

UPLC-MS/MS分析牛肉红朱橘成熟果实多酚类化合物积累特征

李文云, 韩秀梅, 柏自琴, 罗 悺, 王小柯, 林 乾, 李金强, 马玉华

Polyphenolic Compounds Analysis in Fruits of 'Niurouhong' Tangerine by UPLC-MS/MS

LI Wenyun, HAN Xiumei, BAI Ziqin, LUO Yi, WANG Xiaoke, LIN Qian, LI Jinqiang, and MA Yuhua

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.13386/j.issn1002-0306.2021030355>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

五种寒地果树果实的多酚含量、抗氧化活性及抗 α -淀粉酶活性分析

Analysis of Polyphenolic Content, Antioxidant Capacity and α -amylase Inhibitory Activity of Five Fruits

食品工业科技. 2020, 41(4): 282-288

余甘子果渣多酚提取工艺优化及其抗氧化活性分析

Optimization of Polyphenols Extraction from *Phyllanthus emblica* L. Pomace and Its Antioxidant Activity Analysis

食品工业科技. 2019, 40(12): 171-177

不同干燥方法对生姜叶活性成分和抗氧化活性的影响

Effects of Different Drying Methods on Active Components and Antioxidant Activities of Ginger Leaves

食品工业科技. 2020, 41(18): 75-80, 86

响应面法优化提取无花果干果中多酚和总黄酮物质及其抗氧化活性

Optimization of Extraction of Polyphenols and Total Flavonoids from Dried Figs by Response Surface Methodology and Antioxidant Activity Analysis

食品工业科技. 2018, 39(16): 183-190, 212

天浆壳多酚的提取工艺优化及其抗氧化活性评价

Optimization of extraction process of polyphenols from fruit shell of *Metaplexis japonica* (Thunb.) Makino and evaluation of its antioxidant activity

食品工业科技. 2017(22): 167-172

三种食药菌多酚含量测定及抗氧化活性比较

Determination of Polyphenols Contents in Three Edible and Medicinal Fungi and Comparison of Antioxidant Activity

食品工业科技. 2020, 41(4): 51-57



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

李文云, 韩秀梅, 柏自琴, 等. UPLC-MS/MS 分析牛肉红朱橘成熟果实多酚类化合物积累特征 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(22): 11-17. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021030355

LI Wenyun, HAN Xiumei, BAI Ziqin, et al. Polyphenolic Compounds Analysis in Fruits of 'Niurouhong' Tangerine by UPLC-MS/MS[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(22): 11-17. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2021030355

UPLC-MS/MS 分析牛肉红朱橘成熟果实 多酚类化合物积累特征

李文云, 韩秀梅, 柏自琴, 罗 悒, 王小柯, 林 乾, 李金强, 马玉华*

(贵州省农业科学院果树科学研究所, 贵州贵阳 550006)

摘 要:为探索贵州地方柑橘品种-牛肉红朱橘(NRH)多酚类化合物组成特征,以朱红橘(ZHJ)和红香柚(HXY)为对照,利用超高效液相色谱串联质谱技术(UPLC-MS/MS)和代谢组学方法,分析三个种质成熟果实积累特征。结果表明:共检测到493种物质,其中类黄酮(163种)最多,其次是酚酸(71种)。聚类热图、火山图、差异代谢物筛选、维恩图和KEGG功能注释等分析结果均表明,三个柑橘种质多酚类化合物种类和相对含量呈现种质特异性,遗传背景相似的NRH与ZHJ代谢物种类和相对含量更为接近,筛选到的差异代谢物较少;两者与HXY代谢物种类和相对含量差异较大,说明代谢物种类与种质类型间存在密切联系。本研究有助于了解地方柑橘种质多酚类化合物积累特征,为后期开发利用提供参考。

关键词:柑橘, 果实, 抗氧化活性, 多酚, 不同种质, 代谢物

中图分类号:TS255.1

文献标识码:A

文章编号:1002-0306(2021)22-0011-07

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2021030355



本文网刊:

Polyphenolic Compounds Analysis in Fruits of 'Niurouhong' Tangerine by UPLC-MS/MS

LI Wenyun, HAN Xiumei, BAI Ziqin, LUO Yi, WANG Xiaoke, LIN Qian, LI Jinqiang, MA Yuhua*

(Pomology Science Institute, Guizhou Academy of Agricultural Sciences, Guiyang 550006, China)

Abstract: In this study, UPLC-MS/MS(Ultra Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry) was used to detect the polyphenolic compounds in mature fruits of three Guizhou local germplasms, named 'Niurouhong' tangerine(NRH), 'Zhuhongju'(ZHJ) and 'Hongxiangyou'(HXY). Results showed that a total of 493 compounds including flavonoids, phenolic acids, lignins and coumarins were detected, of which flavonoids(163) were the most, followed by phenolic acids(71). Generally, the results of heat map, volcano plot, differential metabolites selected, venn diagram and KEGG analysis showed that the types and relative contents of polyphenolic compounds were germplasm specific. The metabolites in NRH and ZHJ were more similar, and the number of different metabolites were the least. There were great differences in metabolite types and relative contents between the two and HXY, indicating that there was a close relationship between metabolite types and germplasm types. This study would be helpful to understand the accumulation characteristics of polyphenolic compounds in local citrus germplasm and provide reference for later development and utilization.

Key words: citrus; fruit; antioxidant activity; polyphenols; different germplasm; metabolites

柑橘主栽类型主要包括宽皮柑橘、柚类、橙类、柠檬等,不仅果形优美、酸甜爽口、香味浓郁,还富含多种生物活性成分,其中多酚类化合物是柑橘最常见

的一类生物活性成分^[1]。多酚类化合物广泛存在于根、茎、叶、花、果实和种子中,泛指化学结构中具有苯环和多个酚基团的一类次生代谢产物的总称,主要

收稿日期: 2021-03-30

基金项目: 贵州省科技计划项目(黔科合基础[2019]1304号);贵州省农科院青年科技基金(黔农科院青年基金[2019]11号);国家现代农业产业技术体系(CARS-26)。

作者简介: 李文云(1983-),女,博士,副研究员,研究方向:果实品质,E-mail:gziwenyun@163.com。

* 通信作者: 马玉华(1979-),女,博士,研究员,研究方向:果实品质,E-mail:360181050@qq.com。

包括类黄酮、木质素、香豆素、酚酸、苯醌等^[2-4]。多酚类化合物不仅与园艺产品外观、产量、营养品质、抗性和适应性等密切相关,在人体健康方面也发挥着重要作用,被称为人体“第七类营养素”,但人体自身不能合成,需从食物中摄取。多酚类化合物通常以抗氧化剂的形式清除人体活性氧自由基、抑制细胞过氧化、保护细胞免受损伤^[5],在调解免疫活性、改善心血管功能、抗炎镇痛、抗癌等方面发挥多重药理活性,被广泛应用于功能食品、保健品、贮藏保鲜等领域^[6]。随着社会进步和生活水平的提高,以及对大健康理念的认知加深,消费者更加注重对果实品质和功能性成分追求。因此,柑橘多酚类化合物因极具研究和应用价值而被广泛关注。

牛肉红朱橘是朱红橘的自然突变体,其果实呈橘红色,香味浓郁持久,是贵州地方特色柑橘品种^[7-8]。本文以两个地方特色柑橘种质-朱红橘和红香柚为对照,利用 UPLC-MS/MS 比较分析多酚类化合物积累特征并筛选差异代谢物,探索牛肉红朱橘成熟果实多酚类化合物积累特征,以期为牛肉红朱橘生产栽培、营养评价和功能性成分挖掘利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

牛肉红朱橘(NRH)、朱红橘(ZHJ)、红香柚(HXY) 15 年生,均采自贵州省惠水县烂坝林场,砧木为枳壳,栽培管理条件一致。选择长势良好、无病虫害的植株 3 株,在树冠外围不同方位随机采摘健康、无病虫害的成熟果实,带回实验室,用蒸馏水将果面清洗干净,将果实随机分成 3 组,设置 3 次生物学重复,分离果肉迅速用液氮速冻,置于-80℃超低温冰箱保存待测;甲醇、乙酸、乙腈等 色谱纯,均购自国药集团。

CBM30A 超高效液相质谱 配有电喷雾离子源(ESI)和 Analyst 1.6.3 数据处理软件,日本岛津公司;QTRAP 6500 串联质谱 美国 ABI 公司;HSS T3 C₁₈ 色谱柱(1.8 μm, 2.1 mm×100 mm) 美国 Waters。

1.2 实验方法

1.2.1 代谢物提取 将真空冷冻干燥后的样品研磨成细碎的粉末,准确称取 100 mg,并加入 1.2 mL 70% 甲醇溶液。震荡涡旋混匀,随后置于 4℃冰箱过夜浸提,10000×g 离心 10 min,用注射器吸取上清。过 0.22 μm 的微孔滤膜于上样瓶中待测。

1.2.2 代谢物检测 参照 Chen 等^[9]的方法,详细检测方法如下:

液相条件:色谱柱为 Waters ACQUITY UPLC HSS T3 C₁₈(1.8 μm, 2.1 mm×100 mm)。流动相 A 相为超纯水(含 0.04% 乙酸),B 相为乙腈(含 0.04% 乙酸)。洗脱梯度为:0 min B 相为 5%,10 min 内 B 相增加至 95%,保持 95% 1 min,11.00~11.10 min,

B 相降为 5% 并平衡至 14 min。柱温设置为 40℃,进样量 2 μL。

质谱条件:电喷雾离子源温度 550℃,质谱电压 5500 V,帘气 30 psi,碰撞诱导电离参数设置为高。

1.3 数据处理

利用二级谱信息对物质进行定性,利用质谱峰对物质进行峰面积积分^[10]。利用 R 软件制作聚类热图用于分析代谢物相对丰度。基于 OPLS-DA(Partial Least Squares Discrimination Analysis, 偏最小二乘判别分析)模型,根据差异倍数值和 VIP 值(Variable Importance In Project, 变量重要性投影)来筛选差异代谢物。满足 VIP 值 ≥ 1 且 Fold Change ≥ 2 或 Fold Change ≤ 0.05 的物质即为差异代谢物。

2 结果与分析

2.1 三个地方种质多酚类化合物积累特征分析

聚类热图分析结果表明,NRH、ZHJ 和 HXY 明显区分开,说明三者代谢物存在明显差异,且同一种质三个生物学重复聚在一起,表明数据可靠(图 1)。本研究共鉴定出 493 种物质(其中多酚类化合物约占 60%),依次为类黄酮(Flavonoids)163 种,酚酸(Phenolic acids)71 种,氨基酸及其衍生物(Amino acids and derivatives)55 种,木脂素和香豆素(Lignans and Coumarins)35 种,脂质(Lipids)29 种,核苷酸及其衍生物(Nucleotides and derivatives)27 种,有机酸(Organic acids)27 种,生物碱(Alkaloids)24 种,萜类(Terpenoids)5 种,醌类(Quinones)1 种,鞣质(Tannins)1 种,其它(Others)55 种。

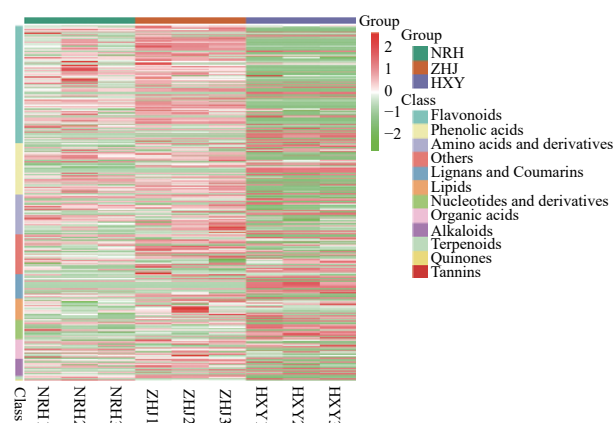


图 1 聚类热图分析代谢物相对丰度

Fig.1 Metabolites relative abundance analysis by heat map
注:横坐标表示样品名称;纵坐标表示检测到的代谢物;红色表示相对丰度高;绿色表示相对丰度低。

从热图分析结果上我们还可以看出,NRH 与 ZHJ 聚类在一起,相距更近,两者代谢物种类基本一致,差异主要在含量上;而与 HXY 代谢物种类和含量差异较大,在热图上距离相对较远。NRH 检测到的物质数量最多(460 种),ZHJ 次之(457 种),HXY 最少(409 种)。其中毛蕊异黄酮、木犀草素、2'-羟基金雀异黄酮、表儿茶素、阿魏酸-4-羟基香豆素、4-羟

基-7-氧甲基香豆素鼠李糖苷、7,8-二羟基-5,6,4'-三甲氧基黄酮、泽兰黄素、芹菜素-8-C-葡萄糖苷、芹菜素-7-O-葡萄糖苷、金雀异黄素-8-C-葡萄糖苷、橙皮苷、山柰酚-3-O-芸香糖苷-7-葡萄糖苷、山柰酚-3-O-新橙皮苷-7-葡萄糖苷等多酚类化合物仅在 NRH 和 ZHJ 中检测到。而瑞香素、异荭苈亭、香柑醇、佛手柑内酯、花椒素、异欧前胡素、对香豆酰基腐胺、飞燕草素、异鼠李素-己糖丙二酸等多酚类化合物仅在 HXY 中检测到。

2.2 差异物质的鉴别与筛选

火山图分析结果表明(图 2), NRH 和 HXY 比较组筛选到 287 种差异代谢物, 其中 179 种下调, 108 种上调。ZHJ 和 HXY 比较组筛选到 292 种差异代谢物, 其中 194 种下调, 98 种上调。ZHJ 和 NRH 比较组仅筛选到 54 种差异代谢物, 其中 42 种下调, 12 种上调。

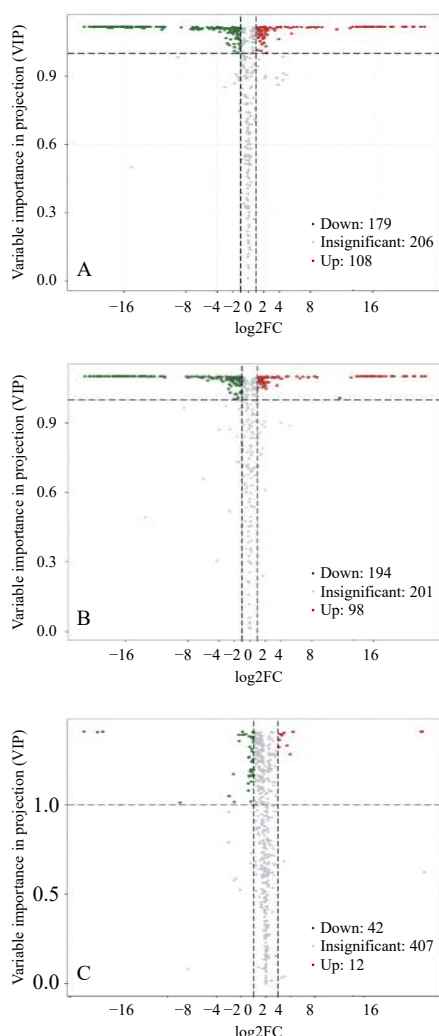


图 2 不同比较组差异代谢物火山图

Fig.2 Volcano plot of differential metabolites in different comparison groups

注: A、B 和 C 分别表示 NRH vs HXY、ZHJ vs HXY 和 ZHJ vs NRH 两两比较组筛选到的差异代谢物。图中每个点表示一种代谢物, 横坐标表示代谢物在两样品间差异倍数的对数值(Log2), 纵坐标表示 VIP 值。绿色表示下调, 红色表示上调, 灰色表示差异不显著。

韦恩图结果表明(图 3), 三个比较组共有的差异代谢物有 29 种(其中多酚类化合物占 83%), 具体物质信息见表 1, 其中类黄酮 13 种, 香豆素 6 种, 核苷酸及其衍生物 2 种, 酚酸类 2 种, 其它 2 种, 氨基酸及其衍生物、木脂素、生物碱和醌类各 1 种。

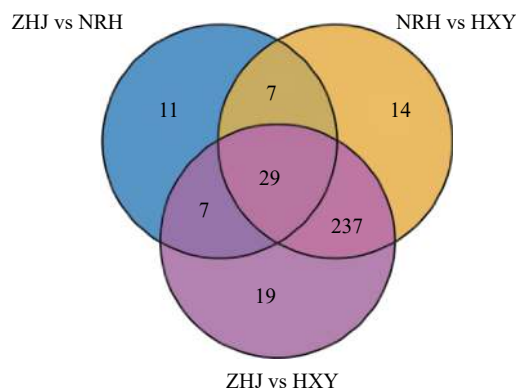


图 3 韦恩图(Venn)展示三个比较组共有和特有差异代谢物

Fig.3 Common and unique metabolites among three comparison groups explained by Venn

ZHJ 和 HXY 比较组分别筛选到 19 种差异代谢物(其中多酚类化合物占 42%)(图 3, 表 2), 其中类黄酮、核苷酸及其衍生物、酚酸类、脂质和其它类均为 3 种, 生物碱 2 种, 有机酸和氨基酸及其衍生物各 1 种。NRH 和 HXY 比较组筛选到 14 种特异代谢物(其中多酚类化合物占 57%), 其中酚酸类 5 种, 有机酸、类黄酮和脂质均为 2 种, 核苷酸及其衍生物、氨基酸及其衍生物、木脂素各 1 种。ZHJ 和 NRH 比较组筛选到 11 种差异代谢物(其中多酚类化合物占 91%), 其中类黄酮 5 种, 酚酸类 4 种, 有机酸 1 种, 木脂素和香豆素 1 种。

2.3 差异代谢物功能注释和富集分析

差异代谢物 KEGG 富集分析表明, NRH vs HXY 比较组差异代谢物参与了苯丙烷合成、异黄酮合成、黄烷酮和黄酮醇合成等 20 个生物过程(图 4A)。ZHJ vs HXY 比较组差异代谢物参与了氨基酸合成与降解、氧化磷酸化、丙酸代谢、苯丙烷合成、黄烷酮和黄酮醇合成等 20 个生物过程(图 4B)。ZHJ vs NRH 比较组差异代谢物参与了黄烷酮和黄酮醇合成、牛磺酸代谢、核黄素代谢、苯丙烷合成、嘧啶合成、嘌呤合成等 11 个生物合成过程(图 4C)。

3 讨论

多酚类化合物是广泛存在于植物体的一类重要的天然抗氧化物质, 对人体健康发挥着重要作用^[11-12], 目前已经鉴定分离出 8000 余种^[13]。多酚类化合物属于苯丙烷的衍生物, 糖酵解途径和戊酸磷酸途径生成的中间产物经莽草酸途径形成前体物质苯丙氨酸, 随后通过苯丙烷代谢途径进一步形成类黄酮、木质素、香豆素、酚酸、生物碱、鞣质等^[14-15]。其中类黄酮是多酚类化合物最大一个亚类, 也是柑橘研究最广泛深入的一类生物活性成分, 根据苯环位置和

表 1 三个比较组共有差异代谢物

Table 1 Common differential metabolites among three comparison groups

类别	物质名称	ZHJ vs HXY		NRH vs HXY		ZHJ vs NRH	
		VIP值	差异倍数	VIP值	差异倍数	VIP值	差异倍数
类黄酮(13种)	香叶木素	1.10	0.00↓	1.10	0.00↓	1.02	0.43↓
	泽兰黄素	1.10	0.00↓	1.11	0.00↓	1.19	0.41↓
	甜橙素	1.10	0.16↓	1.07	0.35↓	1.31	0.45↓
	柚皮苷	1.10	8.27↑	1.12	18.18↑	1.38	0.45↓
	芸香柚皮苷	1.09	0.15↓	1.10	0.30↓	1.37	0.48↓
	柚皮素-7-O-三葡萄糖苷	1.10	0.12↓	1.12	0.25↓	1.41	0.49↓
	丙二酰染料木苷	1.10	116.67↑	1.12	288.19↑	1.33	0.40↓
	5-羟基橙黄酮	1.10	0.01↓	1.10	0.01↓	1.17	0.46↓
	单羟基三甲氧基黄酮	1.10	0.00↓	1.12	0.00↓	1.39	0.21↓
	山柰酚-3-O-葡萄糖苷	1.05	0.15↓	1.11	0.39↓	1.16	0.38↓
	3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮	1.10	0.00↓	1.11	0.01↓	1.27	0.38↓
	3,5,7,4'-四羟基-8-甲氧基黄酮-3-葡萄糖苷-7-鼠李糖苷	1.08	0.37↓	1.12	10742.63↑	4.41	0.00↓
	芹菜素-6-C-己糖基-8-C-己糖基-O-己糖苷	1.10	21865.93↑	1.08	3.38↑	1.41	6474.63↑
香豆素(6种)	东莨菪内酯	1.10	7.42↑	1.12	27.49↑	1.41	0.27↓
	东莨菪苷	1.06	11.42↑	1.12	154611.11↑	1.41	0.00↓
	花椒毒醇	1.10	26.31↑	1.12	56.26↑	1.38	0.47↓
	七叶苷	1.09	0.08↓	1.11	0.02↓	1.41	4.67↑
	秦皮甲素	1.06	3.54↑	1.12	35698.89↑	1.41	0.00↓
	4-羟基香豆素二葡萄糖苷	1.01	32425.56↑	1.09	4.63↑	1.41	7008.96↑
核苷酸及衍生物(2种)	尿嘧啶核苷	1.08	2.95↑	1.10	5.92↑	1.26	0.50↓
	鸟苷-3',5'-环单磷酸	1.08	0.21↓	1.11	0.10↓	1.32	2.11↑
酚酸类(2种)	阿魏酰苹果酸	1.10	0.00↓	1.12	0.00↓	1.39	0.28↓
	苜蓿-β-D-吡喃葡萄糖苷	1.09	0.04↓	1.09	0.08↓	1.30	0.46↓
其它类(2种)	D-生物素	1.08	0.09↓	0.06	0.21↓	1.38	0.45↓
	异甜菜苷-6-O-β-葡萄糖苷	1.10	4763962.96↑	1.12	703.41↑	1.41	6772.70↑
木脂素(1种)	丁香树脂酚-己糖	1.09	17.57↑	1.09	47.64↑	1.08	0.37↓
氨基酸及衍生物(1种)	N-(3-吡啶乙酰基)-L-丙氨酸	1.09	0.15↓	1.10	0.30↓	1.35	0.49↓
生物碱(1种)	2-[(2R)-4-甲氧基-2,3-二氢呋喃并[2,3-b]喹啉-2-基]丙-2-醇	1.10	0.00↓	1.12	0.00↓	1.40	0.32↓
醌类(1种)	6-羟基大黄酸-8-O-D-吡喃葡萄糖苷	1.10	0.00↓	1.12	0.00↓	1.36	2.16↑

注: '↑'、'↓'分别表示差异模式为上调或下调。

羟基个数分为黄烷酮、黄酮、黄酮醇和花青苷等,游离态的苷元较少,大部分经糖基化、异戊烯基化和甲基化等修饰作用以衍生物的形式存在,如橙皮苷、柚皮苷、柚皮芸香苷、新橙皮苷等^[16-18]。随着消费者对优质、健康果品需求不断升级,该类物质积累特征、开发和创新利用一直是育种者关注的热点。

多酚类化合物受品种、生长发育阶段、组织部位、生态条件等内在和外在多种因素影响下,共同形成独特的积累特征^[19-20]。其中,品种是影响多酚类化合物组成和含量决定性因素之一,如咖啡酸、食子酸、原儿茶酸、肉桂酸阿魏酸和鞣花酸等酚酸在不同枣品种间存在显著差异^[21]。作为苹果主要抗氧化成分的多酚类物质在各个品种间差异显著^[22]。郑洁等^[23]分析椪柑、砂糖橘、纽荷尔脐橙、鸡尾葡萄柚、柠檬、金柑等品种果实中酚酸和类黄酮组分时发现,椪柑和鸡尾葡萄柚果皮总酚含量最高,金柑最低;类黄酮在鸡尾葡萄柚果皮中含量最高,其次是椪柑和纽荷尔脐橙。本研究结果表明三个地方特色柑橘种质果实中多酚类化合物种类和相对含量呈现出种质特

异,遗传背景相似的种质,其代谢物种类和相对含量也更为接近。具体表现为同为宽皮柑橘的 NRH 和 ZHJ,代谢物种类和相对含量更为接近,两者筛选到的差异代谢物较少;两者与柚类 HXY 代谢物种类和相对含量差异明显。进一步说明代谢物种类与种质类型间存在密切联系。

类黄酮是柑橘果实中含量丰富的一类多酚类化合物,不仅影响果实着色和风味,对果实营养价值也具有重要影响,是果实品质的重要组成部分^[4]。根据化学结构类黄酮可分为查尔酮、黄酮、黄酮醇、异黄酮、黄烷醇和花青素等,大部分类黄酮苷元(如柚皮素、橙皮素、香叶木素、山柰酚等)形成后,进一步经过糖基化、酰基化和甲基化等修饰形成稳定的产物,柑橘中类黄酮主要修饰方式为糖基化^[24],如检测到的芸香柚皮苷、柚皮苷和山柰酚-3-O-芸香糖苷等。除检测到大量的类黄酮糖基化产物外,同样检测到在柑橘中特异积累的多甲氧基黄酮(含 2 个或 2 个以上甲氧基),如 5,6-二羟基-7,4'-二甲氧基黄酮、5,2'-二羟基-7,8-二甲氧基黄酮、单羟基三甲氧基黄酮、

表 2 各比较组筛选到的特异代谢物

Table 2 Specific metabolites selected in each comparison group

ZHJ vs HXY				
类别	物质名称	VIP值	差异倍数	差异类型
类黄酮(3种)	芹菜素-6-C-葡萄糖苷	1.09	0.49	↓
	槲皮素-3-O-芸香糖苷	1.08	0.50	↓
	5,6,7,8,3',4'-六甲氧基黄酮	1.08	0.20	↓
核苷酸及衍生物(3种)	2-脱氧腺苷	1.10	14280.37	↑
	尿苷-5'-二磷酸-D-葡萄糖	1.05	2.09	↑
	烟酸腺嘌呤二核苷酸	1.08	2.28	↑
酚酸类(3种)	4-羟基苯甲醛	1.08	0.47	↓
	1-O-没食子酰-β-D-葡萄糖	1.08	2.31	↑
	二酒石酰-羟基香豆素	1.08	0.47	↓
脂质(3种)	月桂酸	1.09	0.38	↓
	单酰甘油酯(18:2)	1.03	0.43	↓
	溶血磷脂酰乙醇胺14:0	1.06	0.43	↓
其它类(3种)	D-松醇	1.10	0.41	↓
	葡萄糖酸	1.10	0.45	↓
	吴茱萸醇	1.06	4.01	↑
生物碱(2种)	胆碱	1.10	0.38	↓
	甜菜碱	1.03	0.49	↓
有机酸(1种)	莽草酸	1.09	0.35	↓
氨基酸及衍生物(1种)	2-氨基异丁酸	1.10	0.43	↓
NRH vs HXY				
类别	物质名称	VIP值	差异倍数	差异类型
酚酸类(5种)	邻氨基苯甲酸	1.12	14946.59	↑
	香豆酸	1.07	2.50	↑
	芥子酸甲酯	1.08	3.10	↑
	2,5-二羟基苯甲酸-O-己糖苷	1.06	3.59	↑
	三羟基肉桂酰奎宁酸	1.09	3.32	↑
有机酸(2种)	苹果酸	1.11	0.49	↓
	3,5-二羟基-3-甲基戊酸	1.11	0.41	↓
类黄酮(2种)	山柰酚-3-O-半乳糖苷	1.03	4.82	↑
	山柰酚-7-O-葡萄糖苷	1.00	5.18	↑
脂质(2种)	溶血磷脂酰乙醇胺18:1	1.09	2.46	↑
	溶血磷脂酰胆碱18:4	1.10	2.33	↑
核苷酸及衍生物(1种)	鸟苷	1.08	2.61	↑
氨基酸及衍生物(1种)	3-N-甲基-L-组氨酸	1.07	0.45	↓
木脂素(1种)	松脂醇	1.04	3.40	↑
ZHJ vs NRH				
类别	物质名称	VIP值	差异倍数	差异类型
类黄酮(5种)	忍冬苷	1.28	3.96	↑
	山柰酚-3-O-芸香糖苷	1.01	0.01	↓
	4,2',4',6'-四羟基查尔酮	1.13	0.44	↓
	5,6-二羟基-7,4'-二甲氧基黄酮	1.05	0.13	↓
	5,2'-二羟基-7,8-二甲氧基黄酮	1.02	0.17	↓
酚酸类(4种)	原儿茶酸-4-葡萄糖苷	1.12	0.37	↓
	丁香酸-O-葡萄糖苷	1.17	0.49	↓
	苯甲酰苹果酸	1.40	2.24	↑
	二对香豆酰氨基酸	1.27	0.39	↓
有机酸(1种)	2-氨基乙烷亚磺酸	1.16	0.50	↓
木脂素(1种)	五味子素	1.16	0.40	↓

注: ‘↑’、‘↓’分别表示差异模式为上调或下调。

3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮和 5,6,7,8,3',4'-六甲氧基黄酮等,这类物质在抗炎、抗氧化和抗肿瘤等方面具有广泛的药理作用^[25-26]。

除类黄酮外,酚酸类也是本研究中检测到较丰富的一类化合物,其泛指同一苯环上有若干个羟基的一类化合物的总称。柑橘中主要以酰胺、酯或糖苷

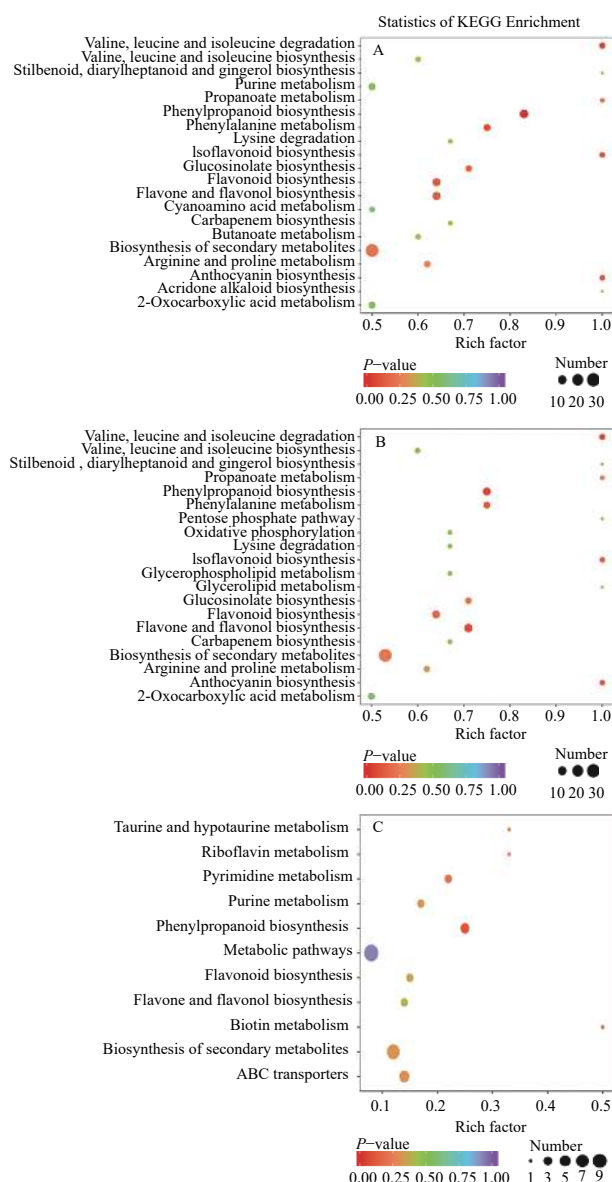


图4 差异代谢物 KEGG 富集分析

Fig.4 Differential metabolites enrichment analysis by KEGG
注: A、B 和 C 分别表示 NRH vs HXY、ZHJ vs HXY 和 ZHJ vs NRH 两两比较组 KEGG 富集图。横坐标表示注释到的代谢物个数和占被注释代谢物总数的比例,纵坐标表示代谢通路。点的颜色为 P 值,越红表示越显著;点的大小表示差异代谢物个数。

结合态存在,游离态的较少^[27]。如本研究中检测到的香豆酸、芥子酸甲酯、原儿茶酸-4-葡萄糖苷、丁香酸-O-葡萄糖苷、2,5-二羟基苯甲酸-O-己糖苷和 1-O-没食子酰- β -D-葡萄糖等。

柑橘多酚类化合物种类丰富,从头合成途径较长,涉及上下游的多条代谢途径,如上游的糖酵解、磷酸烯醇式丙酮酸和戊酸磷酸途径等,下游的莽草酸、苯丙烷、甲羟戊酸等多条生物代谢途径^[28-29]。以及苯丙氨酸解氨酶(Phenylalanine ammonia-lyase, PAL)^[30]、4-香豆酰-CoA-连接酶(4-coumarate coenzyme A ligase, 4CL)^[31]、查耳酮合成酶(Chalcone synthase, CHS)^[32]和肉桂酸-4-羟基化酶(Cinnamate 4-hydroxylase, C4H)^[33]等多个限速酶的作用。各品

种间生物活性成分种类和含量的差异,具体是哪些代谢物、代谢途径、关键结构基因或调控基因起主导作用,还有待从结构基因、转录调控、环境调控、库源供应等多个层面深入研究。

参考文献

- [1] 张海朋,彭昭欣,石梅艳,等.柑橘果实风味组学研究进展[J].华中农业大学学报,2021,40(1):52-59. [ZHANG H P, PENG Z X, SHI M Y, et al. Advances on citrus flavoromics[J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2021,40(1):52-59.]
- [2] 吴建华,吴志瑰,裴建国,等.多酚类化合物的研究进展[J].中国现代中药,2015,17(6):630-636. [WU J H, WU Z G, PEI J G, et al. Advances in studies on polyphenols[J]. Modern Chinese Medicine, 2015, 17(6): 630-636.]
- [3] 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.]
- [4] 陈嘉景,彭昭欣,石梅艳,等.柑橘中类黄酮的组成与代谢研究进展[J].园艺学报,2016,43(2):384-400. [CHEN J J, PENG Z X, SHI M Y, et al. Advances on flavonoid composition and metabolism in citrus[J]. Acta Horticulturae Sinic, 2016, 43(2): 384-400.]
- [5] GANDHI G R, VASCONCELOS A, WU D T, et al. Citrus flavonoids as promising phytochemicals targeting diabetes and related complications: A systematic review of *in vitro* and *in vivo* studies[J]. Nutrients, 2020, 12(10): 1-32.
- [6] 黄睿,沈淑好,陈虹霖,等.柑橘类黄酮的生物学活性及提高生物利用度技术研究进展[J].食品科学,2019,40(1):319-326. [HUANG R, SHEN S Y, CHEN H L, et al. Recent advances in bioactivities and technologies for bioavailability improvement of citrus flavonoids[J]. Food Science, 2019, 40(1): 319-326.]
- [7] 陈守一,袁启凤,谭功亮,等.柑橘新品种-牛肉红朱橘的选育[J].果树学报,2012,29(1):147-148. [CHEN S Y, YUAN Q F, TAN G L, et al. Niurouhongzhuju, a new citrus cultivar[J]. Journal of Fruit Science, 2012, 29(1): 147-148.]
- [8] 李文云,王壮,袁启凤,等.不同产地牛肉红朱橘果实的品质和类胡萝卜素含量[J].西南农业学报,2013,26(2):686-690. [LI W Y, WANG Z, YUAN Q F, et al. Fruit qualities and carotenoid contents of niurouhong mandarin from different areas[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2013, 26(2): 686-690.]
- [9] CHEN W, GONG L, GUO Z, et al. A novel integrated method for large-scale detection, identification, and quantification of widely targeted metabolites: Application in the study of rice metabolomics[J]. Molecular Plant, 2013, 6(6): 1769-1780.
- [10] FRAGA C G, CLOWERS B H, MOORE R J, et al. Signature-discovery approach for sample matching of a erve-agent precursor using liquid chromatography-mass spectrometry, XCMS, and chemometrics[J]. Analytical Chemistry, 2010, 82(10): 4165-4173.
- [11] QUIDEAU S, DEFFIEUX D, DOUAT-CASASSUS C. Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities and synthesis[J]. Angewandte Chemie-International Edition, 2011, 50(3): 586-

621.

- [12] 费鹏, 赵胜娟, 陈曦, 等. 植物多酚抑菌活性、作用机理及应用研究进展[J]. 食品与机械, 2019, 35(7): 226–230. [FEI P, ZHAO S J, CHEN X, et al. The research progress on antimicrobial activity, mechanism and application of plant polyphenols[J]. Food and Machinery, 2019, 35(7): 226–230.]
- [13] 于森, 王长远, 王霞. 代谢组学在植物多酚类物质检测分析中的应用[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(13): 280–285. [YU M, WANG C Y, WANG X. Application of metabolomics in detection and analysis of plant polyphenols[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(13): 280–285.]
- [14] 白晓琳, 樊梓鸾, 李璐, 等. 多酚类化合物与其他活性物质协同作用研究进展[J]. 食品工业科技, 2019, 40(6): 308–311. [BAI X L, FAN Z L, LI L, et al. Research progress on synergistic effect of polyphenols and other active substances[J]. Science and Technology of Food Industry, 2019, 40(6): 308–311.]
- [15] SHI M Y, LIU X, ZHANG H P, et al. The IAA- and ABA-responsive transcription factor CgMYB58 up-regulates lignin biosynthesis and triggers juice sac granulation in pummelo[J]. Horticulture Research, 2020, 7: 139–152.
- [16] 李玲玲, 刘雪, 邱泽天, 等. 植物多酚的微生物合成[J]. 生物工程学报, 2021, 37(6): 1–27. [LI L L, LIU X, QIU Z T, et al. Microbial synthesis of plant polyphenols[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2021, 37(6): 1–27.]
- [17] CHEN J J, YUAN Z Y, ZHANG H P, et al. Cit1, 2RhaT and two novel CitdGlcTs participate in flavor-related flavonoid metabolism during citrus fruit development[J]. Journal of Experimental Botany, 2019, 70(10): 2759–2771.
- [18] FRYDMAN A, LIBERMAN R, HUHMAN D V, et al. The molecular and enzymatic basis of bitter/non-bitter flavor of citrus fruit: Evolution of branch-forming rhamnosyltransferases under domestication[J]. The Plant Journal, 2013, 73(1): 166–178.
- [19] 刘佩, 谢佳璇, 秦栋, 等. 五种寒地果树果实的多酚含量, 抗氧化活性及抗 α 淀粉酶活性分析[J]. 食品工业科技, 2020, 44(4): 288–294. [LIU P, XIE J X, QIN D, et al. Analysis of polyphenolic content, antioxidant capacity and α -amylase inhibitory activity of five fruits[J]. Science and Technology of Food Industry, 2020, 44(4): 288–294.]
- [20] 张华, 周志钦, 席万鹏. 15 种柑橘果实主要酚类物质的体外抗氧化活性比较[J]. 食品科学, 2015, 36(11): 64–70. [ZHANG H, ZHOU Z Q, XI W P. Comparison of antioxidant activity *in vitro* of 15 major phenolic compounds in citrus fruits[J]. Food Science, 2015, 36(11): 64–70.]
- [21] 丁胜华, 王蓉蓉, 吴继红, 等. 枣果实中生物活性成分与生物活性的研究进展[J]. 现代食品科技, 2016, 32(5): 332–348, 321. [DING S H, WANG R R, WU J H, et al. A review of the bioactive components and biological activities of *Zizyphus jujuba* Mill.(Jujube) fruits[J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 32(5): 332–348, 321.]
- [22] 李旋, 毕金峰, 刘璇, 等. 苹果多酚的组成和功能特性研究现状与展望[J]. 中国食品学报, 2020, 20(11): 334–346. [LI X, BI J F, LIU X, et al. Research status and prospect on the composition and functional characteristics of apple polyphenols[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2020, 20(11): 334–346.]
- [23] 郑洁, 赵其阳, 张耀海, 等. 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[J]. 中国农业科学, 2014, 47(23): 4706–4717. [ZHENG J, ZHAO Q Y, ZHANG Y H, et al. Simultaneous determination of main flavonoids and phenolic acids in citrus fruit by ultra performance liquid chromatography[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2014, 47(23): 4706–4717.]
- [24] 朱凤妮, 卢剑青, 陈金印, 等. 江西省 6 种宽皮柑橘类黄酮及挥发油成分的研究[J]. 果树学报, 2017, 34(9): 1106–1116. [ZHU F N, LU Jian Q, CHEN J Y, et al. Flavonoid and essential oil components in six cultivars of *Citrus reticulata* in Jiangxi province[J]. Journal of Fruit Science, 2017, 34(9): 1106–1116.]
- [25] 梅振英, 张荣菲, 赵志敏, 等. 陈皮多甲氧基黄酮类成分组成、提取纯化及生物活性研究进展[J]. 中成药, 2020, 42(10): 2709–2715. [MEI Z Y, Zhang R F, ZHAO Z M, et al. Research progress on composition, extraction, purification and biological activity of polymethoxy flavones from pericarpium chenpi[J]. Chinese Traditional Patent Medicine, 2020, 42(10): 2709–2715.]
- [26] 刘洋, 方迅, 胡爽, 等. 高效液相色谱法检测不同品种柑橘类果皮多甲氧基黄酮[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(15): 123–128. [LIU Y, FANG X, HU S, et al. Determination of polymethoxy flavonoids in different varieties of citrus peel by high performance liquid chromatography[J]. Food Research and Development, 2020, 41(15): 123–128.]
- [27] 何雅静, 张群琳, 谷利伟, 等. 柑橘中酚酸类化合物及其生物活性与机理的研究进展[J]. 食品与发酵工业, 2020, 46(15): 301–306. [HE Y J, ZHANG Q L, GU L W, et al. Research progress on phenolic acids in citrus and their biological activities and mechanisms[J]. Food and Fermentation Industries, 2020, 46(15): 301–306.]
- [28] 单杨, 刘娟, 王振, 等. 生物合成柑橘类黄酮研究进展[J]. 中国食品学报, 2019, 19(11): 1–13. [SHAN Y, LIU J, WANG Z, et al. Research progress on the biosynthesis of flavonoids in citrus[J]. Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology, 2019, 19(11): 1–13.]
- [29] 邢文, 金晓玲. 调控植物类黄酮生物合成的 MYB 转录因子研究进展[J]. 分子植物育种, 2015, 13(3): 689–696. [XING W, JIN X L. Recent advances of MYB transcription factors involved in the regulation of flavonoid biosynthesis[J]. Molecular Plant Breeding, 2015, 13(3): 689–696.]
- [30] 王星, 罗双霞, 于萍, 等. 茄科蔬菜苯丙烷类代谢及相关酶基因研究进展[J]. 园艺学报, 2017, 44(9): 1738–1748. [WANG X, LUO S X, YU P, et al. Advances in phenylpropanoid metabolism and its enzyme genes in solanaceae vegetables[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2017, 44(9): 1738–1748.]
- [31] SHEKH A R H, KANT G, TRIPATHI R, et al. Structural insight of two 4-coumarate CoA ligase (4CL) isoforms in *Leucaena* suggests targeted genetic manipulations could lead to better lignin extractability from the pulp[J]. 3 Biotech, 2020, 10(9): 1–13.
- [32] WANG Z B, YU Q B, SHEN W X, et al. Functional study of CHS gene family members in citrus revealed a novel CHS gene affecting the production of flavonoids[J]. BMC Plant Biology, 2018, 18(1): 189.
- [33] CHEN O, DENG L L, RUAN C Q, et al. *Pichia galeiformis* induces resistance in postharvest citrus by activating the phenylpropanoid biosynthesis pathway[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(8): 2619–2631.