,加入 0.1 mL FeSO₄·7H₂O(5 mmol/L)和 0.1 mL H₂O₂(100 mmol/L)引发脂质过氧化,37 °C 孵育 60 min。孵育完毕后加入终止液停止反应,将反应混合物在 95 °C 加热 60 min。将样品冷却并离心,在波长 532 nm 处测量上清液的吸光度。抗坏血酸测定方法同样品溶液,抗氧化能力用半数抑制浓度(IC₅₀)表示。

$$\text{抑制率} = (A_{\text{对照}} - A_{\text{测试}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}}) \times 100\% \quad (2)$$

式中, $A_{\text{对照}}$ ——对照组吸光度; $A_{\text{测试}}$ ——样品组吸光度; $A_{\text{空白}}$ ——空白组吸光度。

1.3.4 网络药理学研究

1.3.4.1 疾病靶点与彭祖寿柑优株果皮成分靶点的筛选 通过 GeneCards (<https://www.genecards.org>)、TTD (<http://db.idrblab.net/ttd/>)、DisGeNet (<https://www.disgenet.org/home/>)、CTD (<https://ctdbase.org/>)、DrugBank (<https://www.drugbank.ca/>)、OMIM (<https://omim.org/>)、TCMSP (<http://tcmspw.com/tcmsp.php>) 等数据库分别搜索“anti-oxidant”、“ox-

idative stress”、“anti-oxidative stress”,合并各数据库疾病靶点,去重后,运用 Uniprot 蛋白数据库 (<https://www.uniprot.org>) 将靶点名称转化为基因名称,得到与抗氧化相关的靶点。通过调研文献及成分解析得到彭祖寿柑优株果皮成分,并在 TCM-SP、SwissTargetPrediction 数据库 (<http://www.SwissTargetPrediction.ch/>) 中查询化合物的 OB 值与 DL 值,获得活性成分相关的靶点蛋白,结合 UniProt 数据库查询靶点对应的基因名,规范靶点蛋白。

1.3.4.2 核心靶点的筛选和 PPI 网络图的构建

根据活性成分靶点和抗氧化靶点,绘制韦恩图,共有靶点为彭祖寿柑优株果皮干预抗氧化的潜在靶点。将潜在靶点录入 STRING 11.5 数据库 (<https://string-db.org/cgi/input.pl>) 软件,限定蛋白种类为 Homo sapiens,最低相互作用阈值设为 Highest confidence (>0.4),隐藏网络中无联系的节点,其余参数设置不变,获取蛋白-蛋白相互作用 (Protein-protein interaction, PPI) 关系。将上述结果导入 Cytoscape 3.8.2 软件进行可视化处理,绘制相互作用网络,并选取“度值”(Degree)、“介数中心性”(Betweenness centrality)、“接近中心性”(Closeness centrality) 3 个重要拓扑参数均大于中位数的靶点作为核心靶点。

1.3.4.3 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析 利用 R 语言 (clusterProfiler 包) 对关键靶点蛋白进行基因本体 (Gene ontology, GO) 功能富集分析和基于京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析。GO 功能富集包括基因产物生物功能

(Biological process, BP)、细胞功能 (Cellular component, CC) 和分子功能 (Molecular function, MF) 分析,对基因进行注释和分类;KEGG 通路富集分析可以进一步明确靶点蛋白的生物学功能。GO 和 KEGG 分析均根据 $P < 0.05$ 表示具有统计学意义。

1.3.4.4 成分-靶点-通路网络构建 根据筛选得到的成分、靶点和通路,运用 Cytoscape 3.8.2 软件构建“活性成分-关键靶点-通路”的分析网络。

1.3.5 分子对接验证 结合文献[19]和[20]及网络药理学结果进行筛选,得到彭祖寿柑优株果皮抗氧化的 7 个潜在活性成分,如表 1 所示,借助 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) 在线数据库获取潜在活性成分的 2D 结构,采用 Discovery Studio 软件对各成分进行能量优化并保存。通过 RSCB PDB (<https://www.rcsb.org/>) 数据库筛选出网络药理学排名靠前的 4 个核心靶点蛋白的晶体复合物,包括 TP53、MAPK3、MMP9、PPARA。借助 Discovery Studio 2016 Client 软件去除配体与非蛋白分子并保存。以原配体空间结构为中心活性口袋,用 CDocker 模块将原配体对接到活性口袋中,计算原配体与对接构象的均方根偏差 (Root-mean-square deviation, RMSD),当 $RMSD < 2\text{\AA}$ 时,说明既定数值能够较好地体现原配体与蛋白的结合模式^[21]。最后采用 CDocker 模块将各成分对接到活性口袋,以原配体与蛋白受体对接得分值的 80% 作为阈值,选择对接得分值接近或者高于阈值的化合物作为靶标潜在的活性成分^[22],判断其与受体的关键氨基酸是否具有相互作用。

表 1 彭祖寿柑优株果皮抗氧化的潜在活性成分

Table 1 Potential active ingredients of antioxidant of *Citrus reticulata* Blanco superior plants fruit peel

序号	MOL	成分	CAS	类型	Pubchem ID
1	MOL004328	柚皮素 (Naringenin)	480-41-1	黄酮	932
2	MOL005828	川陈皮素 (Nobiletin)	478-01-3	黄酮	72344
3	MOL006411	黄柏酮 (Obacunone)	751-03-1	黄酮	119041
4	MOL005100	橙皮素 (Hesperetin)	520-33-2	黄酮	520-33-2
5	MOL000359	豆甾醇 (Sitosterol)	68555-08-8	甾醇	68555-08-8
6	MOL007930	橙皮苷 (Hesperidin)	520-26-3	黄酮	520-26-3
7	MOL013336	芸香柚皮苷 (Narirutin)	14259-46-2	黄酮	14259-46-2
8	MOL002881	香叶木素 (Diosmetin)	520-34-3	黄酮	5281612

2 结果与分析

2.1 HPLC-DAD-ESI-MS/MS 化学成分鉴定

2.1.1 主要成分鉴定 采用 HPLC-DAD-ESI-MS/MS 技术,按照 1.3.1 节的条件检测供试品溶液,对彭祖寿柑优株果皮的化学成分进行表征。利用 Agilent MassHunter Qualitative Analysis B.07.00 软件生成化合物分子式,选择一定误差内的分子式与建立的数据库进行匹配,确定分子离子峰,对解析获得的数据信息根据参考文献和化合物裂解规律推断可能的化合物。得到正、负离子模型的总离子流图(TIC),见图 2。

彭祖寿柑优株果皮中共检测到 32 个化合物,具体包括黄酮类化合物 15 个,有机酸类化合物 7 个,苯丙素类化合物 4 个,甾体类化合物 2 个及其

它类型化合物 4 个,结果见表 2。4,6,9~10,12~17,19~20,22,26,28 号峰为黄酮类化合物;1,2,25,27,29,30,32 号峰为有机酸类化合物;18,21,23,24 为苯丙素类化合物;3 号峰为氨基酸类化合物;5,31 号峰为甾醇类化合物,剩余为其它类型化合物。

2.1.2 质谱裂解规律分析 黄酮类化合物是具有 2-苯基色原酮结构的化合物,其裂解方式主要是丢失中性碎片 CO、H₂O,黄酮苷类则常脱去糖基,当化合物中有甲氧基存在时,化合物首先失去甲基,然后 C 环丢失碎片 CO 等^[43-44]。结合建立的数据库、参考文献推断出 15 个黄酮类化合物,分别是 5,7,8,4'-四甲氧基黄酮、山奈苷、芹菜素、牡荆素、葡萄糖苷、香风草苷、橙皮苷、橘红素、5-羟基-

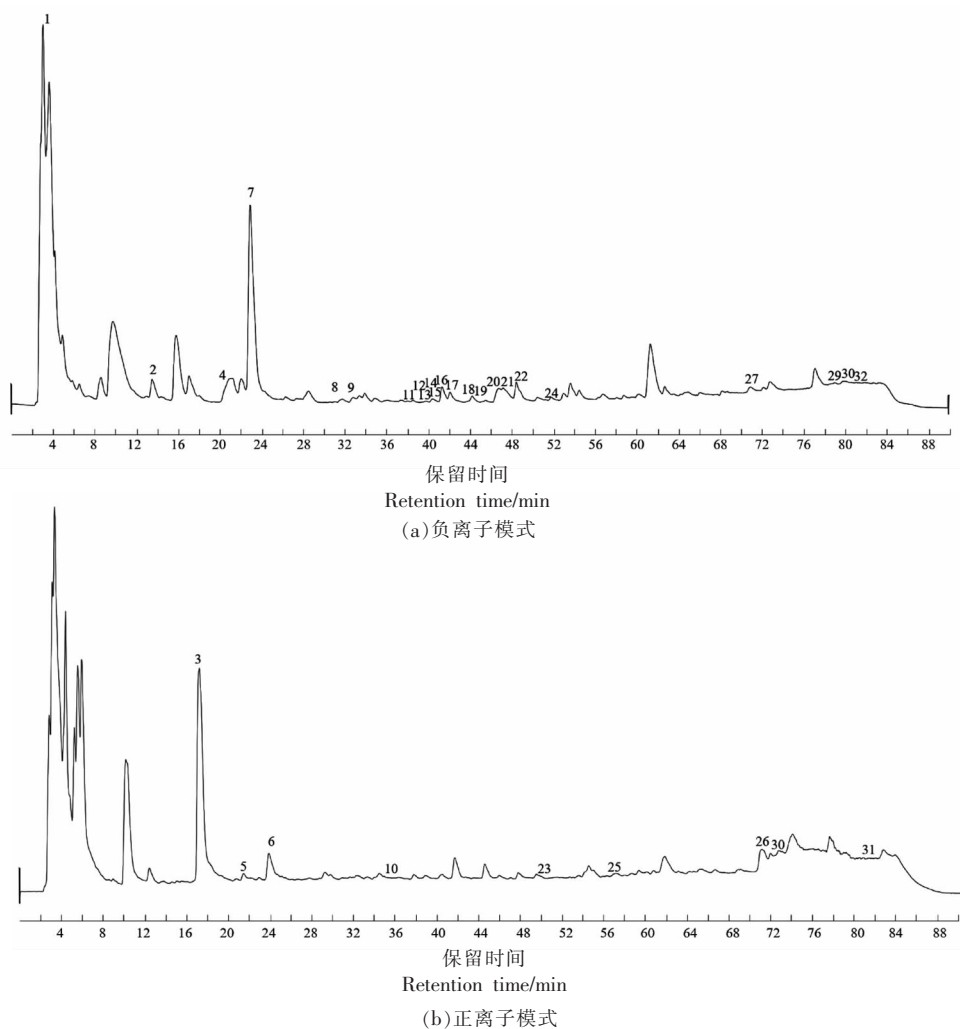


图 2 样品总离子流图

Fig.2 Total ion flow diagram of sample

表2 HPLC-ESI-MS/MS法鉴定彭祖寿柑优良果皮化学成分

序号	t_R/min	m/z	分子式	化合物	MS/MS (m/z)	误差/ $\times 10^6$	类别	参考文献
1	4.155	133.0146[M-H] ⁻	C ₄ H ₆ O ₅	苹果酸	71.5486[M-H-H ₂ O-CO ₂] ⁻	2.32	有机酸	[23]
2	15.983	191.0199[M-H] ⁻	C ₆ H ₈ O ₇	柠檬酸	173.0101[M-H-H ₂ O] ⁻ ; 129.0258[M-H-H ₂ O-CO ₂] ⁻ ; 111.0175[M-H-CO ₂ -2H ₂ O] ⁻ ; 87.0100[M-2H-2CO ₂ -CH ₃] ⁻	1.17	有机酸	[23]~[24]
3	17.089	205.096[M+H] ⁺	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	色氨酸	188.0719[M+H-NH ₃] ⁺ ; 170.0156[M+H-NH ₃ -OH] ⁺ ; 142.1584[M+H-COOH-NH ₃] ⁺ ; 132.0998[M-C ₂ H ₂ NO ₂] ⁺ ; 118.0856[M-C ₃ H ₄ NO ₂] ⁺	-4.9	氨基酸	[25]
4	20.937	341.1014[M-H] ⁻	C ₁₉ H ₁₈ O ₆	5,7,8,4'-四甲氧基黄酮	179.0568[M-H-C ₆ H ₈ O-2CH ₃] ⁻	-4.46	黄酮	[26]
5	21.872	413.3815[M+H] ⁺	C ₂₉ H ₄₈ O	豆甾醇	367.0264[M+H-C ₂ H ₆ O] ⁺ ; 171.1014	5.06	甾醇	[27]
6	24.05	579.1727[M+H] ⁺	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	山奈苷	271.1952[M+H-C ₅ H ₈ O ₄] ⁺	0.94	黄酮	[28]
7	24.31	121.03[M-H] ⁻	C ₇ H ₆ O ₂	对羟基苯甲醛	92.0261; 79.7039	3.21	其他	[29]
8	31.655	163.0406[M-H] ⁻	C ₉ H ₈ O ₃	对羟基肉桂酸	119.0475[M-H-CO ₂] ⁻ ; 117.0334[M-H-CH ₂ O ₂] ⁻ ; 93.0333[M-H-C ₃ H ₃ O ₂] ⁻	1.72	其他	[30]
9	33.918	269.046[M-H] ⁻	C ₁₅ H ₁₀ O ₃	芹菜素	251.0813[M-H-H ₂ O] ⁻ ; 225.0640[M-H-CO ₂] ⁻	-0.36	黄酮	[31]
10	35.964	433.1122[M+H] ⁺	C ₂₁ H ₃₀ O ₁₀	柚皮素-7-O-葡萄糖苷	269.0924	-1.1	黄酮	[32]
11	38.658	151.0409[M-H] ⁻	C ₈ H ₈ O ₃	香草醛	137.0248[M-H-CH ₂] ⁻	5.61	其他	[26]
12	39.256	593.1882[M-H] ⁻	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₄	牡荆素葡萄糖苷	309.1146	1.68	黄酮	[33]
13	39.256	593.1878[M-H] ⁻	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₄	香风草苷	241.3879[M-H-Rha-Glc-CO] ⁻ ; 151.208[M-H-Rha-Glc-C ₆ H ₁₀ O] ⁻	1.26	黄酮	[26]
14	41.05	609.1849[M-H] ⁻	C ₂₈ H ₃₄ O ₁₅	橙皮苷	447.1538[M-H-C ₆ H ₁₀ O ₅] ⁻ ; 301.0442[M-H-C ₆ H ₁₀ O ₅ -C ₆ H ₁₀ O ₄] ⁻	3.39	黄酮	[34]
15	41.055	373.1303[M+H] ⁺	C ₂₀ H ₂₀ O ₇	橘红素/福橘素	313.1628; 269.0870; 209.9521	1.65	黄酮	[34]
16	41.349	417.1221[M-H] ⁻	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	5-羟基-3,6,7,8,3',4'-六甲氧基黄酮	369.1314	7.12	黄酮	[35]
17	42.074	399.1449[M-H] ⁻	C ₂₂ H ₂₄ O ₇	5,4-二羟基-7,8-二甲氧基黄酮	163.0758[C ₆ H ₁₁ O ₅] ⁻	-2.55	黄酮	[36]

(续表2)

序号	t_R/min	m/z	分子式	化合物	MS/MS (m/z)	误差/ $\times 10^6$	类别	参考文献
18	44.21	277.1092[M-H] ⁻	$C_{15}H_{18}O_5$	水合橙皮内酯	215.0173 [M-H-CO ₂ -H ₂ O] ⁻ ; 189.8587 [M-H-C ₄ H ₆ O ₂] ⁻ ; 174.9568[M-H-C ₄ H ₆ O ₂ -CH ₃] ⁻ ; 159.1023[M-H-C ₄ H ₆ O ₂ -2CH ₃] ⁻	5.07	萜丙素	[26]
19	44.249	301.0373[M-H] ⁻	$C_{15}H_{10}O_7$	槲皮素	151.0404; 161.9684; 162.9618; 178.0516	5.53	黄酮	[37]
20	47.334	433.1153[M-H] ⁻	$C_{21}H_{22}O_{10}$	櫻桃苷	271.2199[M-H-Glc] ⁻	1.98	黄酮	[26]
21	47.797	353.1397[M-H] ⁻	$C_{21}H_{22}O_5$	异米拉素	201.0384[M-H-C ₁₀ H ₁₇ O] ⁻ ; 145.0584[M-H-C ₁₀ H ₁₇ O-2CO] ⁻	-1.46	萜丙素	[26]
22	48.053	435.1307[M+HCOO] ⁻	$C_{20}H_{22}O_8$	白藜芦醇-3-O-葡萄糖苷	311.1476; 273.0206[M+HCOO-Glc] ⁻	-0.37	黄酮	[38]
23	50.483	195.067[M+H] ⁺	$C_{10}H_{10}O_4$	阿魏酸	180.0908[M+H-CH ₃] ⁺ ; 151.0360[M+H-COOH] ⁺	6.51	萜丙素	[39]
24	52.878	343.1572[M+HCOO] ⁻	$C_{19}H_{22}O_3$	葡萄柚内酯	225.9316[M-H-C ₆ H ₃] ⁻ ; 213.9779; 187.8613[M-H-C ₆ H ₂ -C ₂ H ₅] ⁻ ; 161.0453[M-H-C ₆ H ₂ -2C ₂ H ₅] ⁻	6.75	萜丙素	[34]
25	56.504	331.283[M+H] ⁺	$C_{19}H_{38}O_4$	单棕榈酸甘油	313.4245[M+H-H ₂ O] ⁺ ; 239.0222[M+H-H ₂ O-74] ⁺	-4.13	有机酸	[40]
26	70.682	403.1393[M+H] ⁺	$C_{21}H_{22}O_8$	川陈皮素	373.1795[M+H-2CH ₃] ⁺ ; 355.1566[M+H-2CH ₃ -H ₂₀] ⁺ ; 211.09161	1.98	黄酮	[41]
27	74.720	279.2338[M-H] ⁻	$C_{18}H_{32}O_2$	亚油酸	261.1129[M-H-H ₂ O] ⁻ ; 161.0456[M-H-C ₆ H ₁₄ O ₃] ⁻	2.86	有机酸	[34]
28	72.048	455.2072[M+H] ⁺	$C_{28}H_{30}O_7$	黄酮	161.1303[M+H-C ₁₆ H ₂₂ O ₅] ⁺	-2.3	黄酮	[34]
29	79.824	315.2527[M+HCOO] ⁻	$C_{17}H_{34}O_2$	十七烷酸	269.4629[M+HCOO-CH ₂ O ₂] ⁻	-3.99	有机酸	[41]
30	80.849	283.2658[M-H] ⁻	$C_{18}H_{36}O_2$	硬脂酸	187.8609[M-C ₇ H ₁₃] ⁻ ; 173.9944[M-C ₈ H ₁₅] ⁻	3.07	有机酸	[25]
31	81.912	415.3928[M+H] ⁺	$C_{29}H_{50}O$	β -谷甾醇	135.7570; 119.0856; 91.0548	-1.07	甾醇	[42]
32	81.959	303.2324[M-H] ⁻	$C_{20}H_{32}O_2$	花生四烯酸	285.5450[M-H-H ₂ O] ⁻ ; 59.7150[M-H-C ₁₈ H ₂₈] ⁻	-1.76	有机酸	[41]

注:“+”表示正离子模式,“-”表示负离子模式。

3, 6, 7, 8, 3', 4'-六甲氧基黄酮、5, 4-二羟基-7, 8-二甲氧基黄酮、柚皮素-7-O-葡萄糖苷、槲皮素、櫻桃苷、白藜芦醇-3-O-葡萄糖苷、川陈皮素、黄酮。

式并参考相关文献^[31], 推断其为芹菜素($C_{15}H_{10}O_5$); 14号峰的准分子离子峰为 m/z 609.1849 [M-H]⁻, 在二级质谱中, 该母离子丢失1分子 $C_6H_{10}O_5$, 形成 m/z 447的碎片离子, 之后又失去了1分子 $C_6H_{10}O_4$, 形成 m/z 301的碎片离子, 根据该化合物的质谱相对分子质量、断裂方式并参考相关文献^[28, 34], 推断其为橙皮苷($C_{28}H_{34}O_{15}$); 26号峰的准分子离子峰为 m/z 403.1393[M+H]⁺, 在二级质谱中, 该母离子丢失2分子 CH_3 , 形成 m/z 373的碎片离子, 之后又失去了1分子 H_2O , 形成 m/z 355的

以峰9, 14, 26的解析为例, 了解黄酮类化合物的质谱裂解规律。9号峰的准分子离子峰为 m/z 269.046[M-H]⁻, 在二级质谱中, 该母离子丢失1分子 H_2O , 形成 m/z 251的碎片离子, 或丢失1分子 CO_2 , 形成 m/z 225的碎片离子, 根据该化合物的精确相对分子质量、断裂方

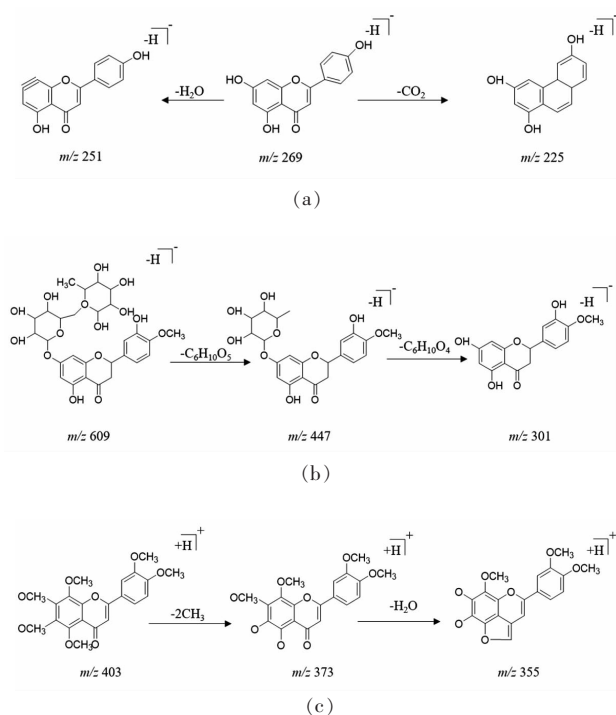
碎片离子,根据该化合物的精确相对分子质量、断裂方式并参考相关文献^[28,34],推断其为川陈皮素($C_{21}H_{22}O_8$)。芹菜素、橙皮苷和川陈皮素的碎片离子的裂解途径如图3所示。

有机酸类化合物在负离子模式下主要以[M-H]⁻的准分子离子峰形式存在,在碰撞下,易发生CO₂、H₂O等中性分子丢失,形成[M-H-CO₂]⁻或[M-H-H₂O]⁻碎片离子^[45-46]。结合建立的数据库和参考文献信息,推断出7个有机酸类化合物,分别是苹果酸、柠檬酸、单棕榈酸甘油、亚油酸、十七烷酸、硬脂酸、花生四烯酸。以峰2和峰27的解析为例,了解有机酸类化合物的质谱裂解规律。2号峰的准分子离子峰为 m/z 191[M-H]⁻,在二级质谱中,该母离子丢失1分子CO₂形成 m/z 147的碎片离子,之后又失去1分子H₂O,形成 m/z 129的碎片离子,或母离子丢失1个C₆H₁₄O₂,形成 m/z 161的碎片离子。根据该化合物的精确相对分子质量、断裂方式并参考相关文献^[41],推断其为亚油酸($C_{18}H_{32}O_2$)。柠檬酸和亚油酸的碎片离子的裂解途径如图4所示。

苯丙素类化合物是含有1个或几个C₆-C₃单元结构的化合物,包括苯丙素类、香豆素类和木脂素3类成分,质谱裂解中容易丢失H₂O、CO₂及CO等中性分子^[47]。结合建立的数据库和参考文献信息,推断出4个苯丙素类化合物,分别是水合橙皮内酯、异米拉素、阿魏酸、葡萄柚内酯,以峰23的解析为例,了解有苯丙素类化合物的质谱裂解规律。23号峰的准分子离子峰为 m/z 195[M+H]⁺,在二级质谱中,该母离子丢失1分子CH₃,形成 m/z 180的碎片离子,或丢失1分子COOH,形成 m/z 151的碎片离子。根据该化合物的精确相对分子质量、断裂方式并参考相关文献^[39],推断其为阿魏酸($C_{10}H_{10}O_4$),其碎片离子的裂解途径如图5所示。

2.2 挥发油组成分析

根据上述GC-MS条件,对彭祖寿柑优株果



注:a~c依次为芹菜素、橙皮苷、川陈皮素可能的裂解途径。

图3 黄酮类化合物可能的裂解途径

Fig.3 Possible fragmentation pathway of flavonoids

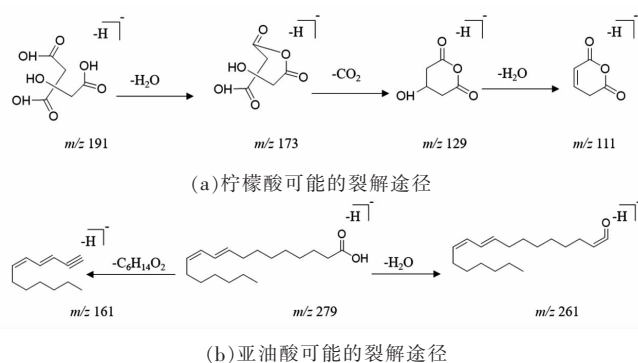


图4 有机酸可能的裂解途径

Fig.4 Possible fragmentation pathway of organic acids

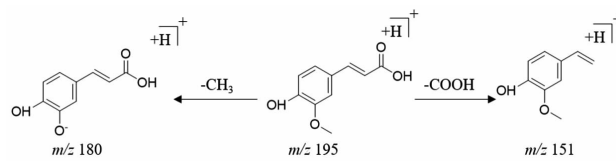


图5 苯丙素类化合物-阿魏酸可能的裂解途径

Fig.5 Possible fragmentation pathway of phenylpropanoids-ferulic acid

皮挥发油成分进行分离鉴定,总离子流图见图 6。经计算机质谱数据系统检索,采用 NIST14.L 谱图库进行检索匹配,按积分查找,对色谱峰进行鉴

定,并采用面积归一化法测得挥发油各组分的相对百分含量,其中总相似度 80%以上的化合物有 37 个,已鉴定出 33 个化合物,结果见表 3。

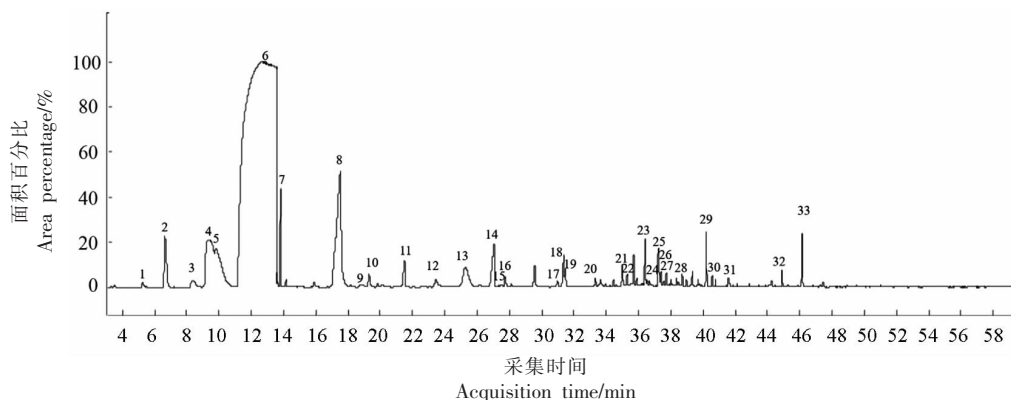


图 6 彭祖寿柑优株果皮挥发油 GC-MS 总离子流图

Fig.6 GC-MS total ion chron chromatogram of volatile oil from *Citrus reticulata* Blanco superior plants fruit peel

表 3 彭祖寿柑优株果皮挥发油 GC-MS 的化学成分分析

Table 3 Chemical composition analysis of volatile oil from *Citrus reticulata* Blanco superior plants fruit peel by GC-MS

峰号	保留时间/min	化合物名称	分子式	占比/%
1	5.248	环己酮	C ₆ H ₁₀ O	0.257922792
2	6.637	Tricyclo[2.2.1.0(2,6)]heptane, 1,3,3-trimethyl-	C ₁₀ H ₁₆	4.111283916
3	8.37	桉烯	C ₁₀ H ₁₆	1.066240151
4	9.337	月桂烯	C ₁₀ H ₁₆	12.47628967
5	9.806	(+)-异松蒎醇	C ₁₀ H ₁₈ O	8.29425044
6	13.118	(+)-柠檬烯	C ₁₀ H ₁₆	25.01051812
7	13.818	罗勒烯	C ₁₀ H ₁₆	2.650411146
8	17.504	芳樟醇	C ₁₀ H ₁₈ O	19.47654626
9	18.84	2-Cyclohexen-1-ol,1-methyl-4-(1-methylethenyl)-, trans-	C ₁₀ H ₁₆ O	0.330519704
10	19.308	(3E,5E)-2,6-二甲基-1,3,5,7-辛四烯	C ₁₀ H ₁₄	0.722774557
11	21.493	(+)-香茅醛	C ₁₀ H ₁₈ O	1.765259802
12	23.443	4-萜烯醇	C ₁₀ H ₁₈ O	0.816266966
13	25.279	α-松油醇	C ₁₀ H ₁₈ O	3.699230044
14	27.054	癸醛	C ₁₀ H ₂₀ O	3.71660339
15	27.742	醋酸辛酯	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	0.546783704
16	29.571	D-香芹酮	C ₁₀ H ₁₄ O	1.16849214
17	30.959	反式-2-癸烯醛	C ₁₀ H ₁₈ O	0.303054443
18	31.369	紫苏醛	C ₁₀ H ₁₄ O	1.524368924
19	31.458	柠檬醛	C ₁₀ H ₁₆ O	0.637884765
20	33.316	十一醛	C ₁₁ H ₂₂ O	0.253127787
21	34.989	乙酸松油酯	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	0.656601792
22	35.28	乙酸香茅酯	C ₁₂ H ₂₂ O ₂	0.350007909
23	36.402	乙酸橙花酯	C ₁₂ H ₂₀ O ₂	1.356583285
24	37.215	2,7-Octadiene-1,6-diol, 2,6-dimethyl-	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	0.836396494

(续表 3)

峰号	保留时间/min	化合物名称	分子式	占比/%
25	37.257	p-Mentha-1(7),8(10)-dien-9-ol	C ₁₀ H ₁₆ O	0.940825482
26	37.375	β -石竹烯	C ₁₅ H ₂₄	0.35980429
27	37.714	(1R,2S,6S,7S,8S)-8-Isopropyl-1-methyl-3-methylenetri-cyclo[4.4.0.02,7]decane-rel-	C ₁₅ H ₂₄	0.362822557
28	38.699	反式- β -金合欢烯	C ₁₅ H ₂₄	0.311604654
29	40.201	α -法呢烯	C ₁₅ H ₂₄	1.458880239
30	40.567	1-Isopropyl-4,7-dimethyl-1,2,3,5,6,8a-hexahydronaphthalene	C ₁₅ H ₂₄	0.337147108
31	41.572	Cyclohexanemethanol,4-ethenyl-.alpha.,.alpha.,4-trimethyl-3-(1-methylethenyl)-, [1R-(1.alpha.,3.alpha.,4.beta.)]-	C ₁₅ H ₂₆ O	0.498263661
32	44.89	2,6,11-Dodecatrienal, 2,6-dimethyl-10-methylene-	C ₁₅ H ₂₂ O	0.405550041
33	46.148	甜橙醛	C ₁₅ H ₂₂ O	1.448319727

由表 3 可知,提取的挥发油中共鉴定出 33 种物质,包括烷烯类化合物 8 种,烃类 1 种,醇类化合物 7 种,酮类化合物 2 种,酯类化合物 4 种,醛类化合物 7 种,萜类化合物 4 种,其中含量较高的成分为(+)-柠檬烯(25.077%)、芳樟醇(19.529%)、月桂烯(12.510%)、(+)-异松蒎醇(8.316%)、Tricyclo[2.2.1.0(2,6)]heptane, 1,3,3-trimethyl-(4.122%)、 α -松油醇(3.709%)、癸醛(3.727%)。

2.3 体外抗氧化活性研究

采用 DPPH 法、ABTS 法、FRAP 法和 TBARS 法 4 种不同的体系评价彭祖寿柑优株果皮体外抗氧化活性。DPPH 法、ABTS 法以抗坏血酸为标样做标准曲线,FRAP 法以 FeSO₄ 为标样做标准曲线,样品带入公式计算其抑制率。结果表明,当彭祖寿柑优株果皮质量浓度为 12.5063 mg/mL 时,DPPH 自由基清除能力为 18.7128 μ mol VC/g;ABTS 自由基清除能力抑制率为 1 762.3 μ mol VC/g;铁离子还原能力为 50.4 μ mol FeSO₄/g,3 种抗氧化活性测试结果具有一致性。TBARS 法以抗坏血酸为阳性药,阳性药 TBARS 的 IC₅₀ 为 0.347 mg/mL,样品 TBARS 的 IC₅₀ 为 2.570 mg/mL。各标准曲线如图 7 所示。

与常见柑橘属植物相比,以上 4 种不同体系体外抗氧化能力测定数据中,DPPH 自由基清除能力与铁离子还原能力更为显著,整体呈现较好的抗氧化能力^[48]。彭祖寿柑优株果皮发挥抗氧化作用的成分可能是黄酮类成分和挥发性成分。过

去的几十年中,柑橘黄酮的抗氧化能力通过各种体外自由基清除试验得到证实,其抗氧化活性强弱与结构中的酚羟基数目呈正相关,多个酚羟基能够提供大量电子,可将多种自由基转化为稳定结构进而中断其链式反应,从而起到抗氧化的作用^[49]。如彭祖寿柑优株果皮解析出的柚皮苷、橙皮苷等黄酮类化合物具有较好的抗氧化作用。挥发油既是柑橘属植物的特征香气成分,也是有应用价值的生物活性成分,对 O₂⁻ 的清除率较高,具有较好的总抗氧化能力^[50]。如 GC-MS 解析出的含量最高成分柠檬烯,王广超等^[51]研究表明 D-柠檬烯能够增强乙醇性肝损伤大鼠体内抗氧化酶的活性,减少脂质过氧化物的产生。当前对彭祖寿柑优株黄酮类和挥发性成分发挥抗氧化作用的具体机制尚不明确,有待进一步探讨。

2.4 网络药理学研究

2.4.1 疾病靶点与活性成分靶点的筛选 利用 GeneCards 等数据库预测抗氧化作用靶点,并采用 Uniprot 数据库对靶点进行校正,经筛选查重后共得到 4 932 个疾病靶点。通过各数据库筛选到活性化合物 7 个,得到 181 种相关靶点基因。在筛选化合物中大多满足 OB 值>30%,DL 值>0.18%。Tryptophan 和 Cyclohexanone DL 值虽未达到要求,鉴于其有较高的口服利用度,本研究也将其列入研究范围。

2.4.2 PPI 网络图分析 根据药物活性成分靶点和抗氧化靶点,绘制韦恩图,得到 146 个共有靶

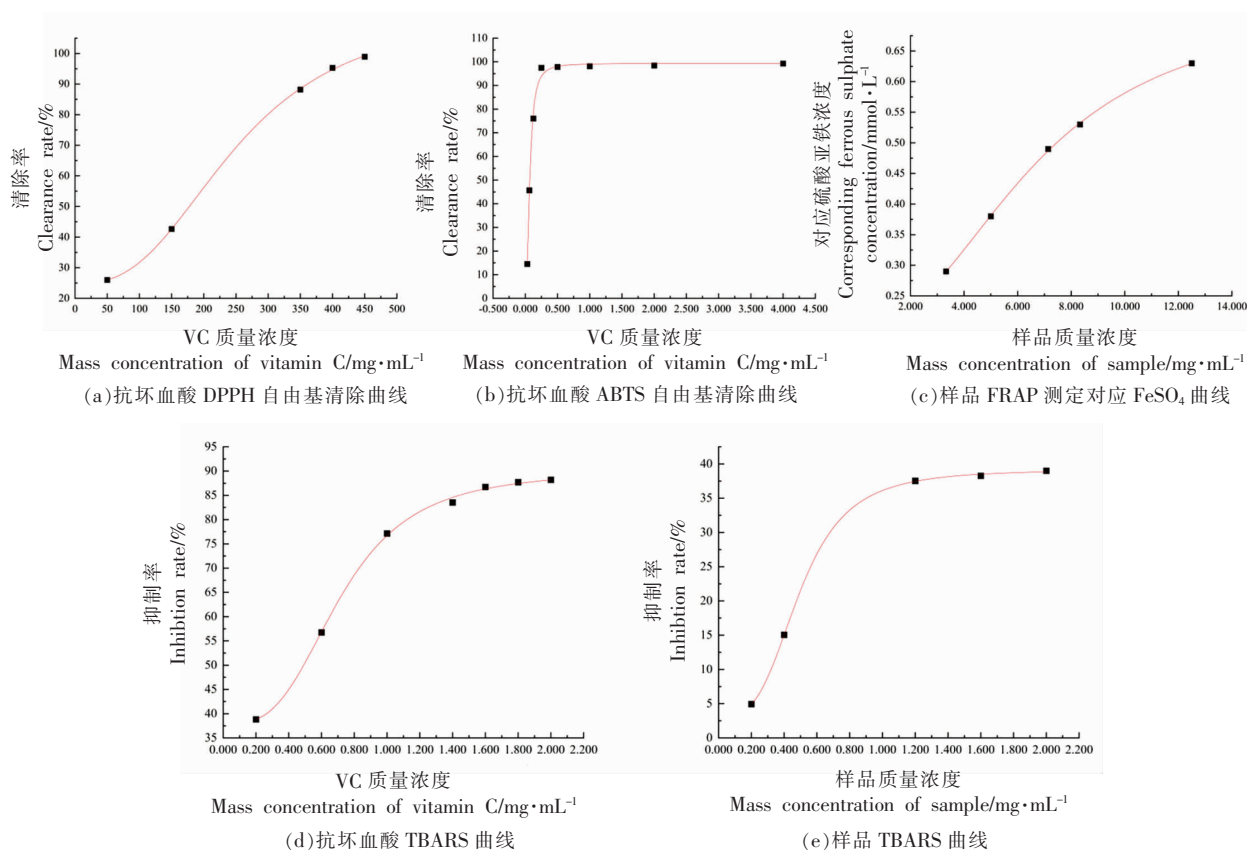


图 7 抗氧化标准曲线

Fig.7 Antioxidant standard curve

点,即为彭祖寿柑优株果皮干预抗氧化的潜在作用靶点,见图 8。筛选得到的共有靶点导入 STRING 11.3 数据库后进行 PPI 网络分析,利用 Cytoscape 3.8.2 的“Network Analyzer”功能对 PPI

网络中的靶点进行拓扑属性分析,见图 9,图中包含 53 个相互作用的节点,458 条相互作用的边。度(Degree)值排名前 3 的 AKT1、TP53、MAPK3 分别与 47、37、35 个蛋白发生相互作用。

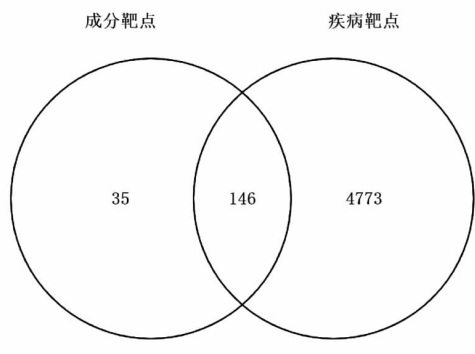


图 8 成分靶点与抗氧化靶点交集韦恩图
Fig.8 Venn diagram of component targets and antioxidant targets

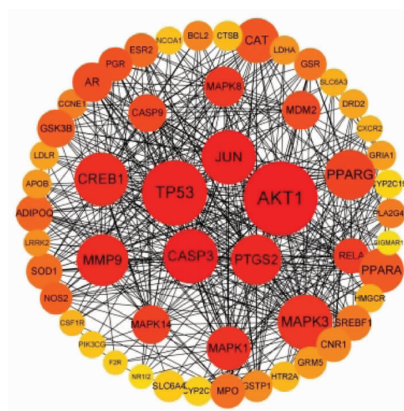


图 9 蛋白-蛋白相互作用(PPI)网络
Fig.9 Protein-protein interaction (PPI) network

2.4.3 GO 功能富集分析与 KEGG 通路分析 通过 R 语言对核心靶点蛋白进行 GO 功能富集分析。结果得到 GO 条目 1 017 个,其中 BP 条目有 921 个,涉及的生物过程有营养水平反应(Response to nutrient levels)、细胞外刺激反应(Response to extracellular stimulus) 和衰老(Aging)等。CC 条目有 45 个,主要富集在膜筏(Membrane raft)、膜微区 (Membrane microdomain)、突触(Caveola)等。MF 条目有 51 个,主要富集在 DNA 结合位点(DNA-binding transcription factor binding)、磷酸酶结合(Phosphatase binding)、DNA 结合的转录激活剂活性和 RNA 聚合酶 II 专用

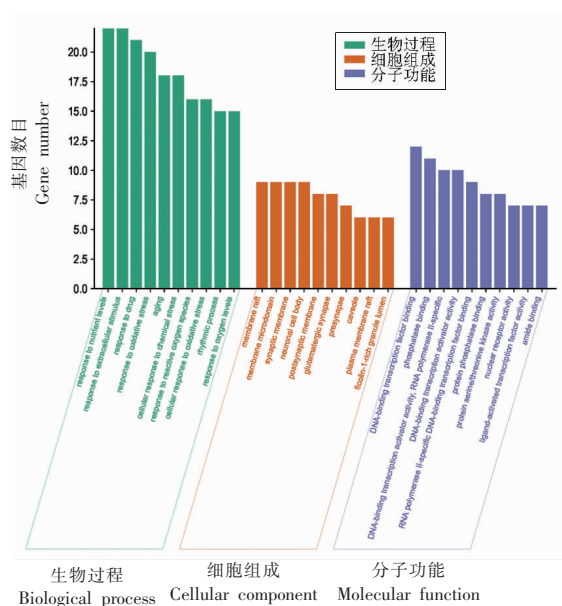


图 10 GO 功能富集分析

Fig.10 GO function enrichment analysis

2.4.4 “活性成分-靶点-通路网络”的构建 将 KEGG 通路富集分析得到的 238 条通路和这些通路涉及的 146 个靶点,以及靶点所对应的 7 种成分,导入 Cytoscape 3.8.2 中构建彭祖寿柑优株果皮“活性成分-靶点-通路”网络,并进行可视化分析,见图 12。

2.5 分子对接

采用 Discovery Studio 软件进行分子对接,结果受体和其原配体对接结果计算所得 RMSD 值小于 2.0 Å,说明既定数值能够较好的体现原配体与蛋白的结合模式。以 TP53、MAPK3、MMP9、PPA-

(DNA-binding transcription activator activity, RNA polymerase II-specific) 等,分别选取 BP、CC、MF 根据 P 值排名前 10 的条目,见图 10。

通过 R 语言对核心靶点进行 KEGG 通路富集分析。结果得到 214 个条目,主要涉及的通路有 PI3K-Akt 信号通路 (PI3K-Akt signaling pathway)、血脂和动脉粥样硬化(Lipid and atherosclerosis)、乙型肝炎(Hepatitis B)等。并选取排名前 20 的通路进行 KEGG 通路富集分析气泡图的绘制,见图 11。以上结果表明,彭祖寿柑优株果皮能通过多条通路达到抗氧化的作用。

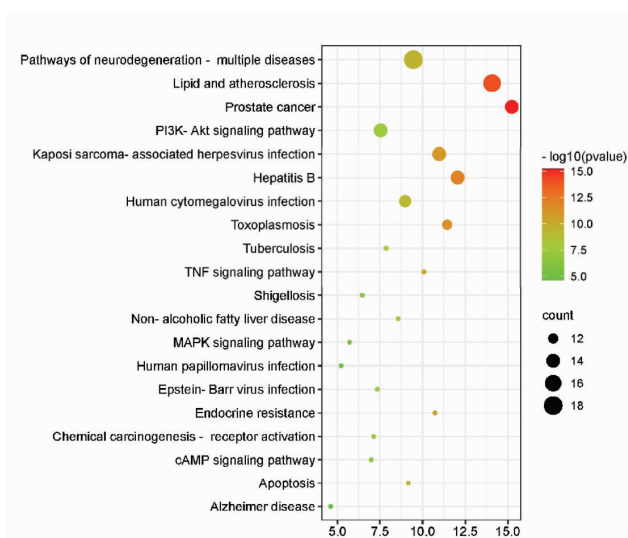


图 11 KEGG 信号通路富集分析(top 20)

Fig.11 Enrichment analysis of KEGG signaling pathway (top 20)

RA 受体与活性成分对接后,结果见表 4,进一步分析其相互作用。

对接结果显示,柚皮素与黄柏酮与各个靶蛋白均有较好的结合。川陈皮素、甲基橙皮苷、柚皮素、芸香柚皮苷与 MMP9 对接打分值最高,谷固醇、黄柏酮与 MAPK3 对接打分值最高,橙皮素、香叶木素与 PPARA 对接打分值最高。分析其相互作用可知,成分与靶蛋白的结合主要是发生氢键作用和疏水作用,分别选取与 3 个靶蛋白对接分值最高的成分作图,如图 13 所示。甲基橙皮苷与 MMP9 的关键氨基酸 ALA191、GLU111、PRO421、

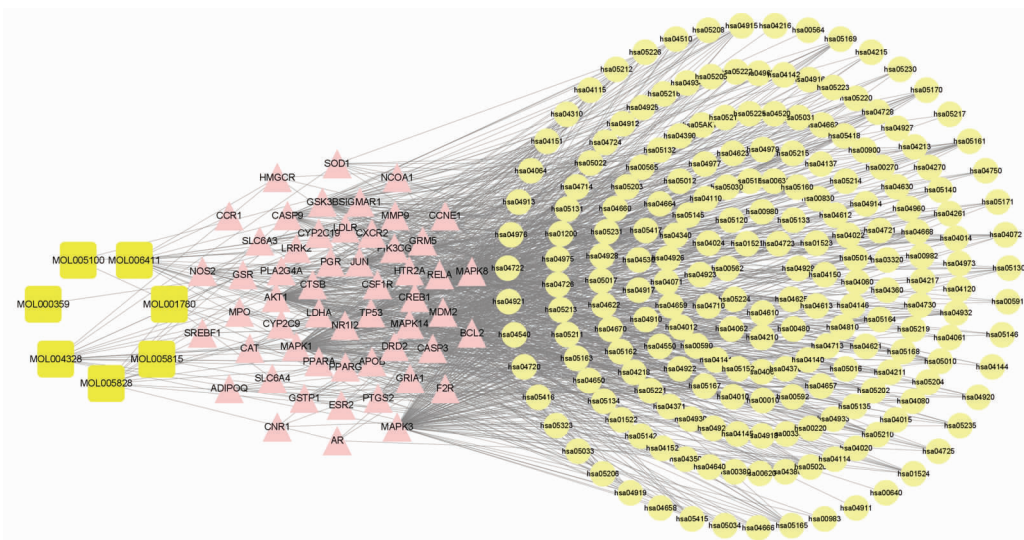


图 12 彭祖寿柑优株果皮“成分-关键靶点-通路”网络

Fig.12 Network prediction of compound-target-pathway of *Citrus reticulata* Blanco superior plants fruit peel

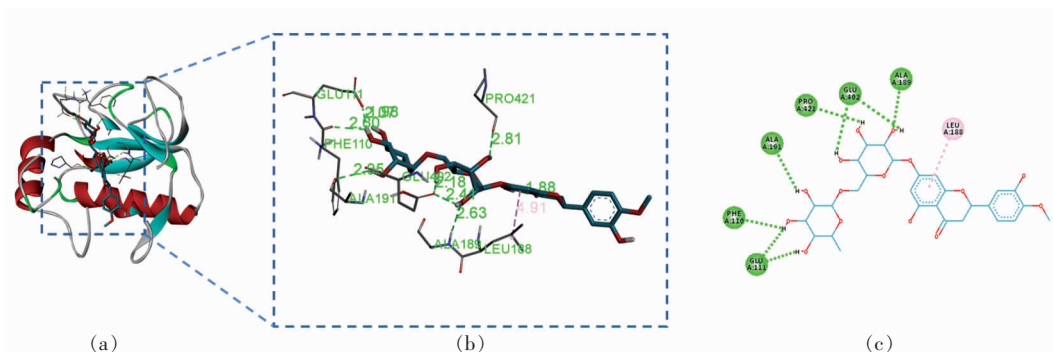
表 4 活性成分与关键靶点对接的 CDOCKER 得分

Table 4 The CDOCKER-energy value of the active ingredients dockes with the key targets

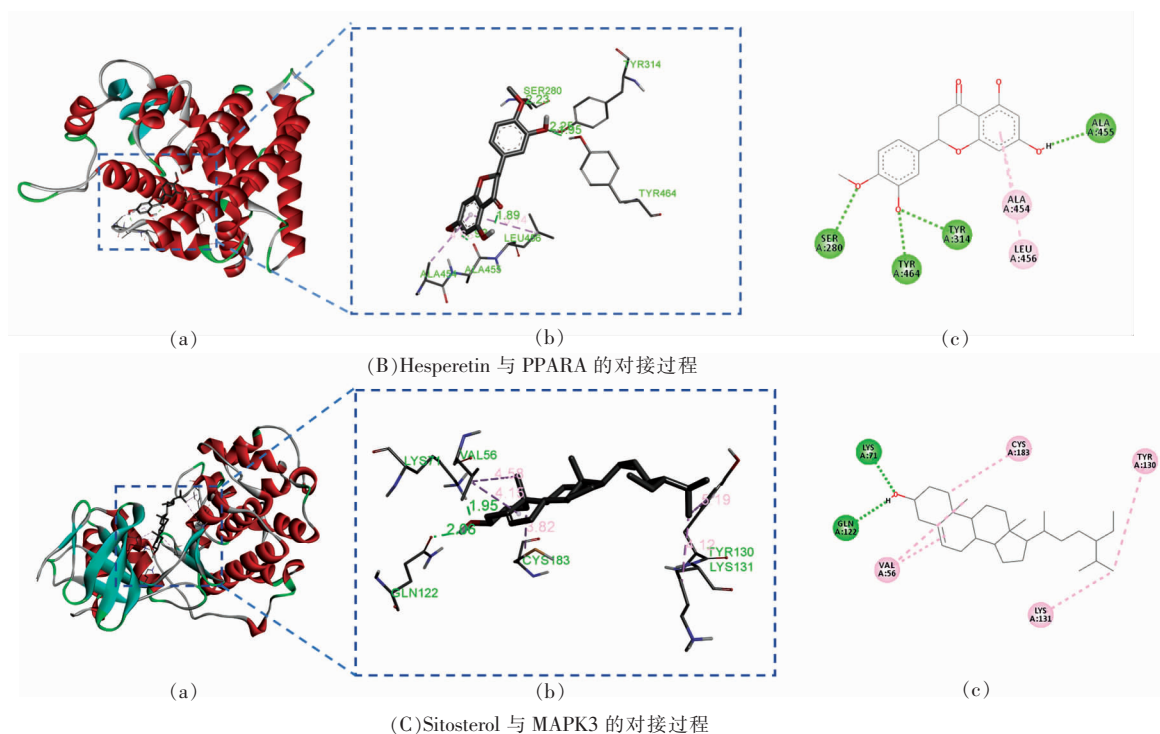
药物活性成分	靶点			
	TP53	MAPK3	MMP9	PPARA
柚皮素 (Naringenin)	41.6859	48.0788	58.3167	48.7856
川陈皮素 (Nobiletin)	58.3325	62.3261	68.3806	
黄柏酮 (Obacunone)	36.6397	37.9869	42.8102	48.96
橙皮素 (Hesperetin)	38.8316	43.035		
谷固醇 (Sitosterol)	29.7436	49.2428	46.5014	
甲基橙皮苷 (Hesperidin)	34.1391		43.5408	46.8616
芸香柚皮苷 (Narirutin)	32.3528	40.0189	50.5588	
香叶木素 (Diosmetin)	47.8002	65.1772	69.3994	

PHE110 发生氢键作用，与 LEU188 发生疏水作用；橙皮素与 PPARA 的关键氨基酸 SER280、TYR464、ALA455 发生氢键作用，与 ALA454、LEU456 发生疏水作用。谷固醇与 MAPK3 的关键氨基酸 LYS71、GLN122 发生氢键作用，与 VAL56、

CYS183、TYR130、LYS131 发生疏水作用^[52]。分子对接结果进一步验证了网络药理学筛选出的靶点可能是彭祖寿柑优株果皮发挥抗氧化作用的关键作用靶点。



(A)Hesperidin 与 MMP9 的对接过程



注:a 为成分与靶蛋白对接图,b 为配体受体结合处相互作用 3D 图,c 为配体受体结合处相互作用 2D 图。

图 13 活性成分与靶蛋白的分子对接过程示例图

Fig.13 Example diagram of molecular docking process between active ingredients and target protein

3 讨论

质谱技术可以实现高效准确的复杂体系快速分析,通过化合物的质谱一级、二级信息可以快速获取其结构信息,而色谱/质谱联用技术可以为中药多组分鉴定研究提供更可靠的依据^[43]。本研究通过 HPLC-DAD-ESI-MS/MS 与 GC-MS 法全面解析了彭祖寿柑优株果皮中的化学成分,共鉴定出 65 个化合物,并研究总结了黄酮类、有机酸类和苯丙素类化合物在质谱中的裂解规律,为彭祖寿柑优株的药效物质基础研究提供了试验和理论依据。其次采用 DPPH 法、ABTS 法、FRAP 法和 TBARS 法评价其抗氧化性能,通过与文献对比发现,彭祖寿柑优株清除 DPPH 自由基和铁离子还原能力较为显著。

网络药理学结果表明有 7 个化合物为潜在活性成分,以橙皮素、柚皮素等黄酮类成分为主,综合文献与网络药理学结果进行分子对接验证,从整体水平对药物与机体相互作用及其机制进行研究。结果表明,TP53、MAPK3、MMP9、PPARA 等靶

点参与 PI3K-Akt 信号通路、MAPK 信号通路、TNF 信号通路、cAMP 信号通路、脂质和动脉硬化等信号通路发挥抗氧化作用。研究表明,氧化应激与 PI3K/AKT、MAPK 信号通路的活化有关,氧化应激水平的增加可以促使活性氧 (ROS) 大量生成,进而阻断 PI3K/AKT、MAPK 信号通路的激活,彭祖寿柑优株果皮中的柚皮素、川陈皮素、甲基橙皮苷等黄酮类化合物可能作用于 TP53、MAPK3 靶蛋白,调控并激活 PI3K/AKT 和 MAPK 信号通路,起到抗氧化的作用^[53]。有相关文献报道柑橘属植物发挥抗氧化作用的关键物质基础和作用机制与上述相同^[48]。

综上,芸香科柑橘属植物为现研究发现抗氧化作用较好的植物,既有药用价值,也有食用价值,然而鉴于彭祖寿柑优株尚未在市场上广泛销售,故没有文献对彭祖寿柑优株抗氧化作用及机制进行详细阐明,限制了该品种进一步的发展。本研究基于 HPLC-DAD-ESI-MS/MS 与 GC-MS 定性表征彭祖寿柑优株的化学成分,将柑橘属植物中的挥发性成分用于抗氧化网络药理学研究,并

将网络药理学与分子对接技术用于筛选并验证其主要活性成分的作用靶点, 对其发挥抗氧化作用的药效成分进行系统研究, 为植物中的天然抗氧化剂筛选提供进一步信息, 为该植物更长久的可持续发展提供理论依据。然而其体内抗氧化机制及相关化合物的活性仍有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] FENG Y, WANG N, YE X, et al. Hepatoprotective effect and its possible mechanism of *coRTidis rhizoma* aqueous extract on carbon tetrachloride-induced chronic liver hepatotoxicity in Rats[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2011, 138(3): 683-690.
- [2] 王晶波, 杨倬, 秦文, 等. 牛肝菌多酚细胞抗氧化活性评价模型研究[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(6): 273-279
- WANG J B, YANG Z, QIN W, et al. Studies on evaluation model of cellular antioxidant activity for boletus polyphenols[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2021, 21(6): 273-279.
- [3] 刘树兴, 赵芳. 从天然植物中开发抗氧化剂研究进展[J]. *食品研究与开发*, 2007(7): 179-182.
- LIU S X, ZHAO F. Research progress on natural antioxidant from nature plant[J]. *Food Research and Development*, 2007(7): 179-182.
- [4] DUGO G, GIACOMO A D. Citrus: The genus citrus[EB/OL]. CRC, 2002. <https://www.perlego.com/book/1712106/citrus-the-genus-citrus-pdf>.
- [5] BENAVENTE-GARCÍA O, CASTILLO J. Update on uses and properties of citrus flavonoids: New findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity[J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(15): 6185-6205.
- [6] 温文英, 林标声. 橘皮提取物在蛋糕制作中的应用研究[J]. *安徽农业科学*, 2020, 48(14): 166-167, 220.
- WEN W Y, LIN B S. Study on the application of orange peel extract in cake making[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2020, 48(14): 166-167, 220.
- [7] 刘仙俊, 李文华, 孙红艳, 等. 橘子不同部位活性成分含量及其体外抗氧化能力研究[J]. *食品研究与开发*, 2021, 42(17): 13-18.
- LIU X J, LI W H, SUN H Y, et al. Study on the active ingredients contents and antioxidant capacity of different parts of tangerine[J]. *Food Research and Development*, 2021, 42(17): 13-18.
- [8] 郑重祿. 彭祖寿柑高接引种及栽培技术要点[J]. *福建果树*, 2007(2): 52-53.
- ZHENG Z L. Key points of high graft introduction and cultivation techniques [J]. *Fujian Fruits*, 2007(2): 52-53.
- [9] 项梦辉, 黄征槐. 彭祖寿柑引种表现及优质低耗栽培技术[J]. *东南园艺*, 2015, 3(5): 40-42.
- XIANG M H, HUANG Z H. Introduction performance and high quality and low cost cultivation techniques of 'Pengzushougan' Tangor [J]. *Southeast Horticulture*, 2015, 3(5): 40-42.
- [10] 刘育铨, 毛思宇, 李昱, 等. 黄花倒水莲总皂苷抗凝血和抗血栓作用及机制: 基于网络药理学[J]. *食品科学*, 2021, 42(23): 206-213.
- LIU Y C, MAO S Y, LI Y, et al. Anticoagulant and antithrombotic effect and underlying mechanism of total saponins from the roots of *Polygala fallax* Hemsl: A study based on network pharmacology[J]. *Food Science*, 2021, 42(23): 206-213.
- [11] 刘雪飞, 吴晓芳, 祁悦, 等. 基于分子对接的副溶血弧菌外膜蛋白 OmpW 天然抑制剂的筛选[J]. *中国食品学报*, 2021, 21(3): 22-30.
- LIU X F, WU X F, QI Y, et al. Screening of natural inhibitors of outer membrane protein OmpW of vibrio parahaemolyticus based on molecular docking[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2021, 21(3): 22-30.
- [12] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 四部. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 248.
- National Pharmacopoeia Commission. Chinese pharmacopoeia[S]. Part 4. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2015: 248.
- [13] DAVIDE B, ERSILIA B, CORRADO C, et al. Kumquat (*Fortuella japonica* Swingle) juice: Flavonoid distribution and antioxidant properties[J]. *Food Research International*, 2011, 44(7): 2190-2197.
- [14] 陆俊, 敦惠瑜, 向孝哲, 等. 体外模拟胃、肠消化对 6 种黑色食品抗氧化成分及其活性的影响[J]. *食品科学*, 2018, 39(5): 47-56.
- LU J, DUN H Y, XIANG X Z, et al. Effect of *in vitro* simulated gastrointestinal digestion on bioactive components and antioxidant activities of six kinds of

- black foods[J]. Food Science, 2018, 39(5): 47-56.
- [15] 周蕙祯, 汤良杰, 龚宇, 等. 瑞香狼毒花化学成分及其抗氧化活性研究[J]. 中草药, 2020, 51(9): 2395-2401.
- ZHOU H Z, TANG L J, GONG Y, et al. Chemical constituents from flowers of *Stellera chamaejasme* and their antioxidant activity[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2020, 51(9): 2395-2401.
- [16] WONG C, LI H, CHENG K, et al. A systematic survey of antioxidant activity of 30 Chinese medicinal plants using the ferric reducing antioxidant power assay[J]. Food Chemistry, 2006, 97(4): 705-711.
- [17] 葛斌, 张振明, 许爱霞, 等. 水红花子醇提物抑制大鼠组织脂质过氧化反应的体外作用研究[J]. 第三军医大学学报, 2007(6): 516-518.
- GE B, ZHANG Z M, XU A X, et al. Effect of alcoholic extract from *Fructus Polygoni Orientalis* on lipid peroxidation in rat tissues[J]. Acta Academiae Medicinae Militaris Tertiae, 2007(6): 516-518.
- [18] HE T, LI X, WANG X P, et al. Chemical composition and anti-oxidant potential on essential oils of *Thymus quinquecostatus* Celak. from Loess Plateau in China, regulating Nrf2/Keap1 signaling pathway in zebrafish[J]. Sci Rep, 2020, 10: 11280.
- [19] 许姗姗, 许凌, 张笑敏, 等. 常用中药陈皮、枳实和枳壳的研究进展及质量标志物的预测分析[J]. 中草药, 2018, 49(1): 35-44.
- XU S S, XU J, ZHANG X M, et al. Research progress on *Citri reticulatae* pericarpium, *Aurantii fructus* immaturus, and *aurantii fructus* and Q-marker predictive analysis[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2018, 49(1): 35-44.
- [20] 杨放晴, 何丽英, 杨丹, 等. 不同陈化时间广陈皮中黄酮类成分的UPLC-Q-Orbitrap HRMS分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(12): 125-132.
- YANG F Q, HE L Y, YANG D, et al. Analysis and identification of flavonoids in *Citri reticulatae* pericarpium with different aging time by UPLC-Q-Orbitrap HRMS [J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2021, 27(12): 125-132.
- [21] 任萍, 曹俊岭, 林珀吏, 等. 基于分子对接技术探讨木犀草素调控脂氧合酶途径抗H9C2心肌细胞缺氧缺糖/复氧复糖损伤的分子机制[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(21): 5665-5673.
- REN P, CAO J L, LIN B L, et al. Molecular mechanism of luteolin regulating lipoxygenase pathway against oxygen-glucose deprivation/reperfusion injury in H9C2 cardiomyocytes based on molecular docking[J]. China Journal of Chinese Materia Medica 2021, 46(21): 5665-5673.
- [22] 谷宇, 雒银珍, 赵博文, 等. 基于分子模拟技术探讨豨莶通栓制剂的抗炎作用机制[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(12): 2572-2579.
- GU Y, LUO Y Z, ZHAO B W, et al. Anti-inflammatory mechanism of Xixian Tongshuan preparation based on molecular simulation methods[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2019, 44(12): 2572-2579.
- [23] 乔晓莉, 吴士杰, 祁向争, 等. 山楂中化学成分的UPLC/ESI-TOF/MS分析[J]. 现代药物与临床, 2014, 29(2): 120-124.
- QIAO X L, WU S J, QI X Z, et al. Identification of chemical constituents in *Crataegus pinnatifida* var. major by UPLC/ESI-TOF/MS [J]. Drugs & Clinic, 2014, 29(2): 120-124.
- [24] 孙宁宁, 张可佳, 耿婉丽, 等. 基于UPLC-Q-TOF-MS的加参片提取物化学成分分析[J]. 中草药, 2018, 49(2): 293-304.
- SUN N N, ZHANG K J, GENG W L, et al. Analysis of chemical constituents of Jiashen Tablet extract by UPLC-Q-TOF-MS[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2018, 49(2): 293-304.
- [25] 张玉, 董文婷, 霍金海, 等. 基于UPLC-Q-TOF-MS技术的广地龙化学成分分析[J]. 中草药, 2017, 48(2): 252-262.
- ZHANG Y, DONG W T, HUO J H, et al. Analysis on chemical constituents of *Pheretima aspergillum* by UPLC-Q-TOF-MS [J]. Chinese Traditional & Herbal Drugs, 2017, 48(2): 252-262.
- [26] 郑玉莹, 庞文静, 白杨, 等. 基于UPLC-Triple TOF-MS/MS技术的枳实传统饮片及破壁饮片化学成分系统分析[J]. 中南药学, 2018, 16(4): 443-450.
- ZHENG Y Y, PANG W J, BAI Y, et al. Chemical constituents in traditional slices and ultrafine granular powder of *Fructus aurantii immaturus* by UPLC-Triple TOF-MS/MS [J]. Central South Pharmacy, 2018, 16(4): 443-450.
- [27] 邓桂明, 向彪, 肖小芹, 等. 基于GC-MS和UPLC-ESI-MS/MS法研究乌药化学成分[J]. 中药材, 2016, 39(10): 2229-2236.

- DENG G M, XIANG B, XIAO X Q, et al. Study on chemical constituents of lindera aggregate by GC-MS and UPLC-ESI-MS/MS[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2016, 39(10): 2229-2236.
- [28] 张雯霞, 冯敏, 苗雨露, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的还贝止咳方化学成分分析[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(14): 3022-3034.
- ZHANG W X, FENG M, MIAO Y L, et al. Analysis of chemical components of Huanbei Zhike prescription based on UPLC-Q-TOF-MS/MS technology [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2019, 44(14): 3022-3034.
- [29] 靳宝芬, 叶昊, 王凤云, 等. 基于 UPLC/Q-TOF MS 法分析生何首乌药材的化学成分[J]. 广东药科大学学报, 2020, 36(4): 473-478.
- JIN B F, YE H, WANG F Y, et al. Chemical component analysis of raw *Polygoni multiflori* radix by UPLC/Q-TOF MS[J]. Journal of Guangdong Pharmaceutical University, 2020, 36(4): 473-478.
- [30] 孙国东, 霍金海, 程团, 等. 基于 UPLC-Q-TOF/MS 技术的胡桃楸叶化学成分分析[J]. 中药材, 2017, 40(5): 1123-1129.
- SUN G D, HUO J H, CHENG T, et al. Identification and characterization of chemical constituents in leaves of *Juglans mandshurica* based on UPLC-Q-TOF/MS[J]. Journal of Chinese Medicinal Materials, 2017, 40(5): 1123-1129.
- [31] 瑞芳, 全庆华, 郭晓宇, 等. UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 法快速分析鬼箭羽中的化学成分[J]. 质谱学报, 2018, 39(5): 540-551.
- RUI F, QUAN Q H, GUO X Y, et al. Identification of chemical constituents of euonymus alatus by UPLC-LTQ-Orbitrap-MS[J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2018, 39(5): 540-551.
- [32] 向青, 王小花, 林慧, 等. HPLC-DAD-Q-TOF-MS/MS 法的银黄颗粒主要成分定性与定量研究[J]. 中成药, 2015, 37(1): 105-112.
- XIANG Q, WANG X H, LIN H, et al. Qualitative and quantitative analysis of major constituents in Yinhuang Granules by HPLC-DAD-Q-TOF-MS/MS [J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2015, 37(1): 105-112.
- [33] 龙红萍, 李欣, 王婷婷, 等. 基于 UPLC-LTQ-Orbitrap-MS 的小儿扶脾颗粒的化学成分研究[J]. 中草药, 2018, 49(23): 5522-5531.
- LONG H P, LI X, WANG T T, et al. Study on chemical constituents from Xiaoer Fupi Granules based on UPLC-LTQ-Orbitrap-MS [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2018, 49(23): 5522-5531.
- [34] 于国华, 杨洪军, 李俊芳, 等. 基于 UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS/MS 技术分析枳实中的化学成分[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(18): 3371-3378.
- YU G H, YANG H J, LI J F, et al. Analysis of chemical constituents from *Citrus aurantium* by UHPLC-LTQ-Orbitrap-MS/MS[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2016, 41(18): 3371-3378.
- [35] 张栋健, 李薇, 何庆文, 等. UHPLC-Q-TOF-MS 分析枳壳炮制前后成分变化[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(11): 2070-2080.
- ZHANG D J, LI W, HE Q W, et al. Chemical variation in *Aurantii fructus* before and after processing based on UHPLC-Q-TOF-MS [J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2016, 41(11): 2070-2080.
- [36] 乔湜, 许海山, 石晓伟, 等. UHPLC-QTOF-MS 法分析鉴定止咳宝片在大鼠血浆中的代谢产物[J]. 药学学报, 2018, 53(9): 1536-1544.
- QIAO S, XU H S, SHI X W, et al. Identification of major bioactive components and their metabolites in rat plasma after oral administration of Zhikebao tablet by UHPLC-QTOF-MS[J]. Acta Pharmaceutica Sinica, 2018, 53(9): 1536-1544.
- [37] 曾美玲, 沈耐涛, 吴赛伟, 等. 基于 UPLC-Triple-TOF/MS 方法的三叶青化学成分分析[J]. 中草药, 2017, 48(5): 874-883.
- ZENG M L, SHEN N T, WU S W, et al. Analysis on chemical constituents in *Tetragium hemsleyanum* by UPLC-Triple-TOF/MS[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2017, 48(5): 874-883.
- [38] 於洪建, 李赫宇, 于滢慧, 等. 红酒泥成分的 UPLC-Q-TOF-MS 分析[J]. 食品研究与开发, 2017, 38(3): 162-165.
- YU H J, LI H Y, YU Y H, et al. The UPLC-Q-TOF-MS analysis of wine lees[J]. Food Research and Development, 2017, 38(3): 162-165.
- [39] 吴吉洋, 高方圆, 叶晓岚, 等. 创新药物川阿格雷及其拼合分子阿魏酸和川芎嗪的质谱裂解规律[J]. 第二军医大学学报, 2012, 33(7): 755-758.
- WU J Y, GAO F Y, YE X L, et al. Chuan'agelei and its flatten structure ferulic acid and ligustrazine:

- Mass fragmentation pathway[J]. Academic Journal of Second Military Medical University, 2012, 33(7): 755-758.
- [40] 翟兴英, 张凌, 李冰涛, 等. 采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析半夏药材中的化学成分[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(7): 173-183.
- QU X Y, ZHANG L, LI B T, et al. Chemical components in *pinelliae Rhizoma* by UPLC-Q-TOF-MS/MS[J]. Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae, 2019, 25(7): 173-183.
- [41] 褚衍涛, 魏文峰, 霍金海, 等. UPLC-Q-TOF-MS 法分析芩苈清肺浓缩丸中的化学成分[J]. 中成药, 2016, 38(6): 1303-1310.
- CHU Y T, WEI W F, HUO J H, et al. Analysis of chemical constituents in Qinbai Qingfei concentrated pills by UPLC-Q-TOF-MS[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2016, 38(6): 1303-1310.
- [42] 侯娅, 马阳, 邹立思, 等. 基于 UPLC-Triple TOF-MS/MS 技术分析不同产地太子参的差异化学成分[J]. 质谱学报, 2015, 36(4): 359-366.
- HOU Y, MA Y, ZOU L S, et al. Difference of chemical compositions in *Pseudostellariae radix* from different origins by UPLC-Triple TOF-MS/MS[J]. Journal of Chinese Mass Spectrometry Society, 2015, 36(4): 359-366.
- [43] 谭林威, 金辉辉, 刘永祥, 等. 基于 HPLC-Q-TOF-MS/MS 技术快速分析肠炎宁片中主要化学成分[J]. 中草药, 2020, 51(16): 4124-4132.
- TAN L W, JIN H H, LIU Y X, et al. Main chemical constituents of Changyanning Tablets based on HPLC-Q-TOF-MS/MS[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2020, 51(16): 4124-4132.
- [44] 唐明, 高霞, 耿婷, 等. 基于 HPLC-Q-TOF-MS/MS 技术的七味通痹口服液化学成分分析[J]. 中草药, 2021, 52(8): 2226-2236.
- TANG M, GAO X, GENG T, et al. Identification of chemical constituents in Qiwei Tongbi oral liquid by HPLC-Q-TOF-MS/MS[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2021, 52(8): 2226-2236.
- [45] 牛研, 王书芳. LC-Q-TOF-MS 和 LC-IT-MSn 分析当归芍药散中化学成分[J]. 中草药, 2014, 45(8): 1056-1062.
- NIU Y, WANG S F. Analysis on chemical constituents in Danggui-Shaoyao-San by LC-Q-TOF-MS and LC-IT-MSn[J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2014, 45(8): 1056-1062.
- [46] 黄斌, 胡燕珍, 李雪, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术分析乌蕨中的化学成分[J]. 实用中西医结合临床, 2021, 21(9): 155-159.
- HUANG B, HU Y Z, LI X, et al. Analysis of chemical constituents in *Odontosoria chinensis* based on UPLC-Q-TOF-MS[J]. Practical Clinical Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, 2021, 21(9): 155-159.
- [47] 许如玲, 范君婷, 董惠敏, 等. 经典名方黄芪桂枝五物汤标准煎液化学成分的 UPLC-Q-TOF-MS 分析[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(23): 5614-5630.
- XU R L, FAN J T, DONG H M, et al. UPLC-Q-TOF-MS analysis on chemical constituents of classical prescription Huangqi Guizhi Wuwu Tang standard decoction[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2020, 45(23): 5614-5630.
- [48] 张东峰, 陈家豪, 郭静, 等. 7 种柑橘多酚、黄酮含量及其抗氧化活性比较研究[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(6): 69-74.
- ZHANG D F, CHEN J H, GUO J, et al. Comparative study on the polyphenol, flavonoid and antioxidant activity of seven varieties of citrus[J]. Food Research and Development, 2019, 40(6): 69-74.
- [49] ZHA X Q, WANG J H, YANG X F, et al. Antioxidant properties of polysaccharide fractions with different molecular mass extracted with hot-water from rice bran[J]. Carbohydr Polym, 2009, 78: 570-575.
- [50] 陈华铮, 朱凯. 两种柑橘类精油及其主要成分的抑菌和抗氧化活性[J]. 林产化学与工业, 2021, 41(4): 17-22.
- CHEN H Z, ZHU K. Antibacterial and antioxidant activities of two citrus essential oils and their main components[J]. Chemistry and Industry of Forest Products, 2021, 41(4): 17-22.
- [51] 王广超, 梁惠, 韩磊, 等. D-柠檬烯对乙醇性肝损伤大鼠抗氧化活性与 NF- κ B 及 COX-2 表达影响[J]. 青岛大学医学院学报, 2015, 51(4): 441-444.
- WANG G C, LIANG H, HAN L, et al. Effects of D-limonene on antioxidant ability and the expressions of NF- κ B and COX-2 in rats with alcohol-induced hepatic injury[J]. Acta Academiae Medicinae Qingdao Universitatis, 2015, 51(4): 441-444.
- [52] 李红燕, 陈海, 谢倩, 等. 基于网络药理学和分子对接探究黄连、厚朴配伍调控溃疡性结肠炎作用机制[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2021, 23(8):

2749-2761.

LI H Y, CHEN H, XIE Q, et al. Study on the mechanism of *Rhizoma coptidis* and *Magnolia officinalis* in regulating ulcerative colitis based on network pharmacology and molecular docking[J]. Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica-World Science and Technology, 2021, 23(8): 2749-2761.

[53] 亓金钗, 陈静, 李文, 等. 基于“干法+湿法”联用技术探究西藏沙棘抗氧化质量标志物[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(11): 2699-2709.

QI J C, CHEN J, LI W, et al. Explore antioxidant quality markers of *Hippophae tibetana* based on "dry-method + wet-method" technology[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 2021, 46(11): 2699-2709.

Chemical Constituents and Antioxidant Activities of *Citrus reticulata* Blanco Superior Plants Fruit Peel were Analyzed by Chromatography-Mass Spectrometry Technology with Network Pharmacology and Molecular Docking

Wei Jing¹, Wang Yu¹, Dong Ying¹, Zhong Xiangjian¹, Shan Dongjie¹, Lü Fang¹, Shi Bin², She Gaimei^{*}

(¹School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488

²Ningxia Medical University, Ningxia 750004)

Abstract Objective: To investigate the chemical constituents and antioxidant activity from *Citrus reticulata* Blanco superior plants fruit peel, and explore the potential effect about it. Methods: To study the chemical constituents of *Citrus reticulata* Blanco superior plants fruit peel by using HPLC-DAD-ESI-MS/MS and GC-MS, evaluation of their antioxidant activity by DPPH method, ABTS method, ferric reducing antioxidant power (FRAP) and measurement of lipid peroxidation by thiobarbituric acid reactive substances methods (TBARS). Targets related to antioxidant were screened by Network pharmacology, and used for GO functional and KEGG enrichment pathway analysis and construct the network of active ingredients-targets-pathway by Cytoscape 3.8.2, and molecular docking was used to verify the interactions between the main active ingredients and the key targets of *Citrus reticulata* Blanco superior plants fruit peel. Results: The HPLC-DAD-ESI-MS/MS results showed that 32 compounds and GC-MS results showed that 33 volatile components were identified of *Citrus reticulata* Blanco superior plants fruit peel. *In vitro* antioxidant experiments showed that has significant antioxidant capacity. The network pharmacology and molecular docking results showed that the flavonoid components such as Naringenin and TP53, MAPK3 and other targets matched well. Conclusion: This study initially explored the potential mechanisms of multi-component, multi-target and multi-pathway antioxidant intervention of *Citrus reticulata* Blanco superior plants fruit peel, providing new possibilities for the further development about it as functional food ingredients or functional feed.

Keywords *Citrus reticulata* Blanco superior plants fruit peel; HPLC-DAD-ESI-MS/MS; GC-MS; antioxidant; network pharmacology; molecular docking