

红美人柑橘幼果生长期营养物质及苦味物质变化规律

宣晓婷¹, 朱麟¹, 沈波涛², 崔燕¹, 林旭东¹, 马建东³, 凌建刚^{1*}

(1. 宁波市农业科学研究院农产品加工研究所, 宁波 315000; 2. 宁波市生产力科技服务中心, 宁波 315040; 3. 宁波源味农业发展有限公司, 宁波 315700)

摘要: **目的** 比较不同生长期红美人柑橘幼果营养成分、苦味物质及生物碱活性成分的变化规律。**方法** 以7~10月不同生长期的红美人柑橘幼果为研究对象, 监测其总酚、总黄酮、果胶、还原糖等营养成分、柠檬苦素类化合物、辛弗林等指标及其变化规律。**结果** 随着生长期延长, 幼果中总酸(total acid, TA)、可溶性固形物(total soluble solids, TSS)、还原糖、总黄酮含量均先上升后下降, 而还原型抗坏血酸含量则先下降后上升, 总酚、果胶含量呈下降趋势, A、B生长期(7月中旬~8月上旬、8月中旬~9月上旬)幼果中总果胶、总黄酮含量最高分别达(22.67±0.03) mg/g 和(5.38±0.02) mg/g, 可作为天然抗氧化剂加工和果胶提取原料资源。此外, 幼果中柠檬苦素和诺米林含量呈先上升后下降趋势, 活性成分辛弗林含量先快速下降后趋于平缓, A生长期幼果中含量最高[(2071.13±16.96) μg/g FW]。**结论** 红美人柑橘幼果可作为果胶、辛弗林等活性成分和天然抗氧化剂的提取原料, 提高其副产物利用率和经济价值。

关键词: 红美人柑橘; 幼果; 营养成分; 柠檬苦素类化合物; 生物碱

Changes rule of nutrition substances and bitter substances in young fruits of 'Hongmeiren' citrus during growing periods

XUAN Xiao-Ting¹, ZHU Lin¹, SHEN Bo-Tao², CUI Yan¹, LIN Xu-Dong¹,
MA Jian-Dong³, LING Jian-Gang^{1*}

(1. Institute of Agricultural Products Processing, Ningbo Academy of Agricultural Sciences, Ningbo 315000, China;
2. Ningbo Productivity Science and Technology Service Center, Ningbo 315040, China;
3. Ningbo Yuanwei Agricultural Development Co., Ltd., Ningbo 315700, China)

ABSTRACT: Objective To study the changes rule in the nutrients, bitter substances, and active ingredients of alkaloid of young fruits of 'Hongmeiren' citrus during different growth periods. **Methods** Taking the young fruits of 'Hongmeiren' citrus in different growth periods from July to October as the research object, the nutritional components such as total phenols, total flavonoids, pectin and reducing sugar and so on, limonin compounds and synephrine and

基金项目: 象山县农业科技计划项目(2022C1012)、宁波市农科院-中国农科院科技合作创新工程项目(2019CXGC004)、宁波市公益类科技计划项目(2019C10043)

Fund: Supported by the Agricultural Science and Technology Plan Project of Xiangshan (2022C1012), the Science and Technology Cooperation and Innovation Project between Ningbo Academy of Agricultural Sciences and Chinese Academy of Agricultural Sciences (2019CXGC004), and the Public Welfare Science and Technology Project of Ningbo (2019C10043)

*通信作者: 凌建刚, 博士, 研究员, 主要研究方向为农产品贮运与非热加工。E-mail: nbjg@163.com

*Corresponding author: LING Jian-Gang, Ph.D, Professor, Institute of Agricultural Products Processing, Ningbo Academy of Agricultural Sciences, Ningbo 315000, China. E-mail: nbjg@163.com

other indexes and their change rules were monitored. **Results** The extension of the growth period, the total acid (TA), total soluble solids (TSS), reducing sugars, and total flavonoids in the young fruits increased firstly and then decreased, while the content of reduced ascorbic acid decreased firstly and then increased, and the content of total phenols and pectin decreased, the total content of pectin and flavonoids reached the highest [(22.67±0.03) mg/g and (5.38±0.02) mg/g] in the young fruits during A and B growth period (mid July to early August, mid August to early September), which could be used as the raw material resources of natural antioxidant and pectin extraction. In addition, the content of limonin and nomilin in young fruits increased first and then decreased, the content of synephrine in young fruits first decreased rapidly and then tended to be flat, the content of young fruits during the growth period of A was the highest [(2071.13±16.96) µg/g FW]. **Conclusion** The young fruits of 'Hongmeiren' citrus can be the raw material for extracting pectin and synephrine active ingredients and natural antioxidant, which improves its utilization rate and economic value.

KEY WORDS: 'Hongmeiren' citrus; young fruit; nutrients; limonin compounds; alkaloid

0 引言

“红美人”柑橘为橘橙类杂交品种,肉嫩汁多、甜酸适度、化渣性好、风味独特,深受广大消费者青睐^[1]。作为浙江省第三大柑橘品种,2020 年全省红美人种植面积突破 10 万亩,其中主产区宁波市象山县 3.3 万亩,产值超 5.5 亿元,成为浙江省名副其实的致富果。但随着种植面积的超速增长和商品率较低,鲜果价格从 50~60 元/kg 跌破至 20 元/kg 左右。高值化利用问题已成为红美人柑橘产业发展的瓶颈。

与砂糖橘、沃柑、贡柑等很多柑橘品种需要用调节剂来保花保果不同,红美人柑橘的花果特性,决定了要用疏花疏果控制合适的产量从而维持树势。红美人柑橘果实生长通常呈现“S”或“双 S”形曲线,根据细胞的变化,果实发育过程可分为果实膨大前期(7 月中旬~8 月上旬)、果实膨大中期(8 月中旬~9 月上旬)、果实膨大后期(9 月中旬~10 月上旬)、果实转色期(10 月中旬~11 月上旬)及成熟期(11 月上旬~12 月)^[2]。红美人柑橘成熟前,其疏果比例高达 50%,疏果后产生大量的幼果,果型不一,无法鲜食与销售。但相较于成熟果,幼果中存在更高含量的多酚、黄酮、类柠檬苦素、辛弗林(synephrine)等营养成分和活性物质,具有很高的副产物利用价值^[3]。红美人柑橘中的多酚、黄酮具有抗氧化性、抗癌、抗菌、防止心血管疾病等生物活性^[4]。柠檬苦素类化合物的生物活性与药理功能日益受到重视。研究表明,柠檬苦素类化合物具有显著的抗癌活性^[5]、抗炎^[6]和抗菌性^[7],以及与维生素 C 相当的抗氧化活性^[8]。生物碱辛弗林主要存在于芸香科柑橘属(*Citrus reticulata* Blanco)植物,具有收缩血管、升高血压^[9]和提高新陈代谢、分解脂肪^[10]等作用。目前,国内辛弗林或其制品主要依赖进口,国内辛弗林提取技术尚处研究阶段,且多从柑橘皮中提取。为进一步探究红美人柑橘幼果的附加值,本研究针对 7~10 月的象山红美人柑橘幼果,监测其生长过程中

主要营养成分(总酚、总黄酮、总果胶、还原糖、总酸等)、苦味物质(柠檬苦素、诺米林)及活性成分辛弗林含量的变化规律,以期为红美人柑橘幼果的副产物高值化利用与精深加工提供新思路与新方法。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

红美人柑橘幼果,采集于宁波象山定塘红美人柑橘分选中心。

还原糖含量试剂盒、还原型抗坏血酸试剂盒、总果胶含量试剂盒(苏州格锐思生物科技有限公司);无水乙醇、酚酞、氢氧化钠(NaOH)、三氯化铝、醋酸钠、冰醋酸、乙醇、硝酸铝、亚硝酸钠、碳酸钠、福林酚、磷酸二氢钾(分析纯)、没食子酸标准品(纯度 99%)、芦丁标准品(纯度 95%)、3,5-二硝基水杨酸(3,5-dinitrosalicylic acid, DNS)(纯度 ≥ 98%)(国药集团化学试剂有限公司);乙腈、甲醇(色谱纯,上海安谱实验科技股份有限公司);乙酸(色谱纯,上海阿拉丁生化科技股份有限公司);十二烷基磺酸钠(色谱纯,上海源叶生物科技有限公司);辛弗林标准品(纯度 ≥ 98%)、柠檬苦素标准品(纯度>95%)、诺米林标准品(纯度 ≥ 98%)(色谱纯,美国 Sigma-Aldrich 公司)。

1.2 仪器与设备

YP30002 电子天平(精度 0.1 mg,上海佑科仪器仪表有限公司);S10 手提式高速分散器、JY92-IIDN 超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司);H1850R 离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);HU13WN3L 榨汁机(韩国惠人公司);F5 手持糖酸度计(日本爱拓 ATAGO 公司);DL-I-15 台式封闭电炉(天津市泰斯特仪器有限公司);LC-20AT 高效液相色谱仪(配备 SPD-M20A 二极管阵列检测器,日本岛津有限公司);干式氮吹仪(无锡沃信仪器有限公司);DH300 金属浴(杭州瑞诚仪器有限公司);MD190

酶标仪(美国 MD 分子仪器有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 样品采集

在宁波象山县定塘红美人柑橘基地采集 7~10 月 4 个不同采收期的红美人幼果, 并于 -18°C 下冷冻贮藏, 测定其理化品质、苦味物质及活性成分。

1.3.2 理化品质测定

(1) 总酸与可溶性固形物含量测定

总酸测定: 取 0.20 g 果肉样品, 加入 1.5 mL 蒸馏水匀浆后, 置于 80°C 水中加热 10 min, 冷却后定容至 2 mL, 12000 r/min、 4°C 离心 10 min, 取 1.0 mL 粗提液和 9.0 mL 水于烧杯中, 加入 20 μL 95% 无水乙醇, 加入 1 滴酚酞试剂, 用 0.01 mol/L NaOH 滴定, 呈微红色且 30 s 不褪色, 记录所用的 NaOH 体积。测定以蒸馏水作为空白对照组, 根据滴定时消耗 NaOH 标准滴定溶液体积计算总酸含量(以苹果酸计), 公式见式(1):

$$\text{总酸}/\% = \frac{[(V_1 - V_2) \times C_{\text{NaOH}} \times 0.067 \times D]}{0.2 \times V_{\text{加入滴定粗提液}} \div V_{\text{提取液}}} \times 100\% \quad (1)$$

其中: V_1 —滴定时消耗 NaOH 标准滴定溶液体积, mL;

V_2 —空白时消耗 NaOH 标准滴定溶液体积, mL;

C_{NaOH} —NaOH 标准滴定液浓度为 0.01 mol/L;

$V_{\text{加入滴定粗提液}}$ —加入滴定粗提液体积为 1 mL;

$V_{\text{提取液}}$ —提取液体积为 2 mL;

D —样品稀释倍数;

0.067—酸的换算系数, 即 1 mol 氢氧化钠相当于苹果酸 0.067 g;

0.20—样品质量, g。

可溶性固形物含量测定: 将柑橘幼果榨汁, 取 2 mL 果汁, 12000 r/min 下离心 10 min, 利用便携式糖酸一体机测定上清液。

(2) 还原糖含量测定

采用还原糖含量试剂盒进行测定。由于碱性条件下, DNS 试剂与还原糖共热生成棕红色氨基化合物, 并在 500 nm 处有特征吸收峰, 在一定浓度范围内还原糖的含量与 500 nm 吸光度呈线性关系。根据试剂盒操作方法得到标准曲线($Y=1.0026X-0.0324$, $r^2=0.9961$), 进而计算得到还原糖含量(mg/g)。

(3) 总黄酮含量测定

取 0.01 g 的新鲜样本, 加入 60% 的乙醇 1.5 mL, 60°C 下振荡提取 2 h, 用 60% 乙醇定容至 1.5 mL。在 25°C 、12000 r/min 下, 离心 10 min, 取上清液测定。总黄酮采用氯化铝比色法进行测定, 根据标准曲线($Y=1.6277X-0.0049$, $r^2=0.9999$), 计算得到总黄酮含量(mg/g)。

(4) 总酚含量测定

取 0.10 g 新鲜样本, 加入 60% 的乙醇 1.5 mL, 60°C 下

振荡提取 2 h, 用 60% 乙醇定容至 1.5 mL。12000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 用 60% 乙醇定容至 1.5 mL, 采用福林酚法测定, 根据标准曲线($Y=0.3494X-0.0006$, $r^2=0.9999$), 计算得到总酚含量(mg/g)。

(5) 还原型抗坏血酸含量测定

还原型抗坏血酸(ascorbic acid, AsA)把三价铁离子还原成二价铁离子, 二价铁离子与红菲咯啉反应生成红色络合物, 在 534 nm 处有特征吸收峰, 颜色深浅与 AsA 含量成正比。根据还原型抗坏血酸试剂盒方法制备样品, 称取约 0.50 g 柑橘幼果样品, 加入 5 mL 预冷的提取液, 冰水浴匀浆, 室温静置 10 min, 12000 r/min、 4°C 下离心 10 min, 取上清液, 置冰上待测。还原型抗坏血酸的测定采用试剂盒方法测定, 计算公式如式(2):

$$\text{AsA}/(\text{mg}/\text{g}) = \frac{0.01 \times (A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}) \times D}{(A_{\text{标准}} - A_{\text{空白}})} \quad (2)$$

其中: AsA 为还原型抗坏血酸含量; $A_{\text{测定}}$ 、 $A_{\text{空白}}$ 、 $A_{\text{标准}}$ 分别为测定管、空白管和标准管的吸光值; W 为样品质量, g; D 为稀释倍数。

(6) 总果胶含量测定

总果胶含量测定采用咔唑比色法测定, 即总果胶在稀酸中水解为半乳糖醛酸, 并与咔唑进行缩合反应, 生成紫红色物质, 该物质在 530 nm 处有最大吸收峰, 颜色深浅与总果胶含量成正比。取 0.10 g 新鲜样品, 加 80% 乙醇 1.5 mL, 研磨匀浆后, 85°C 水浴 10 min, 冷却后, 8000 r/min 离心 10 min, 向沉淀中加入 1 mL 的 80% 乙醇, 85°C 水浴 10 min, 冷却后再离心取沉淀。向沉淀中加入 1 mL 提取液, 95°C 水浴 60 min, 冷却后离心, 取上清液待测。果胶含量采用试剂盒方法测定, 根据标准曲线($Y=1.8749X-0.0018$, $r^2=0.9956$) 计算得到果胶含量(mg/g)。

1.3.3 柠檬苦素和诺米林含量测定

参考李一兵^[11]的测试方法, 部分略作改动, 采用高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)测定。

样品提取方法: 精准称取 0.30 g 鲜样, 用 1 mL 乙腈, 在 60°C 、300 W 下超声 30 min, 并离心(12000 r/min、10 min), 重复提取步骤 3 次, 合并 3 次上清液, 氮气吹干, 加入 1 mL 乙腈溶解, 取上清液过 0.22 μm 有机滤膜, 待测。

HPLC 液相色谱条件: C_{18} 反相色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm), 流动相 A: 甲醇, B: 0.1% 乙酸水, A:B 为 35:65 (V:V), 进样量 10 μL , 流速 1 mL/min, 柱温 35°C , 走样时间为 30 min, 紫外检测器的波长为 210 nm。

根据标准曲线得到柠檬苦素、诺米林含量($\mu\text{g}/\text{g}$ FW)。

1.3.4 辛弗林测定

参考罗朝晖等^[12]的方法, 采用高效液相色谱法测定辛弗林含量。

提取方法: 称取 0.20 g 鲜样用 2 mL 80% 甲醇水, 在 300 W 超声 40 min 后离心(12000 r/min、10 min), 取上清液

过 0.22 μm 有机滤膜, 待测。

HPLC 液相条件: C_{18} 反相色谱柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm), 流动相 A(甲醇):B(0.1%磷酸二氢钾水溶液, 含有 1% 十二烷基磺酸钠和 2 mL 乙酸)=50:50 (V:V)。进样量 10 μL , 流速 1 mL/min, 柱温 25 $^{\circ}\text{C}$, 走样时间为 30 min, 紫外检测器的波长为 275 nm, 用流动相过柱子, 待基线稳定后开始检测。

根据标准曲线得到辛弗林含量($\mu\text{g/g}$ FW)。

1.4 数据分析

所有实验结果都采用 3 次检测结果的平均值 \pm 标准偏差, 标准偏差采用 SPSS 18.0 分析软件(美国 IBM 公司)进行单因素方差分析所得, 用 Tukey 检验法进行显著性比较, 所有显著性分析均在 $P<0.05$ 水平。

2 结果与分析

2.1 外观及总酸与可溶性固形物含量分析

红美人柑橘在不同生长阶段的幼果呈现不同的感官品质。图 1 为 7~10 月份 4 个不同生长期的红美人幼果外观, 由图 1 可见, 在生长早期红美人柑橘幼果表现呈现暗黄偏绿, 到 C 生长期其表皮部分区域出现绿转黄, 到最后一次疏果的 D 生长期, 幼果的表皮已整体呈现红美人柑橘特有的金黄色。红美人柑橘属于典型的非呼吸跃变型水果, 没有后熟作用, 在生长过程中发生糖分积累、有机酸降低、类胡萝卜素形成、色泽转变等变化^[13]。



注: A 采集期为 7 月中旬~8 月上旬; B 采集期为 8 月中旬~9 月上旬; C 采集期为 9 月中旬~10 月上旬; D 采集期为 10 月中旬~11 月上旬, 下同。

图 1 7~10 月份 4 个不同生长期的红美人幼果

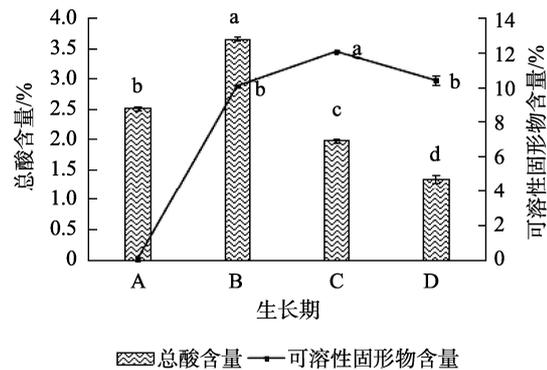
Fig.1 Young fruits of 'Hongmeiren' citrus in 4 different growing periods from July to October

总酸和可溶性固形物含量是作为柑橘鲜果酸甜度的重要表征指标, 其含量越高, 口感越厚重。由图 2 可见, 在柑橘幼果生长期, 其总酸含量呈现先上升后下降的趋势; 而可溶性固形物含量呈现先快速上升后趋于平缓, 最高达到 $12.05\%\pm 0.05\%$, 红美人柑橘风味有较大提升。这是由于在生长初期, 幼果随着生长发育快速积累有机酸和可溶性糖, 后由于部分有机酸转变为糖或是呼吸作用消耗, 导致总酸含量下降。单一糖酸度并不能很好地反馈口感, 通过可溶性固形物与总酸含量比值(简称“固酸比”)可更好地反馈红美人柑橘风味和成熟度, 固酸比越大, 则甜度越高^[14]。在 C 和

D 生长期, 红美人柑橘幼果的固酸比已达到 6.09 以上, 显著高于生长期 B(固酸比=2.75), 说明在这两个生长期的幼果口感有较大提升, 利用此阶段的柑橘幼果进行精深加工, 可以充分提高红美人柑橘的利用率和市场价值。

2.2 还原糖含量分析

还原糖是指具有还原性的单糖或二糖, 柑橘中还原糖以葡萄糖、果糖为主, 是反映柑橘甜度的重要指标之一。图 3 为不同生长期红美人柑橘幼果中还原糖含量的变化, 由图 3 可知, 幼果在生长过程中其还原糖的含量先快速增加后缓慢下降, 此变化规律与可溶性固形物含量的变化规律相一致。红美人柑橘幼果在生长过程中, 通过光合作用不断积累还原糖, 贮存在柑橘果肉细胞的液泡中。本研究中 A~C 生长期为 7~9 月的夏季, 日照时间长且光合作用强, 促使红美人柑橘幼果快速积累还原糖, 后由于日照时间和温度的减少和降低, 还原糖积累速率低于消耗速率, 因此 D 生长期出现小幅下降。



注: 不同字母表示不同生长期间存在显著差异($P<0.05$), 下同。

图 2 不同生长期红美人柑橘幼果总酸和可溶性固形物含量的变化($n=3$)

Fig.2 Changes of total acid and total soluble solid content in young fruits of 'Hongmeiren' citrus during different growing periods ($n=3$)

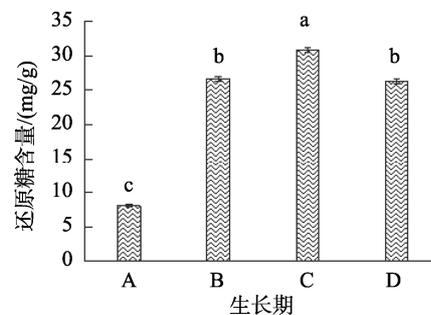


图 3 不同生长期红美人柑橘幼果还原糖含量的变化($n=3$)

Fig.3 Changes of reducing sugar content in young fruits of 'Hongmeiren' citrus during different growing periods ($n=3$)

2.3 总酚含量分析

柑橘属水果(citrus fruits, CFs)富含酚类物质。多酚作为柑橘中重要的植物化学素, 具有强抗氧化性、抑制癌细

胞转移等生物活性作用^[15-16]。如图 4 所示, 随着生长期的推移, 红美人柑橘幼果中总酚含量呈现先快速降低后趋于平缓。这是由于随着幼果的发育, 酚类物质的合成速率降低, 其底物向着合成类胡萝卜素的方向发展, 导致酚类物质的含量不断下降。类似的变化趋势在草莓、苹果等水果中同样被发现^[17], 冯晨静等^[18]研究草莓果实成熟期品质的变化, 发现随着果实的成熟, 酚类物质在绿熟期有较高的含量, 之后不断下降, 这是由于酚类底物向着合成花青苷的方向转变。此外, 有研究报道总酚的含量会影响果实口感, 当水溶液中总酚高于 750 mg/kg 时会有明显苦涩味, 而当低于 300 mg/kg 时会感到无味^[19], 因此适当的总酚含量是有助于提升果实鲜食品质。

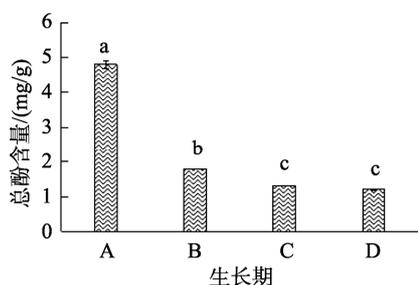


图 4 不同生长期红美人柑橘幼果总酚含量的变化($n=3$)

Fig.4 Changes of total phenol content in young fruits of 'Hongmeiren' citrus during different growing periods ($n=3$)

2.4 总黄酮含量分析

黄酮类化合物是柑橘类果实中含量最丰富的次生代谢产物, 具有抗氧化性、抗癌、抗菌、防止心血管疾病等生物活性, 可捕捉活性氧自由基, 降低氧化伤害, 在柑橘中影响其色泽和风味^[3]。从图 5 可以看出, 在红美人柑橘幼果生长期间, 其总黄酮含量先显著上升, 后显著下降($P<0.05$)。已有研究^[20]报道, 脐橙幼果中黄酮类化合物含量最高, 随着果实不断成熟, 其橙皮苷、柚皮苷等黄酮物质含量降低。周明等^[21]同样证实了“修水化红”甜橙在成熟过程中总黄酮和橙皮苷含量不断下降, 与本研究中结论相符。此外, 吴冬凡等^[22]研究水浴回流方式对火龙果果皮中总黄酮提取的影响, 最佳工艺下提取的总黄酮平均质量分数为 7.87 mg/g, 并通过体外实验证实该总黄酮含量可以达到 1,1-二苯基-2-三硝基苯肼

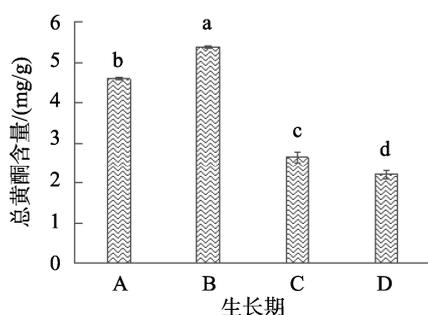


图 5 不同生长期红美人柑橘幼果总黄酮含量的变化($n=3$)

Fig.5 Changes of total flavonoids content in young fruits of 'Hongmeiren' citrus during different growing periods ($n=3$)

(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, DPPH)、2,2-联氮-二(3-乙基-苯并噻唑-6-磺酸)二铵盐[2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate), ABTS]自由基和羟基(hydroxyl, OH)自由基的最大清除率达到 88.64%、60.84%和 61.77%, 具有天然抗氧化剂的提取原材料潜力。因此, 本研究中 B 生长期的红美人柑橘幼果[总黄酮含量达(5.38±0.02) mg/g]可用于加工与开发天然抗氧化剂产品。

2.5 还原型抗坏血酸含量分析

AsA 是抗坏血酸的一种存在形式, 是柑橘抗氧化体系中重要的抗氧化剂, 参与氧化胁迫作用, 在维持细胞氧化还原平衡、清除自由基等方面具有至关重要的作用, 且对红美人柑橘品质具有重要影响^[23]。红美人柑橘幼果成熟过程中 AsA 含量的变化如图 6 所示, 呈现“下降-上升”的变化趋势, 在 C 生长期达到最低值[(0.0404±0.0008) mg/g 鲜重]后快速上升至最大值[(0.0529±0.0028) mg/g 鲜重]。有研究报道晚熟脐橙鲍威尔和中熟脐橙纽荷尔在果实发育过程中其 AsA 的变化规律呈现明显差异, 前者呈快速增加趋势而后者呈波动增加趋势, 与本研究结果总体趋势一致, 其中 AsA 含量波动的原因猜测可能是由于脐橙的采收期不同导致光照强度不同, 使得果实表皮温度变化, 进而影响线粒体呼吸链电子传递从而影响 AsA 的合成^[24]。

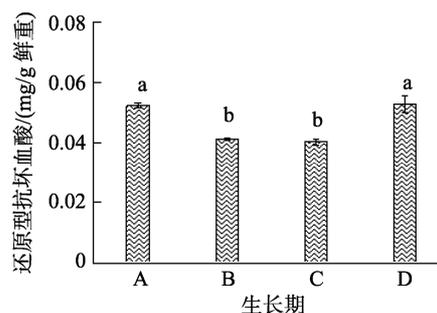


图 6 不同生长期红美人柑橘幼果还原型抗坏血酸含量的变化($n=3$)

Fig.6 Changes of reduced ascorbic acid content in young fruits of 'Hongmeiren' citrus during different growing periods ($n=3$)

2.6 总果胶含量分析

果胶作为细胞壁的重要组成成分, 与果实的软硬度、果肉细腻质地等有紧密联系, 这在枣^[25]、葡萄^[26]、猕猴桃^[27]、甜瓜^[28]等相关研究中得到证实。由图 7 可知, 随着幼果的生长, 红美人柑橘幼果中总果胶含量总体呈现下降的趋势。这是由于红美人柑橘幼果生长期多种参与细胞壁作用的水解酶活性上升, 其中变化最显著的是果胶物质的降解。果胶作为水溶性膳食纤维, 具有一定活性功能^[29], 且总果胶含量会影响柑橘渣渣性^[30]。目前工业中生产果胶一般从柑橘皮、苹果皮、葡萄皮等植物细胞中提取, 而柑橘皮中总果胶含量在 20%~30%^[31], 因此, 本研究中红美人柑橘幼果[总果胶含量最高达(22.67±0.03) mg/g]可作为很好

的提取果胶原料的资源, 提高其利用率和经济价值。

2.7 柠檬苦素和诺米林含量分析

以浓度(X , $\mu\text{g/g}$)为横坐标, 峰面积(Y)为纵坐标分别得到柠檬苦素和诺米林标准曲线线性回归方程分别为 $Y=6972.6X-4220.9$ ($r^2=0.9997$)、 $Y=5587.7X-5713.4$ ($r^2=0.9994$), 相关系数(r^2)均达到 0.999 以上, 保留时间分别为 6.92 min 和 8.35 min, 通过高效液相色谱法测定不同生长期红美人柑橘幼果中柠檬苦素和诺米林的含量, 图 8 为柠檬苦素和诺米林标准品(E)和 A 生长期收集的红美人柑橘幼果提取液(F)在 210 nm 下的高效液相色谱图, 结合标准品的标准曲线对其含量分别进行定量分析。

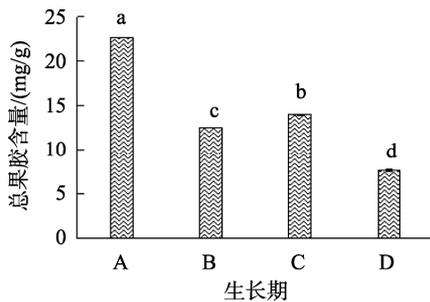


图 7 不同生长期红美人柑橘幼果总果胶含量的变化($n=3$)

Fig.7 Changes of total pectin content in young fruits of 'Hongmeiren' citrus during different growing periods ($n=3$)

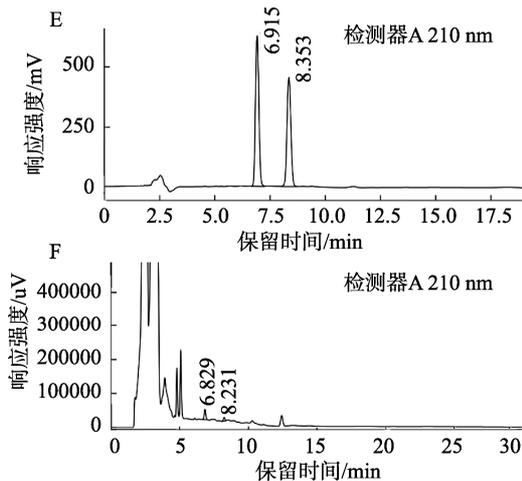


图 8 柠檬苦素和诺米林标准品(E)和 A 生长期收集的红美人柑橘幼果提取液(F)在 210 nm 下的高效液相色谱图

Fig.8 High performance liquid chromatograms of limonin and nomilin standards (E) and 'Hongmeiren' citrus young fruit extract (F) collected in A growth period at 210 nm

柠檬苦素和诺米林是类柠檬苦素糖苷中最具代表性的功能成分, 具有抗氧化、抗肿瘤、抗心血管疾病、抗病毒等生物活性^[32]。但在柑橘加工过程中, 冷冻、机械损伤等会增加果肉酸度和酶活, 促使柠檬苦素生成量增加, 产生影响口感的苦涩味。图 9 显示了不同生长期红美人柑橘幼果中柠檬苦素和诺米林含量的变化, 从图 9 中可见, 柠

檬苦素和诺米林含量均呈现先上升后下降的趋势。在 A~B 生长期, 幼果随着生长逐渐积累有机酸, 而有研究报道柑橘果中的 A-环内酯在酸性条件下可被柠檬苦素 D-环内酯水解酶催化形成柠檬苦素^[33], 因此猜测柠檬苦素含量的增加是由于有机酸的积累导致。在 C~D 生长期, 随着柑橘果实成熟度的提高, 幼果中柠檬苦素 A-环内酯在柠檬苦素葡萄糖基转移酶的作用下形成无苦味的柠檬苦素葡萄糖苷^[34], 进而“后苦”味逐渐减轻。李一兵^[11]在研究甜橙成熟过程中柠檬苦素和诺米林等类柠檬苦素物质的变化规律时得出相似的结果, 且在 11 月中旬是甜橙口感转变的关键时期, 其含量已低于其苦味阈值(6 mg/L)^[35]。从图 9 可以看出, D 生长期的红美人柑橘幼果的柠檬苦素含量显著降低至 $(10.09 \pm 0.22) \mu\text{g/g FW}$ ($P < 0.05$), 因此此阶段幼果有潜力作为加工产品的原料。

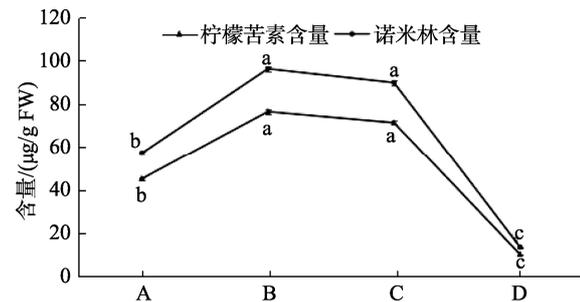


图 9 不同生长期红美人柑橘幼果柠檬苦素和诺米林含量的变化($n=3$)

Fig.9 Changes of limonin and nomilin content in young fruits of 'Hongmeiren' citrus during different growing periods ($n=3$)

2.8 辛弗林含量分析

以辛弗林浓度(X , $\mu\text{g/g}$)为横坐标, 峰面积(Y)为纵坐标得到辛弗林标准曲线线性回归方程为 $Y=5.2892X-3.3537$, 相关系数(r^2)达到 0.999, 保留时间为 7.82 min, 通过高效液相色谱法测定不同生长期红美人柑橘幼果中辛弗林的含量, 图 10 为辛弗林标准品(G)和 A 生长期收集的红美人柑橘幼果提取液(H)在 275 nm 下的高效液相色谱图, 结合标准品的标准曲线对其含量分别进行定量分析。

辛弗林是枳实提取物中的主要功能活性成分, 具有逐风理气、温胃促食欲等作用, 是天然的兴奋剂^[36]。图 11 显示了不同生长期红美人柑橘幼果中辛弗林含量的变化, 从图 11 中可见, 随着生长期延长, 幼果中辛弗林含量先快速下降后趋于平缓, 其中 A 生长期辛弗林含量最高达到 $(2071.13 \pm 16.96) \mu\text{g/g FW}$, D 生长期其含量最低 $[(234.96 \pm 2.08) \mu\text{g/g FW}]$ 。在 A~B 生长期幼果辛弗林含量显著下降($P < 0.05$), 下降率为 73.56%, 而到 C~D 生长期幼果辛弗林含量下降率仅为 12.50%。张文娟^[3]研究了 6 种柑橘幼果生长过程中辛弗林含量的变化, 结果发现随着生长期延长辛弗林含量呈下降趋势, 与本研究结果一致。有研究报道利

用超声提取陈皮中辛弗林产率达 (3.32 ± 0.086) mg/g^[37], 利用乙酸回流法从青皮中提取辛弗林产率达 4.38 mg/g^[38], 而本研

究中 A 生长期的红美人柑橘幼果辛弗林含量达 (2071.13 ± 16.96) $\mu\text{g/g}$ FW, 具有作为辛弗林活性成分提取的原料潜力。

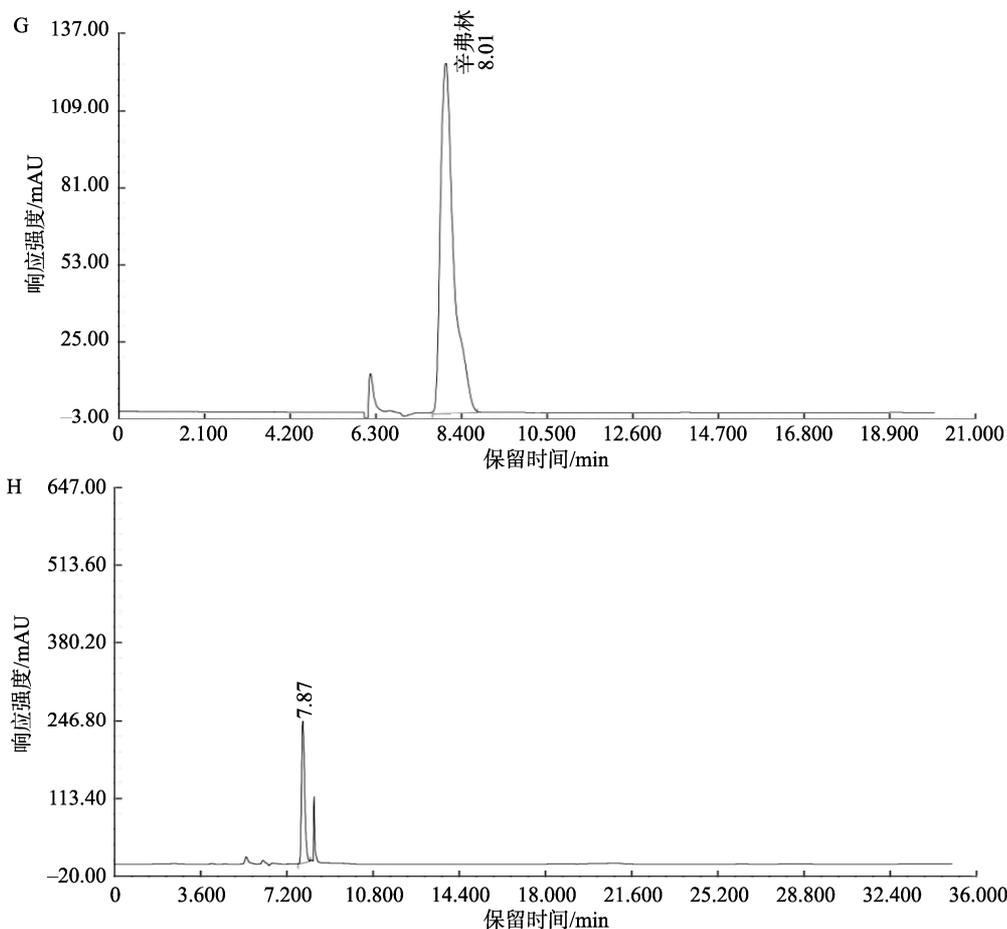


图 10 辛弗林标准品(G)和 A 生长期收集的红美人柑橘幼果提取液(H)在 275 nm 下的高效液相色谱图

Fig.10 High performance liquid chromatograms of synephrine of standard (G) and 'Hongmeiren' citrus young fruit extract (H) collected in A growth period at 275 nm

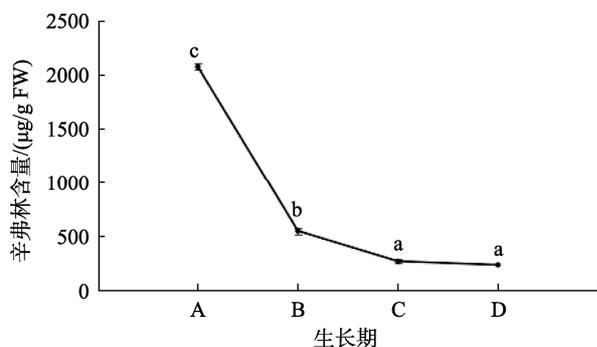


图 11 不同生长期红美人柑橘幼果辛弗林含量的变化($n=3$)

Fig.11 Changes of synephrine content in young fruits of 'Hongmeiren' citrus during different growing periods ($n=3$)

3 结论

本研究探究了不同生长期红美人柑橘幼果中营养成分(总酚、黄酮、果胶等)、苦味物质(柠檬苦素、诺米林)及活

性成分辛弗林含量的变化。结果表明, 在柑橘幼果生长期, 其总酸、可溶性固形物、还原糖、总黄酮含量均呈现先上升后下降的趋势, 而其还原型抗坏血酸含量先下降后上升, 总酚、果胶含量呈现下降趋势。其中 A、B 生长期的红美人柑橘幼果总果胶含量达 (22.67 ± 0.03) mg/g、总黄酮含量最高达 (5.38 ± 0.02) mg/g, 可用作加工与开发天然抗氧化剂产品及提取果胶的原料资源, 提高幼果的利用率与经济价值。同时, 研究表明红美人柑橘幼果中的苦味物质柠檬苦素和诺米林含量均呈先上升后下降趋势。随着生长期延长, 幼果中辛弗林含量先快速下降后趋于平缓, 辛弗林作为柑橘类果实的主要功能活性成分, A 生长期的红美人柑橘幼果中含量最高, 具有作为辛弗林活性成分提取的原料潜力。通过了解不同生长期红美人柑橘幼果的营养品质与活性成分的变化规律, 有利于幼果的新产品开发。开发出天然抗氧化剂新产品, 可作为果胶、辛弗林活性成分的提取原料, 拓宽应用场景, 增加副产物利用率, 提升产业竞争力。

参考文献

- [1] 柯甫志, 徐建国, 孙建华, 等. 日本柑橘新品种—红美人[J]. 浙江柑橘, 2011, (4): 22–24.
KE PZ, XU JG, SUN JH, *et al.* New Japanese citrus variety—Hongmeiren [J]. Zhejiang Citrus, 2011, (4): 22–24.
- [2] 王程宽, 黄振东, 刘兴泉, 等. 气象因子对红美人柑橘品质的影响[J]. 浙江农业学报, 2020, 32(10): 1798–1808.
WANG CK, HUANG ZD, LIU XQ, *et al.* Effects of meteorological factors on fruit quality of Hongmeiren citrus [J]. Acta Agric Zhejiangensis, 2020, 32(10): 1798–1808.
- [3] 张文娟. 柑橘幼果功能成分提取分析及抗氧化活性研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2015.
ZHANG WJ. Extraction and analysis on the functional components and antioxidant activity in young fruits of citrus [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2015.
- [4] 单杨. 柑橘类黄酮的分离、结构鉴定、化学修饰及生物活性研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2007.
SHAN Y. The research on isolation, identification, chemical modification and bioactivities of flavonoids in citrus peel [D]. Changsha: Central South University of Forestry and Technology, 2007.
- [5] KAUR J, KAUR G. An insight into the role of citrus bioactives in modulation of colon cancer [J]. J Funct Foods, 2015, 13(11): 239–261.
- [6] 温靖, 施英, 徐玉娟, 等. 柑橘果实中柠檬苦素抗炎镇痛作用的研究[J]. 食品科学, 2007, 28(11): 515–518.
WEN J, SHI Y, XU YJ, *et al.* Anti-inflammation and analgesic experimental study on citrus fruits limonoids [J]. Food Sci, 2007, 28(11): 515–518.
- [7] 王辉, 曾晓房, 冯卫华, 等. 柠檬皮中的柠檬苦素对青霉的抑菌活性和机理研究[J]. 食品与发酵工业, 2019, 45(5): 75–79.
WANG H, ZENG XF, FENG WH, *et al.* Antifungal activity and mechanism of limonoids from lemon peel against *Penicillium* [J]. Food Ferment Ind, 2019, 45(5): 75–79.
- [8] YU J, WANG L, WALZEM RL. *et al.* Antioxidant activity of citrus limonoids, flavonoids, and coumarins [J]. J Agric Food Chem, 2005, 53(6): 2009–2014.
- [9] PENZAK SR, JANN MW, GOLD JA, *et al.* Seville (sour) orange juice: Synephrine content and cardiovascular effects in normotensive adults [J]. J Clin Pharmacol, 2001, 41: 1059–1063.
- [10] 刘荣, 韦正, 樊丹青, 等. 不同栽培品种橘皮中主要活性成分的动态积累[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(15): 111–117.
LIU R, WEI Z, FAN DQ, *et al.* Dynamic accumulation of main active ingredient in different cultivars of orange peel [J]. Chin J Exp Tradit Med Formul, 2014, 20(15): 111–117.
- [11] 李一兵. 不同柑橘品种果汁类柠檬苦素的含量变化及相关基因表达分析[D]. 重庆: 西南大学, 2018.
LI YB. Content changes of the limonoid and related gene expression analysis in juice of different citrus cultivars [D]. Chongqing: Southwest University, 2018.
- [12] 罗朝晖, 经辉. 反相离子对高效液相色谱法测定枳实中辛弗林的含量[J]. 中国药房, 2006, 17(19): 1502–1503.
LUO ZH, JING H. Content determination of synephrine in citrus *Aurantium* L. by reversed phase ion-pair HPLC [J]. Chin Pharm, 2006, 17(19): 1502–1503.
- [13] 奚昕琰, 杨淑娜, 王颖, 等. 采收期和贮藏时间对红美人杂柑果实品质的影响[J]. 浙江农业科学, 2021, 62(3): 538–540.
XI XY, YANG SN, WANG Y, *et al.* Effect of harvest period and storage time on fruit quality of hongmeiren [J]. J Zhejiang Agric Sci, 2021, 62(3): 538–540.
- [14] 李升锋, 徐玉娟, 廖森泰, 等. 不同品种番石榴果实评价及糖酸组分和抗氧化能力的分析[J]. 食品科学, 2009, 30(1): 68–72.
LI SF, XU YJ, LIAO ST, *et al.* Evaluation of fruit and analysis of sugar and acid compositions and antioxidant activities of different guava cultivars [J]. Food Sci, 2009, 30(1): 68–72.
- [15] MASKAN M. Kinetics of colour change of kiwifruits during hot air and microwave drying [J]. J Food Eng, 2001, 48(2): 169–175.
- [16] HUNG CH, HUANG CC, HSU LS, *et al.* Apple polyphenol inhibits colon carcinoma metastasis via disrupting snail binding to focal adhesion kinase [J]. J Funct Foods, 2015, 12: 80–91.
- [17] JU ZG, YUAN YB, LIU CL, *et al.* Relationships among phenylalanine ammonia-lyase activity, simple phenol concentrations and anthocyanin accumulation in apple [J]. Sci Hort, 1995, 61: 215–226.
- [18] 冯晨静, 关军锋, 杨建民, 等. 草莓果实成熟期花青苷、酚类物质和类黄酮含量的变化[J]. 果树学报, 2003, 20(3): 199–201.
FENG CJ, GUAN JF, YANG JM, *et al.* Changes of the content of anthocyanin, phenolic and flavonoid compounds in strawberries during the maturation [J]. J Fruit Sci, 2003, 20(3): 199–201.
- [19] SCHWARZ B, HOFMANN T. Is there a direct relationship between oral astringency and human salivary protein binding [J]. Eur Food Res Technol, 2008, 227(6): 1693–1698.
- [20] 黄仁华, 陆云梅, 夏仁学. 纽荷兰脐橙果实发育过程中类黄酮变化与体外抗氧化活性的关系[J]. 食品科学, 2009, 30(1): 35–37.
HUANG RH, LU YM, XIA RX. Study on relationship between flavonoids and antioxidant activity *in vitro* during growth of newhall navel orange fruit [J]. Food Sci, 2009, 30(1): 35–37.
- [21] 周明, 朱晓娟, 尧梅香, 等. “修水化红”甜橙成熟过程中黄酮含量与相关酶活性及抗氧化能力的关系[J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(4): 60–67.
ZHOU M, ZHU XJ, YAO MX, *et al.* Correlation between flavonoids content, related enzymes activity and antioxidant capacity during the maturation of ‘Xiushui Huahong’ sweet orange [J]. Food Ferment Ind, 2021, 47(4): 60–67.
- [22] 吴冬凡, 庞杜贤, 林清盛. 火龙果果皮总黄酮和多糖的提取工艺及抗氧化研究[J]. 华南师范大学学报(自然科学版), 2021, 53(5): 68–75.
WU DF, PANG DX, LIN QS. On the extraction and antioxidation of total flavonoids and polysaccharides from pitaya peel (*Hylocereus undatus* ‘FooLon’) [J]. J South China Norm Univ (Nat Sci Ed), 2021, 53(5): 68–75.
- [23] DAVEY MW, VAN MM, INZD D, *et al.* Plant L-ascorbic acid: Chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing [J]. J Sci Food Agric, 2000, 80: 825–860.
- [24] 黄艳花. 脐橙果实发育过程中抗坏血酸含量及相关酶活性的研究[D]. 重庆: 西南大学, 2014.
HUANG YH. Research on ascorbate content and activity changes of related enzymes during navel orange fruit development [D]. Chongqing: Southwest University, 2014.
- [25] SINGH V, GUIZANI N, AL AA, *et al.* Instrumental texture profile analysis (TPA) of date fruits as a function of its physico-chemical properties [J]. Ind Crop Prod, 2013, 50(10): 866–873.

- [26] SEGADÉ SR, ROLLE L, GERBI V, *et al.* Phenolic ripeness assessment of grape skin by texture analysis [J]. *J Food Compos Anal*, 2008, 21(8): 644–649.
- [27] NARDOZZA S, GAMBLE J, AXTEEN LG, *et al.* Dry matter content and fruit size affect flavour and texture of novel *Actinidia deliciosa* genotypes [J]. *J Sci Food Agric*, 2011, 91(4): 742–748.
- [28] 潘好斌, 刘东, 邵青旭, 等. 不同品种薄皮甜瓜成熟期果实质地品质分析及综合评价[J]. *食品科学*, 2019, 40(21): 35–42.
PAN HB, LIU D, SHAO QX, *et al.* Analysis and comprehensive evaluation of textural quality of ripe fruits from different varieties of oriental melon (*Cucumis melo* var. *makuwa* Makino) [J]. *Food Sci*, 2019, 40(21): 35–42.
- [29] 韩苗苗, 李范洙, 朴一龙, 等. 苹果梨果胶理化特性的研究[J]. *食品科学*, 2010, 31(17): 44–46.
HAN MM, LI FZ, PIAO YL, *et al.* Physico-chemical properties of pinguoli pear pectin [J]. *Food Sci*, 2010, 31(17): 44–46.
- [30] 张丽芳. 南丰蜜橘果胶代谢与化渣性关系研究[D]. 南昌: 江西农业大学, 2014.
ZHANG LF. Correlation analysis on pectic metabolism and mastication of Nanfeng tangerine fruit [D]. Nanchang: Jiangxi Agricultural University, 2014.
- [31] 李靓, 朱涵彬, 李长滨, 等. 橘皮中果胶提取工艺研究进展[J]. *现代牧业*, 2021, 5(3): 44–47.
LI L, ZHU HB, LI CB, *et al.* Research progress on pectin extraction from orange peel [J]. *Mod Anim Husbandry*, 2021, 5(3): 44–47.
- [32] 王福生. 柑橘类柠檬苦素生物合成相关基因的鉴定与功能验证[D]. 重庆: 西南大学, 2016.
WANG FS. Molecular and functional identification of limonoids biosynthesis genes in citrus [D]. Chongqing: Southwest University, 2016.
- [33] BREKSA AP, MANNERS GD. Determination of limonin *D*-ring lactone hydrolase activity by solid phase extraction with indirect fluorescence detection [J]. *J Agric Food Chem*, 2004, 52(12): 3765–3772.
- [34] HASEGAWA S, BENNETT RD, HERMAN Z, *et al.* Limonoid glucosides in citrus [J]. *Phytochemistry*, 1989, 28(6): 1717–1720.
- [35] RIBEIRO MH, SILVEIRA D, FERREIRA DS. Selective adsorption of limonin and naringin from orange juice to natural and synthetic adsorbents [J]. *Eur Food Res Technol*, 2002, 215(6): 462–471.
- [36] 刘荣, 韦正, 樊丹青, 等. 不同栽培品种橘皮中主要活性成分的动态积累[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(15): 111–117.
LIU R, WEI Z, FAN DQ, *et al.* Dynamic accumulation of main active ingredient in different cultivars of orange peel [J]. *Chin J Exp Tradit Med Formul*, 2014, 20(15): 111–117.
- [37] 贺冬秀, 何小珍, 刘璐. 陈皮中黄酮和辛弗林的不同提取方法优化比较[J]. *食品科技*, 2011, 36(8): 206–210.
HE DX, HE XZ, LIU L. Optimization and comparison of different extraction techniques for flavanones and synephrine in pericarpium citri reticulatae [J]. *Food Sci Technol*, 2011, 36(8): 206–210.
- [38] 沈连清, 张超. 个青皮中辛弗林两种提取分离方法的比较研究[J]. *食品与生物技术学报*, 2008, 27(6): 14–17.
SHEN LQ, ZHANG C. Study on comparison of two methods for the extraction and separation of synephrine from *Fructus citri immaturus* [J]. *J Food Sci Biotechnol*, 2008, 27(6): 14–17.

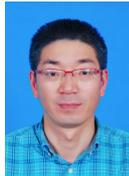
(责任编辑: 于梦娇 郑 丽)

作者简介



宣晓婷, 硕士, 助理研究员, 主要研究方向为食品非热加工。

E-mail: xuanxiaoting163@163.com



凌建刚, 博士, 研究员, 主要研究方向为农产品贮运与非热加工。

E-mail: nbngj@163.com