

柑橘种子类柠檬苦素的分析及质谱裂解途径

——基于 UPLC-Q-TOF-MS 的新方法^①

赵希娟¹, 刘青桥¹, 邢天天²

1. 西南大学 园艺园林学院, 重庆 400715; 2. 西南大学 化学化工学院, 重庆 400715

摘要: 柑橘种子富含类柠檬苦素化合物, 该类物质表现出多种生物活性。基于 UPLC-Q-TOF-MS 技术, 优化出一种新的柑橘中类柠檬苦素化合物的定性定量检测方法。考察了流动相及流速、进样量、色谱柱温等条件的影响, 优化得到分析方法。流动相为 0.01% 甲酸 + H₂O(A) 以及乙腈(B), 在洗脱程序为 0~4.0 min, 35%~55% B; 4.0~5.0 min, 55%~35% B, 进样量 1.0 μ L, 流速 0.4 mL/min, 柱温 40 $^{\circ}$ C 的条件下, 7 种柑橘种子中诺米林、奥巴酮和柠檬苦素在 5 min 内得到最佳分离。通过与标准品的保留时间和质谱碎片比较, 样品中诺米林、奥巴酮和柠檬苦素得到鉴定; 研究了 3 种类柠檬苦素的 MS/MS 质谱裂解规律, 并首次得出了诺米林的质谱裂解途径。此外, 通过 UPLC-PDA 检测器, 测定了 7 种柑橘种子中 3 种类柠檬苦素的质量比。结果显示, 类柠檬苦素是一类很好的分类学标记物。

关键词: 柑橘种子; 类柠檬苦素; 诺米林; 裂解途径

中图分类号: Q503

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2018)11-0020-10

类柠檬苦素(limonoids)是一类高度氧化的四环三萜类植物次生代谢物质, 广泛存在于芸香科(Rutaceae)和楝科(Meliaceae)植物中, 通常以糖苷和苷元两种形式存在^[1-2]。芸香科柑橘属(*Citrus*)植物的种子被认为是天然类柠檬苦素的重要来源^[3]。类柠檬苦素生物合成途径存在于几乎所有柑橘品种中, 诺米林、奥巴酮和柠檬苦素是其中最主要的 3 种^[4]。研究表明类柠檬苦素具有抗癌^[5]、抗氧化^[6]、抗病毒^[7]、抑制 HIV^[8] 和杀虫^[9] 等多种生物活性。而另一方面, 作为柑橘产品开发利用过程中最主要的两种苦味物质之一, 由柠檬苦素苷元引起的苦味是柑橘产业中一个巨大难题^[4,10]。

截至目前, 已从柑橘中分离出大约 39 种柠檬苦素苷元和 17 种糖苷^[11-12]。薄层色谱法(TLC)^[13] 和高效液相色谱法(HPLC)^[14] 都可以用于类柠檬苦素的分析检测。其中, HPLC 是类柠檬苦素分离和鉴定中最常用的方法^[15]。随着分析技术的发展, 超高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱联用技术(UPLC-Q-TOF-MS)在柑橘化学成分分析中的应用越来越普遍^[16-18]。与 HPLC 比较, UPLC 在速度、灵敏度和分离效率上表现出明显的优势^[19-21]。此外, 新型 Q-TOF-MS 为高分辨的质谱, 可提供更准确的离子碎片信息, 能快速准确地对天然产物中一些化合物进行定性分析^[22]。

已有文献报道柠檬苦素和奥巴酮的 MS/MS 详细的质谱裂解途径^[23], 目前诺米林的质谱裂解途径尚未解决。而诺米林作为合成其他所有柑橘中类柠檬苦素化合物的前体物质, 其研究显得尤为重要。此外, 类柠檬苦素在芸香科和楝科植物中可作为一类特殊的分类学标记物^[24]。因为特征性的类柠檬苦素及其生物合成途径只在特定的种或属中存在。因此, 在同一分析方法下对不同品种柑橘种子中类柠檬苦

① 收稿日期: 2017-12-11

基金项目: 国家农产品质量安全风险评估项目(GJFP2018004); 中央高校基本业务费项目(XDJK2016B014, XDJK2016E149)。

作者简介: 赵希娟(1985-), 女, 讲师, 博士, 主要从事果品营养与质量安全研究。

素含量和分布的研究具有重要意义. 已报道的分析方法存在速度慢、重现性差、操作复杂和灵敏度低等问题. 目前类柠檬苦素化合物在柑橘中的含量尚无定论, 各实验室报道有所不同, 相应的定性定量检测方法及商业标准不完善.

本研究拟通过 UPLC-Q-TOF-MS 对柑橘种子中柠檬苦素、诺米林和奥巴叩酮进行定性定量分析, 建立新的柑橘中类柠檬苦素化合物检测方法, 得到 3 种物质准确的质谱信息和含量. 分析不同品种柑橘种子之间柠檬苦素、诺米林和奥巴叩酮的含量差异, 为柑橘脱苦以及品种筛选培育提供依据. 柑橘种子类柠檬苦素化合物的开发, 不仅可以促进柑橘种植业及加工业的发展, 同时可带动相关副产品加工业的发展, 为柑橘的综合开发利用开辟了新的途径.

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究所采用的柑橘果实于 2014 年 11 月采自中国农业科学院柑橘研究所国家种质资源圃. 在果实成熟期, 随机选择树势相对一致的 3 棵树, 在树冠外围的中上部位随机摘取大小相对一致、成熟度相近、无病虫害的果实 20 个. 7 种材料分别是: 椪柑(*Citrus reticulata* Blanco. cv. ‘Ponkan’)、红橘(*Citrus reticulata* Blanco. cv. ‘Hongjv’)、常山胡柚(*Citrus paradisi* Macf. cv. ‘ChangshanhuYOU’)、梁平柚(*Citrus grandis* (L.) Osbeck. cv. ‘Liangpingyu’)、小香橼(*Citrus medica* L)、锦橙(*Citrus sinensis* (L.) Osbeck. cv. ‘Jincheng’)和宜昌橙(*Citrus ichangensis* Swingle).

1.2 实验试剂

标准品诺米林(纯度 98.0)、奥巴叩酮(纯度 98.0)和柠檬苦素(纯度 98.0)购自成都克洛玛生物科技有限公司(中国, 成都); 色谱纯乙腈购自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA); 甲酸购自 Waters 公司(Milford, MA, USA); 超纯水由 Milli-Q 系统(Millipore, Bedford, MA, USA)制备; 石油醚、二氯甲烷为分析纯试剂, 购自四川成都科龙化工试剂厂(中国, 成都); 过滤膜(PTFE, 0.22 μ m)购自 ANPEL Inc(中国, 上海).

1.3 仪器设备

电热恒温鼓风干燥箱 DHG-9240A(上海齐欣科学仪器有限公司); 小型粉碎机 ZN-04A(北京兴时利和科技发展有限公司); 电子天平 JT3101N(感量 0.1 mg, Max 3100g, 上海精天电子仪器有限公司); 电子天平 Sartorius BSA 224S(感量 0.1 mg, Max 220g, 赛多利斯科学仪器(北京)有限公司); 超声清洗器 KQ5200DE(昆山市超声仪器有限公司); 漩涡混合器 DG-800(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司); 台式低速大容量离心机 TDL-5A(上海菲恰尔分析仪器有限公司); 超纯水系统 Milli-Q Advantage A10(美国 Millipore 公司); ACQUITY 超高效液相色谱(UPLC)分析系统(美国 Waters 公司); Xevo G2-S Q-Tof 高分辨四级杆飞行时间质谱仪(配有 lockspray 接口(美国 Waters 公司)、电喷雾离子源(ESI 源), 美国 Waters 公司); ACQUITY UPLC BEH C18 色谱柱(2.1 $\times$ 100 mm, 1.7 μ m)(美国 Waters 公司).

1.4 实验方法

1.4.1 样品制备

柑橘果实采摘后用干净的抹布擦去外部灰尘, 种子被分离, 置于 40 $^{\circ}$ C 鼓风干燥箱中干燥, 种子烘干 72 h, 之后用小型粉碎机粉碎并过 60 目筛. 干粉储存于-80 $^{\circ}$ C 冰箱中备用.

类柠檬苦素化合物的提取在原有方法上加以改进^[25-26]. 平行称取冷冻干燥样品 3 份, 每份样品约 2 g (精确到 0.0001)于 100 mL 锥形瓶中, 加入 20 mL 石油醚, 室温(25 $^{\circ}$ C)超声提取 60 min, 5 000 r/min 离心 5min, 合并固相, 加入 60mL 二氯甲烷, 锡箔纸封口, 室温(25 $^{\circ}$ C)超声提取 30 min, 抽滤, 合并有机相于蒸馏瓶中, 36 $^{\circ}$ C 下减压旋转蒸发至干, 用 1 mL 乙腈溶解, 转入 1.5 mL 离心管中, 5 000 r/min 离心 10 min, 上清液用乙腈定容至 1.5 mL. 测定样品时, 将提取液过 0.22 μ m 亲水性 PTFE 膜到 2 mL 进样小瓶, 待测.

1.4.2 标准品溶液配制

分别将标准品溶解于乙腈中并定容至 10 g/L, 作为标准品储备液. 精密吸取标准品储备液, 用乙腈分别定容至不同质量浓度: 诺米林(0.050, 0.25, 0.50, 1.0, 2.0, 2.5 g/L), 奥巴叩酮(0.010, 0.050, 0.10, 0.20, 0.40, 0.50 g/L), 柠檬苦素(0.10, 0.50, 1.0, 2.0, 4.0, 5.0 g/L). 分析前, 所有标准品储存于 4 ℃ 冰箱中备用.

1.4.3 UPLC-Q-TOF-MS 系统的条件

PDA 检测器波长扫描范围为 200~400 nm, 根据文献报道^[27] 选择 210 nm 作为检测波长. UPLC-Q-TOF-MS 系统使用 ESI 离子源, 在正离子模式下全扫描采集数据. 采用电喷雾电离离子源(ESI), 毛细管电压 0.45 kV, 锥孔电压 40 V, 离子源温度 120 ℃, 除溶剂温度 400 ℃, 雾化气体为氮气(N₂), 碰撞气体为氩气(Ar), 锥孔气体为流量 50 L/h, 脱溶剂气体流量 800 L/h, 低能量为 6 V, 梯度高能量为 20~40 V; MS 扫描范围 m/z 100~1 000, 扫描时间为 0.2 s; 质谱质量数校正溶液亮氨酸脑啡肽(m/z 为 556.2766, 质量浓度为 200 μg/L, 流速为 10 μL/min).

1.4.4 线性关系考察及检出限、定量限测定

精密吸取 3 种类柠檬苦素的各质量浓度标准品溶液, 分别进样. 以峰面积为纵坐标(Y), 质量浓度(X)为横坐标, 绘制标准曲线, 计算标准曲线的回归方程及相关系数. 将标准品溶液逐步稀释, 并以信噪比(S/N)为 3 时所对应的化合物质量浓度为检出限(LOD), 以信噪比(S/N)为 10 时所对应的化合物质量浓度为定量限(LOQ).

1.4.5 精密度实验

精密度实验是在 UPLC 的基础上, 评价所建立的分析方法的精密度. 精密吸取 3 种类柠檬苦素标准品溶液, 按已确定的分析方法进样. 短时间内连续进样 6 次, 测定类柠檬苦素标准品的峰面积, 计算日内标准偏差, 之后分别进样 3 次计算日间标准偏差.

1.4.6 加标回收率

平行称取冷冻干燥样品 6 份, 分别加入一定量柠檬苦素、诺米林和奥巴叩酮标准品溶液, 运用所建立的方法, 对加标样品进行处理和分析. 计算各加标样品的加标回收率及相应的相对标准偏差(RSD)值.

2 结果与讨论

2.1 UPLC 分析方法的建立

为找到最佳条件分析柑橘种子中类柠檬苦素, 本实验优化了不同的 UPLC 条件, 包括流动相与进样量、色谱柱温(30 ℃、35 ℃ 和 40 ℃)和流动相流速(0.3 mL/min, 0.4 mL/min 和 0.5 mL/min)等, 最终优化所得最佳的分析条件是: 流动相为 0.01% 甲酸+H₂O(A), 乙腈(B); 洗脱程序为 0~4.0 min, 35%~55% B; 4.0~5.0 min, 55%~35% B; 流速为 0.4 mL/min, 进样量为 1.0 μL, 色谱柱温度为 40 ℃.

2.2 类柠檬苦素化合物的定性分析

通过 UPLC-Q-TOF-MS 系统, 7 种柑橘种子中类柠檬苦素的分布得到确定. 本实验中, 各样品色谱峰分离情况良好. 所有样品中均出现柠檬苦素、诺米林和奥巴叩酮的相应色谱峰(图 1). 通过与标准品保留时间和 MS^E 质谱数据(表 1 和图 2)比较, 柑橘种子中 3 种类柠檬苦素得以确定. 柠檬苦素、诺米林和奥巴叩酮分别在 2.38, 2.85 和 3.47 min 按洗脱顺序出峰. 准确的分子质量在正离子模式下, 由分子离子峰 [M+H]⁺ 和加 Na 峰 [M+Na]⁺ 确定, 化合物分子结构由准分子离子和断裂产生的碎片离子确定.

为研究 3 种类柠檬苦素碎片离子裂解规律, 在正离子 ESI 模式下进行 MS^E 扫描(图 2). 在高能状态下所有碎片离子均能出现(表 1). 柠檬苦素在正离子模式下进行 MS^E 扫描, 出现双分子离子峰 [2M+1]⁺ 为 m/z 941.395 6. 正离子模式下特征碎片离子 m/z 427.209 9, 由准分子离子 [M+H]⁺ 丢失 CO₂ (44Da) 得到. 准分子离子丢失 H₂O (18Da) 和 CO (28Da) 得到碎片离子 m/z 425.196 0. 同样, 奥巴叩酮在正离子模式下, 准分子离子 [M+H]⁺ 丢失 CO₂ (44Da) 得到碎片离子 m/z 411.216 1. 准分子离子丢失 H₂O (18Da) 和 CO (28Da) 得到碎片离子 m/z 409.201 4. 实验结果中, 柠檬苦素和奥巴叩酮的质谱信息与裂解规律与

之前报道相吻合^[23,28-29]。因诺米林详细的质谱裂解途径尚未被报道,本实验基于正离子模式下高能状态碎片离子,对诺米林可能的质谱裂解途径加以讨论。

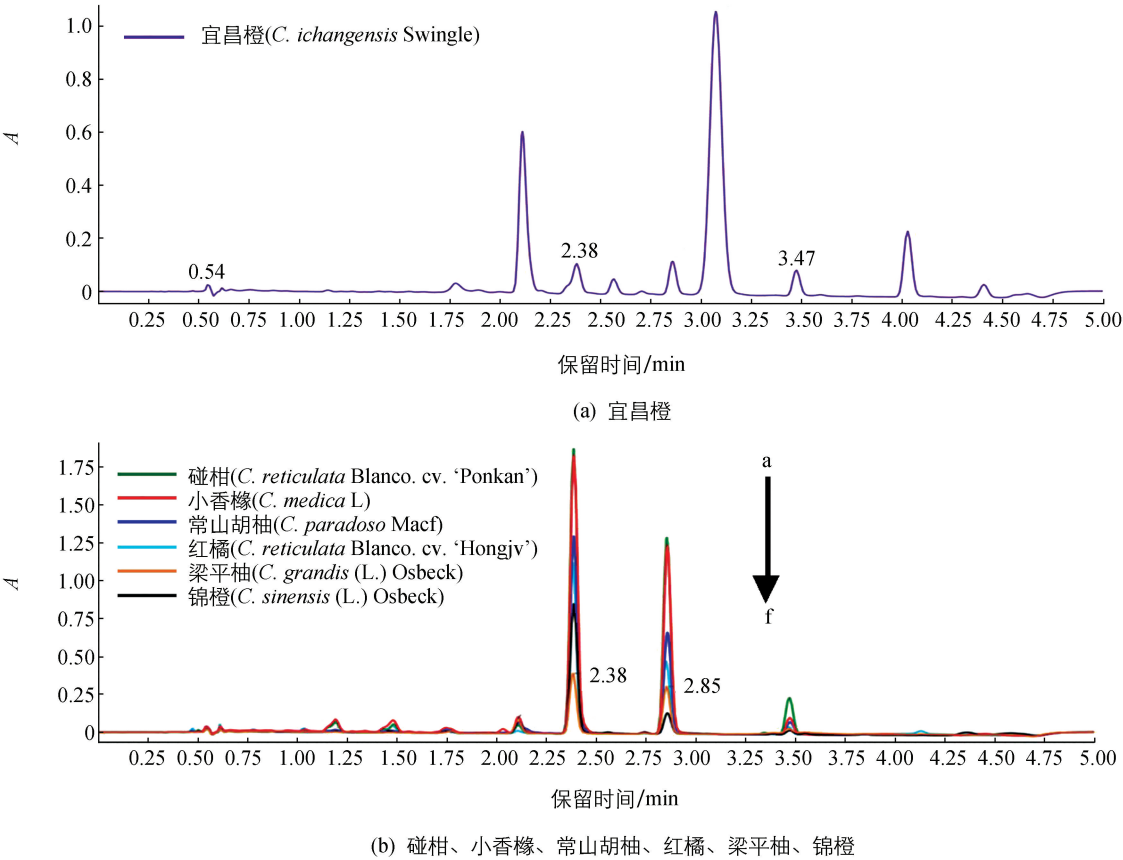


图 1 UPLC 色谱图

表 1 诺米林、奥巴卅酮和柠檬苦素 UPLC-PDA-ESI-MS^E 数据

类柠檬苦素	保留时间/ min	分子式	准分子离子峰[M+H] ⁺	特 征 碎 片/ %
柠檬苦素	2.38	C ₂₆ H ₃₁ O ₈	471.200 4 (−1.42)	941.396 0(100), 453.190 6(3.86), 435.180 2(2.73), 427.209 9(8.33), 425.196 0(27.5), 409.200 4(5.12), 407.184 9(3.12), 367.190 7(5.28), 339.194 9(3.22), 161.059 1(18.61)
诺米林	2.85	C ₂₈ H ₃₅ O ₉	515.230 7 −1.02	487.231 8(57.9), 471.236 6(12.3), 469.222 3(27.8), 455.206 7(23.4), 437.196 0(19.3), 427.211 6(17.5), 419.185 9(12.9), 411.215 4(32.0), 409.201 0(15.8), 393.206 0(21.7), 391.190 5(14.1), 375.195 1(8.71), 373.179 8(5.69), 349.180 2(14.1), 161.059 1(56.2)
奥巴卅酮	3.47	C ₂₆ H ₃₁ O ₇	455.205 8 −0.08	437.196 0(15.4), 427.211 8(34.6), 419.185 5(8.08), 411.216 1(18.6), 409.201 8(34.6), 393.205 9(13.2), 391.190 3(10.2), 375.194 9(5.17), 349.143 3(8.50), 331.188 1(10.1), 321.148 7(5.23), 161.059 1(30.1)

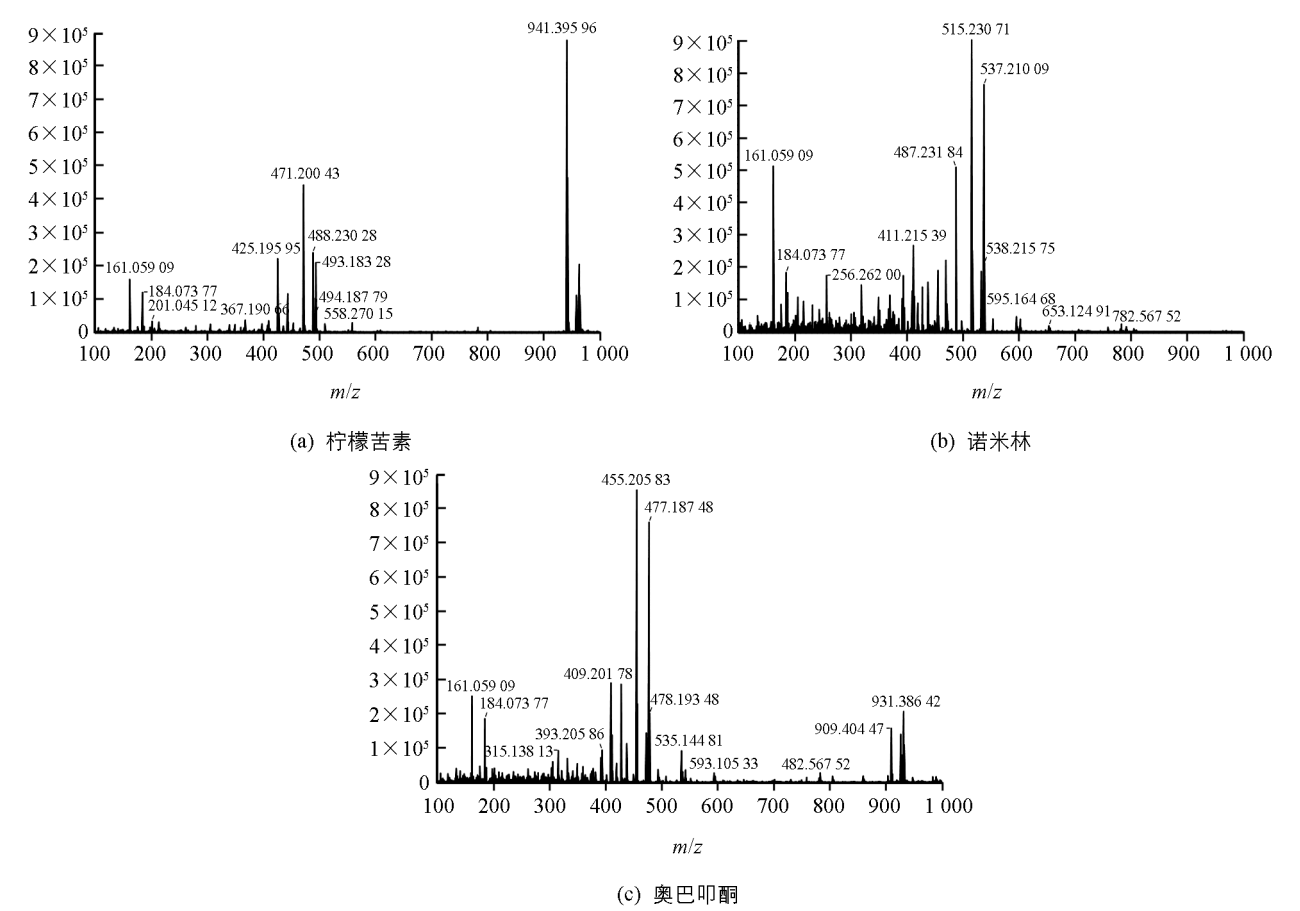


图 2 MS^E 质谱图

在正离子模式下诺米林出现较强碎片离子峰 m/z 487.232 9, 由准分子离子 $[M+H]^+$ m/z 515.228 0 丢失 CO(28Da) 形成. 碎片离子 $[M+H-CO]^+$ 进一步失去 H_2O (18Da) 形成 m/z 为 469.222 3 的碎片离子. 准分子离子失去 CH_3COOH (60Da) 形成同奥巴叩酮分子离子质荷比 455.206 7 相一致的碎片离子. 诺米林在 高能碰撞轰击下, 主要丢失 H_2O 、CO、 CO_2 和 CH_3COOH 等中性碎片. 由于结构相近, 3 种类柠檬苦素的质谱裂解途径表现出极大的相似性. 此外, 3 种类柠檬苦素都出现碎片离子峰 m/z 161.06, 并在高能状态下表现出较高强度, 是呋喃环连接着内酯环断裂后留下的残基. MS/MS 结果显示, CH_3COOH (60Da) 的丢失可能是因为发生了 McLafferty 重排. 化学键的断裂失去 H_2O (18Da), CO(28Da) 和 CO_2 (44Da), 主要发生在内酯环上. 在 UPLC-Q-TOF-MS 系统中, 正离子 ESI 模式下, 诺米林的质谱裂解途径见图 3.

2.3 方法学考察

利用 UPLC-PDA 检测器建立了一种定量测定柑橘种子中柠檬苦素、诺米林和奥巴叩酮的方法. 方法学考察结果见表 2 和表 3. 日内标准偏差与日间标准偏差的 RSD 分别低于 2.2%, 0.84%. 诺米林、奥巴叩酮和柠檬苦素的加标回收率分别为 95.71%, 104.9% 和 107.7%. 对应的 RSD 分别为 0.56%, 0.62% 和 0.95%. 柠檬苦素、诺米林和奥巴叩酮的检出限(LOD)分别为 3.0 mg/mL, 3.0 mg/mL 和 0.5 mg/mL, 而相应的定量限(LOQ)分别为 5.0 mg/mL, 8.0 mg/mL 和 1.0 mg/mL. 3 种类柠檬苦素回归方程的相关系数(R^2)均优于 0.998 6, 说明 3 种类柠檬苦素化合物线性关系良好. 结果表明该分析方法准确可靠.

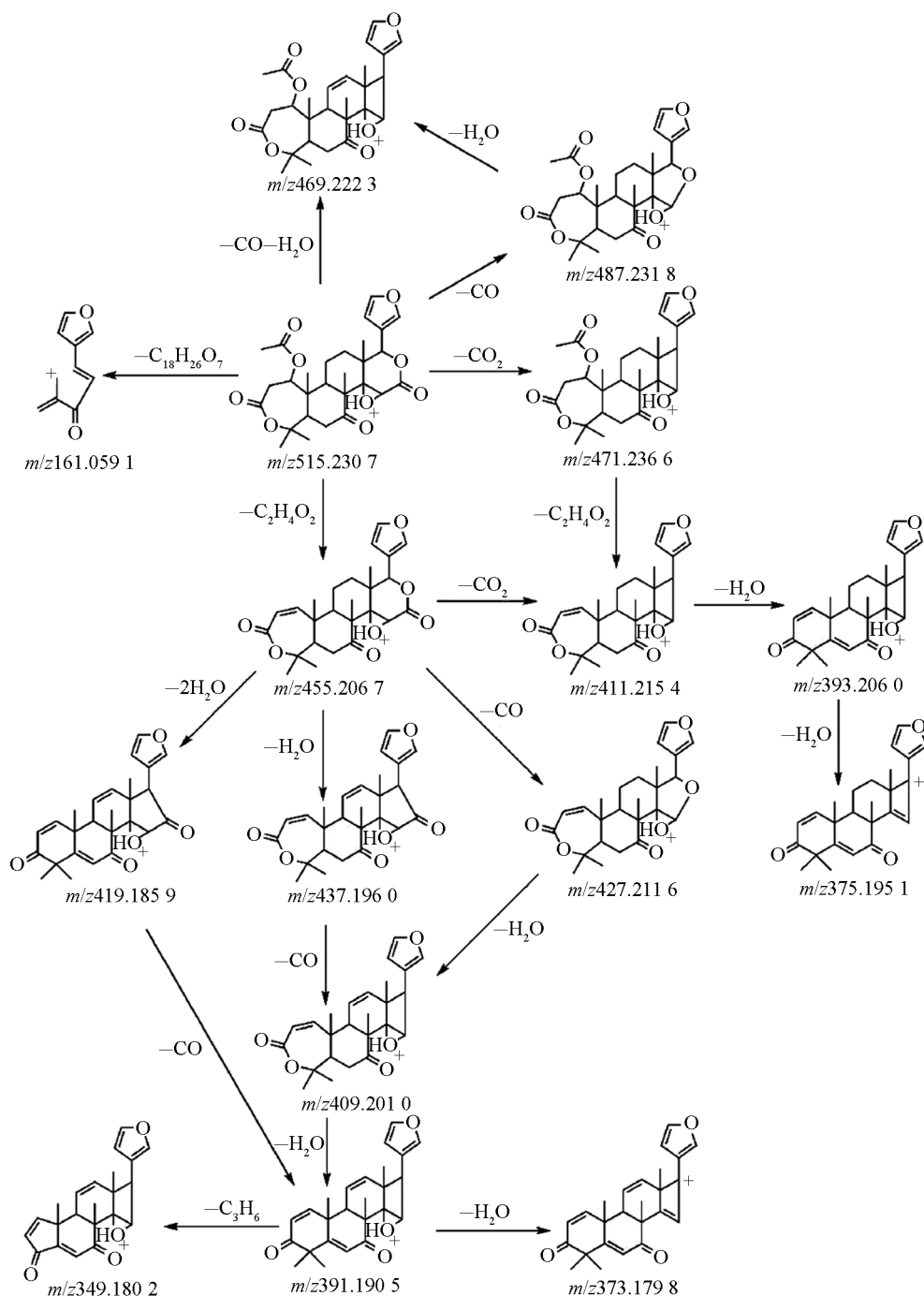


图 3 诺米林的质谱裂解途径

表 2 分析方法方法学考察结果

类柠檬苦素	重复性		回收率	
	日间 RSD/%(<i>n</i> = 3)	日内 RSD/%(<i>n</i> = 6)	Mean%(<i>n</i> = 6)	RSD%(<i>n</i> = 6)
柠檬苦素	0.40	0.69	107.7	0.95
诺米林	0.56	1.1	95.71	0.56
奥巴叩酮	0.84	2.2	104.9	0.62

表 3 标准品线性关系

类柠檬苦素	线性范围/ (mg · mL ⁻¹)	线性方程	相关系数 R ²	检测限/ (mg · mL ⁻¹)	定量限/ (mg · mL ⁻¹)
柠檬苦素	100~5 000	Y=115 000+1 470.x	0.998 6	3	5
诺米林	50~2 500	Y=-5 580+1 550.x	0.999 9	3	8
奥巴叩酮	10~500	Y=8 540+4 830.x	0.999 8	0.5	1

2.4 类柠檬苦素化合物定量分析

研究结果显示 3 种类柠檬苦素分布在 7 种柑橘种子中. 结合标准品的标准曲线(表 3)对柑橘种子中类柠檬苦素的质量比进行测定(表 4), 在 7 种柑橘种子中, 柠檬苦素质量比最高, 其次是诺米林, 奥巴叩酮质量比最低. 柠檬苦素质量比变化范围为 165.57 $\mu\text{g/g}$ (YCC)~257 8.8 $\mu\text{g/g}$ (PK). 诺米林质量比变化范围为 164.97 $\mu\text{g/g}$ (YCC)~1 691.8 $\mu\text{g/g}$ (PK). 奥巴叩酮质量比变化范围为 10.752 $\mu\text{g/g}$ (JC)~108.09 $\mu\text{g/g}$ (PK). 在 7 种柑橘品种中, 椪柑种子中柠檬苦素、诺米林、奥巴叩酮质量比均为最高. 而锦橙种子中奥巴叩酮质量比最低, 宜昌橙种子中柠檬苦素和诺米林质量比最低.

表 4 诺米林、奥巴叩酮、柠檬苦素在不同柑橘中的质量比($n=3$) $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$

化合物	椪柑	小香檬	常山胡柚	红橘	锦橙	梁平柚	宜昌橙
柠檬苦素	2 578.8±162.9	1 845.7±443.6	1 621.8±171.9	1 086.5±253.0	1 065.9±49.9	524.12±31.3	165.57±9.9
诺米林	1 691.8±123.4	1 290.4±232.1	877.99±90.9	508.40±96.0	193.38±18.0	441.38±18.5	164.97±8.1
奥巴叩酮	108.09±9.5	36.355±8.6	34.961±3.7	18.723±5.4	10.752±0.4	15.301±5.1	40.922±2.2

宜昌橙中类柠檬苦素化合物的质量比和分布与其他 6 种柑橘品种相比, 表现出其差异具有统计学意义. 6 种柑橘种子中类柠檬苦素化合物的 UPLC 图谱有着一定的相似性(图 1). 事实上, 种子中类柠檬苦素化合物至少通过 4 种独立的生物合成途径, 如柠檬苦素途径、卡拉敏途径、宜昌根辛途径和 7-醋酸酯类柠檬苦素途径等^[30]. 柠檬苦素途径存在于所有柑橘品种中. 而宜昌根辛途径只存在于 *Citrus ichangensis* 种的植物品种及其杂交种的植物中^[31]. 拥有该生物合成途径的植物组织中, 去乙酰基诺米林和去乙酰基诺米林酸含量较高^[4]. 作为一类分类学标记物, 类柠檬苦素化合物广泛地存在于柑橘及其相近品种中, 并表现出品种自身独有的分布特点^[26]. 类柠檬苦素化合物的含量和分布的差异, 揭示了植物本身遗传机制的不同. 因为遗传的稳定性, 分析这类化合物, 可以推测出柑橘杂交种的亲本. 而且分析柑橘以外的柑桔属植物的类柠檬苦素化合物, 对筛选优良柑橘及其有杂交可能的植物和培育新品种具有重大意义. 类柠檬苦素化合物的分析也可以为新品种的分类命名提供重要依据, 并且能够对现有的分类方法进行评价. 本研究中, 7 种柑橘种子的 UPLC 图谱显示宜昌橙与其他 6 种柑橘存在明显的差异, 再次证明了类柠檬苦素化合物是一类很好的分类学标记物.

3 结 论

本研究基于 UPLC-Q-TOF-MS 优化出一种新的柑橘中类柠檬苦素化合物的定性定量检测方法, 3 种类柠檬苦素化合物在 5 min 之内得到有效分离, 测定了 7 个不同品种柑橘种子中 3 种类柠檬苦素化合物的质量比, 为商业检测标准提供了依据; 得出 3 种物质 ESI-Q-TOF-MS 碎片离子规律, 通过与标准品比较, 7

种柑橘种子中 3 种类柠檬苦素化合物得到鉴别;首次研究诺米林 ESI-Q-TOF-MS 质谱裂解途径;通过比较类柠檬苦素化合物的含量及分布,再次证明类柠檬苦素化合物可作为柑橘属植物分类学标记物,为柑橘品种选育提供依据.

参考文献:

- [1] ROY A, SARAF S. Limonoids: Overview of Significant Bioactive Triterpenes Distributed in Plants Kingdom [J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2006, 29(2): 191—201.
- [2] da SILVA V P, OLIVEIRA R R, FIGUEIREDO M R. Isolation of Limonoids from Seeds of *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae) by High-Speed Countercurrent Chromatography [J]. Phytochemical Analysis, 2009, 20(1): 77—81.
- [3] MANNERS G D. Citrus Limonoids: Analysis, Bioactivity, and Biomedical Prospects [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2007, 55(21): 8285—8294.
- [4] HASEGAWA S, MIYAKE M. Biochemistry and Biological Functions of Citrus Limonoids [J]. Food Reviews International, 1996, 12(4): 413—435.
- [5] MILLER E G, PORTER J L, BINNIE W H, et al. Further Studies on the Anticancer Activity of Citrus Limonoids [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(15): 4908—4912.
- [6] YU J, WANG L M, WALZEM R L, et al. Antioxidant Activity of Citrus Limonoids, Flavonoids, and Coumarins [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2005, 53(6): 2009—2014.
- [7] GUALDANI R, CAVALLUZZI M M, LENTINI G, et al. The Chemistry and Pharmacology of Citrus Limonoids [J]. Molecules, 2016, 21(11): E1530—1—E1530—39.
- [8] BATTINELLI L, MENGONI F, LICHTNER M, et al. Effect of Limonin and Nomilin on HIV-1 Replication on Infected Human Mononuclear Cells [J]. Planta Medica, 2003, 69(10): 910—913.
- [9] BILAL H, AKRAM W, ALI-HASSAN S. Larvicidal Activity of Citrus Limonoids against *Aedes albopictus* Larvae [J]. Journal of Arthropod-Borne Diseases, 2012, 6(2): 104—111.
- [10] CHEN J J, LI S J, XU J, et al. Concentration and Distribution of Main Bitter Compounds in Fruit tissues of ‘Oroblanco’ (*Citrus grandis* L. × *Citrus paradisi* Macf.) [J]. Scientia Horticulturae, 2015, 193: 84—89.
- [11] TIAN Q, MILLER E G, AHMAD H, et al. Differential Inhibition of Human Cancer Cell Proliferation by Citrus Limonoids [J]. Nutrition and Cancer, 2001, 40(2): 180—184.
- [12] PATIL B S, JAYAPRAKASHA G K, CHIDAMBARA MURTHY K N, et al. Bioactive Compounds: Historical Perspectives, Opportunities, and Challenges [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(18): 8142—8160.
- [13] MAIER V P, GRANT E R. Specific Thin-Layer Chromatography Assay of Limonin, a Citrus Bitter Principle [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1970, 18(2): 250—252.
- [14] ROUSEFF R L, FISHER J F. Determination of Limonin and Related Limonoids in Citrus Juices by High Performance Liquid Chromatography [J]. Analytical Chemistry, 1980, 52(8): 1228—1233.
- [15] VIKRAM A, JAYAPRAKASHA G K, PATIL B S. Simultaneous Determination of Citrus Limonoid Aglycones and Glucosides by High Performance Liquid Chromatography [J]. Analytica Chimica Acta, 2007, 590(2): 180—186.
- [16] LI P L, LIU M H, HU J H, et al. Systematic Chemical Profiling of *Citrus grandis* ‘Tomentosa’ by Ultra-Fast Liquid Chromatography/Diode-Array Detector/Quadrupole Time-of-Flight Tandem Mass Spectrometry [J]. Journal of Pharma-

ceutical and Biomedical Analysis, 2014, 90: 167—179.

[17] AVULA B, SAGI S, WANG Y H, et al. Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry Analysis of Limonoids and Flavonoids in Seeds of Grapefruits, Other Citrus Species, and Dietary Supplements [J]. *Planta Medica*, 2016, 82(11/12): 1058—1069.

[18] 赵希娟, 赵无疾, 许华超. 超高效液相色谱-四级杆飞行时间质谱结合 Progenesis QI 分析不同品种橙的指纹图谱及其差异性代谢物 [J]. *中国农业科学*, 2018, 51(13): 2551—2560.

[19] SWARTZ M E. UPLCTM: An Introduction and Review [J]. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 2005, 28(7—8): 1253—1263.

[20] GUILLARME D, RUTA J, RUDAZ S, et al. New Trends in Fast and High-Resolution Liquid Chromatography: a Critical Comparison of Existing Approaches [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, 397(3): 1069—1082.

[21] 王景富, 王静霞, 滕云, 等. 药食两用植物酸模萸醌类成分含量测定研究 [J]. *西南大学学报(自然科学版)*, 2017, 39(4): 199—204.

[22] YANG Y, ZHAO X J, PAN Y, et al. Identification of the Chemical Compositions of Ponkan Peel by Ultra Performance Liquid Chromatography Coupled with Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry [J]. *Analytical Methods*, 2016, 8(4): 893—903.

[23] REN W, LI Y, ZUO R, et al. Species-Related Difference Between Limonin and Obacunone Among Five Liver Microsomes and Zebrafish Using Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Coupled with a LTQ-Orbitrap Mass Spectrometer [J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2014, 28(21): 2292—2300.

[24] ISHII T, OHTA H, NOGATA Y, et al. Limonoids in Seeds of Iyo Tangor (*Citrus iyo hort. ex Tanaka*) [J]. *Food Science and Technology Research*, 2003, 9(2): 162—164.

[25] SUN C D, CHEN K S, CHEN Y, et al. Contents and Antioxidant Capacity of Limonin and Nomilin in Different Tissues of Citrus Fruit of Four Cultivars During Fruit Growth and Maturation [J]. *Food Chemistry*, 2005, 93(4): 599—605.

[26] WANG F S, YU X H, LIU X N, et al. Temporal and Spatial Variations on Accumulation of Nomilin and Limonin in the Pummelos [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2016, 106: 23—29.

[27] TIAN Q G, DING X L. Screening for Limonoid Glucosides in Citrus Tangerina (Tanaka) Tseng by High-Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2000, 874(1): 13—19.

[28] TIAN Q G, SCHWARTZ S J. Mass Spectrometry and Tandem Mass Spectrometry of Citrus Limonoids [J]. *Analytical Chemistry*, 2003, 75(20): 5451—5460.

[29] JAYAPRAKASHA G K, DANDEKAR D V, TICHY S E, et al. Simultaneous Separation and Identification of Limonoids from Citrus Using Liquid Chromatography-Collision-Induced Dissociation Mass Spectra [J]. *Journal of Separation Science*, 2011, 34(1): 2—10.

[30] CAI H H, FUMIO H. The Prospect and Current Studies on the Limonoids in Citrus [J]. *Acta Botanica Sinica*, 1996, 38(4): 328—336.

[31] HERMAN Z, HASEGAWA S, FONG C H, et al. Limonoids in Citrus ichangensis [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1989, 37(4): 850—851.

Analysis of Limonoids in Citrus Seeds and Their Fragmentation Pathways

——A New Method Based on UPLC-Q-TOF-MS

ZHAO Xi-juan¹, LIU Qing-qiao¹, XING Tian-tian²

1. School of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: Citrus seeds have high contents of limonoids, which has been reported to show multiple bioactivities. In this work, an optimized method based on UPLC-Q-TOF-MS was applied to the separation and identification of nomilin, obacunone and limonin in citrus seeds of seven cultivars. The separation was achieved within 5 min with the column temperature set at 40 °C, the flowing rate 0.4 mL/min and the injection volume 1.0 mL. The binary mobile phases consisted of 0.01% formic acid (A) and acetonitrile (B). The gradient elution was as follows: 0–4 min, linear from 35% to 55% B; 4–5 min, from 55% to 35% B for washing and equilibration of the column. Nomilin, obacunone and limonin were identified by comparing the retention time and mass spectral fragmentation with the reference standards. The MS/MS fragmentation patterns of the three limonoids were investigated, and the fragmentation pathway of nomilin was proposed for the first time. In addition, the contents of the three limonoids in the seven different citrus seeds were determined by UPLC-PDA detector. The results showed the limonoids to be excellent taxonomic markers in citrus cultivars.

Key words: citrus seed; limonoid; nomilin; fragmentation pathway

责任编辑 潘春燕