



论文

多组学联合解析干制和陈化对广陈皮代谢品质的影响

周晗昕^{1,2,3†}, 刘园^{1,2†}, 袁子彧^{1,2}, 曾继吾⁴, 肖雪⁵, 陈嘉景^{1,2}, 朱安婷^{6*}, 徐娟^{1,2*}

1. 华中农业大学园艺林学学院, 果蔬园艺作物种质创新与利用全国重点实验室, 武汉 430070

2. 湖北洪山实验室, 武汉 430070

3. 江苏省农业技术推广总站, 南京 210036

4. 广东省农业科学院果树研究所, 广州 510640

5. 贵州师范大学分析测试中心, 贵阳 550001

6. 湖北大学生命科学学院, 湖北省环境微生物技术中心, 生物催化与酶工程国家重点实验室, 武汉 430062

† 同等贡献

* 联系人: E-mail: antingzhu@hubu.edu.cn; xujuan@mail.hzau.edu.cn

收稿日期: 2024-11-24; 接受日期: 2025-01-10; 网络版发表日期: 2025-05-13

国家重点研发计划(批准号: 2021YFD1600102)、湖北省重点研发计划(批准号: 2021BBA237)和华中农业大学自主科技创新基金(批准号: 2662022YQLQD001)资助

摘要 陈皮(*Citri Reticulatae Pericarpium*)由橘(*Citrus reticulata* Blanco)及其变种的干燥果皮制成, 其中茶枝柑(*Citrus reticulata* ‘Chachiensis’)制得的广陈皮(Guangchenpi)是知名中药材. 本研究结合气相色谱-质谱联用、液相色谱-质谱/质谱联用与网络药理学等技术, 探究干制和陈化对广陈皮代谢品质的影响, 并挖掘其潜在药用活性物质. 在茶枝柑及广陈皮样品中鉴定到6种初生代谢物和518种苯丙烷类代谢物, 其中28种为中药活性成分, 如槲皮素-7-O-鼠李糖苷、3',4,7-三羟基黄酮等; 34种为主要抗病药理活性成分, 如秦皮甲素、欧前胡素等. 干制后, 169种物质含量显著上调. 陈化过程中, 代谢物种类增加, 且黄酮-C-葡萄糖苷、3',4,7-三羟基黄酮等代谢物含量随陈化时间延长而显著升高. 干制及陈化过程中生物活性成分经历结构修饰, 干制后多种类黄酮发生葡萄糖苷降解和鼠李糖苷合成, 陈化则以氧甲基化为主. 本研究为广陈皮陈化机理提供数据基础, 诠释“陈久者良”的特性, 并为其高效开发利用提供理论支撑.

关键词 茶枝柑, 广陈皮, 代谢物, 干制, 陈化, 代谢品质

广陈皮(Guangchenpi, GCP), 由广东江门新会地区(核心区)栽培的茶枝柑(*Citrus reticulata* ‘Chachiensis’)果皮制备, 因其丰富的营养价值和独特的功能特性而备受推崇, 以调气、健脾、化痰和缓解咳嗽等功效著称. 广陈皮制备过程包括采摘、洗果、开皮、晒制等

步骤. 主要使用三刀法开皮以保持果皮完整性; 晒制步骤则遵循翻晒四天、避开露水时间收取的原则^[1]. 完整的干制过程应先将茶枝柑新鲜果皮置于阴凉通风处放置4~5 h, 待果皮变软后将其反面朝上, 然后将其放置于自然光下晒制, 以促使水分进一步蒸发, 直至果

引用格式: 周晗昕, 刘园, 袁子彧, 等. 多组学联合解析干制和陈化对广陈皮代谢品质的影响. 中国科学: 生命科学, 2025, 55: 1288–1305

Zhou H-X, Liu Y, Yuan Z-Y, et al. Multi-omics joint analysis of the effects of drying and aging on the metabolic quality of Guangchenpi (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2025, 55: 1288–1305, doi: 10.1360/SSV-2024-0276

皮完全干燥^[2]。广陈皮的陈化方式则主要分为自然陈化和人为干预的加速陈化两种^[3]，目前自然陈化仍然是使用最为广泛的经典陈化方式，主要遵循“离墙、离顶、离地”的原则，在温度低于30℃、相对湿度低于60%的环境中至少陈放三年方可为陈皮^[4]。现有研究表明，陈皮的代谢和药用品质与其陈化时间密切相关^[5,6]，为“陈久者良”提供科学依据。在陈化过程中，广陈皮会发生美拉德反应，导致其颜色加深，其中，5-羟甲基糠醛被认为是广陈皮陈化过程中美拉德反应的重要指标成分^[7]。此外，该研究还发现，广陈皮陈化过程中聚甲氧基黄酮(polymethoxyflavones, PMFs)的相对含量显著上升，而柠檬苦素和生物碱的相对含量则相应下降^[7]。然而，广陈皮的代谢物种类繁多，目前对其陈化过程中代谢品质的分析仍显不足。广陈皮中富含类黄酮、香豆素和酚酸等多种化合物，其代谢品质的深入研究亟待加强。此外，以往的研究主要关注不同陈皮品种之间或者不同成熟度茶枝柑的差异，鲜见关于干制过程对广陈皮代谢品质影响的研究。

柑橘的初生代谢物主要含有葡萄糖、果糖、蔗糖等可溶性糖，柠檬酸、苹果酸等有机酸，以及天冬氨酸、天冬酰胺、丝氨酸、谷氨酸、脯氨酸等游离氨基酸，这些初生代谢物的组成影响柑橘的口感滋味。在茶枝柑果肉中，蔗糖、果糖和葡萄糖是主要的可溶性糖，柠檬酸是主要的有机酸成分。探究柑橘滋味品质相关代谢物的研究多针对柑橘果肉组织、果汁或柑橘类茶饮产品，针对果皮的研究相对较少。苯丙烷类化合物是植物次生代谢产物的重要成分之一，包括类黄酮、酚酸和香豆素等物质，具有多种生物学活性。广陈皮中的类黄酮主要包括黄酮和PMFs，其中PMFs含量是广陈皮抗氧化活性的决定性指标^[8]。橙皮苷、川陈皮素和橘皮素是《中国药典》(2020)中陈皮的指示性成分。已有研究证明随陈化年限的增加，橙皮苷的含量会逐渐降低^[9]，而川陈皮素和橘皮素含量的变化模式仍不清楚。有研究认为这两种物质在陈化早期阶段(0~3年)增加，随后稳定在一定水平，超过10年后又逐渐降低^[10]。也有报道认为陈皮中川陈皮素和橘皮素的含量不随陈放时间而变化^[11]。酚酸是一类含有酚环和羧基的化合物，具有抗氧化、抗肿瘤、抗血栓形成和抑制神经炎症反应等特性^[12]。研究表明，随着茶枝柑采收时间的后延，广陈皮中总酚和酚酸类物质含量逐渐减少^[13]。香豆素则是一类广泛分布于多种药用植物

的化合物，具有抗糖尿病、抗氧化、肝保护、抗真菌、抗炎等多种生物活性^[14,15]。先前的研究报道已对多种柑橘种质中的呋喃香豆素类物质进行分析^[16]，然而，对于茶枝柑和广陈皮的香豆素组成尚不明晰。

植物特殊代谢物(plant specialized metabolites)，如类黄酮、酚酸等苯丙烷类物质，可通过酰化、糖基化、羟基化、异戊烯化、甲基化等化学修饰衍生出多种多样的化合物。类黄酮是陈皮中主要的活性成分，羟基化、甲基化和糖基化等修饰可影响其代谢特征和感官特性，而C-糖基化、甲氧基化、B环羟基化等修饰则可以改变类黄酮的生物利用度和药理特性^[17]。研究人员发现广陈皮中的物质成分或结构会随着陈化时间的延长发生变化，如橙浸膏和圣草酚在陈化5年和10年的广陈皮中被检测到，其含量在第10年急剧增加，而后缓慢下降^[18]。此外，化合物在干制或陈化过程中发生的基团转换、电荷分布改变、立体结构等构效关系变化也是决定其生物学活性的关键因素。代谢组学技术已广泛应用于植物学、微生物学、毒理学、药物开发等领域，通常将核磁共振或质谱与毛细管电泳、气相色谱和液相色谱等上游分离技术相结合，在研究不同生长发育期果实来源陈皮的化学成分以及陈皮品种的鉴定中已有相关应用^[19]。广泛靶向代谢组学具有全面表征化学成分的优势，不依赖于参考化合物，鉴定物质多、定性定量准确、动态范围宽、灵敏度高、重复性好，已被成功用于构建柑橘果实代谢物数据库^[20]。前期针对不同陈化年份广陈皮中常见酚类和挥发性物质等次生代谢物的分析大多采用传统的靶向代谢组学检测技术^[9,19,21]，而针对茶枝柑干制/陈化前后苯丙烷代谢物变化的全面鉴定和比较分析尚未见报道。此外，网络药理学是用于鉴定中药制剂或植物中基础活性成分和其可能分子靶标的方法。现在普遍采用代谢组学和网络药理学相结合的方法来准确诊断生物标志物。

加工过程中的酶促和非酶促化学转变或结构修饰可导致食品的代谢物动态变化，而干燥陈化的陈皮中也可能存在酶促和非酶促代谢变化^[22]。美拉德反应是非酶促反应，广泛发生在中草药和食物的加工与储存过程中，与食品风味、颜色、健康益处和安全性密切相关^[23]。多酚类物质作为调节剂参与美拉德反应，显著影响加工食品的风味和颜色，并降低有害物质含量^[24]。广陈皮陈化过程中同样存在美拉德反应^[21]，其干制和陈化中重要代谢物结构修饰的变化模式值得深

入探讨。此外,微生物群落的组成同样会影响陈皮的代谢品质。陈皮表面定殖的微生物主要包括真菌和细菌,曲霉菌可能是导致不同陈化年份间陈皮活性差异的主要真菌,细菌如芽孢杆菌属、乳球菌属、假单胞菌属等在陈皮中丰度相对较高^[25]。部分研究认为不同陈化年份陈皮中细菌的种类和丰度相对于真菌更加稳定^[26]。鉴于此,广陈皮和新鲜茶枝柑果皮的定殖微生物及其动态变化值得深入研究。

本研究拟利用广靶代谢组学的优势,对广陈皮干制及陈化过程中代谢物的含量及结构变化进行系统性表征分析,进一步结合网络药理学方法,利用中药系统药理学数据库(traditional Chinese medicine systems pharmacology database, TCMSP, <http://tcmsp.com/tcmssp.php>)筛选广陈皮的关键活性代谢物。并利用微生物宏基因组测序的方法解析广陈皮的微生物群落变化,挖掘微生物定殖对于广陈皮代谢品质变化的潜在作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究中的4份材料,分别为茶枝柑新鲜果皮和3个不同陈化年份的广陈皮(GCP)样品。新鲜果皮来自广东省江门市新会区花后240 d的“大种油身”茶枝柑成熟期果实(PCRC,大红袍期),GCP的陈化时间分别为3年(GCP3)、5年(GCP5)和8年(GCP8),均购自新会市政府指定的新会陈皮产业园丽宫公司。广陈皮的制备遵循《中国药典》(2020)中的相关标准,各年份陈皮干制流程和陈化流程相同,仅陈化时间存在差异,排除生长环境、干制方法和贮存环境的差异因素。所有样品均经广陈皮(真伪)鉴定试剂盒(华中农业大学&Big Fish研制)鉴定为真实广陈皮。茶枝柑新鲜果皮用液氮处理后储存在-80℃冰箱中,广陈皮样品储存在相对干燥和凉爽的环境中,平均含水量为9.24%^[21]。

经外观品质筛选后得到大小均一、外观相似、无缺片的茶枝柑果实和3个不同陈化年份广陈皮完整皮各30个,随机分为三个生物学重复用于初生代谢物测定、次生代谢物测定以及微生物群落多样性测序。

1.2 实验方法

1.2.1 代谢物分析及微生物分析的样品制备流程

(1) 用于陈皮初生代谢物分析的样品制备。参考

Sheng等人^[27],将茶枝柑果皮和广陈皮样品冷冻干燥后研磨成粉末。取0.15 g干样,加入3 mL含0.2 mg/mL核糖醇内标的甲醇溶液后进行4℃超声处理40 min,70℃水浴孵育15 min,冷凝离心。取100 μL上清液进行衍生化,加入80 μL含20 mg/mL盐酸甲氧胺的吡啶后于37℃孵育90 min,样品经0.22 μm微孔滤膜过滤后保存等待上样。

(2) 用于陈皮次生代谢物分析的样品制备。样品制备方法在Peng等人^[28]的基础上稍有改动。对于定性分析,样品首先在真空冷冻干燥仪中冻干并研磨成粉末;其次,称取50 mg样品粉末加入到含有0.5 mL 70%甲醇的离心管中,涡旋仪震荡均匀后于超声萃取仪中超声20 min;最后,提取产物在4℃,13523×g条件下离心10 min,取上清液经0.22 μm微孔滤膜过滤入进样瓶,于-80℃下保存待上样。将各样品提取物等比例混合,制得含所有样品的混合样品。对于定量分析,将50 mg样品粉末加入到0.5 mL含0.4%内标物(阿昔洛韦和罗红霉素,各0.1 mg/L)的70%甲醇中混合,25℃下涡旋混匀,超声提取20 min,并于4℃,13523×g条件下离心30 min,上清液通过0.22 μm微孔滤膜过滤,等待上样。

1.2.2 气相色谱质谱联用(GC-MS)分析初生代谢物

参照陈嘉景等人^[29]的方法,采用DB-5MS毛细管柱(5%苯基/甲基聚硅氧烷,30 m×0.25 mm×0.25 μm,Agilent Technologies,美国),离子源(70 eV),传输线温度280℃;离子源温度260℃,质量扫描范围45~650 m/z,载气为高纯氦气(99.999%),载气流量1 mL/min,分流比10:1,进样量1 μL。根据计算机质谱数据库NIST17对样本的代谢物进行质谱定性,根据内标响应值进行定量。

1.2.3 液相色谱-质谱联用(LC-MS/MS)分析

参照相关文献^[30,31]与LC-ESI-MS/MS系统(ExionLCAD, 6500+ QTrap; AB SCIEX, 美国)相结合进行广陈皮的广靶代谢组学分析。使用色谱柱(Accucore C₁₈, 150 mm×2.1 mm, Thermo Fisher Scientific, 美国)分离各组分。流动相为0.04%乙酸水溶液(缓冲液A)和含0.04%乙酸的乙腈溶液(缓冲液B)。流速设定为0.35 mL/min,并使用以下梯度程序:0 min, 2% B; 13 min, 95% B; 14.5 min, 95% B; 14.6 min, 2% B; 18 min, 2% B。进样体积为1 μL,自动进样器的温度设定为

12℃, 柱温设定为40℃.

代谢物定性参照Chen等人^[32], 在正离子和负离子模式下使用分步多离子监测增强产物离子来构建MS2T库. 为便于鉴定代谢物, 使用Ultimate 3000 Nano液相色谱仪和Thermo Q Exactive Plus Orbitrap质谱仪(Thermo Fisher Scientific)获得大多数前体离子的精确m/z值. 结合实验室现有类黄酮标准品数据(网络版附表1)、前人自建的代谢物数据库^[30,33]和以mzCloud为主的开放代谢物数据库(经验库)进行建库, 根据保留时间、一级和二级质谱数据进行代谢物注释. 分析过程中需对干扰信号进行排除, 包括K⁺, Na⁺和NH₄⁺离子的重复信号、同位素信号和片段离子的重复信号. 在

参照自建库数据的同时, 使用CD软件工具(算法库)包括MS-FINDER^[34]和SIRIUS^[35]进行代谢物结构分析(图1).

代谢物定量使用三重四级杆质谱(triple quadrupole, QQQ)的多反应监测模式(multiple reaction monitoring, MRM)进行. 首先需从目标化合物的全扫描质谱图谱中找到丰度最高且具有代表性的分子离子或特征碎片离子. 对每个目标物质各选取Q3, Q4, Q5各自搭配Q1作为该物质的三种离子对, 每个离子对分别设置10, 30, 45 eV的碰撞能(collision energy, CE)并除冗余. 其次, 经质谱过滤后根据色谱图选择所需的唯一离子对, 从而获得更准确和可重复的定量方法. 最后, 在

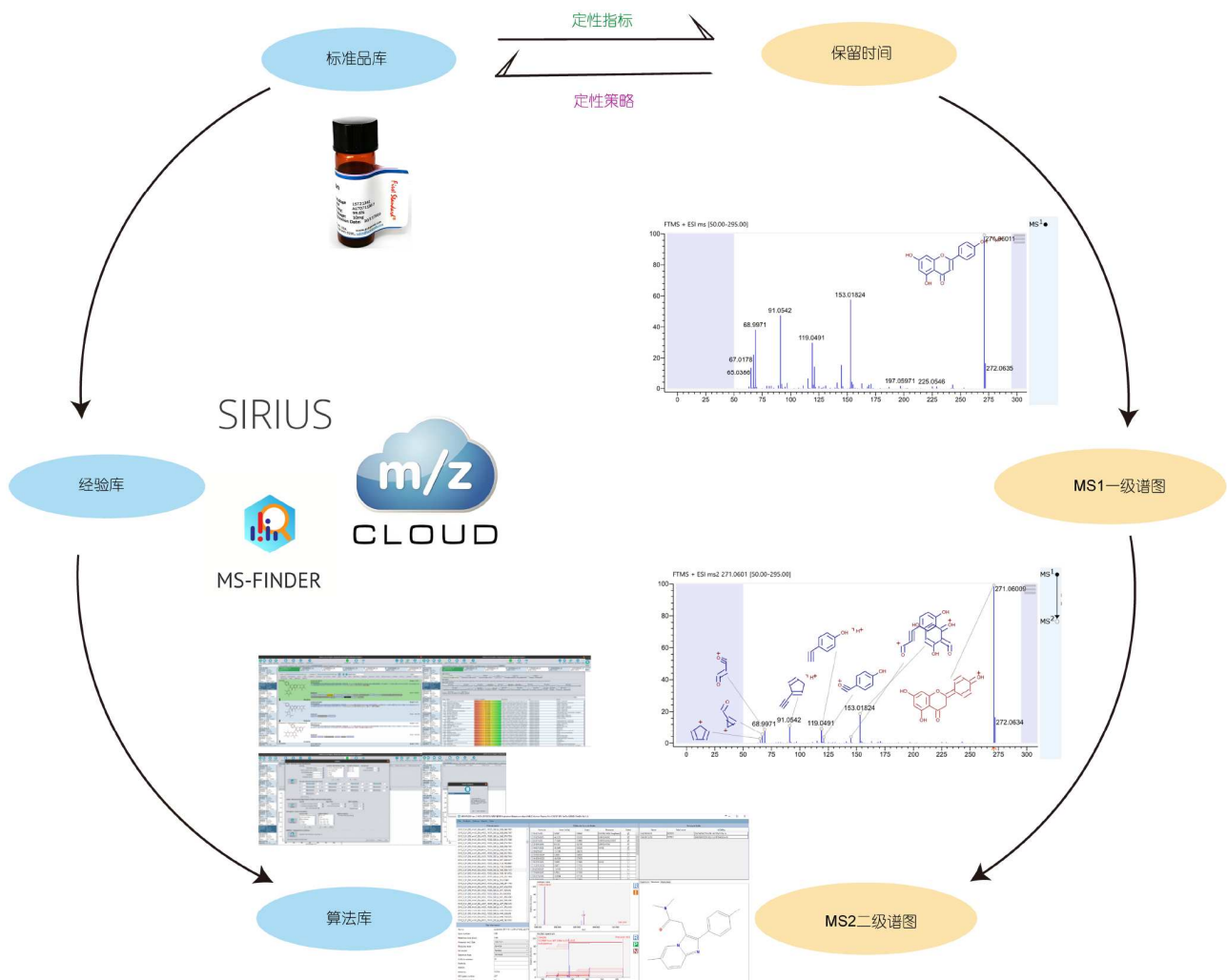


图1 广陈皮广靶代谢组学分析的物质定性流程图

Figure 1 Flowchart of substance characterization of Guangchenpi based on widely targeted metabolomics analyses

使用自建定量方法测定到每份材料的代谢物质谱数据后, 对其中相同代谢物的质谱峰进行积分和校正, 以确保量化的准确性。

1.2.4 主要生物活性成分的鉴定

采用中药系统药理学方法对广陈皮的关键代谢物进行靶向预测。参照Ru等人^[36]的查询参数, 在TCMSP数据库中对鉴定到的代谢物进行检索查询, 参数设定为口服生物利用度(oral bioavailability, OB)≥8%, 药物相似度(drug-like properties, DL)≥0.1; 并在TCMSP数据库获得该关键代谢物的相关靶点和相关疾病信息。

1.2.5 微生物多样性检测

用于陈皮微生物分析的样品制备直接使用液氮将样品进行速冻并充分研磨成粉末状, 装入2 mL离心管放置-80℃保存, 用于后续的DNA抽提。

(1) 样品DNA抽提。根据 E.Z.N.A.® soil DNA kit (Omega Bio-tek, 美国)说明书进行微生物群落总基因组DNA抽提, 使用1%琼脂糖凝胶电泳检测抽提的基因组DNA质量, 使用NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific)测定DNA浓度和纯度。

(2) PCR扩增和测序文库构建。以上述提取的DNA为模板, 使用携带Barcode序列的上/下游引物338F/806R对微生物的16S rRNA基因V3~V4可变区进行PCR扩增, 回收PCR产物, 使用NEXTFLEX Rapid DNA-Seq Kit对纯化后的PCR产物进行建库。

(3) 高通量测序。利用Illumina公司的Miseq PE300/NovaSeq PE250平台对样品进行高通量测序, 测序工作委托上海美吉生物医药科技有限公司(中国)完成。

1.2.6 数据统计分析

所有代谢数据使用Excel 2021 (Microsoft, USA)进行log₂转换, 以增强正态性。使用在线工具MetaboAnalyst (<https://www.metaboanalyst.ca/>)^[37]进行主成分分析(principal component analysis, PCA)、正交偏最小二乘判别分析(OPLS-DA)和K均值分析。使用R (<http://www.r-project.org/>)的程序检验并剔除原始数据离群值, 并进行皮尔逊相关性统计分析。使用Python完成对组间比较Foldchange值进行计算、原始代谢数据的格式转换以及TCMSP的数据检索工作。图片可视化方面使用

R软件corrplot包构建相关性热图, 使用GraphPad Prism 9软件生成其他图示。

所有微生物序列数据分析均在美吉生物云平台(<https://cloud.majorbio.com>)上进行, 具体方法如下: 采用Wilcoxon秩和检验进行Alpha多样性的组间差异分析; 使用基于bray-curtis距离算法的PCoA分析(主坐标分析)检验样本间微生物群落结构的相似性, 并结合PERMANOVA非参数检验分析样本组间微生物群落结构差异。

2 结果与分析

2.1 初生代谢物的变化

对茶枝柑果皮(PCRC)以及3个不同陈化年份的GCP样品(GCP3, GCP5和GCP8, 图2A)进行初生代谢物测定, 以明确滋味相关代谢物质的变化。在所有样品中共检测到3种可溶性糖、2种有机酸和1种氨基酸(图2B)。果糖为PCRC的主要可溶性糖, 达39.96~111.60 mg/g DW (干重)。主要有机酸为苹果酸, 含量为0.06~1.10 mg/g DW; 脯氨酸则为0.02~1.10 mg/g DW (网络版附表2)。PCRC中果糖、葡萄糖和蔗糖的含量均显著高于GCP($P<0.01$)。柠檬酸在干制后产生, 并随陈化年份的延长而显著增加。苹果酸的含量在干制后显著升高, 且于GCP5达最高值, 到GCP8虽有所下降, 但仍高于GCP3。而在陈化过程中, GCP8的蔗糖含量显著低于GCP3和GCP5。总体而言, PCRC干制为GCP后糖类物质普遍减少, 陈化过程中苹果酸和柠檬酸则有积累趋势, 丰富陈皮的酸味。

2.2 苯丙烷类物质代谢表征

采用广泛靶向代谢组学技术, 以峰面积高于 1×10^3 为最低限, 共定性和量化518个代谢物(网络版附表3)。包括247个类黄酮、48个香豆素及其衍生物、45个苯取代衍生物、27个酚酸类及其衍生物、3个萜类物质、4个木脂素及其衍生物、3个氨基酸及其核苷酸类代谢物、7个有机氧化合物以及134个其他物质(图3A)。通过自建标准, 对每个代谢物进行鉴定级别的归类。A级表示与标准品数据相匹配或在两个以上代谢物鉴定软件(compound discoverer, CD)中综合评分高于90%; B级表示在自建数据库里成功匹配, 且至少一个CD软件评分高于90%; C级表示通过特征离子碎片得到母结构

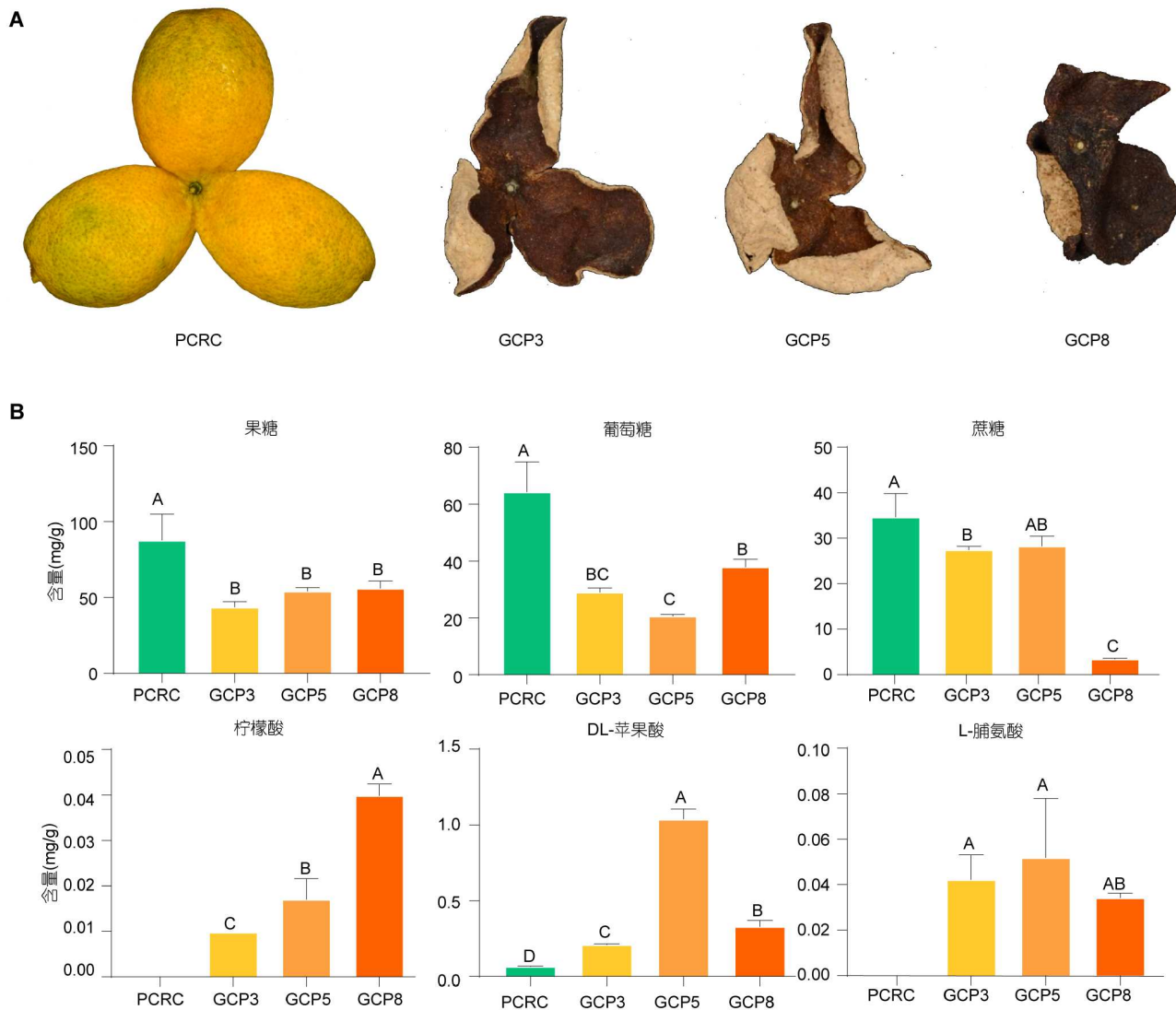


图 2 陈化前后广陈皮的形态和滋味变化。A: 从左至右: 成熟茶枝柑果皮(PCRC)和陈化3年(GCP3)、5年(GCP5)和8年(GCP8)广陈皮的形态观察; B: 广陈皮陈化前后可溶性糖和有机酸类物质的含量。经Student's *t* 检验, 不同的字母表示差异极显著 ($P<0.01$)

Figure 2 Morphological and flavour changes of Guangchenpi before and after aging. A: From left to right: morphological observation of ripe peel of 'Chachiensis' (PCRC) and Guangchenpi aged for 3 years (GCP3), 5 years (GCP5), and 8 years (GCP8); B: the content of soluble sugars and organic acids in Guangchenpi before and after aging. Different letters indicate significant differences by Student's *t*-test ($P<0.01$)

和对应基团, 且CD软件评分在80%以上; D级表示可通过部分离子碎片推断母结构, 或在CD软件评分低于80%; 无级别标识表示可推断出分子式但不确定物质类别。其中161个代谢物鉴定级别在B以上, 物质鉴定准确性良好。在PCRC, GCP3, GCP5和GCP8中分别检测到398, 390, 413和434个苯丙烷类代谢物, 其中38个代谢物仅在PCRC中检测到, 7个代谢物仅在GCP3中检测到, 3个代谢物仅在GCP5中检测到, 而35个代谢物为

GCP8所特有(网络版附表4)。GCP8的特有物质中包括梔子苷B、苜蓿素-8-C-己糖苷、槲皮素-7-O- α -L-鼠李糖苷等。在干制和陈化过程中, 除香豆素类、萜类物质含量总体上升外, 其他代谢物的总含量相对稳定(图3B)。茶枝柑新鲜或陈化果皮中含量最高(峰面积均高于 4×10^8)的化合物是三叶豆苷、川陈皮素、光牡荆素-2、甜橙黄酮和橘皮素(网络版附表3)。

通过皮尔逊相关性分析探究代谢物之间的潜在联

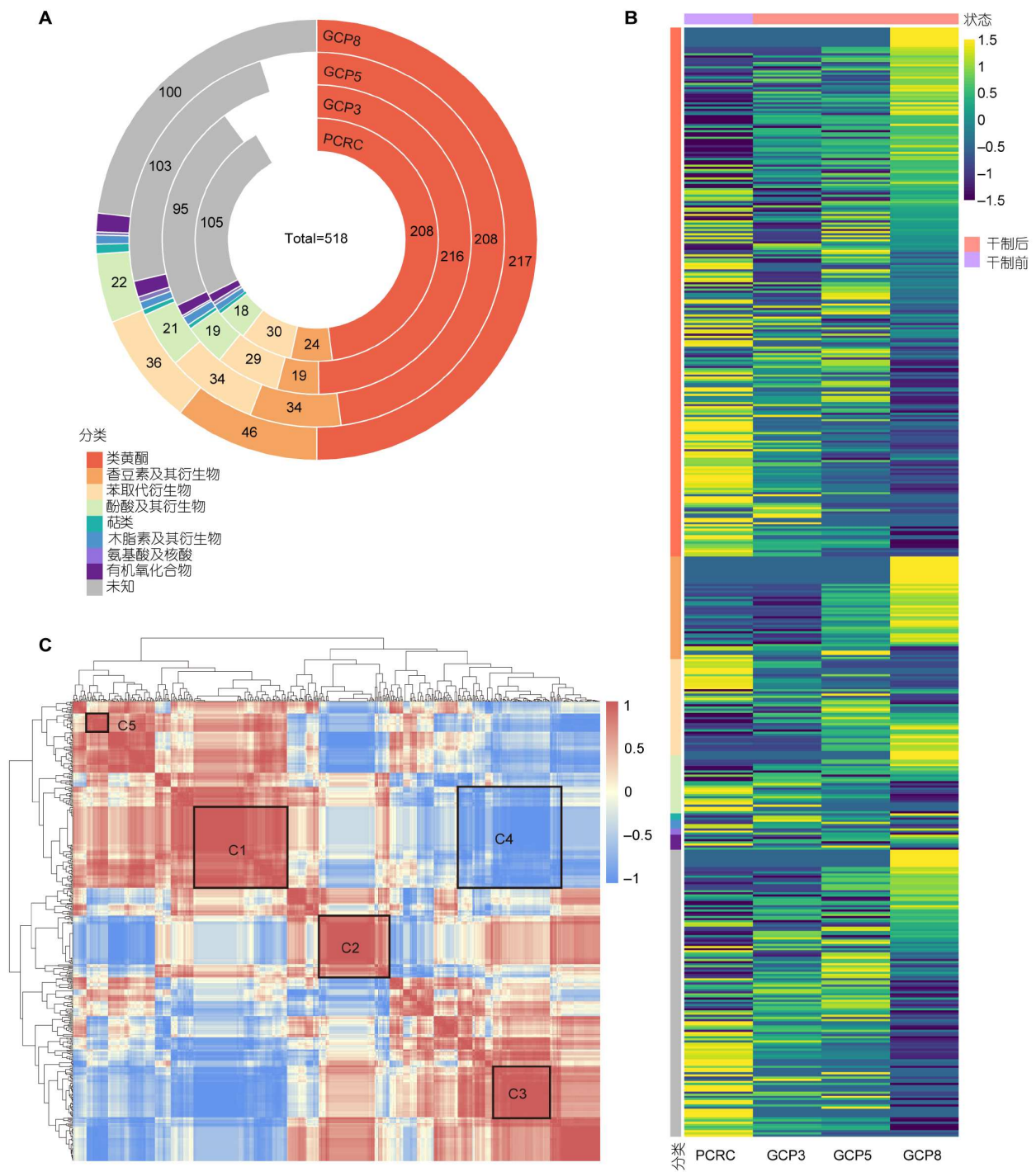


图3 茶枝柑及广陈皮的苯丙烷类代谢物表征。A: 茶枝柑及广陈皮广靶代谢物数量和类别比例的环形图; B: 茶枝柑及广陈皮的广靶代谢物相对含量热图(左侧色卡所代表的代谢物类别与图3A中的颜色标记一致); C: 茶枝柑及广陈皮广靶代谢物相关性分析。C1~C3及C5代表正相关代谢网络, C4代表负相关代谢网络

Figure 3 Characterization of phenylpropanoid metabolites in 'Chachiensis' and Guangchenpi. A: Circular plots of the number and class ratio of widely targeted metabolites of 'Chachiensis' and Guangchenpi; B: Heat map of the relative content of widely targeted metabolites of 'Chachiensis' and Guangchenpi (Metabolite classes represented by the color swatches on the left correspond to the color markings in Figure 3A); C: correlation analysis of widely targeted metabolites of 'Chachiensis' and Guangchenpi. C1~C3 and C5 represent positive correlation metabolic network, C4 represents negative correlation metabolic network

系, 结果显示出一些密集相关的代谢网络(图3C; 网络版附表5), 可能为相同类型的分子或属于相同生物合成途径. 其中, 每个正相关代谢网络(C1~C3)中的物质在骨架修饰方面具有相似性: C1网络中主要由类黄酮组成, 富含 O -糖苷、氧甲基和羟基, 特征官能团是丙/戊二酰基; C2网络主要是香豆素类物质, 修饰基团主要为氧甲基和羟基, 具有异戊烯基或烷基化的特点; C3和C1网络的代谢物组成以及主要官能团相似, 区别在于C3网络的化合物骨架多发生乙酰化修饰. C4为负相关网络, 主要由类黄酮组成, 包含许多典型的 C -糖苷如牡荆素、金雀花素及异金雀花素等. 其中, 母体结构与糖苷之间仅由 O -糖苷键连接的物质与由 O -糖苷键及 C -糖苷键共同连接物质含量呈负相关, 以乙酰化为主的单酰化修饰物质与以丙二酰化为主双酰化修饰物质也呈负相关.

2.3 干制与陈化前后的差异代谢物

基于所有检测到的代谢物进行主成分分析(principal components analysis, PCA)以评估样品间差异(图4A). 各样品的生物学重复间距离接近, 表明重复性良好, 不同样品间差异显著, 可用于进一步筛选差异代谢

物. 第一主成分(PC1=58.3%)均匀地区分4份材料, 第二主成分则解释三个不同陈化年份间25.8%的差异. 相对于陈化而言, 干制对样品的代谢物谱变化影响较大.

基于OPLS-DA模型, 以差异贡献度(variable important for the projection, VIP) ≥ 1 和对差异倍数(fold change, FC)取以2为底的对数($|\log_2(FC)|$) ≥ 1 为标准, 对4份果皮材料进行组间配对比较, 共鉴定出300种(PCRC vs. Others)、228种(GCP3 vs. Others)、205种(GCP5 vs. Others)和272种(GCP8 vs. Others), 总计354种差异代谢物(网络版附表6). 差异代谢物包含157种类黄酮、23种酚酸类化合物、50种木脂素和香豆素、39种苯衍生物、3种氨基酸衍生物、2种萜类化合物、5种有机氧化合物和75种其他代谢产物. 大多数差异代谢物属于类黄酮、香豆素类和酚酸类化合物, 均是药用柑橘中关键生物活性物质.

由PCA图(图4A)可知, 代谢物积累的差异可以很好地区分这4个样品, 为进一步验证干制和陈化对代谢的影响, 采用K-means聚类算法将所有差异代谢物分为6个趋势相似的亚类(图4B). 在这些亚类中, 确定干制前后和陈化年份特异性亚类. 其中, 亚类4含有的代谢物最多, 为92种; 干制后, 亚类1, 3, 4中代谢物含量

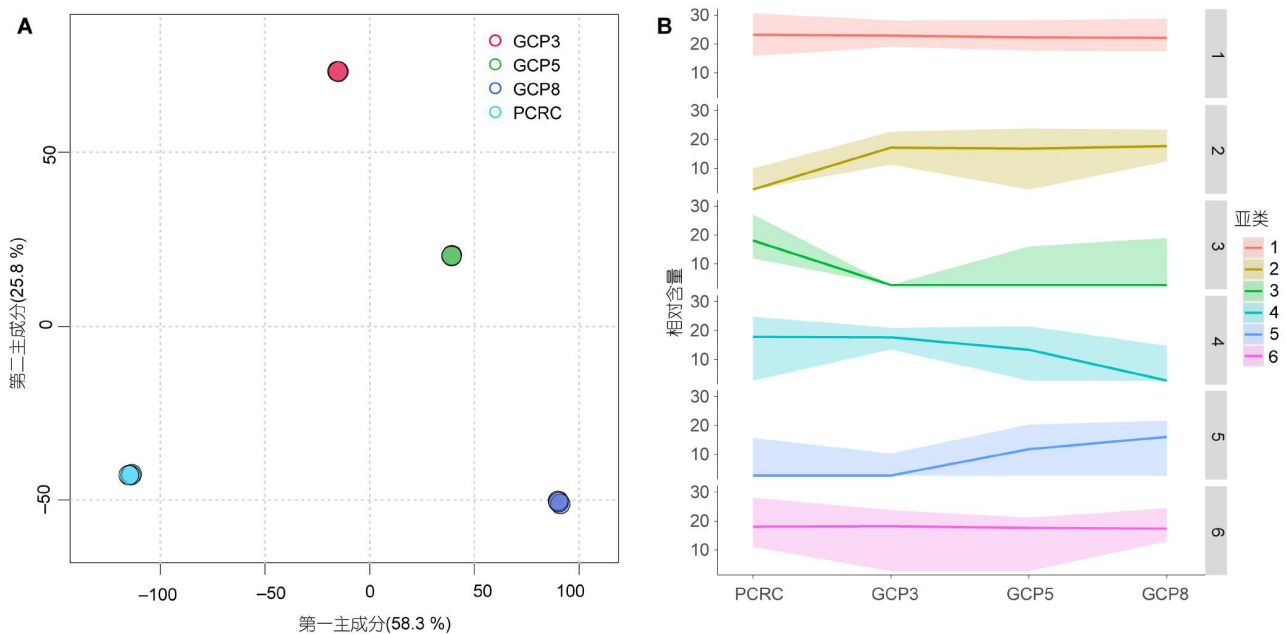


图4 基于广靶代谢的茶枝柑及广陈皮代谢组分分析. A: 基于广靶代谢数据的PCA评分图; B: 差异代谢物的K均值聚类分析
Figure 4 Metabolic analysis of “Chachiensis” and Guangchenpi based on widely targeted metabolomics analyses. A: PCA scoring plot based on widely targeted metabolomics analyses; B: K-mean clustering analysis based on differential metabolites

均有所下降; 亚类2中的代谢物在干制后增加, 亚类5中的代谢物在陈化过程中增加, 且两者的主要代谢组分为类黄酮和苯取代衍生物; 亚类1和6变化趋势相似, 但亚类6中GCP8的代谢物含量总体高于前两个年份。

2.3.1 干制前后差异代谢物分析

采用OPLS-DA法探究茶枝柑果皮干制为广陈皮后代物组分的变化, 共发现300个差异代谢物 ($VIP \geq 1$, $|\log_2(FC)| \geq 1$, $P < 0.01$), 其中131个代谢物下调, 169个代谢物上调(图5), 88个代谢物属于K-means聚类分析中的亚类2和亚类5。

在下调代谢物中, 以 1×10^5 为平均峰面积下限, 筛选到79个高丰度差异代谢物。通过VIP值排序, 木犀草素-7-[6''-(3-羟基-3-甲基戊二酰)葡萄糖苷]、三裂鼠尾草素、牡荆素-2-O-木糖苷、木犀草素-O-丙二酰葡萄糖苷

等14个类黄酮和1个苯甲酸类酚酸对分组有最大贡献, 表明其含量在干制过程中逐渐降低(网络版附表7)。在上调代谢物中, 60个化合物平均峰面积大于 1×10^5 , 经VIP值筛选得到贡献度排名前15的重要差异代谢物(网络版附表7), 主要化学结构为母体连接氧甲基和羟基, 包括Prangenin、秦皮甲素等4个香豆素及其衍生物, 3',4,7-三羟基黄酮、橙皮素、杨梅素-3-O-桑布双糖苷等9个类黄酮, 1个有机氧化合物和1个酚酸类物质。其中, 环氧佛手柑素是贡献度最高的代谢物。

下调的代谢物主要位于C1正相关网络, 包括3'-O-Methyldehamnosylmaysin、牡荆素-2-O-木糖苷、五羟基黄烷醇-O-芸香糖苷等7个代谢物。上调的代谢物主要集中在C3正相关网络, 除1个有机氧化合物、1个单甲基黄酮衍生物、杨梅素-3-O-桑布双糖苷和肉桂酰酰胺外, 其余11种代谢物均集中在C3网络。C4负

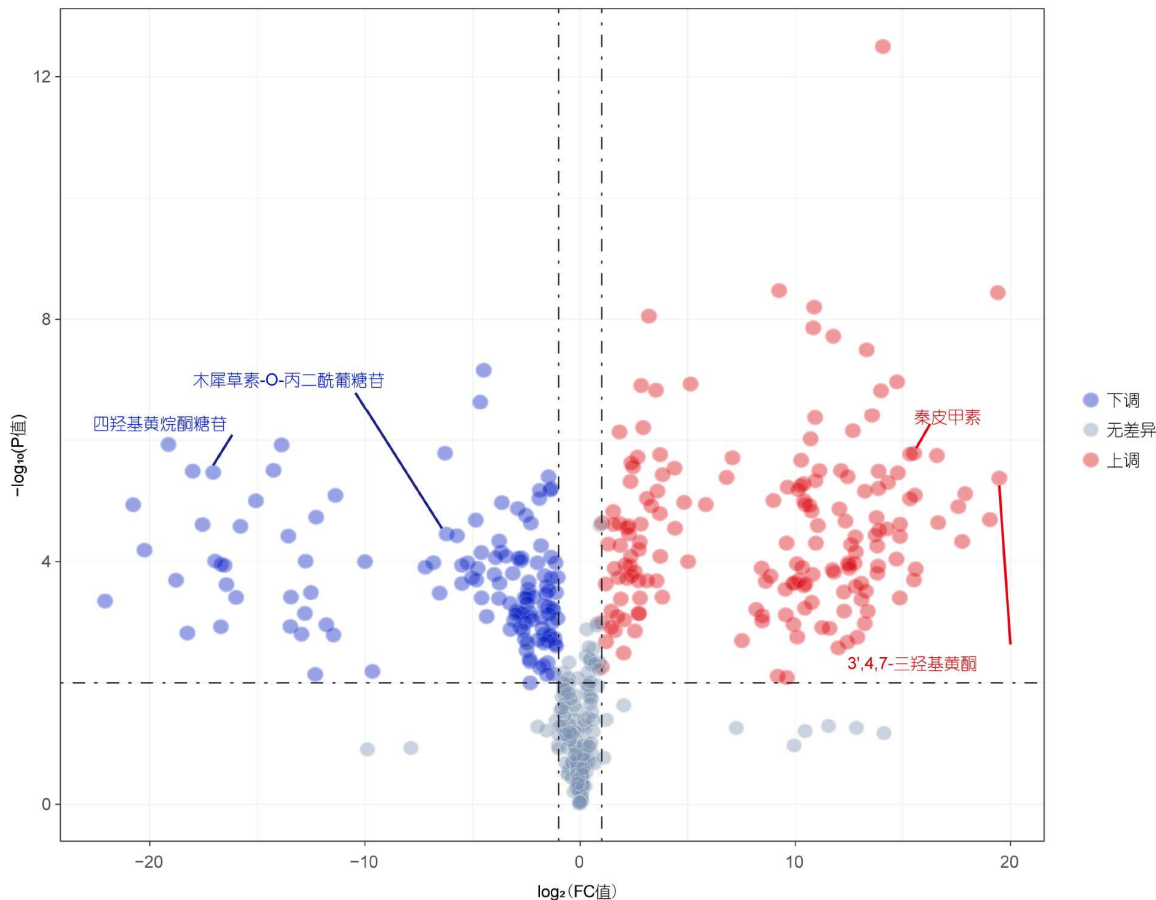


图5 广陈皮干制过程中的差异代谢物T值和FC值评分图(茶枝柑果皮vs.不同年份广陈皮)
Figure 5 T-value and FC-value scoring plots of differential metabolite in Guangchenpi during concoction (peel vs. Guangchenpi with different aging years)

相关网络中则包含21种在OPLS-DA分析中被鉴定为茶枝柑干制过程中的重要差异代谢物(网络版附表5和7)。

2.3.2 不同陈化年份的差异代谢物分析

采用OPLS-DA法探究不同陈化年份的广陈皮代谢物组分的变化, 共发现249个差异代谢物($VIP \geq 1$, $|\log_2(FC)| \geq 1$, $P < 0.01$)其中108个随着陈化年份延长含量显著升高(网络版附表8), 主要物质为类黄酮。77个代谢物属于K-means聚类分析中的亚类2和亚类5。

黄酮-C-葡萄糖苷和苜蓿素-6-C-己糖苷是含量最高的两个差异类黄酮, 平均相对峰面积高达 9.5×10^7 。综合相对含量以及差异贡献度, 发现柚皮素、五羟基黄酮-O-二木糖苷、Centaurein、Haploside C等4种类黄酮是GCP陈化过程中显著积累的重要代谢物(图6A)。

广陈皮中香豆素物质的含量相对较低, 含量最高的羟基呋喃香豆素峰面积仅为 6.5×10^4 。基于含量和贡

献度两个指标可筛选得到橙皮素内酯水合物、马尔敏等8种重要香豆素(图6B)。值得关注的是, 茶枝柑干燥成熟果皮和广陈皮的广靶测定中共鉴定到16种呋喃香豆素如Visamminol、欧前胡素、Pabulenol和Prangenin等, 这些物质均随着陈化进程在广陈皮中逐渐积累。相对而言, 酚酸类代谢物受陈化影响较小, 但部分化合物如Anofinic acid平均相对峰面积达到 6.4×10^5 , 远高于香豆素类物质。

2.3.3 类黄酮代谢物在干制和陈化中的结构变化

基于广靶代谢检测发现, 随着广陈皮的陈化进展, GCP8的苯丙烷类代谢物比GCP3中增加44种, 且共有108种物质随着陈化时间的延长逐渐积累。其他代谢物中, 香豆素和萜类物质也呈总体上升趋势。

PCRC干制后上调和下调的代谢物表现出不同的修饰方式。就类黄酮而言, 葡萄糖苷降解和鼠李糖苷合成的现象较多, 同时伴随异戊烯化和乙酰化(图7A)。陈化后, 黄酮也呈现类似的降解和合成现象, 而黄烷酮则

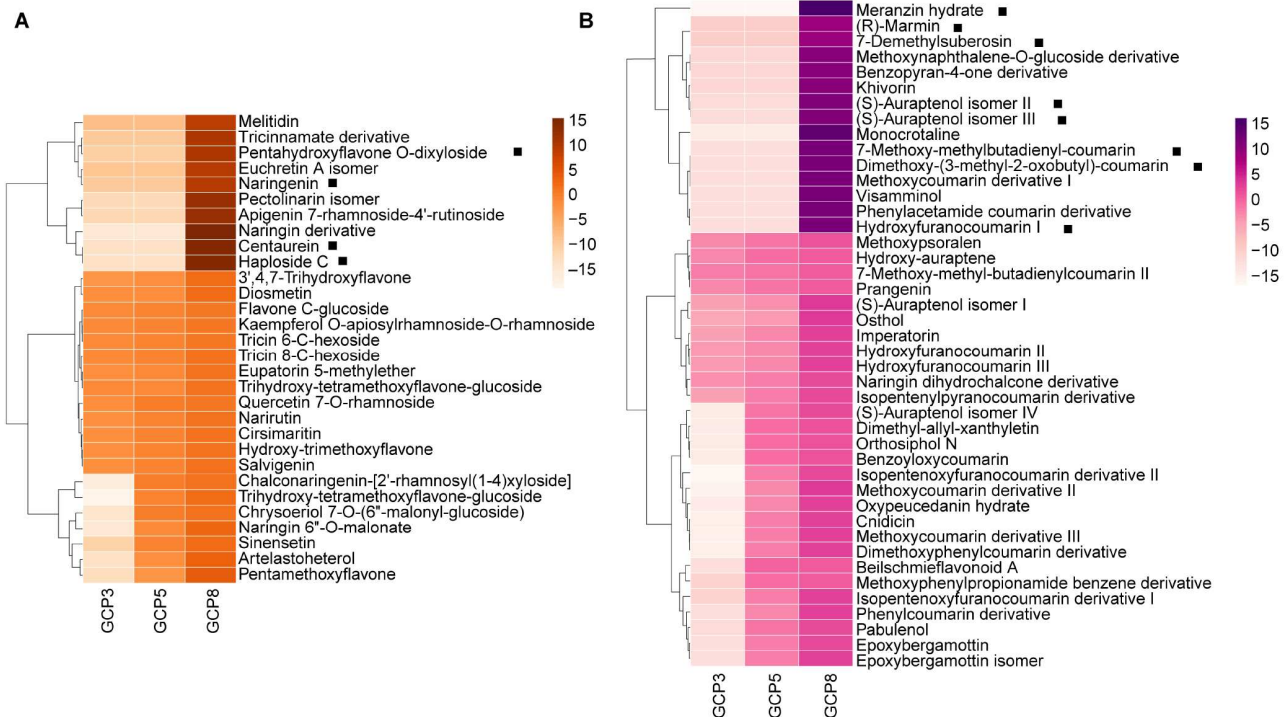


图6 不同陈化年份广陈皮的差异代谢物组成。A: 不同陈化年份广陈皮的差异类黄酮组成; B: 不同陈化年份广陈皮的差异香豆素类物质组成。数据为归一化后的组间比较FC值黑色标记表示该物质为在广陈皮陈化过程中显著积累的重要代谢物

Figure 6 Differential metabolite compositions of Guangchenpi at different aging years. A: Differential flavonoid compositions of Guangchenpi at different aging years; B: differential coumarin-like substance compositions of Guangchenpi at different aging years. The data are normalized FC values for intergroup comparisons. Black markers indicate that the substance is an important metabolite which accumulates significantly during the aging process of Guangchenpi

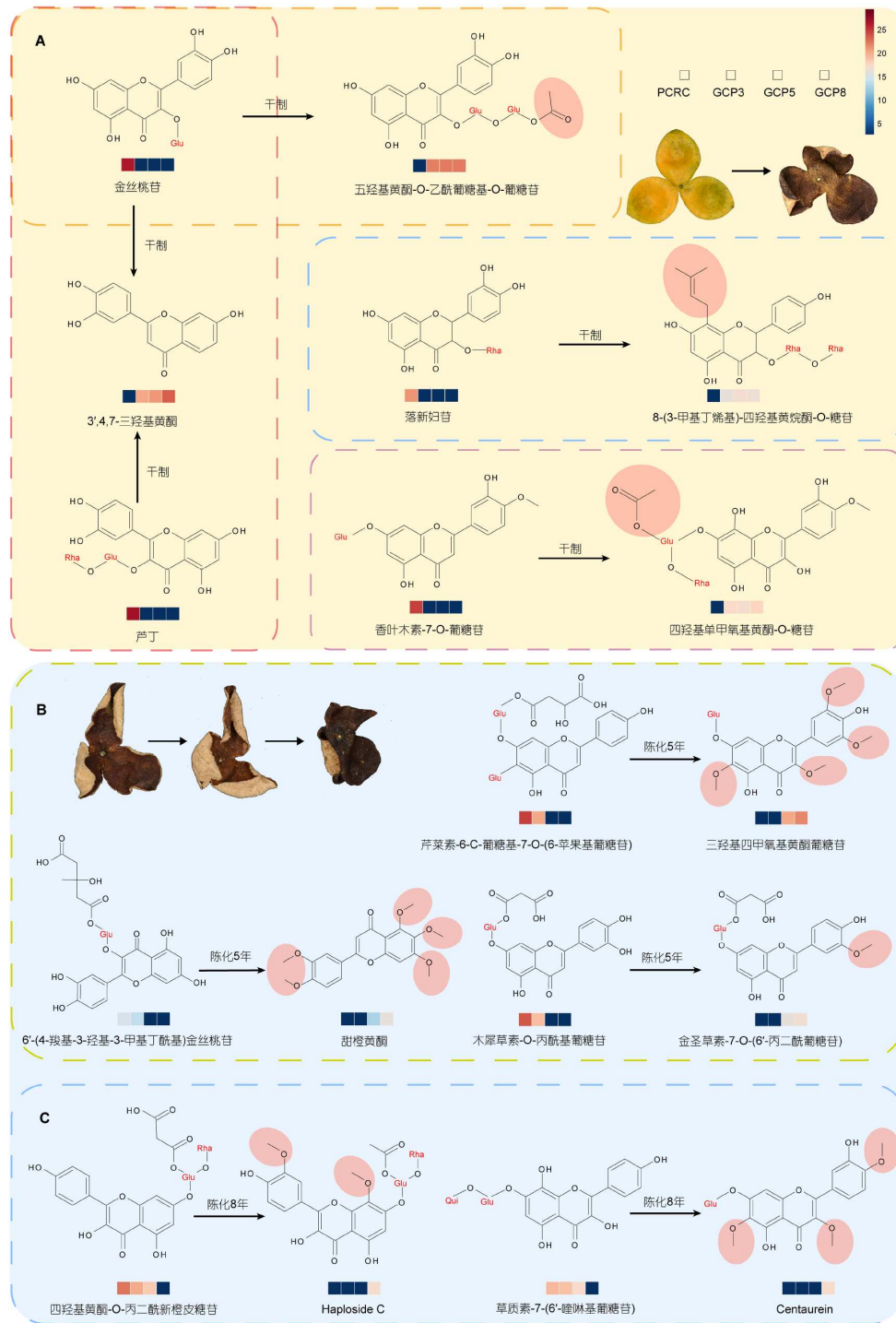


图 7 广陈皮干制或陈化效应下类黄酮的化学结构变化. 示意图表示广陈皮中同一母体结构的类黄酮的修饰基团的变化: A: 广陈皮干制中的修饰变化; B: 广陈皮陈化3年至5年的修饰变化; C: 广陈皮陈化5年至8年的修饰变化. 不同颜色的方块从左至右代表PCRC, GCP3, GCP5和GCP8的相对含量

Figure 7 The chemical structural changes of flavonoids under the drying or aging effects of Guangchenpi. Schematic of the changes of modifying groups in different flavonoid derivatives: A: Modification changes before and after drying; B: modification changes of Guangchenpi aged from 3 to 5 years; C: modification changes of Guangchenpi aged from 5 to 8 years. The different colored squares represent the relative contents of PCRC, GCP3, GCP5 and GCP8 from left to right

多表现为鼠李糖苷的合成(图7B). 而当陈化时长达5年或者8年时, 类黄酮的修饰多为氧甲基化, 而部分类黄酮则失去酰基和糖苷(图7B).

2.4 广陈皮干制与陈化过程中产生的关键活性成分

将鉴定到的354种差异代谢物为潜在生物活性物质, 在TCMSP数据库中搜索对应的中药化学成分. 以OB≥8%和DL≥0.1为标准进行筛选, 分别鉴定到23种在干制和陈化中上调和22种下调的差异代谢物属于对人类健康具有促进功能的关键生物活性成分. 结合

OPLS-DA分析, 上述45种潜在的关键生物活性成分中, 共28种物质含量差异具有统计学意义(|log₂FC|>1, VIP>1, P<0.01), 在干制及陈化过程中变化较大(表1).

28种关键活性成分中, 聚甲氧基黄酮类化合物艾黄素可靶向的疾病高达120种, 涉及癌症、心血管疾病、高血压、炎症、糖尿病、肥胖和老年痴呆症等. 异甘草苷、甲氧补骨脂素、柳穿鱼苷和3',4,7-三羟基黄酮4种代谢物没有相应的靶蛋白和对应疾病, 然而异甘草苷、甲氧补骨脂素和柳穿鱼苷具有高DL值或OB值(DL>0.6或OB>42%), 是潜在的生物活性成分, 其中属于类黄酮的柳穿鱼苷(Pectolinarin)综合表现最佳

表 1 广陈皮干制及陈化过程中变化的28种关键药用活性成分
Table 1 28 key medicinal active ingredients changed during the drying and aging of Guangchenpi

编号	代谢物	靶点数	疾病数	口服利用度	药物相似度	备注 ^{a)}
1	异甘草苷	—	—	8.61	0.60	GCP>>PCRC
2	Citromitin	10	62	86.90	0.51	
3	艾黄素	23	120	49.55	0.48	
4	秦皮甲素	2	34	20.43	0.36	GCP8>>GCP5>>GCP3
5	橙皮素	10	59	47.74	0.27	
6	二苯甲酰甲烷	16	70	62.26	0.10	
7	柚皮芸香苷	1	8	8.15	0.75	
8	三裂鼠尾草素	18	91	49.07	0.33	
9	蓟黄素	11	56	30.35	0.30	GCP>>PCRC, GCP8>>GCP5>>GCP3
10	香叶木素	10	51	31.14	0.27	
11	Visamminol	18	116	50.01	0.23	
12	甲氧补骨脂素	—	—	42.21	0.13	
13	槲皮素-7-O-α-L-鼠李糖苷	3	41	15.50	0.76	
14	柳穿鱼苷	—	—	47.62	0.65	
15	五甲氧基黄酮	29	118	21.38	0.43	
16	马尔敏	4	49	38.23	0.31	
17	Prangenin	3	45	24.90	0.30	
18	Pabulenol	5	47	42.85	0.26	
19	欧前胡素	8	57	34.55	0.22	
20	柚皮素	37	92	59.29	0.21	
21	3',4,7-三羟基黄酮	—	—	17.43	0.21	
22	羟基甲基丁烯基-7-甲氧基香豆素	18	109	26.03	0.17	
23	橙皮内酯水合物	9	81	43.61	0.17	
24	(S)-Auraptenol同分异构体	15	86	74.95	0.15	
25	蛇床子素	27	91	38.75	0.13	
26	香柑醇同分异构体	1	1	24.22	0.12	
27	花椒毒酚同分异构体	1	5	29.21	0.12	
28	7-去甲基软木花椒素	6	47	41.19	0.11	

a) 注: PCRC表示茶枝柑新鲜果皮, GCP3, GCP5, GCP8分别表示陈化3年、5年和8年的广陈皮; GCP>>PCRC表示陈化干制后显著上调的成分, GCP8>>GCP5>>GCP3表示随着陈化时间的延长而显著上调的成分(|log₂FC|>1, VIP>1, P<0.01).

(OB=47.62%, DL=0.65).

同时, 利用TCMSP数据库筛选可以靶向阿尔茨海默病、中风、糖尿病、肥胖、肺癌、哮喘、心血管疾病、高血压、炎症和癌症等十种重要疾病的抗病药物成分, 探究广陈皮中潜在的重要代谢物质. 共匹配到76种包括同分异构体在内的代谢物. 其中, 34个抗病药物成分严格对应本研究检测到的代谢物, 包括19种类黄酮、10种香豆素、2种酚酸类化合物以及3种苯衍生物(网络版附表9). 三裂鼠尾草素(OB=49.07%, DL=0.33)和异甜橙黄酮(OB=51.15%, DL=0.44)对十种疾病均具有抗性.

2.5 广陈皮干制或陈化前后的细菌多样性比较

微生物群落组成也是影响广陈皮代谢品质的潜在因素. 为调查不同果皮材料(PCRC, GCP3, GCP5和GCP8)之间的菌群, 本文构建各样品的微生物OTU聚类树, 将聚类结果与各材料在属水平上的相对丰度进行整合. 根据聚类结果, GCP3和GCP5样品中的细菌菌群组成相似(图8A). 其中, 鞘氨醇单胞菌和泛菌分别在PCRC及GCP5中丰度最高, 芽孢杆菌则在GCP3和GCP8中的丰度最高. 在属水平丰度上, 经学生 t 检验和FC值结果得出40种菌群在广陈皮干制或陈化过程中存在显著差异($P<0.05$), 其中的11个菌群同属于干制和陈化时长的差异菌群(图8B). 总体来看, GCP优势菌属是芽孢杆菌, PCRC的优势细菌为胺杆菌, 而类芽孢杆菌仅存在于GCP8中.

3 讨论

本研究在茶枝柑和广陈皮中检测到大量在体外实验中被证明具有药理作用的艾黄素、黄酮素等类黄酮^[38]. 茶枝柑果皮经干制为广陈皮后, 多种生物活性物质显著上调, 如高积累的苯衍生物二苯甲酰甲烷被广泛用于防晒霜中, 与Phenethyl isothiocyanate组合时还具有预防和抗前列腺癌的活性^[39]. 橙皮素是干制后上调的高贡献度物质之一, 其含量随着陈化时间的延长显著上升. 然而橙皮苷和川陈皮素的相对含量在干制和陈化前后则无显著变化. 目前已有研究证实苷元形式的橙皮素显示出比橙皮苷更强的生物活性^[40]. 此外, 本课题组发现陈化过程中GCP挥发性物质的含量变化比橙皮苷、川陈皮素等10种常见的类黄酮变化更为强

烈^[21], 而萜类挥发性物质对人体健康的效应也被广泛报道. 因此, 市场上人们对广陈皮的偏爱及“陈久者良”的特性可能源于广陈皮中非挥发性物质和挥发性物质变化的双重效应. 同时随陈化时长显著上调的橙皮素内酯水合物、马尔敏等香豆素类化合物也可能是GCP8具有更高保健价值的原因.

就主要代谢物类黄酮而言, 经干制后类黄酮会经历葡萄糖苷降解和鼠李糖苷合成现象, 而陈化则多发生氧甲基化以及酰基和糖苷的丢失. 早期研究已表明, 类黄酮通过发生羟基化、氧甲基化和糖基化修饰可以改变其代谢特征, 影响人体抗炎症机制^[41], 在抗虫和抗菌活性上也扮演着重要角色^[42]. 相对于 O -糖苷化合物, C -糖苷化合物常被用于治疗癌症、糖尿病、自身免疫性疾病和病毒感染等临床疗效^[43]. 因此, O/C -糖苷的不同积累模式可能导致广陈皮药效的变化. 鉴于之前对广陈皮类黄酮的全面表征研究较少, 代谢变化机制的深入研究长期局限于几种常见的药用组分, 本文对陈化过程中类黄酮代谢修饰变化的深度解析将为后续广陈皮中类黄酮结构及其活性关系的创新性研究提供参考.

值得指出的是, 本研究发现呋喃香豆素含量在广陈皮陈化后均显著上调. 呋喃香豆素会通过抑制药物代谢相关的酶活性来增加血液中药物的浓度, 产生药物剂量过大的副作用, 导致葡萄柚汁效应^[16]. 因此, 对呋喃香豆素进行准确定量, 将有助于未来更好地指导广陈皮的健康食用. 本研究中检测到的酚酸类物质较少, 可能是提取方法所致. 对于酚类化合物的提取, 一般会使用HCl将残留物酸化至pH=2, 然后利用己烷进行提取^[5], 后续需要进一步改进提取方法以进行深入研究.

干制和陈化期间的陈皮代谢物变化很可能与陈皮表面的定殖微生物和环境微生物种群转化紧密相关. 鞘氨醇单胞菌属在新鲜茶枝柑果皮中丰度最高, 特别是在潮湿环境下, 其含量高于干燥环境^[44], 这与干制后鞘氨醇单胞菌属细菌丰度显著降低的结果一致. 另外, 发现在陈化8年后, 类芽孢杆菌成为优势菌属. 类芽孢杆菌是一种有益细菌, 对极端环境有较高的耐受能力, 可以在高温干燥条件下生存, 并可用于抑制对人类具有致病性的沙门氏菌等食源性细菌^[45], 这与长期陈化后GCP的干燥条件和可食用性一致. 在所有广陈皮样品中, 芽孢杆菌的相对丰度较高, 能够降解细

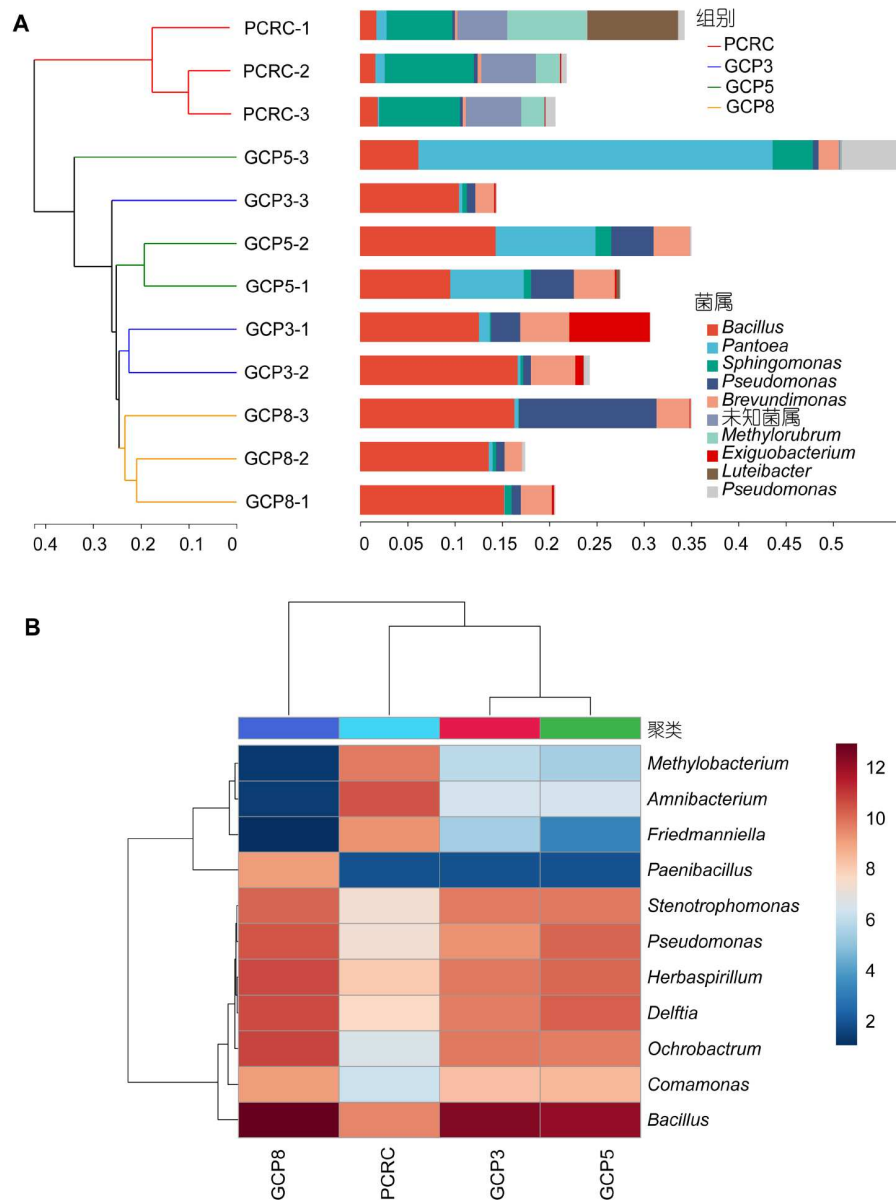


图 8 不同果皮材料中的微生物丰度分析. A: 丰度前10的微生物聚类树; B: 11个差异优势菌属丰度热图

Figure 8 Analysis of microbial abundance in different peels. A: Clustering tree of microbes in the top 10 abundance; B: heatmap of abundance of 11 differentially dominant genera

胞壁纤维素以对细胞中化合物有助溶效应，从而提高药效成分的摄取和利用效率^[46]。在香草兰豆(*Vanilla planifolia*)的研究中发现，芽孢杆菌和曲霉菌是烘烤干燥过程中的优势真菌，其中芽孢杆菌有助于产生更多的香草醛，减少不愉快的香气感官属性^[47]。探索不同优势菌种与关键活性成分之间的关联，可为加速陈化过程、提升关键活性成分含量提供可行途径。

4 总结

本研究基于超高效液相色谱-四极杆-线性离子阱(UHPLC-Q-Trap)定性分析结合超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱(UHPLC-Q-Exactive-Orbitrap)定量分析的广泛靶向代谢组学策略，对茶枝柑和广陈皮苯丙烷类代谢谱及其变化进行全面研究，鉴定出518种以类黄酮和香豆素类化合物为主的次生代谢

物; 同时使用GC-MS对茶枝柑和广陈皮的6种初生代谢物进行分析。通过主成分分析、OPLS-DA和K-means分析等方法对干制及陈化过程中的差异代谢物质进行筛选, 发现在干制和陈化过程中, 广陈皮黄酮主要呈现葡萄糖苷的降解现象, 而黄烷酮则多表现为鼠李糖苷的合成。结合网络药理学的手段, 在广陈皮中共鉴定到Citromitin、艾黄素、七叶苷、柳穿鱼叶苷、欧芹素、蛇床子素、7-去甲基软木花椒素等28个中药活性成分以及黄樟素、橙皮内酯水合物、

马尔敏、落新妇苷、对羟基苯乙酸、新绿原酸等34个抗病活性成分。通过微生物群落多样性分析, 初步确定在干制和陈化过程中优势菌属的变化情况, 明确广陈皮的优势细菌为芽孢杆菌, 多年陈化优势细菌为类芽孢杆菌。本研究为茶枝柑果皮和广陈皮提供全面的苯丙烷类代谢谱。此外, 本研究对广陈皮代谢品质、差异代谢修饰特征和潜在药用活性代谢物进行总结, 并对相关优势菌群进行鉴定, 有助于广陈皮药用品质的深入挖掘。

参考文献

- 1 Yu X, Chen X, Li Y, et al. Effect of drying methods on volatile compounds of *Citrus reticulata* Ponkan and Chachi peels as characterized by GC-MS and GC-IMS. *Foods*, 2022, 11: 2662
- 2 Liu Q H, Yan G Q, Qu J L, et al. Current status and countermeasures of primary processing machinery technology for *Citrus reticulata* Blanco (*Citrus reticulata* 'Chachi') (in Chinese). *J Chin Agric Mech*, 2021, 42: 91–98 [刘桥辉, 闫国琦, 屈佳蕾, 等. 茶枝柑(广陈皮)初加工机械装备技术现状与对策. *中国农机化学报*, 2021, 42: 91–98]
- 3 Yang F Q, Yang L Y, Yang D, et al. Diversity of bacterial and fungal community on surface of *Citrus reticulata* 'Chachi' with different aging times (in Chinese). *Food Ferment Ind*, 2021, 47: 267–275 [杨放晴, 何丽英, 杨丹, 等. 不同陈化时间广陈皮表面细菌和真菌多样性变化分析. *食品与发酵工业*, 2021, 47: 267–275]
- 4 Yan G Q, Qu J L, Ou G L, et al. Current situation and countermeasures of drying and storage technology and equipment of *Citrus reticulata* 'Chachi' (in Chinese). *J South Agric*, 2021, 52: 2543–2553 [闫国琦, 屈佳蕾, 欧国良, 等. 广陈皮干燥和仓储技术及装备的现状与对策. *南方农业学报*, 2021, 52: 2543–2553]
- 5 Bian X, Xie X, Cai J, et al. Dynamic changes of phenolic acids and antioxidant activity of Citri Reticulatae Pericarpium during aging processes. *Food Chem*, 2022, 373: 131399
- 6 Jiang S, Huang C, Wang S, et al. Network pharmacology-based strategy for predicting therapy targets of Citri Reticulatae Pericarpium on myocardial hypertrophy. *Biomed Res Int*, 2022, 2022: 4293265
- 7 Wang G N. Study on the aging change and browning reaction of Citri Reticulatae Pericarpium based on chemical components analysis (in Chinese). Dissertation for Doctoral Degree. Guangzhou: Guangzhou University of Chinese Medicine, 2021 [王光宁. 基于化学组分分析广陈皮陈化变化及褐变反应研究. 博士学位论文. 广州: 广州中医药大学, 2021]
- 8 Duan L, Dou L L, Yu K Y, et al. Polymethoxyflavones in peel of *Citrus reticulata* 'Chachi' and their biological activities. *Food Chem*, 2017, 234: 254–261
- 9 Fu M, Xu Y, Chen Y, et al. Evaluation of bioactive flavonoids and antioxidant activity in Pericarpium Citri Reticulatae (*Citrus reticulata* 'Chachi') during storage. *Food Chem*, 2017, 230: 649–656
- 10 Zhou T, Guo W, Ren S, et al. Flavonoid glycosides and other bioactive compounds in *Citrus reticulata* 'Chachi' peel analysed by tandem mass spectrometry and their changes during storage. *Carbohydr Res*, 2021, 510: 108462
- 11 Li F, Lu Y, Li C, et al. *trnL-trnF* copy number is inversely correlated with storage time of Guang Chenpi, the aged sun-dried peels of *Citrus reticulata* 'Chachi'. *J Stored Prod Res*, 2022, 97: 101982
- 12 Dong X, Huang R. Ferulic acid: an extraordinarily neuroprotective phenolic acid with anti-depressive properties. *Phytomedicine*, 2022, 105: 154355
- 13 Zheng G, Chao Y, Liu M, et al. Evaluation of dynamic changes in the bioactive components in Citri Reticulatae Pericarpium (*Citrus reticulata* 'Chachi') under different harvesting and drying conditions. *J Sci Food Agric*, 2021, 101: 3280–3289
- 14 Sharifi-Rad J, Cruz-Martins N, López-Jornet P, et al. Natural coumarins: exploring the pharmacological complexity and underlying molecular mechanisms. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 6492346

- 15 Grover J, Jachak S M. Coumarins as privileged scaffold for anti-inflammatory drug development. *RSC Adv*, 2015, 5: 38892–38905
- 16 Xu J, Ma L, Jiang D, et al. Content evaluation of 4 furanocoumarin monomers in various citrus germplasms. *Food Chem*, 2015, 187: 75–81
- 17 Chen L, Teng H, Xie Z, et al. Modifications of dietary flavonoids towards improved bioactivity: an update on structure-activity relationship. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2018, 58: 513–527
- 18 Luo Y, Zeng W, Huang K E, et al. Discrimination of *Citrus reticulata* Blanco and *Citrus reticulata* ‘Chachi’ as well as the *Citrus reticulata* ‘Chachi’ within different storage years using ultra high performance liquid chromatography quadrupole/time-of-flight mass spectrometry based metabolomics approach. *J Pharm BioMed Anal*, 2019, 171: 218–231
- 19 Liang S, Zhang J, Liu Y, et al. Study on flavonoids and bioactivity features of pericarp of *Citrus reticulata* “Chachi” at different harvest periods. *Plants*, 2022, 11: 3390
- 20 Wang S, Shen S, Wang C, et al. A metabolomics study in citrus provides insight into bioactive phenylpropanoid metabolism. *Horticult Res*, 2024, 11: uhad267
- 21 Liu Y, Wen H, Kong J, et al. Flavor characterization of Citri Reticulatae Pericarpium (*Citrus reticulata* ‘Chachiensis’) with different aging years via sensory and metabolomic approaches. *Food Chem*, 2024, 443: 138616
- 22 Wu L, Huang X, Liu S, et al. Understanding the formation mechanism of oolong tea characteristic non-volatile chemical constituents during manufacturing processes by using integrated widely-targeted metabolome and DIA proteome analysis. *Food Chem*, 2020, 310: 125941
- 23 Li W, Li G, Yuan Z, et al. Illustration of the variation in the content of flavanone rutinosides in various citrus germplasms from genetic and enzymatic perspectives. *Horticulture Res*, 2022, 9: uhab017
- 24 Han Z, Zhu M, Wan X, et al. Food polyphenols and Maillard reaction: regulation effect and chemical mechanism. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2024, 64: 4904–4920
- 25 Yang F, Yang D, Liu S, et al. Use of high-throughput sequencing to identify fungal communities on the surface of Citri Reticulatae Pericarpium during the 3-year aging process. *Curr Microbiol*, 2021, 78: 3142–3151
- 26 Wang Q, Qiu Z, Chen Y, et al. Review of recent advances on health benefits, microbial transformations, and authenticity identification of *Citri reticulatae* Pericarpium bioactive compounds. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2024, 64: 10332–10360
- 27 Sheng L, Shen D, Yang W, et al. GABA pathway rate-limit citrate degradation in postharvest citrus fruit evidence from HB Pumelo (*Citrus grandis*)×Fairchild (*Citrus reticulata*) Hybrid Population. *J Agric Food Chem*, 2017, 65: 1669–1676
- 28 Peng Z, Zhang H, Li W, et al. Comparative profiling and natural variation of polymethoxylated flavones in various citrus germplasms. *Food Chem*, 2021, 354: 129499
- 29 Chen J J, Liu Y, Wu Y N, et al. Sensory fuzzy modeling and sugar and acid analysis based evaluation of fruit quality difference in different ‘Ehime Kashi 28’ samples (in Chinese). *Acta Horti Sin*, 2023, 50: 2466–2476 [陈嘉景, 刘园, 吴雅诺, 等. 基于感官模糊建模和糖酸分析评价‘红美人’杂柑的品质. *园艺学报*, 2023, 50: 2466–2476]
- 30 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. *Mol Plant*, 2013, 6: 1769–1780
- 31 Wen W, Li D, Li X, et al. Metabolome-based genome-wide association study of maize kernel leads to novel biochemical insights. *Nat Commun*, 2014, 5: 3438
- 32 Chen J, Hu X, Shi T, et al. Metabolite-based genome-wide association study enables dissection of the flavonoid decoration pathway of wheat kernels. *Plant Biotechnol J*, 2020, 18: 1722–1735
- 33 Wang S, Yang C, Tu H, et al. Characterization and metabolic diversity of flavonoids in citrus species. *Sci Rep*, 2017, 7: 10549
- 34 Vaniya A, Samra S N, Palazoglu M, et al. Using MS-FINDER for identifying 19 natural products in the CASMI 2016 contest. *Phytochem Lett*, 2017, 21: 306–312
- 35 Dührkop K, Fleischauer M, Ludwig M, et al. SIRIUS 4: a rapid tool for turning tandem mass spectra into metabolite structure information. *Nat Methods*, 2019, 16: 299–302
- 36 Ru J, Li P, Wang J, et al. TCMSP: a database of systems pharmacology for drug discovery from herbal medicines. *J Cheminform*, 2014, 6: 13
- 37 Pang Z, Chong J, Li S, et al. MetaboAnalystR 3.0: toward an optimized workflow for global metabolomics. *Metabolites*, 2020, 10: 186
- 38 Ferraro G, Belvedere R, Petrella A, et al. Drug affinity-responsive target stability unveils filamins as biological targets for artemetin, an anti-cancer flavonoid. *Front Mol Biosci*, 2022, 9: 964295
- 39 Huang H, He Y, Zhang L, et al. Phenethyl isothiocyanate in combination with dibenzoylmethane inhibits the androgen-independent growth of

- prostate cancer cells. [Food Funct](#), 2018, 9: 2398–2408
- 40 Choi S S, Lee S H, Lee K A. A comparative study of hesperetin, hesperidin and hesperidin glucoside: antioxidant, anti-inflammatory, and antibacterial activities *in vitro*. [Antioxidants](#), 2022, 11: 1618
- 41 Chen X M, Tait A R, Kitts D D. Flavonoid composition of orange peel and its association with antioxidant and anti-inflammatory activities. [Food Chem](#), 2017, 218: 15–21
- 42 Zhao C, Wang F, Lian Y, et al. Biosynthesis of citrus flavonoids and their health effects. [Crit Rev Food Sci Nutr](#), 2020, 60: 566–583
- 43 He P, Wang S, Li S, et al. Structural mechanism of a dual-functional enzyme DgpA/B/C as both a C-glycoside cleaving enzyme and an O- to C-glycoside isomerase. [Acta Pharm Sin B](#), 2023, 13: 246–255
- 44 Siddiqi M Z, Rajivgandhi G, Faiq M, et al. Isolation and characterization of *Sphingomonas telluris*, *Sphingomonas caseinilyticus* isolated from Wet Land Soil. [Curr Microbiol](#), 2023, 80: 264
- 45 Grady E N, MacDonald J, Liu L, et al. Current knowledge and perspectives of *Paenibacillus*: a review. [Microb Cell Fact](#), 2016, 15: 203
- 46 Foge B, Granta R, Valciņa O, et al. Occurrence and diversity of *Bacillus cereus* and moulds in spices and herbs. [Food Control](#), 2018, 83: 69–74
- 47 Xu F, Chen Y, Cai Y, et al. Distinct roles for bacterial and fungal communities during the curing of vanilla. [Front Microbiol](#), 2020, 11: 552388

Multi-omics joint analysis of the effects of drying and aging on the metabolic quality of Guangchenpi

ZHOU Han-Xin^{1,2,3†}, LIU Yuan^{1,2†}, YUAN Zi-Yu^{1,2}, ZENG Ji-Wu⁴, XIAO Xue⁵, CHEN Jia-Jing^{1,2}, ZHU An-Ting^{6*} & XU Juan^{1,2*}

¹ National Key Laboratory for Germplasm Innovation and Utilization of Horticultural Crops, College of Horticulture and Forestry, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

² Hubei Hongshan Laboratory, Wuhan 430070, China

³ Jiangsu Provincial Agricultural Technology Promotion Station, Nanjing 210036, China

⁴ Guangdong Fruit Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Guangzhou 510640, China

⁵ Testing and Analysis Centre of Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China

⁶ State Key Laboratory of Biocatalysis and Enzyme Engineering, Environmental Microbial Technology Center of Hubei Province, College of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, China

† Contributed equally to this work

* Corresponding authors, E-mail: antingzhu@hubei.edu.cn; xujuan@mail.hzau.edu.cn

Citri Reticulatae Pericarpium is made from the dried peel of *Citrus reticulata* Blanco and its cultivated varieties, of which the one made from *Citrus reticulata* ‘Chachiensis’ is Guangchenpi, a widely known traditional Chinese medicine. This study explores the effects of drying and aging on the metabolic quality of Guangchenpi and identifies potential medicinal active substances in Guangchenpi through gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry combined with network pharmacology analysis. Six types of primary metabolites and 518 types of phenylpropanoid metabolites were identified in peels of *Citrus reticulata* ‘Chachiensis’ and Guangchenpi samples, among which 28 were key active ingredients in traditional Chinese medicine (such as quercetin-7-*O*-rutinoside and 3',4,7-trihydroxyflavone), and 34 phenylpropane metabolites (such as esculin and imperatorin) are major pharmacologically active ingredients. After drying, the contents of 169 substances were significantly up-regulated. During the aging process, the variety of metabolites increased, and the content of metabolites such as flavonoid-*C*-glucoside and 3',4,7-trihydroxyflavone significantly increased with the prolonged aging time. Chemical modifications of bioactive components also accompanied the drying and aging process. After drying, glucoside degradation and rhamnoside synthesis of various flavonoids in Guangchenpi occurred, whereas the aging process was dominated by oxymethylation. This study helps understand the aging mechanism of Guangchenpi and the phenomenon of ‘Extra aging makes for better Chenpi’. It also provides theoretical support for the efficient development and utilization of Guangchenpi.

Citrus reticulata ‘Chachiensis’, Guangchenpi, metabolite, drying, aging effect, metabolic quality

doi: [10.1360/SSV-2024-0276](https://doi.org/10.1360/SSV-2024-0276)