

23 个柑橘品种果实油胞层类黄酮组分鉴定与抗氧化活性研究

刘 阳, 臧文静, 梁 潇, 王 岳, 李 鲜, 孙崇德*

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

摘要 选取 23 个柑橘品种果实油胞层,采用高分辨质谱等技术鉴定其主要类黄酮组分,研究其抗氧化活性。结果表明:柑橘果实油胞层的总酚含量在 4.38~21.10 mg GAE/g DW 之间。柑橘果实油胞层综合抗氧化能力最强,最弱的品种分别为“本地早”“爱媛 38”。从 23 种柑橘果实油胞层中共鉴定出 53 种类黄酮,包括 5 种类黄酮-C-糖苷,4 种类黄酮-O-糖苷,12 种黄烷酮-O-糖苷,32 种多甲氧基黄酮(PMFs),有 2 种类黄酮为首次在柑橘中被鉴定出,分别是根皮素-3',5'-二-C-葡萄糖苷和槲皮-3-O-鼠李糖基己糖苷。油胞层中的黄烷酮类化合物主要为圣草次苷、新圣草次苷、柚皮芸香苷、橙皮苷和香蜂草苷,PMFs 主要为川陈皮素、橘皮素、5HMPF 和甜橙黄酮。本文进一步挖掘并补充不同柑橘品种组分和抗氧化活性信息,为活性研究提供理论依据,也为消费提供科学指导。

关键词 柑橘; 品种; 类黄酮; 油胞层; 抗氧化

文章编号 1009-7848(2022)12-0234-13 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2022.12.024

柑橘是世界大宗水果,具有重要的国民经济价值。我国幅员辽阔,有适宜柑橘栽培的多种气候和土地类型,为多种柑橘资源的积聚提供了良好条件。目前我国柑橘种植面积和产量均居世界首位,种植面积在 2019 年达 2 617 000 hm²,产量为 4 584.54 万 t^[1]。

我国浙-闽-粤柑橘带作为传统柑橘产区,主要种植宽皮橘、柚、杂柑;长江中、上游柑橘带,即湖北、四川、重庆地区主要种植甜橙;赣南-湘南-桂北柑橘带主要种植甜橙及宽皮橘;鄂西-湘西柑橘带主要种植温州蜜柑和椪柑^[2]。我国柑橘栽培品种丰富,利用价值多样,为食品和保健领域更高效、更全面利用柑橘资源提供了优势。

柑橘果实富含多种药用价值的生物活性物质,包括类黄酮、酚酸、萜类化合物、类胡萝卜素、生物碱、精油、果胶、膳食纤维以及 VC 等^[3]。随着

这些功能组分的生物活性和药理作用机制的明晰,对柑橘生物活性物质的研究受到重视,其中类黄酮作为重要的一类活性物质,在不同种类柑橘果实中的研究中均有涉及^[4]。类黄酮是指一类具有 2-苯基色原酮(C6-C3-C6)为基本骨架的天然酚类化合物(图 1),其结构中含有酚羟基、甲基、甲氧基等取代基团。目前柑橘属中发现的类黄酮多以苷的形式存在,主要为黄烷酮、黄酮和黄酮醇^[5]。其中,含有 4 个及以上甲氧基取代基的类黄酮称为多甲氧基黄酮(Polymethoxyflavonoids, PMFs),主要分布在柑橘果皮油胞层中^[6],因其富含较多的甲氧基团,亲脂性较高,故与一般黄酮相比具有更高的生物利用度,也具有更强的生物活性^[7]。

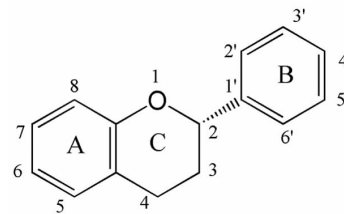


图 1 类黄酮基本结构

Fig.1 General structure of flavonoids

类黄酮含量与类型在不同柑橘品种中的差异被大量研究所证实,例如,柚类中主要的类黄酮为柚皮苷、柚皮芸香苷、圣草枸橼苷、新橙皮苷和柚皮素^[8]。柠檬中橙皮苷与圣草次苷含量较高^[9]。宽皮

收稿日期: 2021-12-13

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

第一作者: 刘阳,女,硕士生

通信作者: 孙崇德 E-mail: adesun2006@zju.edu.cn

橘果皮中 PMFs 含量较高^[10]。对我国特有的 13 种柑橘属植物果实进行类黄酮含量分析发现,在柚类、橙类、宽皮橘类中,柚类果实的柚皮苷含量最高,宽皮橘类和橙类的橙皮苷含量最高^[11]。柑橘果实不同组织部位中类黄酮的种类和含量也有较大差异。研究发现,将“瓯柑”和“胡柚”果实分为油胞层、白皮层、囊衣和汁胞 4 个部分,测定类黄酮种类和含量,结果油胞层中富含 PMFs,而白皮层中黄酮含量较高^[4]。

现代流行病学研究表明,柑橘果实中丰富的类黄酮具有抗氧化^[12]、抗肿瘤^[13]、降血脂^[14]和抗炎^[15]等作用。机体的氧化现象主要是因为存在自由基,自由基具有强氧化能力,在机体内与功能重要的生物大分子反应,使之丧失活性,逐渐引起细胞、机体功能障碍,对机体造成损伤、病变。而类黄酮自身结构赋予独特的理化性质,具有良好的抗氧化活性。类黄酮结构中的羟基不仅具有较强的自由基清除能力^[16],还与金属离子螯合,减少自由基的产生,达到抗氧化效果^[17]。类黄酮也可通过抑制氧化酶活性和促进抗氧化酶活性来抵抗机体氧化损伤^[18]。有关柑橘类黄酮抗氧化活性已有很多研究报道,例如,“瓯柑”和“胡柚”4 个部位粗提物均有一定的抗氧化活性,其中,油胞层具有最强的 DPPH 自由基清除活性^[4]。

目前,柑橘果实类黄酮的鉴定方法主要有色谱法、分子质谱法、核磁共振法、紫外-可见光吸收

光谱法等。在柑橘类黄酮鉴定方面,色谱法应用较广泛,紫外-可见吸收光谱法应用相对较少。以往关于柑橘果实中类黄酮的研究,特别是不同柑橘品种果实中类黄酮的种类、含量及相关活性评价等,大多利用 HPLC 通过比对标准品对已知结构类黄酮进行分析,而利用高分辨质谱等技术鉴别不同种类柑橘果实中的类黄酮研究较少。

本文以 23 个品种的柑橘为材料,比较柑橘果实的品质。采用超高效液相色谱、高效液相色谱-高分辨质谱联用等多种技术,对柑橘果实油胞层中的类黄酮进行鉴定和抗氧化评价。从组分和活性角度挖掘柑橘组分和抗氧化活性信息,为其活性研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料、试剂与仪器设备

试验材料:23 个柑橘品种如图 2 所示,于 2017—2018 年果实商业采收期采集,挑选大小、色泽均匀,无机械伤、无病虫害的单果为试验材料。取果实油胞部分,用液氮处理后冷冻干燥至恒重,干样磨成粉末储存于-40℃条件下,备用。

试验试剂:无水乙醇、甲醇、三氯甲烷、饱和碳酸钠、氯化氢、氯化铁、醋酸钠、二硫酸钾、氢氧化钾、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠均为分析纯级试剂,上海国药控股股份有限公司;Folin-Ciocalteu 试剂、没食子酸(Gallic acid)、1-二苯基-2-2 三硝基

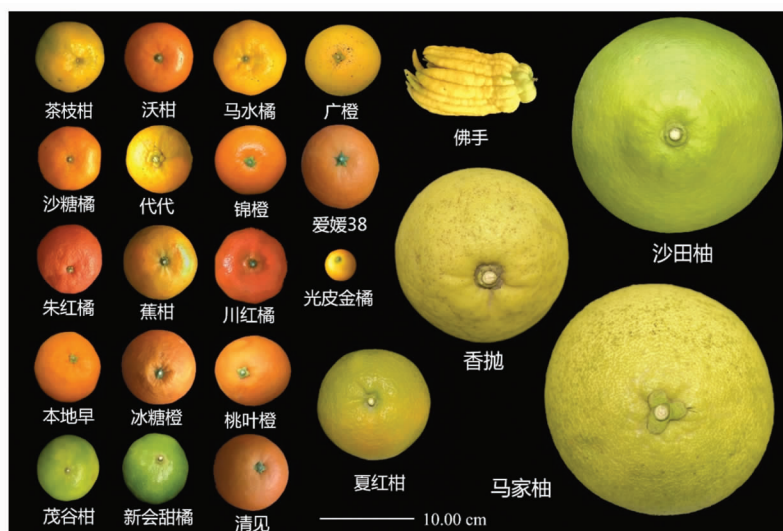


图 2 本试验用不同品种柑橘果实

Fig.2 Different citrus varieties used in the present study

苯肼 (DPPH)、2,4,6-三吡啶基三嗪 (TPTZ)、Trolox、ABTS、荧光素钠、AAPH, 美国 Sigma-Aldrich 公司; 甲醇、乙腈为色谱纯级, Sigma-Aldrich 公司。

试验设备与仪器: 真空冷冻干燥机 (FM 25EL-85), SP Scientific; 超声波清洗器 (SK8200G), 上海科导超声仪器有限公司; 涡旋振荡器 (Vortex-Genie2), 美国 Scientific Industries; 超速离心机 (Eppendorf AG22331), 德国; 旋转蒸发仪 Heidolph LABOROTA 4000-efficient, 德国; 固相萃取真空装置, Agela technologies; SPE 固相萃取柱, 美国 Waters; 真空离心浓缩仪 (Eppendorf centrifuge 5810Rz), 德国; 96 孔板, 美国 Corning; 电子天平 (BSA224S-CW), 赛多利科学仪器北京有限公司; 台式酶标仪, 美国 Biotek; 一次性使用无菌注射器, 江西洪达医疗器械集团有限公司; 一次性针头式过滤器 (孔径 0.22 μm), 浙江同力信息科技有限公司; 液相小瓶, LC-Q-TOF-MS/MS, 美国 Waters Corp.。

1.2 不同品种柑橘果实类黄酮抗氧化活性测定

1.2.1 类黄酮提取液的制备 称取 23 个品种柑橘油胞层冻干粉 0.2 g, 按料液比 1:20 加入 80% 乙醇, 超声辅助提取 30 min (超声频率 60 kHz, 功率 30 W), 5 000 r/min 离心 8 min, 收集上清液。重复提取 3 次, 收集上清液用于后续总酚含量、抗氧化活性测定。设置 3 个重复试验。

1.2.2 总酚含量测定 总酚含量测定采用 Ghafoor 等^[19]的方法并适当修改。在已添加 4 mL 双蒸水的离心管中加入 0.5 mL 稀释适当倍数的提取液, 混合均匀后加入 0.5 mL Folin-Ciocalteu (0.5 mol/L) 试剂, 静置 3 min, 加入 1 mL 7% 碳酸钠溶液, 摇匀后在 30 $^{\circ}\text{C}$ 水浴条件下静置 2 h。待反应完全后, 取 200 μL 反应液加入 96 孔板, 用酶标仪在 $A_{760\text{nm}}$ 处测定吸光值。以没食子酸 (Gallic acid) 为标准品绘制标准曲线, 计算各样品总酚含量, 单位 mg Gallic acid equivalent (GAE)/g DW。设置 3 次重复试验。

1.2.3 抗氧化活性测定

1) DPPH 法 采用 Zhang 等^[20]的方法并适当改进。在无色 96 孔板中加入 2 μL 稀释适当倍数

的提取液, 再加入 200 μL 60 mmol/L DPPH 溶液混匀, 室温条件下避光反应 2 h, 使用酶标仪测定 $A_{517\text{nm}}$ 处吸光值。

2) FRAP 法 采用 Zhang 等^[20]的方法并适当改进。FRAP 工作液的制备: 10 mmol/L TPTZ 溶液 (使用 40 mmol/L HCl 溶解)、20 mmol/L FeCl_3 溶液、300 mmol/L 醋酸钠缓冲液 (冰醋酸调节 pH 值至 3.6) 按照体积比 1:1:10 混合, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育。在无色 96 孔板中加入 10 μL 稀释适当倍数的提取液, 再加入 90 μL FRAP 工作液, 混匀, 室温条件避光反应 5 min, 使用酶标仪在 $A_{593\text{nm}}$ 处测定吸光值。

3) ABTS 法 采用 Floegel 等^[21]方法并适当改进。ABTS 工作液的制备: 7 mmol/L ABTS 溶液与 2.6 mmol/L $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 按体积比 1:1 混合, 在室温条件下避光反应 12h 后稀释 28 倍。在无色 96 孔板中加入 10 μL 稀释适当倍数的提取液, 再加入 200 μL ABTS 工作液, 混匀, 室温条件放置 5 min, 使用酶标仪在 $A_{734\text{nm}}$ 处测定吸光值。

4) ORAC 法 采用 Roy 等^[22]的方法并适当改进。在黑色 96 孔板中加入 25 μL 稀释适当倍数的提取液, 接着加入 150 μL 40 nmol/L 荧光素钠溶液 (磷酸缓冲液溶解), 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 条件下静置 10 min, 加入 25 μL 150 mmol/L AAPH 溶液 (磷酸缓冲液溶解), 使用酶标仪在激发波长 485 nm、发射波长 535 nm 处测定荧光强度, 每 2 min 记录读数, 总测定时长为 2 h。以 25 μL 磷酸缓冲液为样品替代液 (阴性对照), 以 25 μL 0~1 mg/mL Trolox 为标准品 (对照), 初始荧光值读数孔设定为不加 AAPH 孔的读数。第 n 次读数的相对荧光值计算公式: $f_n = \text{第 } n \text{ 次荧光值 } (F_n) / \text{初始荧光值 } (F_0)$ 。 $\text{AUC} = 2 \times (f_0 + f_1 + \dots + f_n) - f_n - f_0$; $\text{Net AUC} = \text{AUC}_{\text{sample}} - \text{AUC}_{\text{AAPH} \circ}$ 。

以上试验均以 Trolox 为标准品绘制标准曲线, 计算各样品抗氧化能力。设置 3 次重复试验。利用综合抗氧化能力复合指数 (Antioxidant potency composite index, APC)^[23] 对 23 个柑橘品种抗氧化能力进行综合评价。抗氧化方法测定结果中, 抗氧化指数得分 (APC 指数) = (样品值/最高样品值) $\times 100$, 最终结果使用的 APC 指数为 4 种抗氧化方法 APC 指数得分的平均值。

1.3 不同品种柑橘果实类黄酮的结构鉴定

1.3.1 样品制备 称取 23 个品种柑橘果实油胞层冻干粉各 0.2 g,按料液比 1:20 加入 80%乙醇,用超声波清洗器超声 30 min(超声频率 60 kHz,功率 30 W)后,5 000 r/min 离心 8 min,收集上清液。重复提取 3 次,收集上清液。使用旋转浓缩仪去除乙醇,用水溶液将梨形瓶中残留物质转移至离心管中。使用固相萃取真空装置,SPE Vac 12cc C18 柱(Waters,2g)经活化(12 mL 甲醇)、平衡(12 mL 去离子水)、上样、淋洗(100 mL 去离子水)、洗脱(10 mL 甲醇)5 个步骤,去除残留物质中糖酸等物质。将所得去糖样品置真空离心浓缩仪中,在 30 °C 条件下浓缩得到粗提物粉末,存于 4 °C 冰箱中,备用。

检测时,称取 0.1 g 粗提物粉末溶于 1 mL 色谱甲醇,充分溶解后使用一次性针头式过滤器(孔径 0.22 μm)过滤,滤液加入液相小瓶中待用。

1.3.2 UPLC-Q-TOF-MS 检测方法 UPLC 部分使用 Waters UPLC 系统,配备 FTN 自动进样器,四元泵及 UV 检测器。使用 C18 色谱柱(2.1 mm×150 mm)。液相色谱(LC)条件:进样量 3 μL;柱温 30 °C;流速 1 mL/min;UV 检测器设在 280 nm;流动相:A 相为去离子水,B 相为色谱乙腈(流动相均经 30 min 超声波清洗器脱气模式脱气),线性梯度程序:0 min:3% B;0~5 min:3%~7% B;5~23 min:7%~20% B;23~28 min:20%~30% B;28~40 min:30%~55% B;40~42 min:55%~100% B;42~43 min:100%~3% B;45 min:3% B。

质谱使用 AB Triple TOF 5600^{Plus} 系统。最佳 MS 条件:气体 1(空气)和气体 2(空气)的压力设定为 50 psi(344 737.95 Pa),帘式气体(N₂)的压力设定为 35 psi(241 316.57 Pa)。负离子模式:源电压-4.5 kV,源温度 550 °C。正离子模式(ESI):源电压+5.5 kV,源温度 600 °C。允许的最大误差设置为±5 ppm。去聚集电位(DP)100 V;碰撞能量(CE)10 eV。基于 IDA 的自动 MS² 在全扫描(1s)循环中针对 8 种最强的代谢物离子进行扫描。前体离子和产物离子的 *m/z* 扫描范围分别设定为 100~1 500 u 和 50~1 500 u。对于 MS/MS 采集模式,参数几乎相同,只是将碰撞能量(CE)设置为(40±20)eV,离子释放延迟(IRD)设置为 67,离子释放

宽度(IRW)设置为 25。精确质量在使用自动校准传递系统进行分析前自动校准。

1.4 不同品种柑橘果实类黄酮含量测定

1.4.1 样品制备 样品制备方法同 1.3.1 节。

1.4.2 UPLC 检测方法 UPLC 体系:进样量 2 μL;柱温 25 °C;流速 0.3 mL/min;PDA 检测器检测 280 nm 及 330 nm;流动相:A 相为去离子水,B 相为色谱乙腈(流动相均经 30 min 超声波清洗器脱气模式脱气),线性梯度程序同 1.3.2 节。

1.4.3 标曲制作 精准称取标准品,用甲醇溶解,配得 1 mg/mL 母液。依次将母液对半稀释,配制 8 个浓度梯度。使用上述 UPLC 检测方法,分别进样。以标准品浓度为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线。

1.5 统计分析

试验设计为完全随机设计,数据采用平均值±标准差表示($\bar{x} \pm s$),统计分析和绘图采用 Excel(V.2015,美国微软公司)、SPSS(V13.0,美国 IBM)等软件。样品数据用 PeakView 分析处理。对样品中未知物质,通过试验及软件得出化合物元素组成、分子量、一级和二级碎片峰质谱信息,同时对标准品保留时间等,通过 Reaxys 和 Scifinder 数据库筛选对比,对物质进行综合分析、鉴定。

2 结果与分析

2.1 不同品种柑橘果实油胞层总酚含量和抗氧化活性

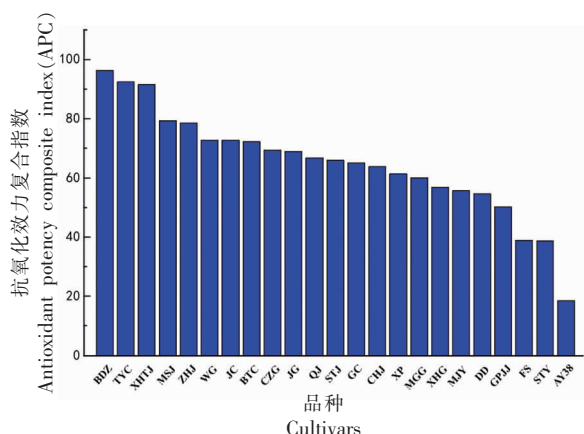
23 个柑橘品种果实油胞层总酚含量与抗氧化活性比较见表 1,不同品种的总酚含量和抗氧化活性存在显著差异。不同品种柑橘果实油胞层总酚含量在 4.38~21.10 mg GAE/g DW 之间,其中总酚含量最高品种为“桃叶橙”(21.10 mg GAE/g DW)、“爱媛 38”总酚含量最低(4.38 mg GA/g DW)。

柑橘油胞层抗氧化活性各品种间差异显著。DPPH 自由基清除能力较强的品种为“桃叶橙”(40.11 mg TEAC/g DW),较弱的品种为“爱媛 38”(5.28 mg TEAC/g DW)。在 FRAP 方法中,抗氧化能力较强的品种为“本地早”(18.46 mg TEAC/g DW),较弱的品种为“沙田柚”(5.82 mg TEAC/g DW)。ORAC 方法中,抗氧化能力较强的为“新会

表1 23个柑橘品种果实油胞层总酚含量与抗氧化活性比较

品种	Total phenolics and antioxidant properties of <i>Citrus</i> fruit flavedo of 23 cultivars				
	总酚含量/ mg GA·g ⁻¹ DW	DPPH 清除能力/ mg TE·g ⁻¹ DW	铁离子还原能力 FRAP/ mg TE·g ⁻¹ DW	氧自由基吸收能力 ORAC/ mg TE·g ⁻¹ DW	ABTS 清除能力 ABTS/ mg TE·g ⁻¹ DW
茶枝柑	15.86 ± 0.50 ^{de}	20.70 ± 2.38 ^{ghi}	13.78 ± 1.11 ^{ef}	131.44 ± 19.20 ^{akg}	26.41 ± 0.62 ^f
马水橘	15.92 ± 0.22 ^f	26.99 ± 2.55 ^{ode}	16.48 ± 1.41 ^b	138.97 ± 23.73 ^{oef}	28.26 ± 0.21 ^{de}
沙糖橘	14.69 ± 0.33 ^{ghi}	20.02 ± 2.08 ^{ghi}	13.63 ± 0.58 ^{ef}	105.69 ± 4.24 ^{ghij}	27.04 ± 0.66 ^{ef}
朱红橘	17.25 ± 1.35 ^c	25.88 ± 1.79 ^{de}	13.38 ± 1.17 ^{ef}	156.84 ± 13.30 ^{abcde}	30.46 ± 0.62 ^{abc}
本地早	18.77 ± 0.35 ^{ed}	36.83 ± 3.82 ^a	18.46 ± 1.81 ^a	194.05 ± 20.64 ^a	29.54 ± 1.03 ^{bcd}
川红橘	17.70 ± 0.23 ^{de}	20.86 ± 2.54 ^{ghi}	13.64 ± 0.82 ^{ef}	100.44 ± 16.39 ^{ghijk}	24.51 ± 0.71 ^{gh}
新会甜橘	17.09 ± 0.13 ^c	31.81 ± 1.92 ^b	15.96 ± 1.59 ^e	194.25 ± 4.22 ^a	31.67 ± 0.94 ^a
爱媛38	4.38 ± 0.34 ^o	5.28 ± 2.59 ^q	5.88 ± 0.67 ^m	26.39 ± 4.07 ^l	4.93 ± 0.61 ^m
清见	19.68 ± 0.22 ^{bc}	29.90 ± 1.19 ^{bc}	8.46 ± 0.28 ^k	107.84 ± 29.02 ^{ghij}	28.87 ± 0.95 ^{cd}
沃柑	20.30 ± 0.30 ^{ab}	28.58 ± 2.30 ^{bcd}	7.86 ± 0.22 ^{kl}	153.90 ± 3.45 ^{abcde}	30.93 ± 0.79 ^{ab}
茂谷柑	14.18 ± 0.37 ⁱ	15.64 ± 1.03 ^{klm}	10.69 ± 0.68 ^{hi}	119.27 ± 9.78 ^{bcdfgh}	25.88 ± 1.08 ^g
夏红柑	11.78 ± 0.16 ^{kl}	16.37 ± 1.92 ^{klm}	11.20 ± 0.44 ^{gh}	103.26 ± 12.32 ^{ghij}	22.91 ± 0.86 ^{hi}
蕉柑	17.69 ± 0.26 ^{de}	22.04 ± 1.77 ^{fg}	13.87 ± 1.32 ^{ef}	118.04 ± 4.49 ^{bcdfgh}	26.85 ± 0.43 ^{ef}
冰糖橙	17.38 ± 0.08 ^c	27.26 ± 1.66 ^{ode}	13.05 ± 0.79 ^{ef}	129.84 ± 21.59 ^{cdefg}	26.31 ± 1.35 ^f
桃叶橙	21.10 ± 0.49 ^u	40.11 ± 0.17 ^a	16.97 ± 1.12 ^b	161.87 ± 21.88 ^{abcd}	29.81 ± 0.62 ^{bcde}
锦橙	18.27 ± 1.52 ^{de}	23.93 ± 1.70 ^{ef}	14.78 ± 1.55 ^{de}	130.50 ± 11.34 ^{cdefg}	26.5 ± 0.95 ^f
代代	12.71 ± 0.18 ^{kl}	16.97 ± 1.26 ^{ghklm}	9.30 ± 0.78 ^{ij}	100.80 ± 4.51 ^{ghijk}	23.32 ± 0.95 ^{hi}
广橙	15.37 ± 0.81 ^{ghi}	19.86 ± 2.20 ^{ghij}	12.46 ± 1.45 ^{fg}	113.30 ± 28.38 ^{efghi}	26.76 ± 1.03 ^{ef}
马家柚	10.33 ± 0.23 ^m	28.97 ± 1.67 ^{bcd}	9.20 ± 0.82 ^{ij}	89.13 ± 6.35 ^{ghijk}	17.41 ± 1.12 ^k
沙田柚	8.90 ± 0.34 ⁿ	11.24 ± 1.17 ^{opq}	5.82 ± 0.41 ^m	71.04 ± 26.43 ^{ijk}	18.64 ± 1.46 ^k
香抛	13.08 ± 0.28 ^f	19.33 ± 1.20 ^{ghijk}	16.46 ± 0.47 ^b	81.35 ± 1.25 ^{ghijk}	20.91 ± 0.78 ^j
佛手	7.88 ± 0.53 ⁿ	10.71 ± 2.38 ^{op}	9.28 ± 1.08 ^{ij}	58.79 ± 15.94 ^{kl}	15.28 ± 0.40 ^l
光皮金橘	15.00 ± 0.60 ^{ghi}	17.53 ± 1.77 ^{ijkl}	6.27 ± 0.50 ^{lm}	65.12 ± 16.40 ^{kl}	28.28 ± 1.68 ^{de}

注:同一列的不同字母表示品种间差异显著(Duncan's 检验, $P < 0.05$)。



注:BDZ. 本地早;TYC. 桃叶橙;XHTC. 新会甜橘;MSJ. 马水橘;ZHJ. 朱红橘;WG. 沃柑;JC. 锦橙;BTC. 冰糖橙;CZG. 茶枝柑;JG. 蕉柑;QJ. 清见;STJ. 沙糖橘;GC. 广橙;CHJ. 川红橘;XP. 香抛;MGG. 茂谷柑;XHG. 夏红柑;MJY. 马家柚;DD. 代代;GPJJ. 光皮金橘;FS. 佛手;STY. 沙田柚;AY38. 爱媛 38。

图 3 23 个品种柑橘油胞层抗氧化效力复合指数
Fig.3 APC Index in flavedo of 23 citrus cultivars

甜橘”(194.25 mg TEAC/g DW),较弱的为“爱媛 38”(26.39 mg TEAC/g DW)。ABTS 方法中,抗氧

化能力较强的品种为“新会甜橘”(31.67 mg TEAC/g DW),最弱的为“爱媛 38”(4.93 mg TEAC/g DW)。抗氧化效力复合指数分析表明(图 3),油胞层中抗氧化能力最强的品种为“本地早”(APC=96.25),最弱的品种为“爱媛 38”(APC=18.54)。

2.2 柑橘类黄酮 UPLC 检测体系的优化

使用柑橘果实中具有代表性的类黄酮标准品对体系进行检测,结果显示:在 280 nm 处,各标准品分离度较好。将标准品配成 8 个浓度梯度后进行 UPLC 检测,以标准品浓度为横坐标,峰面积为纵坐标绘制标准曲线,得到曲线 R^2 均大于 0.99,线性良好,表明本试验用 UPLC 体系可用于柑橘提取液的定量、定性检测。

利用上述 UPLC 体系建立的 UPLC-Q-TOF-MS 检测方法,对 23 个柑橘品种果实油胞层的黄酮类粗提物进行鉴定。共鉴定出 5 种黄酮-C-糖苷,4 种黄酮-O-糖苷,12 种黄烷酮-O-糖苷,32 种 PMFs 在内的 53 种类黄酮(图 4 和表 2)。

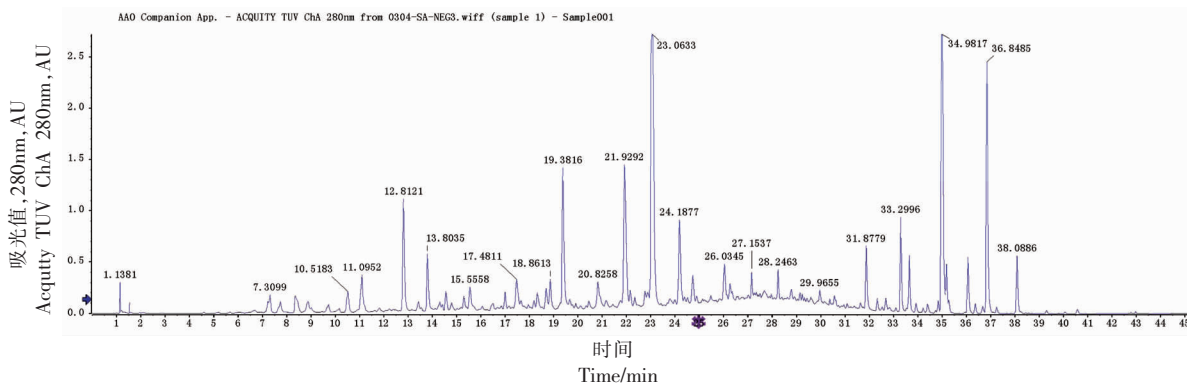


图 4 正离子模式下物质 1~53 出峰顺序 (280 nm)

Fig4. The peak number of substances 1-53 under positive ion mode (280 nm)

如表 2 所示,鉴定出 5 种黄酮-C-糖苷,鉴定物质 1 为新西兰牡荆苷(Vicenin-2);物质 2 为地奥司明-6,8-二-C-葡萄糖苷;物质 7 为根皮素-3',5'-二-C-葡萄糖苷,对比已有文献,该物质是第 1 次在柑橘中报道;物质 8 为地奥司明-6-C-葡萄糖苷;物质 17 为刺槐素-8-C-新橙皮苷。

鉴定出 4 种黄酮-O-糖苷,即化合物 6、11、14、18,分别鉴定为木犀草素-7-O-芸香糖苷、野漆树苷、新地奥司明、苏打其亭 C 或 B。

鉴定出 12 种黄烷酮-O-糖苷,按照出峰顺序依次鉴定,物质 3 为圣草次苷,物质 4 为新圣草次苷,物质 5 为芹菜素-7-O-葡萄糖苷,物质 9 为柚皮芸香苷,物质 10 为槲皮素-3-O-鼠李糖苷,物质 12 为柚皮苷,物质 13 为橙皮苷,物质 15 为新橙皮苷,物质 16 为地奥司明-O-葡萄糖苷,物质 19 为橙皮素-7-O-鼠李糖苷,物质 20 为香蜂草苷,物质 21 为枸橼苷。

共鉴定出 32 种 PMFs,通过判断其特征性碎

表 2 23 个柑橘品种油胞层黄酮的 UPLC-Q-TOF-MS 鉴定结果
Table 2 Determination of flavonoids from 23 varieties of *Citrus* flavedo by UPLC-Q-TOF-MS

峰编号	保留时间 RT/min	最大吸收波长 λ_{max}/nm	离子模式		分子式	碎片离子 (m/z)	推测物质名称
			$[M+H]^+$ ($m+z$)	$[M-H]^-$ ($m-z$)			
黄酮-C-糖苷							
1	9.569	240.4, 330.6	+595.1665		$C_{27}H_{30}O_{15}$	457.1107, 383.0711, 353.0628	新西兰牡荆苷
2	10.847	282.2	+625.1741		$C_{28}H_{32}O_{16}$	607.1650, 553.1329, 487.1215, 355.0815	地奥司明-6,8-二-C-葡萄糖苷
7	16.824	-	-597.1825		$C_{27}H_{34}O_{15}$	417.1078, 357.0918, 315.0757,	根皮素-3',5'-二-C-葡萄糖苷
8	17.588	267.333	+463.1234		$C_{22}H_{22}O_{11}$	397.0791, 367.0781, 343.0810, 301.0698	地奥司明-6-C-葡萄糖苷
17	25.2027	270.8	+593.1719		$C_{28}H_{32}O_{14}$	285.0756	刺槐素-8-C-新橙皮苷
黄酮-O-糖苷							
6	14.268	262.3	+595.1659		$C_{27}H_{30}O_{15}$	355.0810, 287.0123, 313.0705	木犀草素-7-O-芸香糖苷
11	21.173	267.0, 334.0	+579.1704		$C_{27}H_{30}O_{14}$	433.1131, 271.0599	野漆树苷
14	23.7708	-	+609.1786		$C_{28}H_{32}O_{15}$	301.0702	新地奥司明
18	25.4639	-	+667.1866		$C_{30}H_{34}O_{15}$	522.1109, 485.0211, 315.0123, 273.0001	苏打其亭 C 或 B
黄酮-O-糖苷							
3	11.619	284.2	+597.1823		$C_{27}H_{32}O_{15}$	435.1159, 399.0946, 289.0591	圣草次苷
4	12.7559	284.2	+597.1823		$C_{27}H_{32}O_{15}$	433.0139, 399.0515, 289.0690, 195.0120	新圣草次苷
5	13.615	270.0	+433.1127		$C_{21}H_{20}O_{10}$	415.1015, 313.0717, 125.0010	芹菜素-7-O-葡萄糖苷
9	19.3396	283.0, 329.4	+581.186		$C_{27}H_{32}O_{14}$	419.1132, 273.1115	柚皮芸香苷
10	20.786	-	-609		$C_{28}H_{34}O_{15}$	609.0100, 300.0218	榭皮素-3-O-鼠李糖基己糖苷
12	21.8898	283.0, 389.4	+581.1865		$C_{27}H_{32}O_{14}$	273.1015	柚皮苷
13	23.0146	284.2, 331.8	+611.1987		$C_{28}H_{34}O_{15}$	303.0873	橙皮苷
15	24.1590	284.2	+611.1974		$C_{28}H_{34}O_{15}$	303.0773	新橙皮苷
16	24.8708	282.4	+463.1089		$C_{22}H_{22}O_{11}$	301.0701, 286.0464	地奥司明-O-葡萄糖苷
19	25.5396	-	+449.1238		$C_{29}H_{30}O_5$	301.1, 282.5, 124.0	橙皮素-7-O-鼠李糖苷
20	26.0345	283.0	+595.2019		$C_{28}H_{34}O_{14}$	+595.2019	香蜂草苷
21	27.1437	285.330	+595.2017		$C_{28}H_{34}O_{14}$	287.0905	枸橼苷
22	27.3318	281.8	+359.1114		$C_{19}H_{18}O_7$	344.0894, 329.0650, 298.0839	单羟基四甲氧基黄酮(1)
23	27.410	215.6, 324.7	+329.1019		$C_{18}H_{16}O_6$	314.0751, 299.0432, 271.0021	单羟基三甲氧基黄酮(1)
24	28.3963	328.2	+359.1114		$C_{19}H_{18}O_7$	344.0894, 329.0651, 314.0346	梔子黄素 B
25	28.604	323.1	+329.1025		$C_{18}H_{16}O_6$	314.0789, 299.0524, 268.0717	单羟基三甲氧基黄酮(2)
26	28.5304	322.3	+329.1016		$C_{18}H_{16}O_6$	314.0779, 299.0554, 268.0727	单羟基三甲氧基黄酮(3)

(续表2)

峰编号	保留时间 RT/min	最大吸收波长 $\lambda_{\text{max}}/\text{nm}$	离子模式		分子式	碎片离子 (m/z)	推测物质名称
			$([M+H]^+ (m+z) / [M-H]^- (m-z))$				
27	29.1451	385.3	+359.1129		$C_{19}H_{18}O_7$	344.0814, 329.0150, 298.0839	单羟基四甲氧基黄酮(2)
28	29.3385	-	+359.1128		$C_{19}H_{18}O_7$	344.0894, 329.0655, 298.0837	单羟基四甲氧基黄酮(3)
29	29.4291	324.0	+359.1126		$C_{19}H_{18}O_7$	344.0895, 329.0651, 298.0831	单羟基四甲氧基黄酮(4)
30	29.5962	-	+331.0808		$C_{17}H_{14}O_7$	316.1012, 301.0224, 273.0125	麦黄酮
31	29.9513	-	+331.0817		$C_{17}H_{14}O_7$	316.0178, 301.0011, 245.0046	三羟基二甲氧基黄酮
32	30.3761	348.0	+389.1227		$C_{20}H_{20}O_8$	374.0968, 359.0987, 341.0011	单羟基五甲氧基黄酮(1)
33	30.5553	-	+373.1282		$C_{20}H_{20}O_7$	358.1050, 343.0812, 315.0849	5,6,7,3',4'-五甲氧基异黄酮
34	31.8775	323.5	+373.1277		$C_{20}H_{20}O_7$	343.0809, 315.0855, 181.0124, 153.0176	异甜橙黄酮
35	32.3274	335.4	+389.1227		$C_{20}H_{20}O_8$	374.0968, 359.0987, 298.0791	单羟基五甲氧基黄酮(2)
36	32.888	351.6	+343.1389		$C_{19}H_{18}O_6$	328.0156, 313.0223, 285.0189, 181.0119	四甲氧基黄酮
37	32.925	270.350	+403.1187		$C_{21}H_{22}O_8$	388.0099, 373.0189, 359.0257, 327.0231	六甲氧基黄酮(1)
38	33.2984	240.4, 330.6	+373.1289		$C_{20}H_{20}O_7$	358.0877, 343.1021, 315.1201, 153.0122	甜橙黄酮
39	33.6494	268.0, 334.0	+343.118		$C_{19}H_{18}O_6$	328.0129, 313.0332, 285.0879, 257.0423	四甲氧基-O-异黄酮
40	34.219	343.4	+345.0974		$C_{18}H_{16}O_7$	330.0175, 318.0907	二羟基三甲氧基黄酮
41	34.405	210.0, 336.6	+403.1392		$C_{21}H_{22}O_8$	388.0213, 373.0144, 359.0499, 327.0121	六-O-甲基棉黄素
42	34.9677	249.8, 334.2;	+403.1388		$C_{21}H_{22}O_8$	388.1142, 373.0907, 358.0677, 355.0224, 345.0989	川陈皮素
43	35.178	321.1	+343.1175		$C_{19}H_{18}O_6$	328.0121, 313.0189, 285.0011, 181.0198	四甲氧基-O-野黄芩素
44	35.266	278.336	+375.1074		$C_{19}H_{18}O_8$	345.0127, 327.0124, 197.0694	5,4'-二羟基-3,7,8,3'-四甲氧基黄酮
45	36.067	254.6, 341.2	+433.1486		$C_{22}H_{24}O_9$	417.0907, 403.0217, 388.0224	3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮
46	36.907	-	+419.134		$C_{21}H_{22}O_9$	358.0749, 373.0677, 268.0369	单羟基六甲氧基黄酮
47	36.8468	271.1, 323.5	+373.1281		$C_{20}H_{20}O_7$	358.1042, 343.0809, 297.0749, 211.0230	橘皮素
48	37.2742	282.0, 341.0	+359.1128		$C_{19}H_{18}O_7$	344.0219, 329.0605, 311.0444, 283.1042	6-O-去甲橘皮素/7-O-去甲橘皮素
49	37.663	349.2	+403.1388		$C_{21}H_{22}O_8$	388.0569, 373.0111, 359.0120, 163.0572	六甲氧基黄酮(2)
50	38.0841	283.0, 341.3	+389.1229		$C_{20}H_{20}O_8$	374.1004, 359.0763, 341.0662, 197.0080	5-羟基-6,7,8,3',4'-五甲氧基黄酮
51	38.247	357.6	+389.1232		$C_{20}H_{20}O_8$	374.0876, 359.0024, 341.0021, 298.0086	单羟基五甲氧基黄酮(3)
52	38.559	331.8	+329.1018		$C_{18}H_{16}O_6$	314.0751, 299.0432, 271.0021	单羟基三甲氧基黄酮(4)
53	39.294	346.9	+419.1326		$C_{21}H_{22}O_9$	404.1106, 389.0865, 371.0765	柚皮黄素

注:PMFs 存在取代基结合位点不同等情况,同分异构体以序号区分。“-”表示无数据。

片离子,对比前人文献中一级质谱碎片、二级质谱碎片、保留时间、出峰顺序等信息,确定质谱中物质 22、27、28、29 为单羟基-四甲氧基黄酮,物质 23、25、26、52 为单羟基-三甲氧基黄酮,物质 24 为梔子黄素 B,物质 30 为麦黄酮,物质 31 为三羟基二甲氧基黄酮,物质 23、25、26、52 为单羟基-五甲氧基黄酮,物质 33 为 5,6,7,3',4'-五甲氧基异黄酮,物质 34 为异甜橙黄酮,物质 38 为甜橙黄酮,物质 47 为橘皮素,物质 36 为四甲氧基黄酮,物质 37、49 为六甲氧基黄酮,物质 39 为四甲基-O-异黄芩素,物质 43 为四甲基-O-野黄芩素,物质 40 为二羟基三甲氧基黄酮,物质 41 为六-O-甲基棉黄素,物质 42 为川陈皮素,物质 44 为 5,4'-二羟基-3,7,8,3'-四甲氧基黄酮,物质 45 为 3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮,物质 46 为单羟基六甲氧基黄酮,物质 48 为 6-O-去甲橘皮素/7-O-去甲橘皮素,物质 50 为 5-羟基-6,7,8,3',4'-五甲氧基黄酮,物质 53 为柚皮黄素。

本研究的物质鉴定参考文献[24]~[30],对比已有文献,有 2 种类黄酮:根皮素-3',5'-2-C-葡萄糖苷和槲皮素-3-O-鼠李糖基己糖苷是第 1 次在柑橘中报道。其中,根皮素-3',5'-2-C-葡萄糖苷在蜜树茶(*Cyclopia intermedia*)中被报道^[31];槲皮素-3-O-鼠李糖基己糖苷在澳洲蜜蜂(*Tetragonula carbonaria*)产出的蜂蜜中被报道^[32]。

2.3 柑橘果实油胞层类黄酮组分的含量

以 23 个柑橘品种果实为试验材料,采用超高效液相色谱(UPLC)技术鉴定其中主要的类黄酮。圣草次苷、新圣草次苷、柚皮芸香苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、香蜂草苷、枸橼苷、野漆树苷、麦黄酮、异甜橙黄酮、甜橙黄酮、川陈皮素、橘皮素和 5-去甲川陈皮素用标准品标定。在鉴定出的类黄酮中,PMFs 的定量以川陈皮素当量表示,其余无标准品的物质以新橙皮苷当量表示。

对不同品种柑橘果实油胞层进行 UPLC 定量分析发现,品种间类黄酮含量差异显著。油胞层中检测到 53 种类黄酮,包括黄酮-C-糖苷类、黄酮-O-糖苷类、黄烷酮-O-糖苷类、PMFs 类;含量较多的组分为圣草次苷、新圣草次苷、柚皮芸香苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、香蜂草苷和枸橼苷。横向对比类黄酮含量,“代代”中圣草次苷和新圣草次

苷含量最高,分别为 444.86 $\mu\text{g/g}$ DW 和 229.83 $\mu\text{g/g}$ DW;“夏红柑”中柚皮芸香苷含量最高为 1 151.61 $\mu\text{g/g}$ DW;“香抛”中柚皮苷含量最高为 5 579.04 $\mu\text{g/g}$ DW;“茂谷柑”中橙皮苷含量最高为 18 528.85 $\mu\text{g/g}$ DW;“夏红柑”中新橙皮苷含量最高为 8 187.22 $\mu\text{g/g}$ DW;“川红橘”中香蜂草苷含量最高为 607.34 $\mu\text{g/g}$ DW;“光皮金橘”中枸橼苷含量最高为 364.13 $\mu\text{g/g}$ DW。

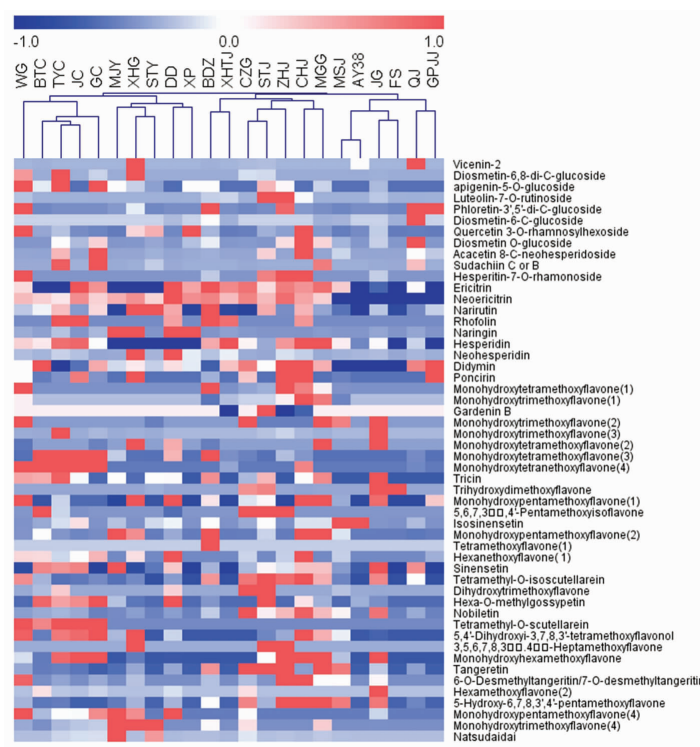
PMFs 中甜橙黄酮及川陈皮素、橘皮素、5-去甲川陈皮素含量显著高于其它 PMFs 类物质,横向对比 PMFs 含量,“马水橘”中异甜橙黄酮含量最高为 65.66 $\mu\text{g/g}$ DW;“马家柚”中甜橙黄酮含量最高为 2289.23 $\mu\text{g/g}$ DW;“茶枝柑”中川陈皮素含量最高为 2638.05 $\mu\text{g/g}$ DW;“朱红橘”中橘皮素含量和 5-去甲川陈皮素含量最高,分别为 378.74 $\mu\text{g/g}$ DW 和 152.23 $\mu\text{g/g}$ DW。

分析油胞层中所含类黄酮种类和含量,将数据归一化处理,做层次聚类分析。如图 5 所示,不同品种柑橘的类黄酮种类和含量差异明显。橘类(“茶枝柑”“沙糖橘”“朱红橘”和“川红橘”)中橙皮苷含量较高,新橙皮苷含量较低,PMFs 种类和含量较多;橙类(“冰糖橙”“锦橙”“桃叶橙”和“广橙”)中圣草次苷、新圣草次苷和橙皮苷含量较高,PMFs 种类和含量相似;柚类的“香抛”“马家柚”和“沙田柚”聚为一类,其含有的类黄酮以新圣草次苷、柚皮苷和新橙皮苷为主,“马家柚”在柚类中 PMFs 含量相对较高;金柑类的“光皮金橘”油胞层中主要类黄酮为根皮素-3',5'-二-C-葡萄糖苷、圣草次苷、新圣草次苷、柚皮芸香苷、香蜂草苷和枸橼苷;“光皮金橘”和“佛手”与其它柑橘品种所含类黄酮含量差异较大。

3 讨论

随着生活水平的提高,果蔬的抗氧化活性成为大众关注的热点之一。钱井^[33]测定 35 个品种柑橘油胞层的总酚含量在 11.52~27.55 mg GAE/g DW 范围,而本研究所测柑橘油胞层总酚含量在 4.38~21.10 mg GAE/g DW 范围,二者结果相近。

不同抗氧化评价方法间存在差异,体外抗氧化评价常同时使用 3~4 种抗氧化方法验证。本研究使用 APC 指数综合评价不同品种柑橘的 4 种



注:WG. 沃柑;BTC. 冰糖橙;TYC. 桃叶橙;JC. 锦橙;GC. 广橙;MJY. 马家柚;XHG. 夏红柑;STY. 沙田柚;DD. 代代;XP. 香抛;BDZ. 本地早;XHTJ. 新会甜橘;CZG. 茶枝柑;STJ. 沙糖橘;ZHU. 朱红橘;CHJ. 川红橘;MGG. 茂谷柑;MSJ. 马水橘;AY38. 爱媛 38;JG. 蕉柑;FS. 佛手;QJ. 清见;GPJJ. 光皮金橘。

图 5 23 个品种柑橘果实油胞层类黄酮含量的热图分析

Fig.5 Heatmap analysis of flavonoids in the flavedo of 23 *Citrus* cultivars

抗氧化活性,结果显示,柑橘果实油胞层抗氧化能力最强的品种为“本地早”,抗氧化能力最弱的品种为“爱媛 38”。

采用 UPLC-Q-TOF-MS 和 UPLC 技术,对 23 个品种柑橘果实油胞层类黄酮进行鉴定,发现油胞层中类黄酮的种类及含量十分丰富。有研究表明,PMFs 物质只在油胞层中被检测到,造成这种差异的原因可能是油胞层中有丰富的腺体,便于类黄酮,尤其是 PMFs 类化合物的合成、转运和贮藏^[34]。

通过分析各品种柑橘油胞层类黄酮物质含量,发现柚类中柚皮苷含量高于其它种类柑橘,橙皮苷含量虽极微,但检测出 16.99~445.50 mg/g DW 的新橙皮苷。结合柚类中广泛分布的高含量柚皮苷,推测柚皮苷、新橙皮苷和橙皮苷可作为鉴别柚类和其它类柑橘的标志性物质。区别于其它柚类(香抛、沙田柚等),马家柚油胞层中有多种 PMFs,造成这种差异的原因可能是马家柚油胞层

具有许多凸起的腺体颗粒,便于 PMFs 的合成、贮藏和转运。具有橘、柚杂交遗传背景的夏红柑也含有高含量的柚皮苷。对橘类和杂柑类柑橘品种进行分析发现,橙皮苷与新橙皮苷含量呈负相关。在橘类中橙皮苷含量较高,而新橙皮苷含量极微或检测不到,推测新橙皮苷与橙皮苷在柑橘中作为标志性物质存在或存在相互转化关系。

4 结论

测定了 23 个柑橘品种果实包括单果质量、可食率、可溶性固形物在内的基本生理指标。比较分析了 23 个柑橘品种果实油胞层的抗氧化活性及总酚含量。在 23 个柑橘品种油胞层中,共鉴定出 53 种类黄酮,包括 5 种黄酮-C-糖苷,4 种黄酮-O-糖苷,12 种黄烷酮-O-糖苷和 32 种 PMFs,这些类黄酮的种类和含量在不同品种间、果实不同部位间均存在差异。以 25 种组分为特征性物质,将所收集的柑橘品种聚类为橙类、柚类、橘类及杂

柑类。

柑橘家族存在较为复杂的亲缘关系,而果实中所含类黄酮可为柑橘品种进化提供鉴别依据。由于质谱的局限性,无法确定甲氧基及羟基连接的具体位点,后续研究可通过与核磁共振的碳谱、氢谱联用确定物质的具体分子结构。另外,进一步收集更多的柑橘种质资源,对其类黄酮物质进行鉴别与研究,选取相关性较大的类黄酮绘制品种鉴定图谱,构建信息库,为柑橘进化的推演和资源的综合利用提供理论依据。

参 考 文 献

- [1] 沈兆敏. 我国柑橘生产销售现状及发展趋势[J]. 果农之友, 2021(3): 1-4.
SHEN Z M. Present situation and development trend of *citrus* production and sales in China [J]. Fruit Growers' Friend, 2021(3): 1-4.
- [2] 农业部. 全国优势农产品区域布局规划(2008—2015年).(2008-08-22)[2021-07-23]. http://www.moa.gov.cn/xw/zwdt/200809/t20080912_1132619.htm, 2008.
Ministry of Agriculture of China. Regional layout plan of national superior agricultural products (2008—2015).(2008-08-22)[2021-07-23]. http://www.moa.gov.cn/xw/zwdt/200809/t20080912_1132619.htm, 2008.
- [3] ABEYSINGHE D C, LI X, SUN C D, et al. Bioactive compounds and antioxidant capacities in different edible tissues of *citrus* fruit of four species [J]. Food Chemistry, 2007, 104(4): 1338-1344.
- [4] 张九凯. 瓯柑和胡柚果实黄酮类化合物组分鉴定、分离纯化及生物活性研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2013.
ZHANG J K. Determination and purification of flavonoids from *Citrus reticulata* cv. *Suavissima* and *Citrus changshanensis* fruit and their bioactivity evaluation[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2013.
- [5] 张明霞, 杨天佑, 冯卫华, 等. 柑橘属植物类黄酮研究进展[J]. 河南科技学院学报(自然科学版), 2014, 42(5): 11-15.
ZHANG M X, YANG T Y, FENG W H, et al. Research progress on the flavonoids of *Citrus* plants [J]. Journal of Henan Institute of Science and Technology, 2014, 42(5): 11-15.
- [6] GAYDOU E M, BIANCHINI J P, RANDRIAMI-HARISOA R P. Orange and mandarin peel oils differentiation using polymethoxylated flavone composition[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 1987, 35(4): 525-529.
- [7] WALLE T. Methylation of dietary flavones greatly improves their hepatic metabolic stability and intestinal absorption[J]. Molecular Pharmaceutics, 2007, 4(6): 826.
- [8] 方波. 中国特有柚类资源类黄酮含量变化及抗氧化活性研究[D]. 重庆: 西南大学, 2013.
FANG B. The change of flavonoid composition and antioxidant activity of the endemic pummelos and grapefruits fruits cultivated in China[D]. Chongqing: Southwest University, 2013.
- [9] PETERSON J J, BEECHER G R, BHAGWAT S A, et al. Flavanones in grapefruit, lemons, and limes: A compilation and review of the data from the analytical literature[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2006, 19(supp-S): 74-80.
- [10] CHEN J, ZHANG H, PANG Y, et al. Comparative study of flavonoid production in lycopene-accumulated and blonde-flesh sweet oranges (*Citrus sinensis*) during fruit development[J]. Food Chemistry, 2015, 184(10): 238-246.
- [11] 李秀娟. 中国特有柑橘属植物果实主要黄酮含量及其动态变化研究[D]. 重庆: 西南大学, 2011.
LI X J. An analysis of the key flavanone component and their content variations in the endemic *citrus* germplasm of china[D]. Chongqing: Southwest University, 2011.
- [12] MAJO D D, GIAMMANCO M, GUARDIA M L, et al. Flavanones in *Citrus* fruit: Structure-antioxidant activity relationships[J]. Food Research International, 2005, 38(10): 1161-1166.
- [13] KAWAH S, TOMONO Y, KATASE E, et al. Antiproliferative activity of flavonoids on several cancer cell lines [J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 1999, 63(5): 896-899.
- [14] KUROWSKA E M, MANTHEY J A. Hypolipidemic effects and absorption of *Citrus* polymethoxylated flavones in hamsters with diet-induced hypercholesterolemia[J]. Journal of Agricultural & Food Chemistry, 2004, 52(10): 2879.
- [15] 叶兴乾, 徐贵华, 方忠祥, 等. 柑橘属类黄酮及其生理活性[J]. 中国食品学报, 2008, 8(5): 1-7.
YE X Q, XU G H, FANG Z X, et al. *Citrus*

- flavonoids and their physiological bioactivities [J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2008, 8(5): 1-7.
- [16] PROMDEN W, MONTHAKANTIRAT O, UMEHARA K, et al. Structure and antioxidant activity relationships of isoflavonoids from *Dalbergia parviflora* [J]. *Molecules*, 2014, 19(2): 2226-2237.
- [17] 任红, 郑少杰, 张小利, 等. 基于不同抗氧化机制的黄酮类化合物构效关系研究进展 [J]. *食品工业科技*, 2016, 37(2): 384-388.
- REN H, ZHENG S J, ZHANG X L, et al. Research progress on the structure-activity relationship of flavonoid compounds based on different antioxidant mechanism [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 37(2): 384-388.
- [18] LI Y, FRENZ C M, LI Z, et al. Virtual and *in vitro* bioassay screening of phytochemical inhibitors from flavonoids and isoflavones against xanthine oxidase and cyclooxygenase-2 for gout treatment [J]. *Chemical Biology & Drug Design*, 2013, 81(4): 537-544.
- [19] GHAFOR K, PARK J, CHOI YH. Optimization of supercritical fluid extraction of bioactive compounds from grape (*Vitis labrusca* B.) peel by using response surface methodology [J]. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 2010, 11(3): 485-490.
- [20] ZHANG W, LI X, ZHENG J, et al. Bioactive components and antioxidant capacity of Chinese bayberry (*Myrica rubra* Sieb. and Zucc.) fruit in relation to fruit maturity and postharvest storage [J]. *European Food Research and Technology*, 2008, 227(4): 1091-1097.
- [21] FLOEGEL A, KIM D O, CHUNG S J, et al. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods [J]. *Journal of Food Composition & Analysis*, 2011, 24(7): 1043-1048.
- [22] ROY M K, KOIDE M, RAO T P, et al. ORAC and DPPH assay comparison to assess antioxidant capacity of tea infusions: Relationship between total polyphenol and individual catechin content [J]. *International Journal of Food Sciences & Nutrition*, 2010, 61(2): 109-124.
- [23] SEERAM N P, AVIRAM M, ZHANG Y. Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(4): 1415-1422.
- [24] CAO G H, FU Q R, ZHANG C M, et al. Rapid characterization of 96 chemical constituents in *Citri Reticulatae Folium* (leaves of 'Fuju') using HPLC-DAD-ESI-MSn [J]. *Journal of Chinese Pharmaceutical Sciences*, 2016, 25(2): 91-110.
- [25] KIM H G, KIM G S, PARK S, et al. Flavonoid profiling in three *citrus* varieties native to the Republic of Korea using liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry: contribution to overall antioxidant activity [J]. *Biomedical Chromatography*, 2012, 26(4): 464-470.
- [26] MENCHERINI T, CAMPONE L, PICCINELLI A L, et al. HPLC-PDA-MS and NMR characterization of a hydroalcoholic extract of *Citrus aurantium* L. var. *amara* peel with antiedematogenic activity [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2013, 61(8): 1686-1693.
- [27] SCHMIDT S, ZIETZ M, SCHREINER M, et al. Identification of complex, naturally occurring flavonoid glycosides in kale (*Brassica oleracea* var. *sabellica*) by high-performance liquid chromatography diode-array detection/electrospray ionization multi-stage mass spectrometry [J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2010, 24(14): 2009-2022.
- [28] ZHANG J Y, ZHANG Q, ZHANG H X, et al. Characterization of polymethoxylated flavonoids (PMFs) in the peels of 'Shatangju' mandarin (*Citrus reticulata* Blanco) by online high-performance liquid chromatography coupled to photodiode array detection and electrospray tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*, 2012, 60(36): 9023.
- [29] ZHANG Y J, WANG D M, YANG L N, et al. Purification and characterization of flavonoids from the leaves of *Zanthoxylum bungeanum* and correlation between their structure and antioxidant activity [J]. *Plos One*, 2014, 9(8): e105725.
- [30] ZHENG G D, ZHOU P, YANG H, et al. Rapid resolution liquid chromatography-electrospray ionisation tandem mass spectrometry method for identification of chemical constituents in *Citri Reticulatae Pericarpium* [J]. *Food Chemistry*, 2013, 136(2): 604-611.

- [31] JACK B U, MALHERBE C J, WILLENBURG E L, et al. Polyphenol-enriched fractions of cyclopia intermedia selectively affect lipogenesis and lipolysis in 3T3-L1 adipocytes[J]. *Planta Medica*, 2018, 84 (2): 100-110.
- [32] TRUCHADO P, VIT P, HEARD T A, et al. Determination of interglycosidic linkages in *O*-glycosyl flavones by high-performance liquid chromatography/photodiode-array detection coupled to electrospray ionization ion trap mass spectrometry. Its application to *Tetragonula carbonaria* honey from Austr[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2015, 29 (10): 948-954.
- [33] 钱井. 柑橘黄酮类化合物组分鉴定与抗氧化活性研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2017.
- QIAN J. Determination and antioxidant evaluation of flavonoids compounds from different *Citrus* cultivars [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2017.
- [34] VOO S S, GRIMES H D, LANGE B M. Assessing the biosynthetic capabilities of secretory glands in *Citrus* peel[J]. *Plant Physiology*, 2012, 159(1): 81-94.

Identification of Flavonoids from the Flavedo of 23 *Citrus* Cultivars Fruit and Their Antioxidant Activity

Liu Yang, Zang Wenjing, Liang Xiao, Wang Yue, Li Xian, Sun Chongde*

(Laboratory of Fruit Quality Biology, Zhejiang University/Laboratory of Horticultural Plant Growth, Development and Quality Improvement, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Horticultural Products Cold Chain Logistics Technology and Equipment National-Local Joint Engineering Laboratory/Zhejiang Provincial Key Laboratory of Integrative Biology of Horticultural Plants, Hangzhou 310058)

Abstract In this study, the flavedo of 23 *Citrus* varieties were selected as materials, and the components and antioxidant capacity of flavonoids were investigated by Liquid Chromatography-Mass spectrometry (LC-MS). The results showed that, the total phenolic content of the flavedo varied from 4.38 mg GAE/g DW to 21.10 mg GAE/g DW; and the varieties with the strongest and weakest comprehensive antioxidant capacity in the flavedo were 'local early' and 'Aiyuan 38'. Using the LC-MS to identify the flavonoids in the flavedo of 23 *Citrus* varieties, we identified a total of 53 flavonoids, including 5 flavonoid-C-glycoside, 4 flavonoid-O-glycoside, 12 flavanone-O-glycoside, 32 polymethoxyflavone (PMFs). Compared with the existing literature, two flavonoids, phloretin-3',5'-di-C-glucosid and hesperitin-7-O-rhamonoside, were reported for the first time in *Citrus*. The main flavanones contained in the flavedo are eriocitrin, neoeriocitrin, narirutin, hesperidin, and didymin. The main PMFs in the flavedo are nobiletin, tangeretin, 5HMPF and sinensetin. In conclusion, this article further supplemented information on the components and antioxidant activities of different *Citrus* varieties, which provided scientific guidance for *Citrus* consumption and set a theoretical basis for bioactivity studies.

Keywords *Citrus*; variety; flavonoids; flavedo; antioxidant activity