

李阳, 安琪, 宋悦, 等. HPLC 法测定不同产地柑橘第一次生理落果中活性成分的含量 [J]. 食品工业科技, 2022, 43(19): 364–371.
doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022010076

LI Yang, AN Qi, SONG Yue, et al. Determination of Active Components in the First Physiological Fruit Drop of *Citrus* from Different Producing Areas by HPLC[J]. Science and Technology of Food Industry, 2022, 43(19): 364–371. (in Chinese with English abstract).
doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2022010076

· 分析检测 ·

HPLC 法测定不同产地柑橘第一次生理落果中活性成分的含量

李 阳^{1,2}, 安 琪^{1,2}, 宋 悦^{1,2}, 屈沙沙^{1,2}, 范 刚^{1,2,*}, 任婧楠^{1,2}, 潘思轶^{1,2}

(1. 华中农业大学食品科学技术学院/环境食品学教育部重点实验室, 湖北武汉 430070;

2. 果蔬加工与品质调控湖北省重点实验室(华中农业大学), 湖北武汉 430070)

摘 要: 本研究采用高效液相色谱法(HPLC)测定我国柑橘主要产区如湖北宜昌、湖南怀化、广东潮州、广西南宁、福建漳州、浙江衢州等地的柑、橙、柚三种柑橘属植物第一次生理落果中川陈皮素、橘皮素、橙皮苷、柚皮苷、柠檬苦素以及辛弗林的含量, 比较不同产地柑橘属植物落果中有效活性成分含量的规律特点, 旨在选取营养价值高、活性成分含量丰富的柑橘落果品种, 为将来从中进一步提取有效成分并将其应用到各方面奠定基础。结果表明浙江衢州的槿柑落果中川陈皮素及橘皮素含量最高, 分别为 359.63 $\mu\text{g/g}$ 和 222.14 $\mu\text{g/g}$; 湖北宜昌的蜜柚落果中柚皮苷含量最高, 为 20.97 mg/g ; 湖北宜昌的脐橙落果中橙皮苷含量最高, 为 1485.73 $\mu\text{g/g}$; 福建漳州的琯溪蜜柚落果中柠檬苦素含量最高, 为 866.73 $\mu\text{g/g}$; 广西南宁的沃柑落果中辛弗林含量最高, 为 1004.14 $\mu\text{g/g}$ 。

关键词: 高效液相, 柑橘生理落果, 活性成分, 含量测定, 不同产地

中图分类号: TS255.1

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2022)19-0364-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2022010076



本文网刊:

Determination of Active Components in the First Physiological Fruit Drop of *Citrus* from Different Producing Areas by HPLC

LI Yang^{1,2}, AN Qi^{1,2}, SONG Yue^{1,2}, QU Shasha^{1,2}, FAN Gang^{1,2,*}, REN Jingnan^{1,2}, PAN Siyi^{1,2}

(1. College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Key Laboratory of Environment Correlative Dietology, Ministry of Education, Wuhan 430070, China;

2. Hubei Key Laboratory of Fruit & Vegetable Processing & Quality Control (Huazhong Agricultural University), Wuhan 430070, China)

Abstract: In this study, high performance liquid chromatography (HPLC) was used to determine the contents of nobiletin, tangeretin, hesperidin, naringin, limonin and synephrine in the first physiological fruit drop of mandarin orange, orange and pomelo from the main *Citrus* producing areas in China, such as Yichang in Hubei, Huaihua in Hunan, Chaozhou in Guangdong, Nanning in Guangxi, Zhangzhou in Fujian and Quzhou in Zhejiang. The purpose of comparing the characteristics of the content of effective active components in young fruits of *Citrus* plants from different habitats was to select *Citrus* cultivars with high nutritional value and rich active components, so as to lay a foundation for further extracting effective components and applying them to all aspects in the future. The results showed that: The contents of nobiletin and hesperidin in tangerine young fruits in Zhejiang Province were the highest, which were 359.63 $\mu\text{g/g}$ and 222.14 $\mu\text{g/g}$, respectively. The content of naringin in the young fruit of Hubei Changyang grapefruit was the highest, which was 20.97 mg/g . The content of hesperidin in young fruits of Hubei Newhall orange was the highest, which was 1485.73 $\mu\text{g/g}$. The content of limonin in the young fruit of Guanxi grapefruit in Fujian was the highest, which was 866.73 $\mu\text{g/g}$. The

收稿日期: 2022-01-11

基金项目: 湖北省重点研发计划项目(2020BBA049)。

作者简介: 李阳(1997-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 果蔬加工和风味化学, E-mail: 944343720@qq.com。

* 通信作者: 范刚(1982-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 果蔬加工和风味化学, E-mail: fangang@mail.hzau.edu.cn。

content of synephrine in the young fruit of fertile orange in Guangxi was the highest, which was 1004.14 $\mu\text{g/g}$.

Key words: HPLC; physiological fruit drop of *Citrus*; active ingredient; determination of contents; different origin

柑橘类水果是世界上消费最多的水果之一, 其包括柑、橘、柚、橙、柠檬等多个品种, 营养全面, 栽培广泛, 深受消费者的喜爱。柑橘生理落果, 又称柑橘落果, 是由于植物生理原因而凋落的, 落果的高峰期集中在每年的五月到六月, 分两次进行。第一次落果时间短而集中, 落果量大, 约占总量的 98%; 第二次落果数量较少, 果实较大^[1]。柑橘落果晒干后可作药用, 具有破气消积, 化痰除痞, 理气健脾等功效。有研究表明, 未成熟落果的药用作用比已成熟果实更强^[2], 且第一次生理落果中的有效活性物质含量高于第二次落果^[1]。

柑橘落果中含有多种营养成分, 如类黄酮化合物(flavonoids)、柠檬苦素(limonin)、生物碱类物质等, 黄酮类化合物按其结构可分为黄酮类(flavone)、黄酮类以及多聚甲氧基黄酮类三大类。黄酮类主要包括橙皮苷(hesperidin)、柚皮苷(naringin)、芸香柚皮苷(narirutin)、新橙皮苷(neohesperidin)等; 黄酮类包括木犀草素(luteolin)、香叶木素(diosmetin)、槲皮素(queracetin)、山奈酚(kaempferol)等^[3]; 多聚甲氧基黄酮类化合物可以被看作柑橘分类的标识物, 是柑橘属植物中的特有成分。类黄酮化合物在柑橘落果活性物质中占据很大比例, 具有抗癌^[4]、抗炎抑菌^[5]、抗增殖^[6]、神经保护^[7]以及降血糖^[8]等功效, 被广泛应用于食品科学、化学以及医学领域, 近年来越来越多地受到消费者的关注。柠檬苦素是柑橘果实中最常见的柠檬苦素类化合物之一, 也是柑橘属植物苦味的主要来源。目前已被人们发现的柠檬苦素类化合物大约有三百余种, 根据其结构大致分为柠檬苦素苷元(limonin aglycones)、降解性柠檬苦素类似物(degraded limonoids)以及糖苷型柠檬苦素类似物(limonoid glucosides)三类^[9], 具有抗肿瘤^[10]、镇静^[11]、调节人体内胆固醇水平^[12]以及除虫杀虫等功效^[13]。辛弗林(synephrine)是存在于芸香科柑橘属植物枳实、枳壳、陈皮等多种中药材中的一种生物碱, 具有提高新陈代谢, 增加热量消耗^[14], 强心护心^[15], 调节血压^[16-17]和调节胃肠平滑肌, 促进胃肠运动等方面的作用^[18]。

柑橘落果率高, 座果率低, 每年虽产生大量落果, 但仅有少数能得到利用, 大多柑橘落果腐烂地中, 不仅加重了环境负担, 且造成了严重的资源浪费。本研究从全国各柑橘主要产区湖北宜昌、湖南怀化、广东潮州、广西南宁、福建漳州、浙江衢州等地分别收集了柑、橙、柚三种柑橘属植物的第一次生理落果, 并选取其中具有代表性的六种有效活性成分(川陈皮素、橘皮素、橙皮苷、柚皮苷、柠檬苦素、辛弗林)作为定量检测指标, 采用 HPLC 法测定其含量, 旨在选取有效活性成分含量丰富的柑橘落果品种, 为将来从中进一步提取活性成分并将其应用到各方面奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

本试验选取柑橘属植物中的柑、橙、柚作为研究对象, 由于各产地气候差异, 柑橘第一次生理落果时间有所不同, 故本实验的原料采集日期自 4 月底开始, 至 6 月初结束, 分别从湖北宜昌、湖南怀化、广东潮州、广西南宁、福建漳州、浙江衢州等柑橘主要产区收集, 具体品种见下表 1; 川陈皮素、橘皮素、橙皮苷、柚皮苷、柠檬苦素以及辛弗林对照品(HPLC 级)均购自上海源叶生物科技有限公司, HPLC $\geq 98\%$; 乙腈、甲醇 色谱纯, 购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司; 十二烷基磺酸钠(SDS) 色谱纯, 购自武汉市伟琪博星生物科技有限公司; 磷酸 分析纯, 购自上海麦克林生化科技有限公司。

表 1 柑橘落果品种							
Table 1 <i>Citrus</i> young fruit cultivars							
产地/品种	柑	编号	橙	编号	柚	编号	采集时间
湖北宜昌	椪柑	BG	脐橙	BC	蜜柚	BY	2021.05.28
湖南怀化	椪柑	NG	脐橙	NC	香柚	NY	2021.05.31
广东潮州	潮州柑	DG	红江橙	DC	沙田柚	DY	2021.04.27
广西南宁	沃柑	XG	脐橙	XC	沙田柚	XY	2021.04.24
云南丽江	椪柑	YG	脐橙	YC	/	/	2021.04.28
福建漳州	沃柑	FG	脐橙	FC	蜜柚	FY	2021.05.05
重庆	椪柑	CG	脐橙	CC	文旦柚	CY	2021.05.10
江西赣南	/	/	脐橙	JC	蜜柚	JY	2021.05.01
四川眉山	椪柑	SG	/	/	沙田柚	SY	2021.06.15
浙江衢州	椪柑	ZG	脐橙	ZC	胡柚	ZY	2021.06.24

Waters-e2695 高效液相色谱仪 美国沃特世公司; DHG-06-100B 电热恒温鼓风干燥箱 武汉海声达仪器设备有限公司; MM400 冷冻混合球磨机 Retsch 公司; YB-300 高速多功能粉碎机 永康市速锋工贸有限公司; Milli-Q 超纯水机 贝徕美生物科技有限公司; KQ-300DE 超声波清洗机 昆山市超声仪器有限公司; SHZ-D(III)循环水式多用真空泵 上海力辰邦西仪器科技有限公司; JE203 电子天平 上海浦春计量仪器有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 对照品溶液的制备 分别精密称取橙皮苷、柚皮苷、川陈皮素、柠檬苦素、辛弗林对照品 20 mg, 置于 25 mL 容量瓶中, 加甲醇溶液, 定容, 摇匀, 得各对照品储备溶液。分别精密吸取 1、3、5、7 mL 对照品储备溶液于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇定容, 即得各浓度对照品溶液。橘皮素: 精密称取橘皮素对照品 20 mg, 置于 25 mL 容量瓶中, 加甲醇溶液, 定容, 摇匀, 得橘皮素对照品储备溶液。分别精密吸取 0.5、1、1.5、2、2.5 mL 橘皮素对照品储备溶液于 10 mL 容量瓶中, 用甲醇定容, 得到各浓度对照品溶液。

1.2.2 供试品溶液的制备 将不同品种落果置于 60 ℃ 烘箱烘干至恒重,用高速粉碎机打成粉末,过 60 目筛,精确称取 1.0 g,置于具塞锥形瓶中,加入 25 mL 甲醇,密塞,称定质量,超声处理 30 min 后取出,放冷至室温,称定质量,补齐质量,摇匀过滤,取续滤液,过 0.22 μm 滤膜,即得供试品溶液。

1.2.3 色谱条件 色谱柱为 Global Chromatography C₁₈ 柱,规格:250 mm×4.6 mm, 5 μm;柱温:30 ℃;流速为 1.0 mL/min;进样量:10 μL。川陈皮素、橘皮素:流动相为超纯水(A)-乙腈(B),梯度洗脱,条件为 0~15 min, 40%~55% B; 15~20 min, 55%~70% B; 20~30 min, 70%~80% B; 检测波长为 330 nm。橙皮苷、柚皮苷:流动相为超纯水(A)-乙腈(B),等度洗脱,条件为 80:20;检测波长为 283 nm。柠檬苦素:流动相为超纯水(A)-乙腈(B),等度洗脱,条件为 55:45;检测波长为 210 nm。辛弗林:流动相为超纯水(A)-乙腈(B),等度洗脱,条件为 68:32,水中含 0.05% 十二烷基磺酸钠和 0.02% 磷酸;检测波长为 275 nm。

1.2.4 定性及定量方法 吸取最高浓度的各对照品溶液 1 mL,用甲醇稀释,分别定容至 25 mL 容量瓶,放入紫外分光光度计中,在 200~400 nm 波长范围内扫描,根据紫外吸收图谱中最大吸收波长对活性成分进行 HPLC 法测定。随后精密吸取各对照品溶液及供试品溶液 10 μL,按“1.2.3”项色谱条件进行分析,每个样品设置三个平行,使用外标法,根据所得各活性成分保留时间以及峰面积计算各供试品溶液中川陈皮素、橘皮素、橙皮苷、柚皮苷、柠檬苦素以及辛弗林的含量。

1.3 数据处理

利用 Excel、SPSS Statistics 26 软件对测定数据进行统计分析。每组样品设置三个平行,结果以平均值±标准误差表示。

2 结果与分析

2.1 色谱条件的确定

2.1.1 检测波长的确定 利用紫外可见分光光度计

分别对川陈皮素、橘皮素、橙皮苷、柚皮苷、柠檬苦素以及辛弗林 6 种物质溶液进行扫描,结果显示川陈皮素与橘皮素两种多甲氧基黄酮均在 330 nm 附近有最大吸收波长;橙皮苷与柚皮苷均在 283 nm 附近有最大吸收波长;柠檬苦素的最大吸收波长出现在 210 nm 处,辛弗林的最大吸收波长为 275 nm。故选择上述波长条件进行高效液相色谱的检测,如图 1 所示。

2.1.2 流动相的确定 为获得较好的分离度,结合出峰时间、峰型等因素,参考文献报道 [19-22] 稍作调整。最终确定选择乙腈-水作为流动相,取“1.2.2”项中的供试品溶液 10 μL,注入液相色谱仪,记录谱图如下。由图 2 可知, A 图中的 1、2 号峰分别为川陈皮素与橘皮素,两种多甲氧基黄酮的色谱峰分离度及峰型均较好,符合高效液相色谱定量分析的一般要求; B 图中的 3 号峰为橙皮苷色谱峰,同一波长下没有其余杂质峰,峰型较好; C 图中的 4 号峰为柚皮苷色谱峰,同一波长下没有其余杂质峰,分离度好,峰型标准; D 图中的 5 号峰为柠檬苦素; E 图中的 6 号峰为辛弗林,可以看出峰与峰之间分离清晰,分离度均大于 1.5,峰型标准,如图 2 所示。

2.2 方法学验证

2.2.1 线性关系、检出限及定量限的考察 精密吸取“1.2.1”项下各浓度的对照品溶液 10 μL 注入液相色谱仪,以浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)进行线性回归分析;取各单品对照品溶液,用甲醇稀释,分别以信噪比 S/N=3 和 S/N=10 时对应的物质浓度为检出限(LOD)和定量限(LOQ),结果见表 2。结果显示,各成分在各自线性范围内均呈良好的线性关系,决定系数均大于 0.99,检出限在 0.05~0.12 μg/mL 范围内,定量限在 1.14~3.53 μg/mL 范围内。

2.2.2 精密度试验 精密吸取“1.2.1”项中所配制的不同浓度各对照品储备液中浓度最高溶液 10 μL,在上述“1.2.3”的色谱条件下,连续进样 6 次,记录川陈皮素、橘皮素、橙皮苷、柚皮苷、柠檬苦素和辛弗林

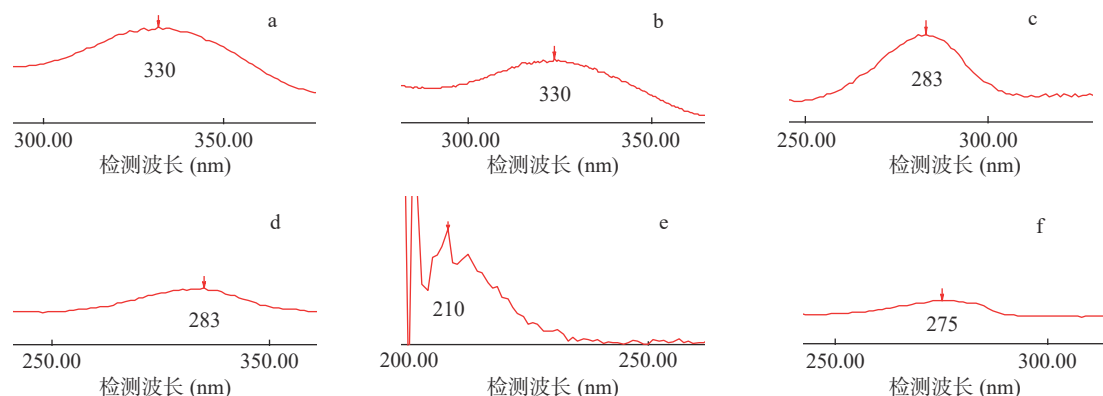


图 1 各活性成分紫外吸收光谱图

Fig.1 UV absorption spectra of active components

注:图 a~f 分别为川陈皮素、橘皮素、橙皮苷、柚皮苷、柠檬苦素以及辛弗林。

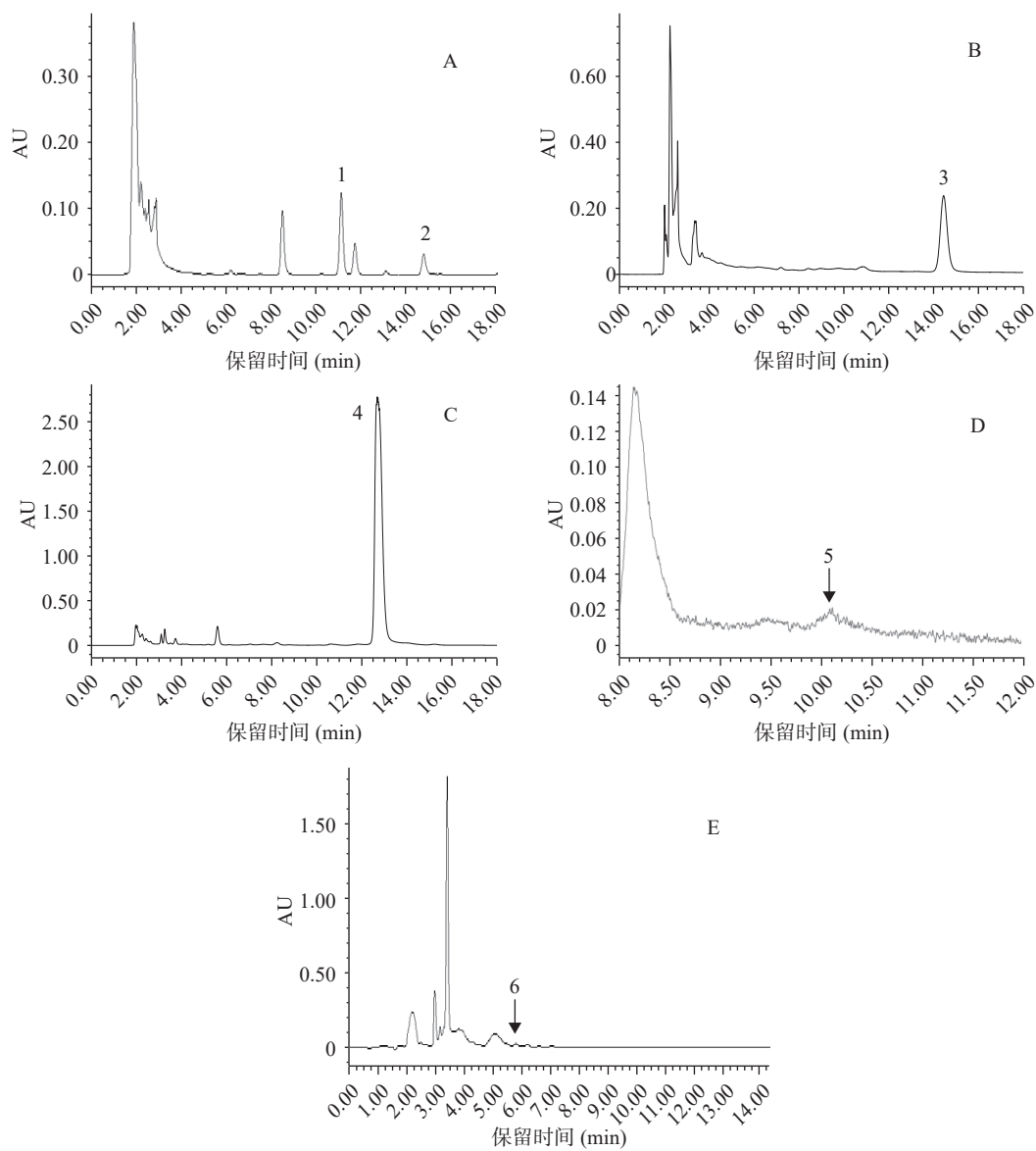


图 2 柑橘落果供试品溶液 HPLC 色谱图

Fig.2 HPLC chromatogram of the test solution of young *Citrus* fruit
注: 1~6 号峰分别为川陈皮素、橘皮素、橙皮苷、柚皮苷、柠檬苦素、辛弗林。

表 2 线性回归方程

Table 2 Linear regression equation						
成分	检测波长(nm)	回归方程	决定系数(R^2)	线性范围($\mu\text{g/mL}$)	检出限($\mu\text{g/mL}$)	定量限($\mu\text{g/mL}$)
川陈皮素	330	$Y=38570X+2782.5$	0.9998	80~800	0.09	1.14
橘皮素	330	$Y=48055X-35967$	0.9999	40~200	0.06	1.18
橙皮苷	283	$Y=20588X+521443$	0.9983	80~800	0.05	2.45
柚皮苷	283	$Y=7659X-22461$	0.9996	80~800	0.12	2.79
柠檬苦素	210	$Y=7703.4X+134300$	0.9987	80~800	0.08	1.58
辛弗林	275	$Y=3757.8X+16886$	0.9994	80~800	0.07	3.53

的峰面积,计算其峰面积的相对标准偏差 RSD(n=6)。结果显示各对照品溶液峰面积 RSD 范围为 0.37%~0.79%,均 $\leq 2.0\%$,表明仪器具有较好的精密度。

2.2.3 稳定性试验 取烘干粉碎后的同一品种落果样品,按“1.2.2”项下方法制备供试液,分别在 0、2、6、10、12、24 h 进样,按照上述“1.2.3”项色谱条件测定川陈皮素、橘皮素、橙皮苷、柚皮苷、柠檬苦素以

及辛弗林的峰面积,测定结果显示以上物质的 RSD (n=6)分别为 0.56%、0.33%、0.67%、0.71%、0.48% 和 0.36%,表明供试品溶液在室温下 24 h 内稳定。

2.2.4 重复性试验 取同一品种烘干粉碎后的落果样品共 6 份,每份 1.0 g,精密称定,按“1.2.2”项下方法制备供试液,分别测定川陈皮素、橘皮素、橙皮苷、柚皮苷、柠檬苦素以及辛弗林的含量,计算得出它

们的 RSD(n=6)分别为 1.44%、0.89%、0.59%、1.24%、1.17% 和 0.95%，表明该方法重现性良好。

2.2.5 加样回收率试验 选取浙江衢州胡柚和湖北宜昌脐橙两品种落果进行加样回收试验，精密称取已知含量的两品种供试样品共 18 份，每份 1.0 g，分别加入不同浓度的川陈皮素、橘皮素、橙皮苷、柚皮苷、柠檬苦素、辛弗林的对照品溶液适量，按供试品溶液的制备方法制备加样供试液并按“1.2.3”项下色谱条件测定，计算加样回收率。结果表明：川陈皮素的平均回收率为 97.5%(RSD=0.6%)、橘皮素的平均回收率为 97.3%(RSD=1.1%)、橙皮苷的平均回收率为 99.4%(RSD=1.2%)、柚皮苷的平均回收率为 100.8%(RSD=0.8%)、柠檬苦素的平均回收率为 99.5%(RSD=1.1%)、辛弗林的平均回收率为 98.0%(RSD=1.4%)，表明该方法准确可靠，结果见表 3。

2.3 柑橘第一次生理落果中有效活性成分含量测定

对照品溶液与供试品溶液各进样 10 μL，每个样品作三次平行，记录峰面积。对于未在线性范围浓度内的样品进行稀释或浓缩处理，测定结果见表 4。

由表 4 可知，不同产地间柑品种落果中川陈皮素含量由高到低前 6 位依次为浙江衢州>湖北宜昌>

广东潮州>云南丽江>广西南宁>湖南怀化，与橘皮素和橙皮苷含量由高到低前 6 位相同，只存在个别省份的顺序差异。福建漳州、重庆与四川眉山三地落

表 3 加样回收率试验结果

Table 3 Test results of sample addition recovery							
成分	取样量 (g)	样品含量 (μg/g)	加入量 (μg/g)	测得量 (μg/g)	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
川陈皮素	1.001	34.098	240	268.338	97.6	97.5	0.6
	1.002	34.101	240	269.541	98.1		
	1.000	34.086	240	266.646	96.9		
橘皮素	1.000	23.037	200	218.837	97.9	97.3	1.1
	1.002	23.038	200	213.838	95.4		
	0.999	23.038	200	220.438	98.7		
橙皮苷	1.001	1501.334	400	1903.749	100.6	99.4	1.2
	1.000	1501.332	400	1895.314	98.5		
	1.001	1501.327	400	1898.021	99.2		
柚皮苷	0.999	7011.476	240	7247.156	100.2	100.8	0.8
	1.001	7011.483	240	7245.963	101.7		
	1.000	7011.476	240	7242.836	100.4		
柠檬苦素	1.001	166.372	560	723.491	99.5	99.5	1.1
	1.001	166.374	560	725.146	99.8		
	1.002	166.363	560	722.095	99.2		
辛弗林	1.000	185.628	240	417.228	96.5	98.0	1.4
	1.002	185.633	240	423.953	99.3		
	0.999	185.633	240	421.3130	98.2		

表 4 不同产地柑、橙、柚品种落果生理功能活性物质含量

Table 4 Contents of physiological functions and active substances in young fruits of mandarin orange, orange and pomelo varieties from different habitats

样品	川陈皮素(μg/g)	橘皮素(μg/g)	橙皮苷(μg/g)	柠檬苦素(μg/g)	辛弗林(μg/g)	柚皮苷(mg/g)
BG	264.32±1.76 ^b	163.86±0.53 ^b	654.78±1.44 ^d	131.50±4.36 ^d	932.45±2.88 ^b	ND
NG	125.48±0.92 ^e	95.19±0.62 ^d	585.36±2.54 ^f	100.33±1.31 ^e	886.90±4.11 ^d	ND
DG	174.93±3.45 ^e	82.53±0.43 ^e	889.59±1.54 ^c	221.58±3.66 ^b	34.63±0.96 ⁱ	ND
XG	137.56±0.62 ^d	31.17±0.14 ^f	1050.02±1.66 ^a	230.19±3.70 ^b	1004.14±3.80 ^a	ND
YG	173.74±0.19 ^e	117.04±0.12 ^c	642.53±6.17 ^e	74.85±2.16 ^f	769.15±2.10 ^e	ND
FG	97.19±0.37 ^f	23.75±0.11 ^g	519.82±2.81 ^g	184.59±3.58 ^c	902.51±2.66 ^c	ND
CG	12.73±0.24 ^h	5.86±0.11 ⁱ	477.31±2.42 ^h	95.75±1.89 ^e	347.46±2.89 ^h	ND
SG	21.67±0.26 ^g	17.61±0.01 ^h	455.33±3.97 ⁱ	67.09±2.38 ^f	532.61±4.87 ^g	ND
ZG	359.63±1.59 ^a	222.14±1.02 ^a	915.35±2.01 ^b	281.39±3.79 ^a	722.20±6.60 ^f	ND
BC	28.57±0.05 ^d	10.78±0.36 ^c	1485.73±3.68 ^a	165.93±1.53 ^b	188.22±3.31 ^e	ND
NC	39.71±0.21 ^a	14.75±0.62 ^a	441.39±3.51 ^f	15.85±2.46 ^f	386.06±6.03 ^c	ND
DC	23.27±0.20 ^f	5.61±0.07 ^g	427.32±1.06 ^g	57.00±2.59 ^d	91.00±5.28 ^f	ND
XC	23.94±0.03 ^e	6.58±0.69 ^f	1293.30±2.17 ^b	188.03±4.00 ^a	204.52±5.78 ^e	ND
YC	30.36±0.31 ^b	7.20±0.09 ^e	656.85±1.22 ^c	28.51±1.90 ^e	359.06±1.53 ^d	ND
FC	29.13±0.18 ^c	7.64±0.27 ^d	331.04±2.85 ⁱ	11.88±0.96 ^h	574.20±5.71 ^b	ND
CC	10.90±0.12 ⁱ	4.61±0.30 ^h	813.94±5.56 ^c	10.74±0.85 ^h	758.45±4.97 ^a	ND
JC	13.94±0.34 ^h	5.61±0.13 ^g	407.30±0.14 ^h	118.27±3.83 ^c	374.28±5.81 ^{cd}	ND
ZC	16.00±0.08 ^g	12.82±0.23 ^b	722.17±2.62 ^d	12.82±1.36 ^g	189.86±4.55 ^e	ND
BY	微量	1.76±0.01 ^e	ND	223.45±1.81 ^c	ND	20.97±0.21 ^a
NY	微量	1.78±0.18 ^c	ND	微量	ND	9.14±0.13 ^c
DY	微量	微量	ND	88.92±1.86 ^d	ND	7.64±0.09 ^g
XY	8.02±0.38 ^b	微量	ND	322.57±2.12 ^b	ND	5.23±0.07 ^h
FY	微量	1.98±0.05 ^b	ND	866.73±4.23 ^a	ND	15.57±0.19 ^d
CY	微量	微量	ND	微量	ND	20.00±0.22 ^b
JY	微量	微量	ND	2.88±0.52 ^f	ND	17.96±0.18 ^c
SY	微量	微量	ND	微量	ND	8.58±0.07 ^f
ZY	32.89±0.33 ^a	23.04±0.05 ^a	492.62±5.12	47.67±1.09 ^e	ND	3.41±0.05 ⁱ

注：含量低于定量限记为微量；同列同种样品间不同小写字母表示差异显著(P<0.05)；ND：未检出。

果中诸如多甲氧基黄酮、橙皮苷等黄酮类化合物的含量较少,由此可以推测,在我国东部、中东部以及南部地区所种植的柑类落果中含有的黄酮类化合物含量较高,西南部柑类落果中黄酮类化合物含量较少。柠檬苦素在柑类落果中含量由高到低前 6 位为浙江衢州>广西南宁>广东潮州>福建漳州>湖北宜昌>湖南怀化,均超过 100 $\mu\text{g/g}$ 。辛弗林含量较高的柑品种主要集中在我国中东部以及南部的广西、湖北等地。

各产地橙品种中川陈皮素与橘皮素含量变化差异不大,橙皮苷含量由高到低为湖北宜昌>广西南宁>重庆>浙江衢州>云南丽江>湖南怀化,柠檬苦素含量较高的产地集中在广西南宁、湖北宜昌、江西赣南,含量超过 100 $\mu\text{g/g}$,与谭润雅等^[23]的测定结果一致。辛弗林含量由高到低前 6 位为重庆>福建漳州>湖南怀化>江西赣南>云南丽江>浙江衢州,推测在我国西南部以及东南部种植的橙品种落果中辛弗林的含量较高。

柚品种落果中含有丰富的柚皮苷,其中含量较高的品种主要集中在湖北宜昌、重庆、江西赣南以及福建漳州等地,含量均超过 15000 $\mu\text{g/g}$ 。柠檬苦素含量较高的地区为福建漳州,广西南宁以及湖北宜昌,均超过 200 $\mu\text{g/g}$ 。柚皮苷和柠檬苦素是柑橘中起主要作用的苦味物质,由此可推测,在我国中部以及东南部地区种植的柚子品种落果中的苦味物质较多,东部及南部地区柚子落果中苦味物质相对较少。

3 讨论与结论

本研究选取我国不同产地柑橘主要产区的柑橘第一次生理落果为试验原料,采用 HPLC 法进行测定,分析结果表明,不同产地不同品种柑橘落果中黄酮类化合物、柠檬苦素以及生物碱辛弗林的含量差异显著。

从总体来看,在所检测的所有柑橘属植物中,川陈皮素含量最高的是浙江衢州的柑品种落果,为 359.63 $\mu\text{g/g}$,其次为湖北宜昌、云南丽江以及广东潮州的柑品种落果。柑品种中川陈皮素的含量明显高于橙品种。橘皮素含量最高的同样为浙江衢州的柑,为 222.14 $\mu\text{g/g}$ 。其次为湖北宜昌、云南丽江以及湖南怀化的柑品种落果,柑品种中橘皮素的含量普遍大于橙品种。柚品种中仅能检出少量的多甲氧基黄酮,与赵梓燕^[24]的检测结果一致。由于胡柚为柚与柑杂交栽培出的杂交柚品种,故其中多甲氧基黄酮的含量略高。除浙江衢州胡柚以外,其他的柚类落果中川陈皮素、橘皮素含量均在 10 $\mu\text{g/g}$ 以下。

橙皮苷含量最高的落果品种为湖北宜昌橙,为 1485.73 $\mu\text{g/g}$,其次为广西南宁的橙品种、柑品种以及浙江衢州的柑品种落果。柑品种与橙品种中橙皮苷的含量大致相同,没有明显差异。除在浙江衢州胡柚中检测到少量橙皮苷以外,其余柚品种落果均不含橙皮苷。湖北宜昌柚中的柚皮苷含量最高,为 20.97 mg/g ,其次为重庆、江西赣南以及福建漳州的柚品种落

果。柑品种、橙品种落果中均未检出柚皮苷。

福建漳州的柚落果中柠檬苦素含量最高,为 866.73 $\mu\text{g/g}$ 。其次为广西南宁柚、浙江衢州柑以及广西南宁的柑品种落果。广西南宁的沃柑落果中辛弗林含量最高,为 1004.14 $\mu\text{g/g}$ 。其次为湖北宜昌椪柑,福建漳州沃柑以及湖南怀化椪柑。柚品种落果中均未检出辛弗林,柑品种中辛弗林含量普遍高于橙品种。

与张静等^[25]的研究成果对比发现,柑橘幼果中的川陈皮素、橘皮素两类多甲氧基黄酮的含量显著大于成熟柑橘果肉中的含量。柑品种落果中的川陈皮素含量与成熟柑橘果皮中含量近乎一致,柑、橙品种落果中的橘皮素含量与成熟柑橘果皮中含量近乎一致。橙皮苷的含量略小于成熟柑橘果肉中的含量;与苏智先等^[26]的研究结果比较,柚类幼果中的柚皮苷含量普遍大于成熟柚果实中的柚皮苷含量,说明随着柚类果实的成熟,苦味物质逐渐减少;与吴今人等^[27]的研究结果进行对比发现,柑、橙、柚类幼果中柠檬苦素的含量普遍小于成熟柑橘果肉与果皮;与刘伟等^[28]的研究结果进行比较,发现柑、橙幼果中的辛弗林含量均小于成熟柑橘中的辛弗林含量。

黄酮类化合物的常规检测方法例如紫外分光光度法等,只能测定总黄酮的含量,且实验中发现紫外吸收光谱测定的黄酮含量误差较大,准确度不高,可靠性差。本实验选用 HPLC 法测定柑橘落果中的活性成分,既方便快捷,又具有较好的灵敏性、准确度,还可同时测定多种物质,能够满足不同产地不同品种柑橘落果的测定要求。

从质量评价角度来看,经过现代药理学研究证实,黄酮类化合物如橙皮苷、柚皮苷、新橙皮苷等具有保护心血管健康^[29-30]、抗疲劳焦虑^[31]等功效;生物碱类化合物辛弗林可促进胃肠动力,松弛支气管平滑肌,与《中国药典》2015 年版所记载^[32]中功效相一致。故可以橙皮苷、柚皮苷以及辛弗林的含量作为评价柑橘落果质量的标志物。结合实验结果可以看出,湖北宜昌的柑品种、橙品种、柚品种,广西南宁的橙品种、柑品种以及重庆的柚品种落果的质量较高,具有良好的药理活性。从提取有效成分含量最大化的角度来看,在未来进行柑橘落果中生理活性物质的提取试验时选择浙江衢州、广西南宁的柑品种,湖北宜昌的橙品种,福建漳州以及湖北宜昌的柚品种预计可获得较高的有效成分含量,能够显著凸显提取效果。

柑橘生理落果资源丰富,采用 HPLC 法测定不同产地柑橘落果中活性成分的含量,有助于对落果的针对性利用,争取资源利用最大化,具有极大的工业化生产价值,另外对于减轻环境负担,减少污染等方面也具有重大的现实意义。本实验仅探究了不同产地柑橘落果中活性成分含量的区别,至于造成以上差异的原因例如环境土壤、种植方式、气候条件等外部因素还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 毛华荣. 柑橘生理落果有效成分复合提取工艺研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2009. [MAO H R. Study on compound extraction technology of effective components from physiological fruit drop of *Citrus*[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2009.]
- [2] BAI Y, ZHENG Y Y, PANG W J, et al. Identification and comparison of constituents of *Aurantii fructus* and *Aurantii fructus* immaturus by UFLC-DAD-Triple TOF-MS/MS[J]. *Molecules*, 2018, 23: 803.
- [3] 杨雪妍. 柑橘黄酮抗氧化、抗增殖及抗衰老活性研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2020. [YANG X Y. Antioxidant, antiproliferative and anti-aging activities of *Citrus* flavonoids[D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2020.]
- [4] BRGLEZ M E, KNEZ H M, SKERGET M, et al. Polyphenols: Extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects[J]. *Molecules*, 2016, 7(21): 901.
- [5] GUARDIA T, ROTELLI A E, JUAREZ A O, et al. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat[J]. *II Farm*, 2001, 9(56): 683–687.
- [6] MANTHEY J A, GUTHRIE N. Antiproliferative activities of *Citrus* flavonoids against six human cancer cell lines[J]. *Agricultural and Food Chemistry*, 2002, 21(50): 5837–5843.
- [7] NAKAJIMA A, AOYAMA Y, NGUYEN T T, et al. Nobiletin, a *Citrus* flavonoid, ameliorates cognitive impairment, oxidative burden, and hyperphosphorylation of tau in senescence-accelerated mouse[J]. *Behavioural Brain Research*, 2013, 250(6): 351–360.
- [8] JUNG U J, LEE M K, JEONG K S, et al. The hypoglycemic effects of hesperidin and naringin are partly mediated by hepatic glucose-regulating enzymes in C57BL/KsJ-db/db mice[J]. *Nutrition*, 2004, 10(134): 2499–2503.
- [9] 王贱荣, 董美玲, 郭跃伟. 芸香科柠檬苦素类化合物及其生物活性研究进展[J]. *国际药学研究杂志*, 2009, 36(5): 321–332. [WANG J R, DONG M L, GUO Y W. Advances in limonoids of Rutaceae and their biological activities[J]. *International Journal of Pharmaceutical Research*, 2009, 36(5): 321–332.]
- [10] RAHMAN A, SIDDIQUI S A, JAKHAR R, et al. Growth inhibition of various human cancer cell lines by imperatorin and limonin from *Poncirus trifoliata* Rafin seeds[J]. *Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 2015, 15(2): 236–241.
- [11] YANG Y, WANG X, ZHU Q, et al. Synthesis and pharmacological evaluation of novel limonin derivatives as anti-inflammatory and analgesic agents with high water solubility[J]. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2014, 24(7): 1851–1855.
- [12] SAH A N, JOSHI A, JUYAL V, et al. Antidiabetic and hypolipidemic activity of *Citrus medica* Linn. seed extract in streptozotocin induced diabetic rats[J]. *Pharmacognosy Journal*, 2011, 3(23): 80–84.
- [13] ERAKY M A, ELKHOLY A A, RASHED G A, et al. Dose-response relationship in *Schistosoma mansoni* juvenile and adult stages following limonin treatment in experimentally infected mice[J]. *Parasitology Research*, 2016, 115(10): 1–10.
- [14] CALAPAI G, FIRENZUOLI F, SAITTA A, et al. Anti-obesity and cardiovascular toxic effects of *Citrus aurantium* extracts in the rat: A preliminary report[J]. *Fitoterapia*, 1999, 70(6): 586–592.
- [15] 陈芳群, 侯玲. 柑橘属植物中辛弗林的测定[J]. *药物分析杂志*, 1999, 70(6): 586–592. [CHEN F Q, HOU L. Determination of synephrine in *Citrus*[J]. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 1999, 70(6): 586–592.]
- [16] 王天山, 潘扬, 殷飞, 等. 马前素与辛弗林对家兔重症失血性休克模型的作用[J]. *南京中医药大学学报(自然科学版)*, 1999, 15(6): 345–346. [WANG T S, PAN Y, YIN F, et al. Effects of premedication and synephrine on severe hemorrhagic shock model in rabbits[J]. *Journal of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine (Natural Science Edition)*, 1999, 15(6): 345–346.]
- [17] PENZAK S R, JANN M W, GOLD J A, et al. Seville (sour) orange juice: Synephrine content and cardiovascular effects in normotensive adults[J]. *Journal of Clinical Pharmacology*, 2001, 41(10): 1059–1063.
- [18] 官福兰, 王汝俊, 王建华. 枳壳及辛弗林对兔离体小肠运动的影响[J]. *中国药理与临床*, 2002, 18(2): 9–11. [GUAN F L, WANG R J, WANG J H. Effects of *Fructus aurantii* and synephrine on the movement of rabbit small intestine *in vitro*[J]. *Chinese Pharmacology and Clinic*, 2002, 18(2): 9–11.]
- [19] 张菊华, 李志坚, 单杨, 等. 柑桔鲜果皮中类黄酮含量比较与分析[J]. *中国食品学报*, 2015, 5(15): 233–240. [ZHANG J H, LI Z J, SHAN Y, et al. Comparison and analysis of flavonoids in *Citrus* peel[J]. *Chinese Journal of Food*, 2015, 5(15): 233–240.]
- [20] 胡玲, 王仁才, 周鸣谦, 等. HPLC法测定不同时期柑桔落果中活性成分含量[J]. *湖南农业科学*, 2009(1): 115–117. [HU L, WANG R C, ZHOU M Q, et al. Determination of active components in Ponkan fruit drop at different stages by HPLC[J]. *Hunan Agricultural Sciences*, 2009(1): 115–117.]
- [21] 许志彬, 李巧琪, 李婷, 等. 柑橘种子中柠檬苦素的提取工艺优化及分析[J]. *当代化工*, 2016, 10(45): 2325–2327. [XU Z B, LI Q Q, LI T, et al. Optimization and analysis of extraction technology of limonin from *Citrus* seeds[J]. *Contemporary Chemical Industry*, 2016, 10(45): 2325–2327.]
- [22] 王丽静, 李艳, 姚闯. HPLC法测定枳壳中辛弗林的含量[J]. *江西化工*, 2012, 2: 110–111. [WANG L J, LI Y, YAO M. Determination of octocarpine in *Citrus aurantium* by HPLC[J]. *Jiangxi Chemical*, 2012, 2: 110–111.]
- [23] 谭润雅, 雷鹏, 黄琪, 等. 反相高效液相色谱法测定不同产地枳实中柠檬苦素的含量[J]. *中南药学*, 2014, 8(12): 808–811. [TAN R Y, LEI P, HUANG Q, et al. Determination of limonin in *Fructus aurantii* from different producing areas by RP-HPLC[J]. *Central South Pharmacy*, 2014, 8(12): 808–811.]
- [24] 赵梓燕. 柑橘果实多甲氧基黄酮的提取、富集与分离纯化方法研究[D]. 重庆: 西南大学, 2018. [ZHAO Z Y. Extraction, enrichment and purification of polymethoxy flavonoids from *Citrus* fruits[D]. Chongqing: Xinan University, 2018.]
- [25] 张静, 朱丽莎, 张耀海, 等. 不同晚熟柑橘中酚类物质的含量检测及分析[J]. *食品与机械*, 2012, 34(12): 27–34. [ZHANG J, ZHU L S, ZHANG Y H, et al. Detection and analysis of phenolic substances in different late maturing *Citrus*[J]. *Food and Machinery*, 2012, 34(12): 27–34.]

- [26] 苏智先, 边清泉, 王劲, 等. 柚类果皮中柚皮苷含量的测定分析[J]. *绵阳师范学院学报*, 2007, 5(5): 50–54. [SU Z X, BIAN Q Q, WANG J, et al. Determination and analysis of naringin in pomelo peel[J]. *Journal of Mianyang Normal University*, 2007, 5(5): 50–54.]
- [27] 吴今人, 耿平, 胡田叶, 等. 柑橘不同部位中柠檬苦素的分布及含量分析[J]. *湖北农业科学*, 2015, 54(4): 882–885. [WU J R, GENG P, HU T Y, et al. Distribution and content analysis of limonin in different parts of *Citrus*[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2015, 54(4): 882–885.]
- [28] 刘伟, 袁洪燕, 苏东林, 等. 不同柑橘品种及保健品中辛弗林含量的比较[J]. *湖南农业科学*, 2016(12): 61–65. [LIU W, YUAN H Y, SU D L, et al. Comparison of synephrine content in different *Citrus* varieties and health products[J]. *Hunan Agricultural Sciences*, 2016(12): 61–65.]
- [29] YAMAMOTO M, SUZUKI A, HASE T, et al. Short-term effects of glucosyl hesperidin and hesperetin on blood pressure and vascular endothelial function in spontaneously hypertensive rats[J]. *Nutrition Science and Vitaminology*, 2008, 54(1): 95–98.
- [30] YAMAMOTO M S, SUZUKI P D, JOKURA B S, et al. Glucosyl hesperidin prevents endothelial dysfunction and oxidative stress in spontaneously hypertensive rats[J]. *Nutrition*, 2008, 24(5): 470–476.
- [31] 张森品. 桑叶总黄酮抗疲劳、抗抑郁药理作用及机制研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2021. [ZHANG S P. Pharmacological effects and mechanism of total flavonoids from mulberry leaves on fatigue and depression[D]. Beijing: Beijing University of traditional Chinese Medicine, 2021.]
- [32] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典一部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 246. [National Pharmacopoeia Committee. Pharmacopoeia of the People's Republic of China, Volume I[S]. Beijing: China Medical Science and Technology Press, 2015: 246.]