

红肉苹果果皮类黄酮组分及抗氧化活性分析

项亚^{1,2}, 赵瑞雪³, 赖方秣⁴, 孙欣^{1,2,5}, 孙晓红^{1,2}, 戴洪义^{1,2}, 张玉刚^{1,2,*}

¹青岛农业大学园艺学院, 山东青岛266109; ²青岛市园艺植物遗传改良与育种重点实验室, 山东青岛266109; ³山东省果茶技术推广站, 济南250013; ⁴青岛农业大学生殖细胞生物学实验室, 山东青岛266109; ⁵南京农业大学园艺学院, 南京210095

摘要: 以红肉苹果杂种优系2010-5果皮为试材, pH示差法测定总花青苷含量, 超高压液相色谱串联四极杆飞行时间质谱(UPLC-Q-TOF-MS/MS)分析推定类黄酮组分, 对其抗氧化活性进行了评价。结果表明: 红肉苹果2010-5果皮总花青苷含量为390.2 mg·kg⁻¹ (FW), 是其果肉总花青苷含量的1.4倍; 质谱技术推测出果皮中类黄酮主要有12种成分物质: 杨梅酮、儿茶素、矢车菊素-3-*O*-半乳糖苷、山奈酚-3-*O*-芸香糖苷、山奈酚衍生物、矢车菊素-3-*O*-琥珀酸-阿拉伯糖、花葵素-3-甲酰葡萄糖苷、矢车菊素-3-*O*-阿拉伯糖苷、矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷、槲皮素苷元、飞燕草素-3-乙酰芸香糖酰-5-葡萄糖苷和槲皮素衍生物。与对照维生素C (Vc)相比, 红肉苹果果皮类黄酮提取物对3种自由基表现出较好的清除效果, 尤其是对DPPH的清除效果最好, 达90%以上。当红肉苹果果皮类黄酮提取物和Vc浓度为35 mg·L⁻¹时, 对DPPH清除率分别为92.77%和79.87%, 对·OH清除率分别为52.11%和37.55%, 对O₂⁻清除率分别为33.98%和13.44%。这为今后红肉苹果的选育及天然抗氧化剂的开发和保健功能的研究提供理论依据。

关键词: 红肉苹果; UPLC-Q-TOF-MS/MS; 类黄酮; 花青苷; 抗氧化活性

苹果是世界重要的经济水果之一, 果实的色泽直接影响其商品特性和本身的营养价值, 花青苷含量多少和分布状况决定苹果果皮色泽性状(樊连梅等2014)。花青苷是一类广泛存在于植物的花、果实中的水溶性天然色素, 它属于类黄酮类化合物(Cooper-Driver 2001), 其生物合成途径是植物类黄酮物质生物合成途径的分支之一。红肉苹果因其含有丰富的花青苷(Zhang等2013), 被誉为功能性果品。近年来, 关于花青苷的研究引起了人们的极大兴趣, 已经报道了花青苷的很多药理活性, 如降低冠状动脉心脏疾病(Bhaswant等2015)、抗氧化活性(Chen等2014; Alipour等2015; Kšonžeková等2015; Sousa等2016)、防止癌变(Charepalli等2016)、降血压(Kent等2015)等。从黑大豆种皮中提取出的花青苷能防止氧化损伤(Jang等2012)。紫甘薯花青苷可抑制·OH诱导的氧化作用(蔡花真和王霞2009)。在动物实验中, 高血脂症大鼠的超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性和总的抗氧化能力(total antioxidative capability, TAC)通过花青苷作用得到改善(张名位等2006)。

对于红肉苹果, 虽然国外有报道已经育成, 但对其组分的研究报道不多。陈学森等(2014)曾经对红肉苹果类黄酮组分做了鉴定, 红肉苹果含多种花青苷。花青苷具有很强的抗氧化能力且具有较强的体外清除自由基效果, 特别是对1,1-二苯基-2-苦基苯肼(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)和

羟基自由基(·OH)的清除(党娅和刘水英2015)。活性氧是一类化学性质活泼、氧化能力很强的含氧物质的总称, 包括含氧自由基和含氧非自由基, 主要有: 超氧化物自由基、过氧化氢、羟自由基、单线态氧、氢过氧基以及脂质自由基、脂质过氧基等(蒋明义和荆家海1993)。目前, 有关红肉苹果的抗氧化性能研究尚未见报道。本研究以红肉苹果优系2010-5为试材, 分析其果皮总花青苷含量、类黄酮成分以及使用三种体外模型评估其粗提液清除DPPH自由基、羟自由基和超氧阴离子自由基的抗氧化活性, 以期对红肉苹果的保健功能及抗氧化作用研究提供理论依据, 这对功能性果品的选育以及天然抗氧化剂的开发应用具有重要意义。

材料与方法

1 材料

试验材料为本课题组以新疆红肉苹果[*Malus sieversii* f. *neidzwetzkyana* (Dieck) Langenf]品种‘红勋1号’和‘富士’杂交F₁群体中选育的果肉浓红型优系2010-5, 定植于青岛农业大学胶州现代农业科技示范园, 2015年8月中旬, 于花后16周采摘达到园艺学成熟的果实带回实验室, -40℃避光冷冻保存。

收稿 2016-05-03 修定 2016-08-31

资助 国家自然科学基金(31372032)、国家现代苹果产业技术体系(CARS-28-01-07)、山东省良种产业化工程、‘泰山学者’建设工程和青岛市民生科技计划项目(15-9-2-99-nsh)。

* 通讯作者(E-mail: zyg4458@163.com)。

2 方法

2.1 红肉苹果果皮抗氧化物的制备

称取红肉苹果新鲜果皮100 g, 按固液比1:10的比例加无水乙醇1 000 mL, 室温黑暗浸提10 h, 抽滤, 所得滤液进行总花青苷含量测定和类黄酮成分分析。取500 mL滤液旋蒸至膏状, 加蒸馏水定容至500 mL, 过滤后测定其抗氧化活性。

2.2 双波长pH示差法测果皮总花青苷含量

红肉苹果果皮中总花青苷含量测定采用双波长pH示差法(Huang等2009; Giusti和Wrolstad 2001)。取类黄酮提取物1 mL, 分别加入到9 mL 0.025 mmol·L⁻¹氯化钾缓冲液(pH 1.0)和9 mL 0.4 mmol·L⁻¹醋酸钠缓冲液(pH 4.5)中, 混匀, 510和700 nm处测吸光度值。

样品吸光度值(A)计算公式如下:

$$A = (A_{510} - A_{700})_{\text{pH } 1.0} - (A_{510} - A_{700})_{\text{pH } 4.5}$$

以矢车菊素-3-葡萄糖苷为当量, 类黄酮提取物总花青苷含量计算公式为:

$$\text{总花青苷含量}(\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}) = (A \times \text{MW} \times \text{DF} \times 1000) / (\epsilon \times l)$$

式中, A是吸光度; MW=449.2, 是矢车菊素-3-葡萄糖苷的分子量; DF是稀释因子; 1000是克与毫克的换算系数; $\epsilon=26\ 900$, 是矢车菊素-3-葡萄糖苷的摩尔消光系数; l表示比色皿的光路直径。

2.3 红肉苹果果皮类黄酮组分的测定

UPLC条件: 采用二维纳升级超高效液相色谱仪(美国Dionex Ultimate 3000 Nano LC System), Symmetry C18色谱柱(150 mm×2.1 mm, 5 μm); 以甲醇为流动相A, 以体积分数0.2%甲酸水溶液为流动相B。梯度洗脱: 0~0.1 min, 5% A; 0.1~20 min, 5%~20% A; 20.1~22.0 min, 20%~80% A; 22.1~35.0 min, 5% A。流速 0.3 mL·min⁻¹; 柱温35°C。

质谱条件: BRUKER MAXIS UHR-TOF MS质谱仪, ESI离子源, 扫描范围50~1 000 amu, 电喷雾离子化正离子采集模式(ESI+), 毛细管电压4.5 kV, 离子源温度180°C, 脱溶剂气流速6 L·min⁻¹。

2.4 红肉苹果果皮类黄酮抗氧化活性研究

2.4.1 DPPH自由基清除活性测定

DPPH在有机溶剂中是一种稳定的自由基, 其乙醇溶液(显深紫色)在515 nm处有最大吸收峰, 添加抗氧化剂, 减少的吸光度与其抗氧化活性成正比关系(Villaño等2007; Brand-Williams等1995;

Molyneux 2004; Assimopoulou等2005; Li等2009)。红肉苹果果皮类黄酮提取物对DPPH的清除活性测定采用Kano等(2005)方法进行修改。取0.2 mmol·L⁻¹ DPPH溶液2 mL, 分别加入到1 mL不同浓度红肉苹果果皮类黄酮提取物中, 混匀, 反应30 min, 515 nm处测吸光度值, 重复3次, Vc作阳性对照。

DPPH自由基清除活性计算如下:

$$\text{清除率}(\%) = [(DPPH_{t=0} - DPPH_t) / DPPH_{t=0}] \times 100\%$$

其中, DPPH_{t=0}是反应开始时的吸光度值; DPPH_t是DPPH在反应30 min后的吸光度值。

2.4.2 ·OH清除活性测定

邻二氮菲与Fe²⁺形成红色络合物, 在536 nm处有最大吸收峰, H₂O₂/Fe²⁺体系通过Fenton反应产生羟自由基, 使邻二氮菲-Fe²⁺被氧化为邻二氮菲-Fe³⁺, 使536 nm最大吸收峰消失。添加抗氧化剂, Fenton反应产生的羟自由基将被清除, 使得邻二氮菲-Fe²⁺络合物受到的破坏减少, 以此反映抗氧化剂对羟自由基的清除作用。红肉苹果果皮类黄酮提取物对·OH清除活性测定参考Ma等(2016)方法。样品组含类黄酮提取物1 mL, 0.75 mmol·L⁻¹邻二氮菲1 mL, 0.2 mmol·L⁻¹磷酸缓冲液(pH 7.4) 2 mL, 0.75 mmol·L⁻¹硫酸亚铁1 mL, 0.01%过氧化氢1 mL; 损伤组将样品组类黄酮提取物换成蒸馏水; 未损伤组将损伤组过氧化氢换成蒸馏水。混匀, 37°C水浴1 h, 536 nm处测吸光值, 重复3次, Vc作阳性对照。

·OH清除活性用下列公式计算:

$$\text{清除率}(\%) = (A_{\text{样品}} - A_{\text{损伤}}) / (A_{\text{未损}} - A_{\text{损伤}}) \times 100\%$$

其中, A_{样品}是样品组的吸光度值; A_{损伤}是损伤组的吸光度值; A_{未损}是未损伤组的吸光度值。

2.4.3 O₂⁻清除活性测定

在弱碱性条件下, 邻苯三酚发生自氧化链式反应生成大量的O₂⁻和有色中间产物, 该中间产物在320 nm处有一特征吸收峰, 在反应体系中加入抗氧化剂, 它能迅速与O₂⁻反应, 从而阻止中间产物的积累, 使反应溶液在320 nm处的吸光度减小来测定抗氧化剂对O₂⁻的清除作用。提取物对O₂⁻清除活性测定参考Tsuda等(1994)方法稍作修改。取4.5 mL 0.05 mol·L⁻¹的Tris-HCl缓冲液(pH=8.2), 25°C水浴20 min, 加1 mL类黄酮提取物和0.4 mL 75 mmol·L⁻¹邻苯三酚, 反应5 min, 加1 mL 8 mol·L⁻¹的

HCl终止反应, 320 nm处测吸光值, 记为 A_1 ; $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ HCl代替邻苯三酚, 记为 A_2 ; 蒸馏水代替类黄酮提取物, 记为 A_0 , 重复3次, Vc作阳性对照。

红肉苹果果皮类黄酮提取物对超氧阴离子清除率用下列公式计算:

$$\text{超氧阴离子自由基的清除率}(\%) = [(A_1 - A_0) / (A_1 - A_2)] \times 100\%$$

其中, A_0 是类黄酮提取物换成蒸馏水的吸光度值; A_1 是加类黄酮提取物和邻苯三酚的吸光度值; A_2 是邻苯三酚替换成HCl的吸光度值。

2.5 数据统计分析

采用Bruker Daltonic Compass Data Analysis 4.0和Origin 8.0软件对质谱数据进行分析、绘制作图, Excel和GraphPad Prism (第5版)软件对实验数据进行统计分析。

实验结果

1 红肉苹果果皮总花青苷含量测定

采用双波长pH示差法对本课题组选育的果肉浓红型 F_1 代杂种优系2010-5红肉苹果果皮和果肉粗提物总花青苷含量分别进行测定, 结果显示(图1-B)红肉苹果2010-5果皮花青苷含量为 $390.2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (FW), 而果肉的含量只有 $270.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (FW), 这表明2010-5红肉苹果富含花青苷, 且果皮花青苷含量大约为果肉含量的1.4倍。从果实的切面图(图1-A)也可以看出, 2010-5果皮紫红色, 靠近果皮部位的果肉也为紫红色, 果心部位为浓红色, 因此, 本试验选取花青苷含量最高的果皮作为试验材料。

2 红肉苹果果皮抗氧化活性成分分析

采用超高压液相色谱串联四极杆飞行时间质谱技术(ultra performance liquid chromatography

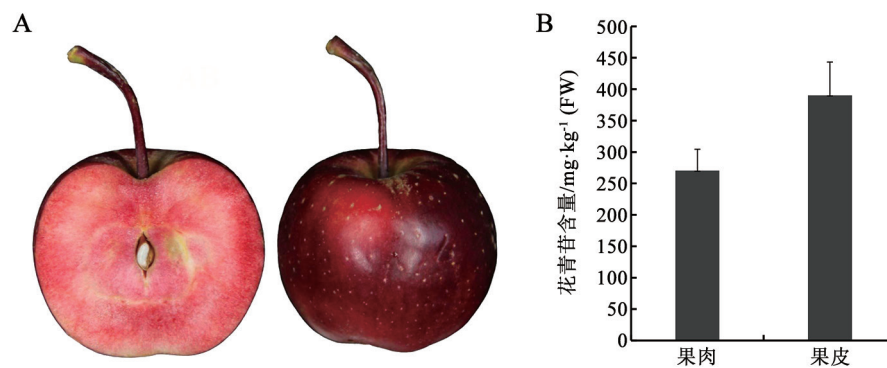


图1 红肉苹果果实切面图及果皮和果肉花青苷含量

Fig.1 The fruit slice graph and the anthocyanin content in peel and flesh of red flesh apple

quadrupole-time-of-flight mass spectrometry, UPLC-Q-TOF-MS/MS)对红肉苹果果皮类黄酮成分进行分析, 总离子流图见图2。根据所得色谱峰的保留时间、分子离子、碎片离子及前人研究(袁帅等2009; 周君等2009; Silva等2007; 张琼等2008; 王燕等2012; Alonso-Salces等2004; Zhang等2012; 张洁等2011)对红肉苹果果皮中的类黄酮成分进行推定, 数据信息汇总见表1。推测出红肉苹果果皮中类黄酮主要有12种成分: 杨梅酮、儿茶素、矢车菊素-3-*O*-半乳糖苷、山奈酚-3-*O*-芸香糖苷、山奈酚衍生物、矢车菊素-3-*O*-琥珀酸-阿拉伯糖、花葵素-3-甲酰葡萄糖苷、矢车菊素-3-*O*-阿拉伯糖苷、矢车菊素-3-*O*-葡萄糖苷、槲皮素苷元、飞燕草素-3-乙

酰芸香糖酰-5-葡萄糖苷、槲皮素衍生物。

3 红肉苹果果皮类黄酮提取物对自由基的清除

3.1 对DPPH自由基的清除作用

DPPH是一种以氮为中心的非常稳定的自由基(李春阳等2006), 从图3可以看出, 红肉苹果果皮类黄酮提取物在 $7.5 \sim 35 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度范围内对DPPH自由基的清除率呈现稳定趋势, 清除率都在90%左右。当浓度达到 $32.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 类黄酮提取物和Vc的清除率分别为92.64%和80.50%。当两者的浓度增加到 $35 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 花青苷的清除率为92.77%, 没有显著增加, 而Vc的清除率为79.87%, 呈下降趋势。总的来说, 果皮类黄酮提取物对DPPH自由基的清除作用强于Vc。

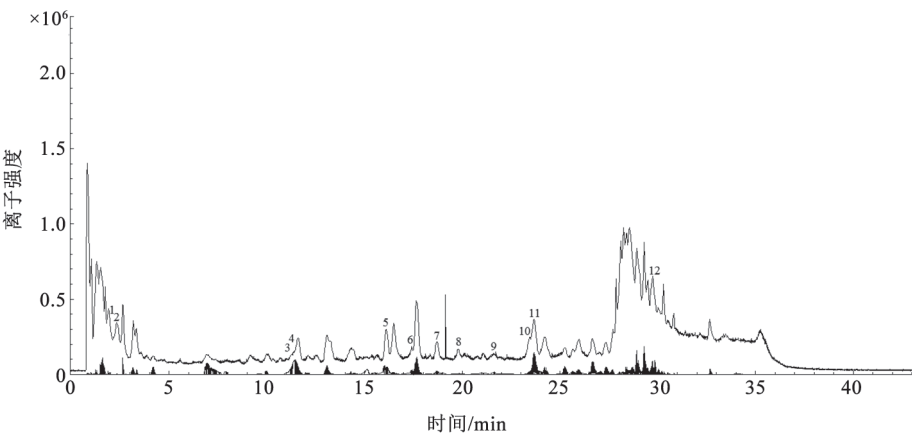


图2 红肉苹果果皮成分总离子流图
Fig.2 The total ion chromatogram of red flesh apple extracts
峰号及推定色谱峰成分见表1。

表1 红肉苹果果皮类黄酮类抗氧化活性成分定性分析结果

Table 1 Analysis of red flesh apple extracts by UPLC-Q-TOF-MS/MS

峰号	保留时间/min	分子离子(m/z)	碎片离子(m/z)	推定结果
1	2.1	319.0973	317.0819	杨梅酮
2	2.2	289.0895	289.0895	儿茶素
3	11.1	449.1707	287.0563	矢车菊素-3-O-半乳糖苷
4	11.1	447.2591	285.0472	山奈酚-3-O-芸香糖苷
5	16.1	489.1021	285.1951	山奈酚衍生物
6	17.3	519.2199	287.9892	矢车菊素-3-O-琥珀酸-阿拉伯糖
7	18.7	461.2008	271.1146	花葵素-3-甲酰葡萄糖苷
8	19.7	419.1895	287.0253	矢车菊素-3-O-阿拉伯糖苷
9	21.7	449.2002	287.0565	矢车菊素-3-O-葡萄糖苷
10	23.5	303.0509	303.0509	槲皮素苷元
11	23.6	465.2335	303.0512	飞燕草素-3-乙酰芸香糖酰-5-葡萄糖苷
12	29.6	505.3361	301.1467	槲皮素衍生物

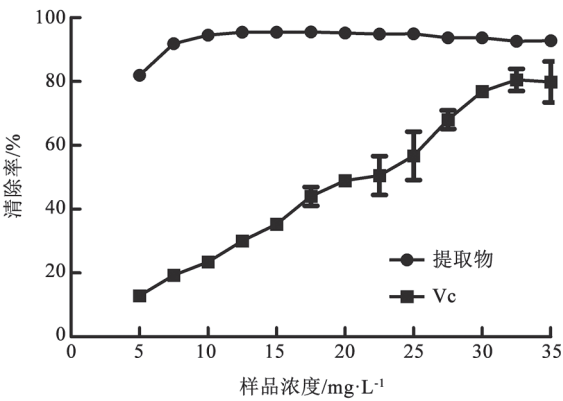


图3 红肉苹果果皮粗提取物对DPPH自由基清除率的影响
Fig.3 Effects of red-fresh apple extracts on DPPH free radical scavenging ability

3.2 对·OH的清除作用

·OH是化学性质最活跃且细胞毒性较大的自由基之一(谢红光和陈修1992)。研究表明,许多抗氧化剂都可以消除O₂⁻,但它们不能够去除·OH⁻。由图4看出,红肉苹果果皮类黄酮提取物对·OH⁻的清除作用随浓度的增加呈上升趋势,Vc对·OH⁻的清除作用呈现基本稳定趋势,在5~30 mg·L⁻¹的浓度范围内,Vc对·OH⁻的清除率明显高于果皮类黄酮提取物对·OH⁻的清除率,在30~35 mg·L⁻¹浓度范围内,果皮类黄酮提取物对·OH⁻的清除率高于Vc对·OH⁻的清除率。当两者浓度为35 mg·L⁻¹时,类黄酮提取物的清除率为52.11%,Vc的清除率为37.55%。

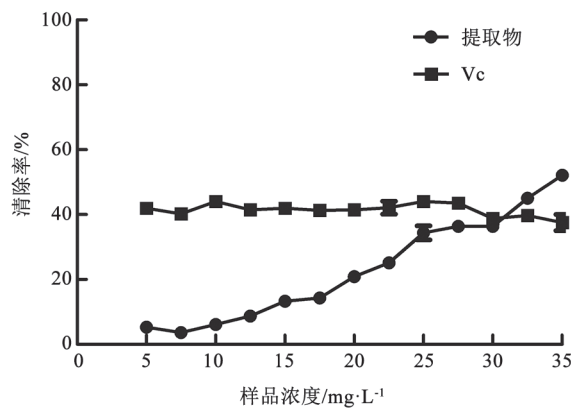


图4 红肉苹果果皮粗提取物对 $\cdot\text{OH}$ 清除率的影响
Fig.4 Effects of red-fresh apple extracts on hydroxyl free radical scavenging ability

3.3 对 O_2^- 的清除作用

由图5看出, 红肉苹果果皮类黄酮提取物对超氧阴离子有一定的清除作用, 且清除效果随着样品浓度的增加而增强。在5~35 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度范围内, 类黄酮提取物对超氧阴离子的清除作用呈线性升高, 然而, Vc的清除率一直低于15%。当两者浓度为35 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 花青苷的清除率为33.98%, Vc的清除率为13.44%。

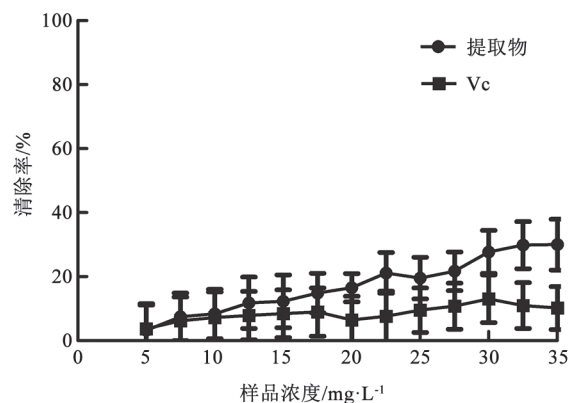


图5 红肉苹果果皮粗提取物对 O_2^- 清除率的影响
Fig.5 Effects of red-fresh apple extracts on superoxide anion scavenging ability

讨 论

红肉苹果因其含有丰富的花青苷和较好的保健功能受到越来越多消费者的青睐。2010-5是本课题组从2 000多株杂种 F_1 代中选育的果肉浓红型

优系, 采用的果实为花后16周采摘的达到园艺学成熟的果实, 此时果肉、果皮的花青苷含量最高, 果皮总花青苷含量为 $390.2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (FW), 是果肉含量的1.4倍。这是本试验选用红肉苹果果皮为试材的原因。园艺学成熟期后, 果实硬度开始下降, 糖分增加, 酸度降低(江道伟等2011), 花青苷含量也逐渐降低(王延玲等2012)。因此, 利用红肉苹果花青苷最好的采收时期是园艺学成熟期, 而不是食用成熟期或生理成熟期。

红肉苹果果皮的生物活性来自于它所含有的功能性物质, 同一植物不同品种花色苷的含量和组分往往不尽相同。苹果果皮中所含花青苷的种类较多, 除矢车菊素-3-半乳糖苷外, 还有少量的矢车菊素-3-阿拉伯糖、矢车菊素-3-葡萄糖苷、矢车菊素-7-阿拉伯糖、矢车菊素-3-木糖苷、矢车菊素-3-芸香糖苷、矢车菊素-3-鼠李糖苷(Takos等2006), 其中矢车菊素-3-半乳糖苷、矢车菊素-3-阿拉伯糖和矢车菊素-3-葡萄糖苷在前人研究中报道较多(Takos等2006)。王燕等(2012)利用液质联用(UPLC-PAD-MS/MS)鉴定出红肉苹果‘紫红1号’含矢车菊素-3-O-葡萄糖苷、矢车菊素-3-O-半乳糖苷、矢车菊素-3-O-木糖苷、矢车菊素-3-O-阿拉伯糖苷4种花青苷及5种暂不能确定其结构的花青苷。本文采用UPLC-Q-TOF-MS/MS技术鉴定出红肉苹果果皮中的12种类黄酮组分中含花青苷6种, 分别为矢车菊素-3-O-半乳糖苷、矢车菊素-3-O-琥珀酸-阿拉伯糖、花葵素-3-甲酰葡萄糖苷、矢车菊素-3-O-阿拉伯糖苷、矢车菊素-3-O-葡萄糖苷、飞燕草素-3-乙酰芸香糖酰-5-葡萄糖苷, 只有3种花青苷和王燕等(2012)结果一致。推测矢车菊素-3-O-葡萄糖苷、矢车菊素-3-O-半乳糖苷、矢车菊素-3-O-阿拉伯糖苷是红肉苹果花青苷的主要成分。不同品种差异的原因可能是品种之间的遗传背景不同及组织特异性造成的(刘玉莲等2013)。花青苷是目前最有效的天然水溶性自由基清除剂, 具有清除自由基的作用(张鲁青2012), 红肉苹果果皮中除含较高含量的花青苷外, 还含有其他具有抗氧化功能的槲皮素衍生物、山奈酚衍生物等类黄酮类化合物。

自由基是具有非偶电子的基团或原子(楚小晶2013)。众多医学研究及临床试验证明: 很多疾

病如动脉粥样硬化、脑血栓、组织器官老化及癌症等都与过剩的自由基有关(董乃源等2007)。DPPH自由基、羟自由基和超氧阴离子自由基是3种造成器官损伤的主要自由基。本试验用红肉苹果果皮类黄酮提取物对这3种自由基的清除作用来分析其抗氧化活性。Vc又称为L-抗坏血酸,具有极强的还原性。研究结果证明,Vc有明显的促进自由基清除的药理作用,因此,本试验以Vc对自由基的清除作用作为对照。红肉苹果果皮类黄酮提取物的抗氧化活性通过DPPH自由基、羟自由基和超氧阴离子自由基来评价,结果表明,红肉苹果优系2010-5果皮类黄酮提取物能够很好的清除DPPH自由基、羟自由基和超氧阴离子自由基。特别是对DPPH自由基具有非常强的清除能力,这与Ma等(2016)得出的研究结果基本一致。当浓度为 $35\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,类黄酮提取物清除3种自由基的效果为对照Vc清除能力的1.2~2.5倍;对羟自由基和超氧阴离子自由基的清除效果随着浓度的升高有上升趋势,而Vc却有下降趋势。

花青苷的种类以及含量的高低决定了其氧化的程度,不同品种以及同一品种不同成熟期的红肉苹果其花青苷含量不同。在果实发育的不同阶段,其代谢产物不同,果实内部的糖酸等物质也在不断变化,从而影响到花青苷含量的变化。本试验试材为课题组选育的果皮紫红、果肉浓红的优系,采收期为花青苷含量最高的园艺成熟期,优异的红肉资源以及检测出的12种类黄酮成分,为本试验中花青苷较强的抗氧化性奠定了基础。12种类黄酮中,具体是哪种类黄酮对抗氧化起主要作用,今后还需要深入的研究。本试验结果初步证明红肉苹果优系2010-5作为天然抗氧化剂有很好的应用前景,这也为天然保健品的开发和研究提供了理论依据。

参考文献

- Alipour B, Rashidkhani B, Edalati S (2015). Dietary flavonoids intake, total antioxidant capacity and lipid oxidative damage: A cross-sectional study of Iranian women. *Nutrition*, 76 (6): 393–413
- Alonso-Salces RM, Ndjoko K, Queiroz EF, Ioset JR, Hostettmann K, Berrueta LA, Gallo B, Vicente F (2004). On-line characterisation of apple polyphenols by liquid chromatography coupled with mass spectrometry and ultraviolet absorbance detection. *J Chromatogr A*, 1046 (1-2): 89–100
- Assimopoulou AN, Sinakos Z, Papageorgiou VP (2005). Radical scavenging activity of *Crocus sativus* L. extract and its bioactive constituents. *Phytother Res*, 19: 997–1000
- Bhaswant M, Fanning K, Netzel M, Mathai ML, Panchal SK, Brown L (2015). Cyanidin 3-glucoside improves diet-induced metabolic syndrome in rats. *Pharmacol Res*, 102: 208–217
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci Technol*, 28 (1): 25–30
- Cai HZ, Wang X (2009). The study on APSP components inhibiting lipid peroxidation of rat liver, kidney, heart and spleen. *Food Ind*, 4: 6–8 (in Chinese with English abstract) [蔡花真, 王霞(2009). 紫甘薯花青苷组分抑制小鼠肝、肾、心、脾脂质过氧化的研究. *食品工业*, 4: 6–8]
- Charepalli V, Reddivari L, Vadde R, Walia S, Radhakrishnan S, Vannamala JK (2016). *Eugenia jambolana* (java plum) fruit extract exhibits anti-cancer activity against early stage human HTC-116 colon cancer cells and colon cancer stem cells. *Cancers J*, 8 (3): 1–11
- Chen L, Xin XL, Yuan QP, Su DH, Liu W (2014). Phytochemical properties and antioxidant capacities of various colored berries. *J Sci Food Agric*, 94 (2): 180–188
- Chen XS, Zhang J, Liu DL, Ji XH, Zhang ZY, Zhang R, Mao ZQ, Zhang YM, Wang LX, Li M (2014). Genetic variation of *F₁* population between *Malus sieversii* f. *neidzwetzkyana* and apple varieties and evaluation on fruit characters of functional apple excellent strains. *Sci Agr Sin*, 47 (11): 2193–2204 (in Chinese with English abstract) [陈学森, 张晶, 刘大亮, 冀晓昊, 张宗营, 张芮, 毛志泉, 张艳敏, 王立霞, 李敏(2014). 新疆红肉苹果杂种一代的遗传变异及功能型苹果优株评价. *中国农业科学*, 47 (11): 2193–2204]
- Chu XJ (2013). The antioxidant activity of curcumin analogues and the protective effect on PC12 cells from oxidative damage (Master's thesis). Suzhou, Jiangsu: Soochow University (in Chinese with English abstract) [楚小晶(2013). 姜黄素类似物的抗氧化活性及其对PC12细胞氧化损伤保护作用的研究(硕士论文). 江苏苏州: 苏州大学]
- Cooper-Driver GA (2001). Contributions of Jeffrey Harborne and co-workers to the study of anthocyanins. *Phytochemistry*, 56 (3): 229–236
- Dang Y, Liu SY (2015). Study on purple cabbage anthocyanins extraction process and oxidation resistance. *Northern Hortic*, 1: 128–136 (in Chinese with English abstract) [党娅, 刘水英(2015). 紫甘蓝花青苷提取工艺及抗氧化性研究. *北方园艺*, 1: 128–136]
- Dong NY, Zhou YJ, Wang QY, Yu LQ (2007). Advances and development prospect of natural antioxidant active substances. *Allelopathy Forum*, Beijing, China, 2007 (in Chinese) [董乃源, 周勇军, 王庆钰, 余柳青(2007). 天然抗氧化活性物质的研究进展与开发前景. *中国水稻化感作用论坛*, 中国北京, 2007]
- Fan LM, Wang C, Liu GS, Yuan YB (2014). Screening and validation of reference genes for real-time fluorescence quantitative PCR during coloring period in apple (*Malus domestica*). *Plant Physiol J*, 50 (12): 1903–1911 (in Chinese with English abstract) [樊连

- 梅, 王超, 刘更森, 原永兵(2014). 苹果着色期实时定量PCR内参基因的筛选和验证. 植物生理学报, 50 (12): 1903–1911]
- Giusti MM, Wrolstad RE (2001). Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. In: Wrolstad RE, Acree TE, Decker EA, Penner MH, Reid DS, Schwartz SJ, Shoemaker CF, Smith DM, Sporns P (eds). Current Protocols in Food Analytical Chemistry. New York: John Wiley and Sons Inc, F1.2.1–F1.2.13
- Huang Z, Wang B, Williams P, Pace RD (2009). Identification of anthocyanins in muscadine grapes with HPLC-ESI-MS. Food Sci Technol, 42 (4): 819–824
- Jang H, Kim SJ, Yuk SM, Han DS, Ha US, Hong SH, Lee JY, Hwang TK, Hwang SY, Kim SW (2012). Effects of anthocyanin extracted from black soybean seed coat on spermatogenesis in a rat varicocele-induced mode. Reprod Fert Dev, 24 (5): 649–655
- Jiang DW, Fan CH, Su BH, Wang Y (2011). The change of fruit quality in bagged red fuji apples at maturity. Northern Hortic, 16: 23–25 (in Chinese with English abstract) [江道伟, 范崇辉, 苏渤海, 王炎(2011). 套袋红富士苹果成熟期果实品质的影响. 北方园艺, 16: 23–25]
- Jiang MY, Jing JH (1993). Generation of hydroxyl radical in plants and its relation to the initiation of lipid peroxidation. Plant Physiol Commun, 29 (4): 300–305 (in Chinese with English abstract) [蒋明义, 荆家海(1993). 植物体内羟自由基的产生及其与脂质过氧化作用启动的关系. 植物生理学通讯, 29 (4): 300–305]
- Kano M, Takayanagi T, Harada K, Makino K, Ishikawa F (2005). Antioxidative activity of anthocyanins from purple sweet potato, *Ipomoea batatas* cultivar Ayamurasaki. Biosci Biotech Bioch, 69 (5): 979–988
- Kent K, Charlton KE, Jenner A, Roodenrys S (2015). Acute reduction in blood pressure following consumption of anthocyanin-rich cherry juice may be dose-interval dependant: a pilot cross-over study. Int J Food Sci Nutr, 67 (1): 47–52
- Kšonžeková P, Mariychuk R, Eliašová A, Mudroňová D, Csank T, Király J, Marcinčáková D, Pistl J, Tkáčiková L (2015). *In vitro* study of biological activities of anthocyanin-rich berry extracts on porcine intestinal epithelial cells: The biological activities of anthocyanin-rich berry extracts. J Sci Food Agric, 96 (4): 1093–1100
- Li CY, Xu SY, Wang Z (2006). Measuring the antiradical efficiency of proanthocyanidin from grape seed by the DPPH assay. J Food Sci Biotechnol, 25 (2): 102–106 (in Chinese with English abstract) [李春阳, 许时婴, 王璋(2006). DPPH法测定葡萄籽原花青素清除自由基的能力. 食品与生物技术学报, 25 (2): 102–106]
- Li XC, Wu XT, Huang L (2009). Correlation between antioxidant activities and phenolic contents of radix angelicae sinensis (dang-gui). Molecules, 14: 5349–5361
- Liu YL, Che F, Guo YP, Liang J, Zhao ZY (2013). Correlation between changes in soluble sugars and anthocyanins contents during fruit coloration. Food Sci, 34 (17): 47–52 (in Chinese with English abstract) [刘玉莲, 车飞, 郭延平, 梁俊, 赵政阳(2013). 苹果着色期花青苷和糖组分含量变化及关联性. 食品科学, 34 (17): 47–52]
- Ma T, Hu N, Ding CX, Zhang QL, Li WC, Suo YR, Wang HL, Bai B, Ding CX (2016). *In vitro* and *in vivo* biological activities of anthocyanins from *Nitraria tangutorum* Bobr. fruits. Food Chem, 194: 296–303
- Molyneux P (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant. Songklanakarin J Sci Technol, 26 (2): 211–219
- Silva FLD, Escribano-Bailón MT, Alonso JJP, Rivas-Gonzalo JC, Santos-Buelga C (2007). Anthocyanin pigments in strawberry. Food Sci Technol, 40 (2): 374–382
- Sousa A, Araújo P, Azevedo J, Cruz L, Fernandes I, Mateus N, de Freitas V (2016). Antioxidant and antiproliferative properties of 3-deoxyanthocyanidins. Food Chem, 192: 142–148
- Takos AM, Ubi BE, Robinson SP, Walker AR (2006). Condensed tannin biosynthesis genes are regulated separately from other flavonoid biosynthesis genes in apple fruit skin. Plant Sci, 170 (3): 487–499
- Tsuda T, Watanabe M, Ohshima K, Norinobu S, Choi SW, Kawakishi S, Osawa T (1994). Antioxidative activity of the anthocyanin pigments cyanidin 3-*O*-beta-D-glucoside and cyanidin. J Agr Food Chem, 42 (11): 2407–2410
- Villaño D, Fernández-Pachón MS, Moyá ML, Troncoso AM, García-Parrilla MC (2007). Radical scavenging ability of polyphenolic compounds towards dpph free radical. Talanta, 71 (1): 230–235
- Wang Y, Chen XX, Liu DL, Wang CZ, Song Y, Chen XL, Zhang YM (2012). Antioxidant activity and anthocyanins analysis of pulp in ‘Zihong 1’ red-flesh apple. Acta Hortic Sin, 39 (10): 1991–1998 (in Chinese with English abstract) [王燕, 陈学森, 刘大亮, 王传增, 宋杨, 陈晓流, 张艳敏(2012). ‘紫红1号’红肉苹果果肉抗氧化性及花色苷分析. 园艺学报, 39 (10): 1991–1998]
- Wang YL, Zhang YM, Feng SQ, Song Y, Xu YT, Zhang YP, Chen XS (2012). The mechanism of red coloring difference between skin and cortex in *Malus sieversii* f. *neidzwetzkyana* (Dieck) Langenf. Sci Agr Sin, 45 (23): 2771–2778 (in Chinese with English abstract) [王延玲, 张艳敏, 冯守千, 宋杨, 徐玉亭, 张友朋, 陈学森(2012). 新疆红肉苹果果皮果肉呈色差异机理. 中国农业科学, 45 (23): 2771–2778]
- Xie HG, Chen X (1992). Hydroxyl radical electrochemical detection method and its application. Chin Pharmacol Bull, 6: 432–435 (in Chinese) [谢红光, 陈修(1992). 羟自由基电化学检测方法及其应用. 中国药理学通报, 6: 432–435]
- Yuan S, Yao SJ, Geng Y, Cai P, Zhang WJ, Guo YL (2009). Identification of anthocyanins and flavonols in extract of blueberry by using HPLC-ESI-MS/MS. Acta Chim Sin, 67 (4): 318–322 (in Chinese with English abstract) [袁帅, 姚胜军, 耿昱, 蔡澎, 章文峻, 郭寅龙(2009). HPLC-ESI-MS/MS识别蓝莓提取物中的花青素和黄酮醇. 化学学报, 67 (4): 318–322]
- Zhang J, Wang LS, Gao JM, Li SB, Xu YJ, Li ZH, Yang RZ (2011). Identification of anthocyanins involving in petal coloration in *Chaenomeles speciosa* cultivars. Acta Hortic Sin, 38 (3): 527–534 (in Chinese with English abstract) [张洁, 王亮生, 高锦明, 李圣波, 徐彦军, 李崇晖, 杨瑞珍(2011). 贴梗海棠花青苷组成及其与花色的关系. 园艺学报, 38 (3): 527–534]

- Zhang J, Wang LS, Gao JM, Xu YJ, Li LF, Li CH (2012). Rapid separation and identification of anthocyanins from flowers of *Viola yedoensis* and *V. prionantha* by high-performance liquid chromatography–photodiode array detection–electrospray ionisation mass spectrometry. *Phytochem Anal*, 23 (1): 16–22
- Zhang LQ (2012). Inhibition effect of fluorouracil combined with anthocyanin to gastric cancer cell *in vitro* (Master's thesis). Hangzhou: Zhejiang University (in Chinese with English abstract) [张鲁青(2012). 花青苷联合氟尿嘧啶对体外胃癌细胞生长的抑制作用(硕士论文). 杭州: 浙江大学]
- Zhang MW, Zhang RF, Guo BJ, Chi JW, Wei ZC, Xu ZH (2006). The hypolipidemic and antioxidative effects of black rice pericarp anthocyanin in rats. *Acta Nutrimenta Sin*, 28 (5): 404–408 (in Chinese with English abstract) [张名位, 张瑞芬, 郭宝江, 池建伟, 魏振承, 徐志宏(2006). 黑米皮花色苷的抗氧化与降血脂作用. 营养学报, 28 (5): 404–408]
- Zhang Q, Wang HQ, Leng P, Jia LX (2008). Mechanism of anthocyan and flavonols in fruit development of strawberries. *Acta Horti Sin*, 35 (12): 1735–1741 (in Chinese with English abstract) [张琼, 王红清, 冷平, 贾乐新(2008). 草莓果实发育过程中花青苷和黄酮醇类物质的形成机制. 园艺学报, 35 (12): 1735–1741]
- Zhang YG, Zhu J, Dai HY (2013). Morphological characteristics and pollination compatibility of a new red flesh apple, Hongxun No. 1. *Res Crop*, 14 (1): 199–204
- Zhou J, Chen ZL, Zhang Q, Wang HQ (2009). Effects of bagging on accumulation of phenolic acids and flavonoids in peach pericarp during fruit maturity. *Acta Horti Sin*, 36 (12): 1717–1724 (in Chinese with English abstract) [周君, 陈宗玲, 张琼, 王红清(2009). 套袋对桃果实成熟过程中酚酸类和类黄酮类物质积累的影响. 园艺学报, 36 (12): 1717–1724]

Components of flavonoids and antioxidant activity analysis of the extracts from red-flesh apple peel

XIANG Ya^{1,2}, ZHAO Rui-Xue³, LAI Fang-Nong⁴, SUN Xin^{1,2,5}, SUN Xiao-Hong^{1,2}, DAI Hong-Yi^{1,2}, ZHANG Yu-Gang^{1,2,*}

¹College of Horticulture, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China; ²Qingdao Key Laboratory of Genetic Development and Breeding in Horticultural Plants, Qingdao, Shandong 266109, China; ³Shandong Provincial Extension Station of Fruits and Tea, Jinan 250013, China; ⁴Institute of Reproductive Sciences, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China; ⁵College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: The peels of red-flesh apple 2010-5 were taken as tested materials to determine the total anthocyanin content by pH differential method, and ultra performance liquid chromatography quadrupole-time-of-flight mass spectrometry (UPLC-Q-TOF-MS/MS) was used to analyze components of flavonoids, which were evaluated on antioxidant activities. The results showed that the total content of anthocyanins in red-flesh apple peel was 390.2 mg·kg⁻¹ (FW), which was 1.4 times of these in flesh. Twelve flavonoids were found in red-flesh apple peel assayed by UPLC-Q-TOF-MS/MS, including myricetin, catechin, cyanidin-3-*O*-anidin galactoside, kaempferol-3-*O*-rutinoside, kaempferol derivative, cyanidin-3-*O*-succinylarabinoside, pelargonidin-3-formylglucoside, cyanidin-3-*O*-arabinoside, cyanidin-3-*O*-glucoside, quercetin, delphinidin-3-acetyl rutinoside acyl-5-glucoside and quercetin derivative. The extracts from red flesh apple peel showed better scavenging effects on the 3 types of free radicals than vitamin C (Vc), especially on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH), which was more than 90% clearance rate. When the concentration was 35 mg·L⁻¹, the scavenging rates of the extracts and the control Vc on DPPH were 92.77% and 79.87%, on ·OH were 52.11% and 37.55%, on O₂⁻ were 33.98% and 13.44%, respectively. These results provide a theoretical basis for the breeding of red flesh apple, the development of natural antioxidants and study of the health function of red flesh apple.

Key words: red-flesh apple; UPLC-Q-TOF-MS/MS; flavonoids; anthocyanin; antioxidant activity

Received 2015-05-03 Accepted 2016-08-31

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31372032), China Agriculture Research System Foundation (Grant No. CARS-28-01-07), Shandong Provincial Improved Variety Engineering System Foundation, Taishan Scholar Constructive Foundation and Qingdao Scientific Research Foundation (Grant No. 15-9-2-99-nsh).

*Corresponding author (E-mail: zyg4458@163.com).