

不同类型柑橘果实汁胞中类黄酮的液相色谱质谱联用分析

刘贤青¹, 涂虹², 王守创¹, 张红艳², 罗杰^{1,*}, 徐娟^{2,*}

华中农业大学¹生命科学技术学院, ²园艺林学院, 武汉430070

摘要: 以我国柑橘主产区商业成熟期27份甜橙(*Citrus sinensis*)、柚(*Citrus grandis*)和葡萄柚(*Citrus paradisi*)果实汁胞为试验材料, 利用液相色谱-串联质谱(HPLC-MS/MS)联用技术, 研究不同柑橘资源类黄酮(flavonoids)组成和含量的差异。结果表明: 类黄酮的组成在不同类型柑橘中存在较大差异。本研究共检测到41种类黄酮, 其中, 黄烷酮(flavanones)在甜橙和葡萄柚中含量最丰富, 且以甜橙中含量最高[平均为353.06 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)], 葡萄柚中次之, 柚中含量最低[平均仅为52.16 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)]; 检测到黄酮(flavones) 23种, 包括鲜见报道的麦黄酮(tricin)及其糖苷; 甜橙和葡萄柚中多甲氧基黄酮(PMFs)含量平均高出柚20倍。不同类型柑橘中, 黄烷酮、黄酮醇(flavonols)和PMFs含量差异趋势与总类黄酮基本一致, 因此总类黄酮含量差异较大, 且以甜橙中含量最高, 平均为584.41 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW); 其次是葡萄柚; 柚中最低, 平均含量仅为184.91 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)。依据汁胞中41种类黄酮的含量进行主成分分析, 可将所检测柑橘资源分为3类, 与柑橘分类结果基本吻合, 说明类黄酮组分及含量受基因型控制, 进一步验证了利用类黄酮进行柑橘资源化学分类的可行性。

关键词: 柑橘; 液相色谱-串联质谱; 类黄酮

类黄酮(flavonoids)是植物中一类重要的次生代谢物质, 种类超过4 000种, 具有较强的抗癌活性和抗氧化性, 对人体健康有重要影响。根据结构的不同, 类黄酮可分为黄烷酮(flavanones)、黄酮(flavones)、异黄酮(isoflavones)、黄酮醇(flavonols)、花色素(anthocyanidins)等类型(Cook等1996)。柑橘是世界上最重要的果树作物之一, 其果实富含类黄酮(Gattuso等2007; Abad-García等2009)。目前已从柑橘中分离鉴定出60多种类黄酮单体, 以黄烷酮为主, 大多以糖苷或苷元形式存在; 此外, 柑橘中还有黄酮和黄酮醇等类型(Tripoli等2007)。多甲氧基黄酮(polymethoxyflavones, PMFs)是苯基色原酮(phenylchromones)结构上3、4、5、6、7、8、2'、3'、4'、5'、6'等位置处连有4个或以上甲氧基的黄酮, 具有抗癌、抗炎等活性。国内外报道的PMFs近80种, 广泛分布于芸香科(Rutaceae)、茜草科(Rubiaceae)等植物中, 可作为检测橙汁真伪的有效标记物(Ooghe等1994)。目前, PMFs的合成途径尚未完全明晰(陈嘉景等2016), 但在甜橙中的含量可观(Chen等2015)。

液相色谱法是传统定量检测柑橘果实类黄酮的有效方法, 利用超高效液相色谱可分析柑橘果实中10余种类黄酮(方波等2013; 郑洁等2014; Zhang等2014), 但色谱分析法依赖标准品, 对柑橘中含量较低的类黄酮难以检测, 定量分析类黄酮种类有限, 仅可对常见类黄酮含量进行测定(Zhang等2011; 张元梅等2012; 冉玥等2013)。高效液相色谱-电喷雾离子阱串联质谱(HPLC-ESI-MS/MS)是

目前先进的鉴定化合物分子结构的仪器, 可对色谱未能定性或难以定量的类黄酮实现定性和定量分析(Abad-García等2012; Barreca等2011a, b)。运用高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱(HPLC-Q-TOF-MS/MS)技术可获得化合物精确质量信息, 结合前人研究结果和类黄酮二级质谱的裂解规律, 可对多种类黄酮进行定性分析, 成为类黄酮结构解析和定量检测的有效工具。

本试验以甜橙、柚和葡萄柚商业成熟期果实为材料, 利用高效液相色谱-串联质谱联用技术, 分析多种柑橘中类黄酮组成, 测定各种类黄酮含量, 有助于完善柑橘中类黄酮代谢途径、研究柑橘果实类黄酮含量遗传规律, 并为柑橘资源利用和分类提供理论依据。

材料与方法

1 供试材料

试验材料包括甜橙[*Citrus sinensis* (L.) Osbeck]、柚[*Citrus grandis* (L.) Osbeck]和葡萄柚(*Citrus paradisi* Macf.) 3种柑橘类型, 采自我国柑橘主产区湖北武汉、重庆和浙江丽水的柑橘园, 详细信息见表1。在柑橘商业成熟期, 每个品种选

收稿 2016-03-24 修定 2016-04-09

资助 农业部公益性行业(农业)科研专项(201303093)、国家自然科学基金(31521092)和教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-13-0810)。

* 共同通讯作者(E-mail: jie.luo@mail.hzau.edu.cn; xujuan@mail.hzau.edu.cn)。

表1 试验柑橘样品
Table 1 Investigated *Citrus* cultivars

类型	品种	产地	采收时间
甜橙	‘Itabori’、‘Early gold’、‘暗柳橙’、‘二月红甜橙’、‘哈姆林甜橙’、‘Bud血橙’、 ‘铜水72-1’、‘锦橙’、‘Paperrind 4X甜橙’和‘眉山无核’	湖北武汉	2012-12-10
柚	‘Kao Phuang’、‘永嘉早香柚’、‘文旦柚’、‘小院枳柚’、‘沙田柚’和‘水晶文旦’	重庆	2012-12-28
	‘土红柚’、‘1号柚’和‘处晶文旦柚’	浙江丽水	2012-11-27
	‘无酸柚’、‘Kaopan’和‘华农红柚’	湖北武汉	2012-12-10
葡萄柚	‘Red Marsh’和‘Flame’	湖北武汉	2012-12-10
	‘Red Marsh’、‘星路比葡萄柚’和‘奥兰布兰科柚’	重庆	2012-12-28

取生长健康的成年果树6株, 每株从东、南、西、北4个方位摘取树冠外围大小一致的果实4个, 共计24个果实。取样后将果实用纯净水洗净, 分离得到果实汁胞后迅速用液氮冷冻处理, 将样品放置于真空冷冻干燥仪(Heto Lyolab3000, 丹麦)中冷冻干燥后, 于CryoMill高通量组织研磨仪(Retsch, 德国)中研磨成粉末, 在-80℃冰箱中保存备用。

2 主要试剂和仪器

内标利多卡因(lidocaine, 分析纯)购自上海新亚药业有限公司, 22种类黄酮标准品芹菜素(5,7,4'-trihydroxyflavone)、芹菜素-5-葡萄糖苷(apigenin 5-*O*-glucoside)、异牡荆苷(apigenin 6-*C*-glucoside)、牡荆苷(apigenin 8-*C*-glucoside)、木犀草素(luteolin)、木犀草素-5-*O*-葡萄糖苷(luteolin 5-*O*-glucoside)、木犀草素-6-*C*-葡萄糖苷(luteolin 6-*C*-glucoside)、木犀草素-7-*O*-葡萄糖苷(luteolin 7-*O*-glucoside)、圣草次苷(eriodictyol 7-*O*-rutinoside)、芸香柚皮苷(naringenin 7-*O*-rutinoside)、柚皮苷(naringenin 7-*O*-neohesperidoside)、橙皮苷(methylesteriodictyol 7-*O*-rutinoside)、新橙皮苷(methylesteriodictyol 7-*O*-neohesperidoside)、香风草苷(methylnaringenin 7-*O*-rutinoside)、枸橼苷(methylnaringenin 7-*O*-neohesperidoside)、*O*-甲基柚皮素-*C*-戊糖苷(*O*-methylnaringenin *C*-pentoside)、槲皮素(quercetin)、槲皮素-3-*O*-芸香糖苷(quercetin 3-*O*-rutinoside)、麦黄酮(tricin)、川陈皮素(3',4',5,6,7,8-hexamethoxyflavone)、甜橙黄酮(5,6,7,3',4'-pentamethoxyflavone)和橘皮素(4',5,6,7,8-pentamethoxyflavone)购自Sigma-Aldrich公司。甲醇、乙腈和乙酸为色谱纯, 德国Merck公司生产。

使用高效液相色谱-四极杆-飞行时间质谱仪

(Agilent 6520B HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS, 安捷伦科技有限公司)定性分析类黄酮, 高效液相色谱-四极杆-线性离子阱质谱仪(AB 4500 HPLC-ESI-Q-TRAP-MS/MS, 美国应用生物系统公司)定量分析类黄酮。

3 类黄酮化合物提取、分离与鉴定

样品提取和仪器分析条件参考刘贤青和张红艳(2014)以及Dong等(2014)的方法略有改动。准确称取粉末样品20 mg, 加入80%甲醇(含0.1 mg·L⁻¹利多卡因), 4℃过夜提取, 12 000×g离心10 min, 取上清液分析。

色谱条件: 色谱柱为Shim-pack VP-ODS C₁₈ (5 μm, 2×150 mm, 岛津), 流动相A为乙腈(含0.04%乙酸), 流动相B为超纯水(含0.04%乙酸)。梯度洗脱程序: 0~20 min, 5% A; 20~22 min, 95% A; 22~28 min, 5% A; 后运行5 min平衡色谱柱, 流速为0.3 mL·min⁻¹, 进样体积为2 μL。

质谱条件: 双电喷雾离子源(dual ESI), 质量扫描范围(质荷比, *m/z*) 100~1 500 Da, 毛细管电压3.5 kV, 雾化器压力2 758 kPa, 干燥气体流速10 mL·min⁻¹, 干燥气体温度350℃, 碰撞气体为高纯N₂, 压力0.15 MPa。

4 数据处理及统计分析

利用HPLC-ESI-Q-TRAP-MS/MS多反应监测扫描(multiple reaction monitoring, MRM)模式采集数据, 分析条件参考Chen等(2013)的方法。采用标准品类黄酮制成标准曲线后, 结合样品中每种待定量类黄酮的峰面积, 利用外标法计算每种类黄酮含量, 详细信息见表2。

试验结果用SAS 8.1软件(SAS Institute Inc., 美国)广义线性模型过程(general linear model, GLM)

表2 标准品与样品中定量分析类黄酮一览表

Table 2 List of standard compounds and compounds in samples quantified accordingly

标准品	定量分析类黄酮
异牡荆苷	牡荆苷、异牡荆苷、芹菜素-6,8- <i>C</i> -葡萄糖苷、木犀草素-6- <i>C</i> -葡萄糖苷、木犀草素- <i>C</i> -己糖苷衍生物、3'-甲基五羟黄酮- <i>C</i> -己糖苷、3',4',5',5,7-五羟黄酮-7,3,4-三甲基醚-5-葡萄糖苷、芹菜素和芹菜素-6- <i>C</i> -葡萄糖苷- <i>O</i> -戊糖苷
柚皮素-7- <i>O</i> -葡萄糖苷	香风草苷、芸香柚皮苷和 <i>O</i> -甲基柚皮素- <i>C</i> -戊糖苷
圣草素- <i>O</i> -葡萄糖苷	圣草次苷、新橙皮苷、枸橼苷和橙皮苷
槲皮素-3- <i>O</i> -葡萄糖苷	山柰酚-3- <i>O</i> -戊聚糖-7- <i>O</i> -鼠李糖苷、山柰酚- <i>C</i> -葡萄糖苷、麦黄酮、山柰酚-3- <i>O</i> -葡萄糖苷-2'- <i>O</i> -鼠李糖苷、山柰酚-3- <i>O</i> -芸香糖苷-7- <i>O</i> -葡萄糖苷、5,7-二羟基黄酮、槲皮素、槲皮素- <i>O</i> -己酰基- <i>O</i> -己糖苷、柚皮苷和槲皮素3- <i>O</i> -芸香糖苷
芹菜素-7- <i>O</i> -葡萄糖苷	芹菜素-5-葡萄糖苷
川陈皮素	川陈皮素、甜橙黄酮和橘皮素
木犀草素-7- <i>O</i> -葡萄糖苷	3'-甲基五羟黄酮- <i>O</i> -己糖苷、麦黄酮-5- <i>O</i> -己糖苷、麦黄酮-7- <i>O</i> -己糖苷、麦黄酮- <i>O</i> -丙二酰基-己糖苷、麦黄酮- <i>O</i> -芥子酰己糖苷、麦黄酮- <i>O</i> -芥子酰戊糖苷、木犀草素- <i>C</i> -己糖- <i>O</i> -己糖苷、木犀草素、木犀草素- <i>C</i> -己糖- <i>O</i> -戊糖苷、木犀草素-7- <i>O</i> -葡萄糖苷和木犀草素-5- <i>O</i> -葡萄糖苷

做差异显著性分析, 显著性水平为 $\alpha=0.05$ 。试验结果经log2转化后用SIMCA-P+11进行主成分分析(principal components analysis, PCA)。

实验结果

1 柑橘果实汁胞中类黄酮定性分析

利用HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS对27份柑橘果实汁胞样品进行类黄酮定性分析。首先, 在HPLC-ESI-TOF-MS正离子模式下, 进行一级质谱全扫描, 获得样品提取液中类黄酮保留时间(retention time, RT)、分子离子 $[M+H]^+$ 精确 m/z 信息。然后, 结合一级质谱信息, 通过HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS做二级质谱, $[M+H]^+$ 被打碎, 得到二级碎片离子甚至三级碎片离子, 这些碎片离子有利于类黄酮结构鉴定。结合Abad-García等(2012)、Chen等(2013)、Wang等(2015)和质谱谱图数据库(MassBank, KNA-pSACk)中高分辨质谱信息, 利用碎片离子鉴定类黄酮结构。对于有标准品的类黄酮, 采用同样仪器条件, 获得标准品质谱数据, 包括RT、 $[M+H]^+$ 精确 m/z 和二级碎片离子, 将这些质谱数据与样品中待解析化合物的质谱数据进行比对。表3为柑橘果实中初步鉴定的41种类黄酮, 包括8种黄烷酮、23种黄酮、7种黄酮醇和3种PMFs的特征数据, 其中22种类黄酮通过标准品比对验证。

以芸香柚皮苷为例说明利用标准品比对和鉴定类黄酮的过程。在(+) ESI-MS正离子模式下, 对标准品芸香柚皮苷做一级质谱全扫描, 获得高丰

度的精确 $[M+H]^+$ m/z 581.186 1和苷元离子 m/z 273 $[A+H]^+$ (表3), 提取 m/z 581.186 1离子流图, 获取RT (9.67 min)和化合物强度信息(图1-A)。二级质谱: m/z 581 $[M+H]^+$ 同时丢失糖基碎片146 Da和162 Da, 形成高丰度苷元离子 m/z 273 $[A+H]^+$; 单独丢失糖基碎片162 Da或146 Da, 分别形成离子 m/z 419 $[M+H-162]^+$ 和435 $[M+H-146]^+$ (图1-B)。芸香柚皮苷裂解途径如图1-C。同样仪器条件下分析样品, 比对标准品与样品中化合物RT、精确 m/z $[M+H]^+$ 和碎片离子信息, 信息一致, 故将样品中化合物鉴定为芸香柚皮苷。图1为标准品芸香柚皮苷的质谱数据特征、裂解途径及化学结构式。

以麦黄酮糖苷为例说明对无标准品的类黄酮的鉴定过程。首先, 依据有标准品的方法鉴定出麦黄酮, 并进一步依据文献和质谱信息初步鉴定5种麦黄酮糖苷。麦黄酮糖苷的鉴定过程为: 样品在(+) ESI-MS正离子一级质谱模式下, 有离子碎片精确 m/z 493.133 9 $[M+H]^+$ 和麦黄酮苷元离子碎片精确 m/z 331.081 1 $[A+H]^+$ 。二级质谱模式下, 有较高的二级碎片苷元离子 m/z 331 $[A+H]^+$, 丢失糖基碎片162 Da形成二级碎片离子 m/z 315 $[M+H-162]^+$, 据此推断化合物为麦黄酮单糖苷。查阅Chen等(2013), 将RT为9.34和9.90 min的麦黄酮单糖苷分别鉴定为麦黄酮-5-*O*-己糖苷(tricin 5-*O*-hexoside)和麦黄酮-7-*O*-己糖苷(tricin 7-*O*-hexoside)。采用类似方法初步鉴定了其他几种麦黄酮糖苷。这是首次在柑橘中检测到麦黄酮物质。

表3 柑橘汁液中鉴定的类黄酮及其含量

Table 3 Tentative identification and quantification of flavonoids in *Citrus* juice sacs

编号	种类	化合物名称	RT/min	实际 m/z (Da)	裂解碎片/Da	含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)	
						甜橙	柚
1	黄酮	O-甲基柚皮素-C-戊糖苷*	9.16	419.1336	383.1, 365.1, 353.1, 337.1	1.84-3.04 (2.35 ^b)	1.00-4.60 (2.23 ^b)
2	黄酮	橙皮苷*	9.82	611.1968	303.1, 345.1, 129.1, 85.0	179.84-254.44 (207.13 ^a)	0.13-2.07 (0.57 ^c)
3	黄酮	枸橼苷*	11.42	595.2016	287.1, 433.1, 449.1, 329.1	20.84-44.24 (34.03 ^a)	0.01-2.01 (0.19 ^c)
4	黄酮	圣草次苷*	8.77	597.1811	289.1, 435.1, 451.1	2.74-6.17 (3.87 ^a)	0.10-4.34 (0.98 ^b)
5	黄酮	香风草苷*	11.37	595.2019	287.1, 129.1, 85.0, 329.1	3.30-5.68 (4.77 ^a)	痕量-0.59 (0.05 ^c)
6	黄酮	新橙皮苷*	10.13	611.1972	303.1, 449.1, 465.1, 431.1	74.39-131.77 (96.45 ^a)	0.02-1.41 (0.40 ^b)
7	黄酮	柚皮苷*	9.67	581.1867	273.1, 435.1	0.02-0.02 (0.02 ^c)	26.12-77.85 (47.23 ^b)
8	黄酮	芸香柚皮苷*	9.38	581.1861	273.1, 419.1, 435.1, 85.0	3.58-6.07 (4.45 ^b)	痕量-6.22 (0.52 ^c)
9	黄酮	3',4',5',7-五羟黄酮-7,3,4-三甲基醚-5-葡萄糖苷	11.1	507.1501	345.1	0.16-0.56 (0.34 ^a)	痕量-0.06 (0.01 ^b)
10	黄酮	3'-甲基五羟黄酮-C-己糖苷	9	479.1184	329.1, 383.1, 359.2, 302.2	痕量-0.01 (痕量 ^b)	痕量 ^b
11	黄酮	3'-甲基五羟黄酮-O-己糖苷	8.45	479.1182	317.1, 460.9, 302.1, 274.2	痕量-0.36 (0.12 ^b)	0.10-1.83 (0.53 ^a)
12	黄酮	5,7-二羟基黄酮	7.79	255.0579	153	0.47-2.40 (1.18 ^a)	0.05-1.53 (0.48 ^b)
13	黄酮	木犀草素-C-己糖-O-己糖苷	7.83	611.1609	299.0, 449.1, 353.4, 329.6	0.04-0.14 (0.09 ^a)	痕量-0.32 (0.05 ^a)
14	黄酮	木犀草素-C-己糖-O-戊糖苷	7.98	581.1503	383.2	0.82-1.48 (1.13 ^a)	0.28-1.53 (0.77 ^b)
15	黄酮	麦黄酮*	12.85	331.0811	315.0, 285.0, 258.0, 243.0	0.03-0.03 (0.03 ^a)	0.56-1.22 (0.86 ^b)
16	黄酮	麦黄酮-5-O-己糖苷	9.34	493.1339	331.1, 315.0, 270.2	0.01-0.81 (0.22 ^a)	0.03-0.03 (0.03 ^a)
17	黄酮	麦黄酮-7-O-己糖苷	9.9	493.1339	331.1, 315.0, 270.2	0.09-1.61 (0.45 ^a)	0.01-1.39 (0.12 ^a)
18	黄酮	麦黄酮-O-丙二酰基-己糖苷	11.8	579.1344	331.1, 535.1, 493.1, 315.2	0.04-0.21 (0.09 ^a)	0.04-0.54 (0.14 ^a)
19	黄酮	杜荆苷*	8.81	433.1129	313.1, 397.1, 415.1, 283.1	0.02-0.09 (0.06 ^a)	痕量-0.21 (0.03 ^b)
20	黄酮	木犀草素*	11.6	287.0544	153.0, 135.0	0.02-0.09 (0.06 ^a)	痕量-0.08 (0.05 ^a)
21	黄酮	木犀草素-5-O-葡萄糖苷*	8.85	449.1071	287.1, 153.1	4.94-8.62 (7.31 ^b)	0.02-8.16 (0.71 ^b)
22	黄酮	木犀草素-6-C-葡萄糖苷*	8.13	449.1078	299.2, 339.1, 329.1, 283.2	1.17-2.85 (1.88 ^b)	0.81-3.31 (1.81 ^b)
23	黄酮	木犀草素-7-O-葡萄糖苷*	9.15	449.1077	287.1	0.25-0.65 (0.44 ^a)	0.01-0.67 (0.26 ^a)
24	黄酮	木犀草素-C-己糖苷衍生物	8.5	449.1087	299.2, 413.1, 353.1, 329.2	0.75-2.88 (1.89 ^b)	0.64-3.34 (1.85 ^b)
25	黄酮	芹菜素*	12.67	271.0602	153.0, 119.0, 91.1	0.25-0.65 (0.43 ^a)	0.01-0.50 (0.24 ^a)
26	黄酮	芹菜素-5-葡萄糖苷*	9.14	433.1126	271.1	痕量-0.07 (0.01 ^a)	痕量-0.28 (0.08 ^a)
27	黄酮	芹菜素-6,8-C-葡萄糖苷	8.37	595.1662	283.3, 577.2, 559.3, 409.3	0.03-0.07 (0.04 ^b)	0.01-0.42 (0.11 ^{ba})
28	黄酮	芹菜素-6-C-葡萄糖苷-O-戊糖苷	8.56	565.6545	313.1, 415.1, 283.1, 207.1	0.30-0.97 (0.65 ^a)	痕量-0.52 (0.25 ^b)
29	黄酮	麦黄酮-O-芥子酰基糖苷	11.65	699.1936	331.1, 463.0, 207.1, 175.1	0.06-0.15 (0.09 ^a)	痕量-0.08 (0.03 ^b)
30	黄酮	麦黄酮-O-芥子酰基糖苷	11.51	669.1833	331.0, 523.1, 315.1, 301.2	痕量-0.01 (0.01 ^a)	痕量 ^a

表3 (续)

编号	种类	化合物名称	RT/min	实际m/z (Da)	裂解碎片/Da	含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)	
						甜橙	葡萄柚
31	黄酮	异牡荆苷*	8.85	433.1128	283.1, 313.1, 337.1, 367.1	0.77–2.57 (1.75 ^a)	0.24–8.12 (1.89 ^a)
32	黄酮醇	槲皮素*	11.6	303.0504	153.0, 137.0, 69.0, 109.0	3.38–8.70 (5.75 ^a)	0.25–3.56 (1.01 ^c)
33	黄酮醇	槲皮素-3-O-芸香糖苷*	8.72	611.1606	303.1, 465.1	50.22–90.56 (69.42 ^a)	0.46–16.82 (3.47 ^c)
34	黄酮醇	槲皮素-O-己酰基-O-己糖苷	8.12	627.3758	303.0, 205.2, 197.6, 596.2	0.02–0.22 (0.05 ^b)	0.02–0.14 (0.08 ^a)
35	黄酮醇	山奈酚-C-葡萄糖苷	8.4	449.1018	299.0, 329.0, 431.1, 353.0	0.17–0.50 (0.33 ^a)	0.01–1.13 (0.19 ^a)
36	黄酮醇	山奈酚-3-O-葡萄糖苷-2'-O-鼠李糖苷	8.81	595.1672	449.1	27.56–60.04 (42.44 ^a)	0.03–35.69 (16.52 ^b)
37	黄酮醇	山奈酚-3-O-戊聚糖-7-O-鼠李糖苷	8.44	741.2166	287.1, 271.0	30.31–145.52 (72.53 ^a)	24.58–147.16 (63.79 ^a)
38	黄酮醇	山奈酚-3-O-芸香糖苷-7-O-葡萄糖苷	8.45	757.2178	286.9, 595.1, 271.0, 449.1	5.31–26.30 (12.58 ^b)	18.64–194.67 (102.53 ^a)
39	PMFs	川陈皮素*	15.3	403.1388	373.1, 388.1, 355.1	0.62–1.40 (0.98 ^a)	痕量–0.02 (0.01 ^c)
40	PMFs	橘皮素*	16.42	373.1283	343.1, 358.1, 325.1, 297.1	3.70–16.14 (9.01 ^a)	0.15–0.72 (0.36 ^b)
41	PMFs	甜橙黄酮*	14.4	373.1285	343.1, 312.1, 329.1, 357.1	痕量–0.05 (0.02 ^a)	0.03–0.05 (0.04 ^c)

*表示该类黄酮通过标准品比对和鉴定。类黄酮的含量表示为“最小值–最大值(平均值)”,含量在0.001–0.005 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)之间用“痕量”表示。同一行内类黄酮含量的平均值用不同小写字母标识表示差异显著($P<0.05$)。

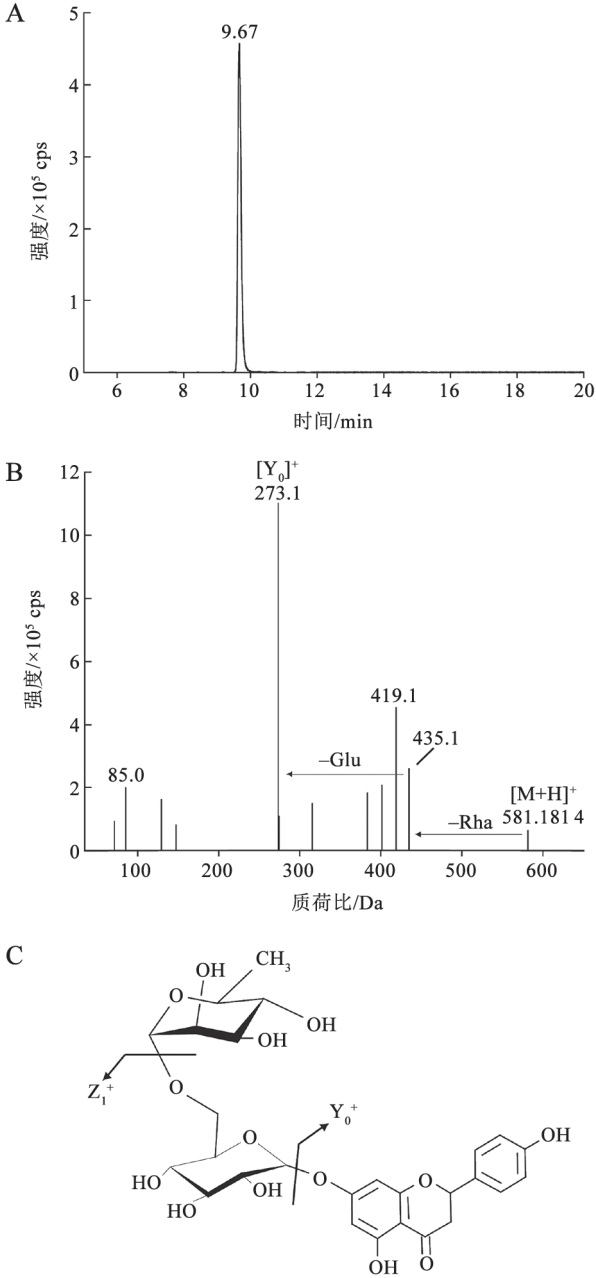


图1 HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS初步鉴定的类黄酮
Fig.1 Detection and identification of secondary metabolites by HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS

A: m/z 581.1867提取离子流图, RT 9.67 min; B: 用芸香柚皮苷标准品鉴定的MS/MS图; C: 芸香柚皮苷裂解途径。

2 不同类型柑橘果实汁胞中类黄酮含量分析

2.1 不同类型柑橘类黄酮含量分析

柑橘中检测并定性的类黄酮有黄烷酮、黄酮醇和黄酮, PMFs是抗氧化性极强的特殊黄酮。黄烷酮影响果实风味, 伴随果实成熟含量下降; 黄酮

醇糖苷比较稳定; 黄酮在柑橘中主要以 O -糖苷和 C -糖苷形式存在。对柑橘中41种类黄酮进行分类比较, 结果见图2。甜橙中黄烷酮含量最丰富, 平均含量为 $353.06 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW); 葡萄柚次之; 柚最低, 平均含量仅为 $52.16 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)。黄酮醇在柑橘中的含量次于黄烷酮, 甜橙、柚和葡萄柚中黄酮醇平均含量分别为 203.11 、 122.92 和 $137.62 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)。葡萄柚中黄酮醇平均含量显著高于甜橙和柚中, 为 $50.76 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW); 甜橙次之; 柚最低, 仅为 $9.46 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)。甜橙和葡萄柚中PMFs平均含量分别为 10.01 和 $7.40 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW), 显著高于柚[平均含量仅为 $0.37 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)]。

对已初步鉴定的41种类黄酮, 采用HPLC-ESI-Q-TRAP-MS/MS技术的(+) ESI-MS-MS正离子MRM模式, 分析柑橘汁胞样品, 定量结果如表3所示: 8种黄烷酮、5种黄酮醇、12种黄酮和3种PMFs共计28种类黄酮在3种类型柑橘汁胞含量间有显著差异。

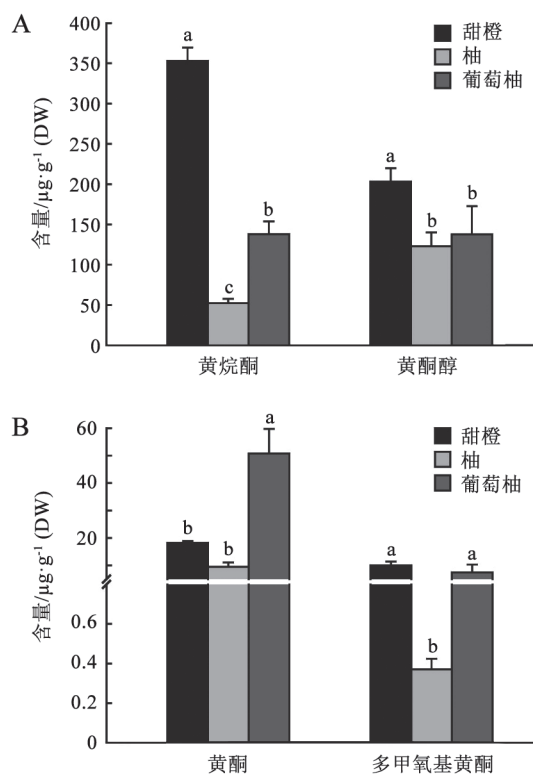


图2 不同类型类黄酮在柑橘中含量比较

Fig.2 The contents of different groups of flavonoids in Citrus fruits

图中同一类型物质的柱形用不同小写字母标识表示数据间差异显著($P<0.05$)。

对比黄烷酮含量可知, 甜橙汁胞橙皮苷和新橙皮苷含量最高, 分别为 $179.84\sim 254.44$ 和 $74.39\sim 131.77 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW), 显著高于柚 $[0.13\sim 2.07$ 和 $0.02\sim 1.41 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)]和葡萄柚 $[3.96\sim 29.66$ 和 $1.22\sim 11.64 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)]; 柚中含量最低。柚皮苷在葡萄柚中含量 $[58.77\sim 110.23 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)]最高; 柚中含量 $[26.12\sim 77.85 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)]次之, 甜橙中平均含量仅为 $0.02 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)。

槲皮素-3- O -芸香糖苷、山柰酚-3- O -戊聚糖-7- O -鼠李糖苷(kaempferol 3- O -rhamnosylhexoside 7- O -rhamnoside)和山柰酚-3- O -葡萄糖苷-2'- O -鼠李糖苷(kaempferol 3- O -glucoside 2'- O -rhamnoside)等黄酮醇在3个柑橘类型间含量差异显著, 其中前2种黄酮醇在甜橙中含量较高, 分别为 $50.22\sim 90.56$ 和 $30.31\sim 145.52 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)。柑橘汁胞中山柰酚-3- O -芸香糖苷-7- O -葡萄糖苷(kaempferol 3- O -rutinoside 7- O -glucoside)的含量在品种间差异较大, 柚汁胞中含量 $[18.64\sim 194.672 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)]总体最高, 葡萄柚次之, 甜橙最低。

柑橘汁胞中定量分析的23种黄酮中, 12种黄酮差异显著, 其中, 木犀草素在葡萄柚中平均含量 $[14.27\sim 54.81 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)]最高, 显著高于甜橙和柚。有11种黄酮含量较低, 在 $0.001\sim 0.005 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)之间。

PMFs在柑橘汁胞中含量低, 但在不同柑橘类型间有较大差异。甜橙和葡萄柚中PMFs含量显著高于柚中, 其中橘皮素分别为 $3.70\sim 16.14$ 和 $1.91\sim 15.49 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW), 显著高于柚中橘皮素含量 $[0.15\sim 0.72 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)]; 甜橙中川陈皮素含量最高 $[0.62\sim 1.40 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)], 显著高于柚和葡萄柚。

2.2 柑橘类黄酮总含量分析

不同柑橘类型中类黄酮总含量结果如图3所示。不同类型柑橘中类黄酮总含量差异较大, 甜橙中含量最高, 平均为 $584.41 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW), 含2个离群值: 其中‘铜水72-1’总含量最高 $[801.23 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)], ‘Early gold’最低 $[460.27 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)]; 葡萄柚中含量平均为 $333.64 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW), 没有离群值; 柚类黄酮总含量最低, 平均为 $184.91 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW), 有2个离群值, 其中‘处晶文旦柚’总含量最高 $[299.08 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)], ‘Kaopan’最低 $[109.62 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)]。

3 PCA分析

以每种类黄酮含量为变量, 进行PCA分析, 获得样品得分图(图4-A)和类黄酮含量分布情况载荷

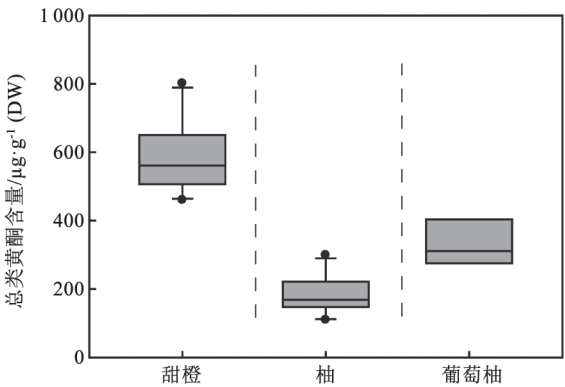


图3 柑橘中类黄酮总含量比较

Fig.3 Comparison of total flavonoid contents in *Citrus* fruits

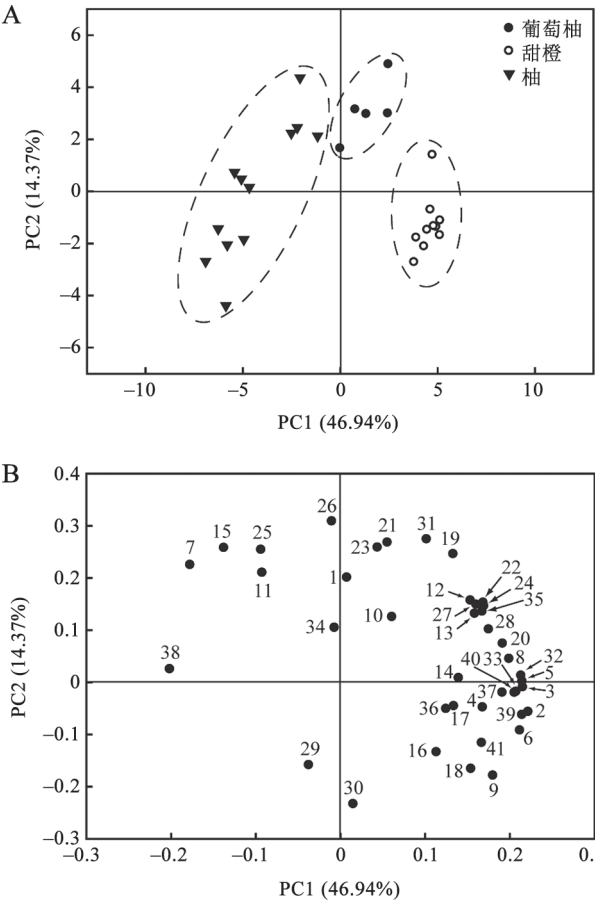


图4 PCA分析柑橘样品得分图(A)和载荷图(B)

Fig.4 Scores plot (A) and loadings diagram (B) from principal component analysis based on the concentration of flavonoids in *Citrus* fruits

B中的数字编号对应的类黄酮详见表3。

图(图4-B)。结合样品的聚集、离散程度以及类黄酮含量载荷图可以清楚看到, 提取的2个主成分中,

第一主成分(PC1)主要由编号为2、3、5、6、32、36、38和39的类黄酮组成, 方差贡献率为46.94%; 第二主成分(PC2)主要由编号为21、23、26、29和31的类黄酮组成, 方差贡献率为14.37%。图4-A将27份柑橘资源聚为3组, 同一类型的柑橘品种聚类相对集中, 说明类黄酮组分及含量与柑橘遗传基因型密切相关, 影响程度远大于栽培环境, 因此, 根据柑橘汁胞中类黄酮组成和含量对柑橘进行分类是切实可行的。另外, 甜橙品种分布点靠近(‘铜水72-1’除外), 说明不同品种甜橙中类黄酮含量差异小, 与试验中10个甜橙品种都来自武汉, 气候和土壤因素等栽培条件都比较一致有关。

从图4-B可以看出, 甜橙中编号为2、3、5、6、32、36、39等化合物含量明显高于柚和葡萄柚; 柚中编号为38的类黄酮含量明显高于甜橙和葡萄柚, 编号为21、23和26的化合物在葡萄柚中含量明显高于甜橙和柚; 这些差异与GLM差异显著性分析结果一致(表3)。表明载荷图中变量分布与得分图中样品分布位置基本对应。

讨 论

本研究基于液相色谱-串联质谱联用技术分离鉴定41种类黄酮, 并对27个柑橘品种果实汁胞中类黄酮进行定量分析。结果表明, 不同类型柑橘中检测到的总类黄酮含量差异较大, 以甜橙中平均总含量最高, 葡萄柚次之, 柚类最低。黄烷酮、黄酮醇和PMFs含量差异与类黄酮总含量差异规律基本一致。黄烷酮是甜橙和葡萄柚中含量最丰富的类黄酮, 以糖苷形式存在的黄烷酮含量较高。在不同类型柑橘中, 检测到橙皮苷、柚皮苷、槲皮素-3-O-芸香糖苷等28种类黄酮含量有显著差异, 其中含8种黄烷酮、5种黄酮醇、12种黄酮和3种PMFs。橙皮苷和槲皮素-3-O-芸香糖苷在甜橙中含量最高; 葡萄柚中柚皮苷和木犀草素含量显著高于甜橙和柚; 甜橙和葡萄柚汁胞中PMFs含量是柚中平均含量的20倍。

用色谱法难以定量检测的类黄酮, 如柑橘果肉中槲皮素(郑洁等2014)和柚橙皮苷(方波等2013), 运用LC-ESI-Q-TRAP MS/MS技术可以进行定量分析。而含量更低的类黄酮, 尤其是鲜见报道的麦黄酮及其糖苷, 以及难以购买标准品的类黄酮, 通过HPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS定性分析后,

结合HPLC-ESI-Q-TRAP MS/MS技术, 可实现相对定量检测。因此, 该方法具有样品提取过程简单、测定类黄酮种类较多等优点, 有利于深入探讨柑橘中类黄酮代谢途径。

根据柑橘汁胞中41种类黄酮含量, 进行PCA分析, 可将27份柑橘资源聚为3组, 充分说明次生代谢物类黄酮在不同柑橘中含量差异表现出较强的资源特异性, 类黄酮组分及含量与柑橘遗传基因型密切相关, 其重要性远远大于栽培环境因素的影响, 因此, 类黄酮组成可以作为柑橘化学分类学的参考指标。

参考文献

- Abad-García B, Berrueta LA, Garmón-Lobato S, Gallo B, Vicente F (2009). A general analytical strategy for the characterization of phenolic compounds in fruit juices by high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray ionization and triple quadrupole mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1216: 5398–5415
- Abad-García B, Garmón-Lobato S, Berrueta LA, Gallo B, Vicente F (2012). 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*, 99: 213–224
- Barreca D, Bellocco E, Caristi C, Leuzzi U, Gattuso G (2011a). Distribution of *C*- and *O*-glycosyl flavonoids, (3-hydroxy-3-methylglutaryl)glycosyl flavanones and furocoumarins in *Citrus aurantium* L. juice. *Food Chem*, 124: 576–582
- Barreca D, Bellocco E, Caristi C, Leuzzi U, Gattuso G (2011b). Flavonoid profile and radical-scavenging activity of Mediterranean sweet lemon (*Citrus limetta* Risso) juice. *Food Chem*, 129: 417–422
- Chen J, Zhang H, Pang Y, Cheng Y, Deng X, Xu J (2015). Comparative study of flavonoid production in lycopene-accumulated and blonde-flesh sweet oranges (*Citrus sinensis*) during fruit development. *Food Chem*, 184: 238–246
- Chen JJ, Peng ZX, Shi MY, Xu J (2016). Advances in on flavonoid composition and metabolism in citrus. *Acta Horti Sin*, 43 (2): 384–400 (in Chinese with English abstract) [陈嘉景, 彭昭欣, 石梅艳, 徐娟(2016). 柑橘中类黄酮的组成与代谢研究进展. *园艺学报*, 43 (2): 384–400]
- Chen W, Gong L, Guo Z, Wang W, Zhang H, Liu X, Yu S, Xiong L, Luo J (2013). A novel integrated method for large-scale detection, identification, and quantification of widely targeted metabolites: application in the study of rice metabolomics. *Mol Plant*, 6: 1769–1780
- Cook NC, Samman S (1996). Flavonoids—chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources. *Nutr Biochem*, 7: 66–76
- Dong X, Chen W, Wang W, Zhang H, Liu X, Luo J (2014). Comprehensive profiling and natural variation of flavonoids in rice. *J Integr Plant Biol*, 56 (9): 876–886
- Fang B, Zhao QY, Xi WP, Zhou ZQ, Jiao BN (2013). Determination of flavonoids in 10 pummelo and pummelo hybrid fruits by ultra performance liquid chromatography. *Sci Agric Sin*, 46 (9): 1892–1902 (in Chinese with English abstract) [方波, 赵其阳, 席万鹏, 周志钦, 焦必宁(2013). 十种柚类及柚杂种果实中类黄酮含量的超高效液相色谱分析. *中国农业科学*, 46 (9): 1892–1902]
- Gattuso G, Barreca D, Gargiulli C, Leuzzi U, Caristi C (2007). Flavonoid composition of *Citrus* juices. *Molecules*, 12: 1641–1673
- Liu XQ, Zhang HY (2014). Determination of flavonoids from navel orange (*Citrus sinensis*) fruits by HPLC-Q-TOF/MS. *Plant Sci J*, 32 (6): 638–644 (in Chinese with English abstract) [刘贤青, 张红艳(2014). HPLC-Q-TOF/MS分析脐橙果实中的类黄酮. *植物科学学报*, 32 (6): 638–644]
- Ooghe WC, Ooghe SJ, Detavernier CM, Huyghebaert A (1994). Characterization of orange juice (*Citrus sinensis*) by polymethoxylated flavones. *J Agric Food Chem*, 42 (10): 2191–2195
- Ran Y, Jiao BN, Zhao QY, Tian L, Su XS, Zeng CB (2013). Simultaneous determination of 11 flavonoids in *Citrus* fruits by ultra performance liquid chromatography. *Food Sci*, 34 (4): 168–172 (in Chinese with English abstract) [冉玥, 焦必宁, 赵其阳, 田玲, 苏学素, 曾朝波 (2013). 超高效液相色谱法同时测定柑橘中11种类黄酮物质. *食品科学*, 34 (4): 168–172]
- Tripoli E, La Guardia M, Giammanco S, Di Majo D, Giammanco M (2007). *Citrus* flavonoids: molecular structure, biological activity and nutritional properties: a review. *Food Chem*, 104 (2): 466–479
- Wang S, Tu H, Wan J, Chen W, Liu X, Luo J, Xu J, Zhang H (2016). Spatio-temporal distribution and natural variation of metabolites in citrus fruits. *Food Chem*, 199: 8–17
- Zhang M, Duan C, Zang Y, Huang Z, Liu G (2011). The flavonoid composition of flavedo and juice from the pummelo cultivar (*Citrus grandis* (L.) Osbeck) and the grapefruit cultivar (*Citrus paradisi*) from China. *Food Chem*, 129: 1530–1536
- Zhang Y, Sun Y, Xi W, Shen Y, Qiao L, Zhong L, Ye X, Zhou Z (2014). Phenolic compositions and antioxidant capacities of Chinese wild mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) fruits. *Food Chem*, 145: 674–680
- Zhang YM, Zhou ZQ, Sun YJ, Shen Y, Zhong LZ, Qiao LQ, Ye XQ (2012). Simultaneous determination of 18 flavonoids in *Citrus* fruits by high-performance liquid chromatography. *Sci Agric Sin*, 45 (17): 3558–3565 (in Chinese with English abstract) [张元梅, 周志钦, 孙玉敬, 沈妍, 钟烈洲, 乔丽萍, 叶兴乾(2012). 高效液相色谱法同时测定柑橘果实中18种类黄酮的含量. *中国农业科学*, 45 (17): 3558–3565]
- Zheng J, Zhao QY, Zhang YH, Jiao BN (2014). Simultaneous determination of main flavonoids and phenolic acids in citrus fruit by ultra performance liquid chromatography. *Sci Agric Sin*, 47 (23): 4706–4717 (in Chinese with English abstract) [郑洁, 赵其阳, 张耀海, 焦必宁(2014). 超高效液相色谱法同时测定柑橘中主要酚酸和类黄酮物质. *中国农业科学*, 47 (23): 4706–4717]

Flavonoid composition of *Citrus* juice sacs determined by high-performance liquid chromatography coupled with tandem electrospray ionization mass spectrometry

LIU Xian-Qing¹, TU Hong², WANG Shou-Chuang¹, ZHANG Hong-Yan², LUO Jie^{1,*}, XU Juan^{2,*}

¹College of Life Science and Technology; ²College of Horticulture and Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract: High-performance liquid chromatography coupled with tandem electrospray ionization mass spectrometry was applied to determine flavonoids in juice sacs of 27 *Citrus* germplasms widely cultivated in China, including 10 sweet orange cultivars (*Citrus sinensis*), 12 pummelos (*Citrus grandis*) and 5 grapefruits (*Citrus paradisi*). Forty-one flavonoids, including 8 flavanones, 23 flavones, 7 flavonols and 3 polymethoxyflavones (PMFs), were identified and quantified. The results show that there were significant differences in total flavonoids levels among different species. Total flavonoids of sweet orange [averagely 584.41 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)] was the highest among all species, followed by grapefruit [averagely 333.64 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)], while pummelo accumulated the lowest level of total flavonoids. Sweet orange has the highest level of flavanones [353.06 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)], followed by grapefruit [137.85 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)] and pummelo [52.16 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW)]. Flavones were detected at relatively low levels, including tricetin and *O*-glycoside which had not been reported in *Citrus* fruits yet. Levels of PMFs in sweet oranges and grapefruits were 20-fold higher than those in pummelos. The accumulation of flavanones, flavonols and PMFs showed similar pattern to total flavonoid contents in different types of *Citrus*, which resulted in big difference in levels of total flavonoid content. The highest accumulation of an average of 584.41 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW) was detected in sweet oranges, followed by grapefruits, while the lowest level of an average of 184.91 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (DW) was observed in pummelos. Principal component analysis (PCA) shows that the grouping by metabotype as represented by flavonoids content was in line with the grouping by genotype of *Citrus* species, revealing that the content of flavonoids was closely related to the genotype of *Citrus*.

Key words: *Citrus*; liquid chromatography-tandem mass spectrometry; flavonoids

Received 2016-03-24 Accepted 2016-04-09

This work was supported by the Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest (Grant No. 201303093), the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31521092), and the Program for New Century Excellent Talents in Universities of Ministry of Education in China (Grant No. NCET-13-0810).

*Co-corresponding authors (E-mail: jie.luo@mail.hzau.edu.cn; xujuan@mail.hzau.edu.cn).