

基于 HS-SPME-GC-MS 法测定酸橙不同时期及不同部位的挥发性成分

张睿胤^{1†}, 成凤^{1†}, 郑亚杰¹,
陈鹏², 陆英¹, 袁建华³, 李先信^{2*}, 唐其^{1*}

¹湖南农业大学园艺学院, 长沙 410128;

²湖南省农业科学院 园艺研究所, 长沙 410125; ³长沙和茂农业开发有限公司, 宁乡 410609

摘要: 本文主要是通过不同时期酸橙果实中的挥发性成分测定和定性定量分析, 获得其主要挥发性成分的变化趋势。在此基础上再选取关键时期对酸橙不同部位挥发性成分进行检测分析和趋势验证。研究方法主要是采用顶空固相微萃取-气质联用技术(HS-SPME-GC-MS)测定酸橙样品中挥发性成分, 通过比对标准品、NIST 谱库检索、结合文献对其挥发性成分进行鉴定, 并用峰面积归一法测定和比对各组分的相对含量。结果显示, 在酸橙果实中共初步鉴定出 69 种成分, 通过对比标准品溶液确定了 *D*-柠檬烯、 γ -松油烯、芳樟醇三种成分, 其中 6 月 17 日与 7 月 1 日样品的三者总含量相对较高(38.03%、33.95%)。我们选取 7 月 1 日酸橙不同部位样品进行检测分析, 共鉴定出 64 种不同化合物, 不同部位之间挥发性成分的组成差异较大。其中根部位共鉴定 34 种, 主要成分为榄香醇(38.24%)、反式- α -香柑油烯(23.85%)等; 茎部位共鉴定 30 种, 主要成分为榄香醇(23.98%)、百里酚(17.29%)、反式- α -香柑油烯(13.74%)、芳樟醇(8.92%)等; 叶部位鉴定 41 种, 主要成分为芳樟醇(24.51%)、百里酚(23.49%)、榄香醇(10.35%)等; 分析不同时期酸橙果实挥发性成分发现, *D*-柠檬烯等三种化合物的相对含量随着生长期呈现“先逐渐上升后逐渐下降”的趋势; 酸橙茎、叶中挥发性成分组成丰富, 芳樟醇等单萜类成分相对含量较高。本实验为酸橙果实挥发性成分及非药用部位的综合利用提供了数据和技术参考。

关键词: 酸橙; 不同时期; 不同部位; 挥发性成分; 顶空固相微萃取; 气相色谱-质谱联用法

中图分类号: R284.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2022)5-0790-10

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2022.5.007

Determination of volatile components in different periods and parts of *Citrus aurantium* L. based on HS-SPME-GC-MS

ZHANG Rui-ying^{1†}, CHENG Feng^{1†}, ZHENG Ya-jie¹,
CHEN Peng², LU Ying¹, YUAN Jian-hua³, LI Xian-xin^{2*}, TANG Qi^{1*}

¹College of Horticulture, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

²Institute of Horticulture, Hunan Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410125, China;

³Changsha Hemao Agricultural Development Co., Ltd., Ningxiang 410609, China

Abstract: This research mainly focus on the determination of the volatile components in different periods of *Citrus aurantium* L. fruit and carry out qualitative and quantitative analysis, which can help the change trend pursue of the main volatile components. The key period was chosen to detect and verify the volatile components in different parts of *C. aurantium*. The volatile components in *C. aurantium* samples were determined by headspace solid phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry (HS-SPME-GC-MS). The volatile components were identified by comparing standard samples, NIST database and literature, and the relative contents of each component were determined and compared by peak area normalization method. A total of 69 components were preliminarily identified in *C. aurantium* fruit, the *D*-limonene, γ -terpinene and linalool

收稿日期: 2021-11-29 接受日期: 2022-03-14

基金项目: 湖南省自然科学基金面上项目(2020JJ4357); 湖南农业大学国家重点实验室培育基地重点项目(19KFXM05); 湖南省大学生创新性实验计划(201910537066)

† 共同第一作者

* 通信作者 E-mail: tangqi@hunau.edu.cn, nky118@163.com

were determined by comparing the standard solution, and the total contents of *D*-limonene, γ -terpinene and linalool were relatively high in June 17 (8.03%) and July 1 samples (33.95%). Samples from different parts of *C. aurantium* on July 1 were selected for further analysis, and a total of 64 different compounds were identified, and the composition of volatile components varied greatly among different parts. Among them, 34 species were identified in the root part, the main components were elemol (38.24%) and *trans*- α -mandarin (23.85%), and 30 species in the stem were identified. The main components are elemol (23.98%), thymol (17.29%), *trans*- α -mandarin (13.74%), linalool (8.92%), etc. 41 kinds of leaf parts were identified, and the main components were linalool (24.51%), thymol (23.49%) and elemol (10.35%). The relative content of *D*-limonene and other three compounds increased in the beginning and then decreased gradually during the growing period. The stems and leaves of *C. aurantium* are rich in volatile components, and the relative content of monoterpenes such as linalool are relatively high. This experiment provides data and technical reference for the comprehensive utilization of volatile components and non-medicinal parts of *C. aurantium*.

Key words: *Citrus aurantium* L.; different periods; different parts; volatile components; headspace solid phase microextraction; gas chromatography-mass spectrometry

枳壳(*Aurantii Fructus*)为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种的未成熟果实^[1], 其性温, 主治胸膈痞满, 胁肋胀痛, 有理气宽胸、行滞消积的功效^[2,3]。现代药理学研究表明, 枳壳具有调节胃肠功能、利胆排石、降血脂和抗肿瘤等药理作用^[4]。枳壳中含有多种化学成分, 如黄酮类、挥发性成分、生物碱类等。枳壳挥发性成分具有理气、行滞、镇咳、祛痰、抑菌等作用^[5,6], 是其理气作用的重要物质基础^[7]; 芳樟醇、柠檬烯等物质是枳壳果香气味的主要来源, 被广泛应用于食品、日化等领域^[8]。酸橙在7月果皮尚绿时采收, 对酸橙而言人们研究利用主要集中在其果实中的黄酮类成分, 但酸橙果实中还富含柠檬烯、芳樟醇等挥发性成分^[8]; 对酸橙不同部位的研究也相对较少, 茎、叶等非药用部位还需进一步地研究开发利用。若能对酸橙中挥发性成分进行系统性的检测分析, 建立一个简单、快速的挥发性成分检测方法, 将会对酸橙的多样化利用提供新的思路。

顶空固相微萃取(HS-SPME-GC-MS)技术如今已逐步应用于多个领域, 如食品、医药卫生、临床化学、生物化学、法医学等, 具有快速、高效、灵敏、无污染等特点。在植物挥发性成分检测中已经在川芎、迎春、石韦、黄花菜等物种得以成功应用^[9-12], 甚至成功用于含有复杂挥发性成分的中成药汉森四磨汤的挥发性成分检测分析^[13], 但总体而言对于中药材的应用尚不多见。

目前对酸橙成分的研究虽然有很多, 但主要都是对其果实中黄酮类成分进行研究和利用, 对挥发性成分相对较少; 而酸橙果实中的挥发性成分又是其药理药效作用的关键组成部分; 酸橙叶、茎等非药

用部位也具有明显气味, 挥发性成分含量也较丰富, 对酸橙生长发育具有重要意义。现阶段对植物源挥发性成分的功能与效用已成为国内外研究热点, 因此本实验采用顶空固相微萃取法结合气相色谱-质谱技术, 对不同时期酸橙果实中挥发性成分进行测定与分析, 结合具体采收时间筛选出关键时期; 对关键时期酸橙非药用部位的根、茎、叶中挥发性成分进行检测分析, 研究不同部位间挥发性成分组成差异, 为更好地开发利用酸橙资源提供参考。

1 材料与方法

1.1 仪器

GCMS-QP2010 型气相色谱-质谱联用仪(日本岛津公司), 配有 GC/MS solution 色谱工作站和 NIST. 14、NIST. 17 质谱数据库; 固相微萃取装置(上海安谱实验科技有限公司), 包括固相微萃取手动进样手柄、萃取纤维针头(65 μ m-PDMS/DVB、85 μ m-Carboxen/PDMS、50/30 μ m-DVB/Carboxen-PDMS、75 μ m-Carboxen/PDMS)、顶空样品瓶; YB-1500A 型粉碎机(永康市速锋工贸有限公司); PL203 电子分析天平(梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司); MM400 混合型球磨仪(广州艾威仪器科技有限公司); Milli-Q Advantage A10 超纯水制备系统(美国 MILLIPORE 公司)。

1.2 实验样品

实验用药材采于湖南省益阳市沅江市三眼塘镇枳壳规范化种植基地, 分别于2018年6月3日(CA-1)、6月11日(CA-2)、6月17日(CA-3)、7月1日(CA-4)、7月8日(CA-5)、7月21日(CA-6)、8月22日(CA-7)、9月22日(CA-8)这8个时期采集, 每个时期采集三株树作为生物学重复, 编号如 CA1-1、

CA1-2、CA1-3,依此类推。后选取7月1日,采集酸橙的根(CA-R)、茎(CA-S)、叶(CA-L)、果(CA-F)。对照品 *D*-柠檬烯、 γ -松油烯、芳樟醇购自中国食品药品检定研究院。

1.3 方法

1.3.1 材料准备及样品前处理

烘干机温度调至60℃烘干至恒重,使用球磨仪粉碎后并过60目筛,置于封口袋编号封口保存。取约0.2 g样品,精密称定,放置在顶空样品瓶中,备用。

将对照品使用正己烷稀释,*D*-柠檬烯、 γ -松油烯、芳樟醇浓度依次为1.0、1.0、0.4 mg/mL;吸取各稀释后的对照品溶液1 μ L于同一顶空样品瓶中,拧紧瓶盖,备用。

1.3.2 萃取头纤维老化

组装萃取纤维针头与萃取进样手柄,随后插入气相色谱仪的气化室SPL1处,推出萃取纤维针头,设定气化室温度为240℃,40 min后缩回萃取纤维针头,取出萃取进样手柄,完成纤维头老化。

1.3.3 萃取方法

固相微萃取装置温度为70℃,将装有样品的萃取瓶置于固定在装置中预热40 min,再将萃取进样手柄插入萃取瓶中,40 min后将萃取手柄取出。

1.3.4 GC-MS 测试条件

色谱柱为HP-88(100 m \times 0.25 mm,0.25 μ m,安捷伦公司);进样口温度240℃;载气高纯氮气(含有量99.99%);柱流量为0.98 mL/min;分流比5:1;程序升温:初始柱温60℃,保持5 min,以3℃/min升到138℃,保持2 min,再以3℃/min升到140℃,保持5 min,再以5℃/min升到210℃,保持10 min,最后以5℃/min升到240℃,保持10 min。

接口温度:220℃;离子源:EI源;离子源温度:200℃,电子能量:70 eV;质荷比扫描范围:45~500 m/z ;质谱图采用NIST.17、NIST.14谱库检索比对。

2 结果与分析

2.1 萃取纤维头的优化

固相微萃取纤维头的不同颜色代表了不同的吸附膜种类,对挥发性成分的吸附能力存在较大差异。通过比较对酸橙根、茎、叶、果混合样品中挥发性成分的吸附能力,筛选出适合酸橙混合样品中挥发性成分的萃取纤维头。本研究选取50/30 μ m-DVB/Carboxen-PDMS灰色纤维头用于实验。

2.2 挥发性成分分析

通过气相色谱-质谱对酸橙样品进行测定,利用

GC-MS solution 软件中的NIST.14、NIST.17标准谱库检索色谱图中存在的可能化合物,结合人工图谱解析和文献资料进行进一步定性分析,推测化合物的可能结构;再通过比对对照品成分的出峰时间,对相关化合物进行进一步的确认。采用峰面积归一化法计算各成分相对含量;使用Microsoft Excel 2019、SPSS软件对数据进行整理与统计(见图1、图2、表1)。通过比对标准品溶液、结合文献及NIST.17、NIST.14质谱数据库检索,对化合物种类进行了初步鉴定。采用面积归一法计算各个积分的色谱峰占总峰面积百分比,分析挥发性成分的相对含量。

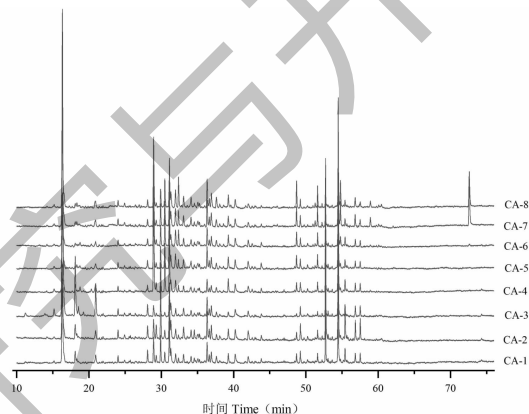


图1 不同时期酸橙果实 GC-MS 总离子流图

Fig. 1 Total ion Chromatogram(TIC) of *C. aurantium* fruits in different periods by GC-MS

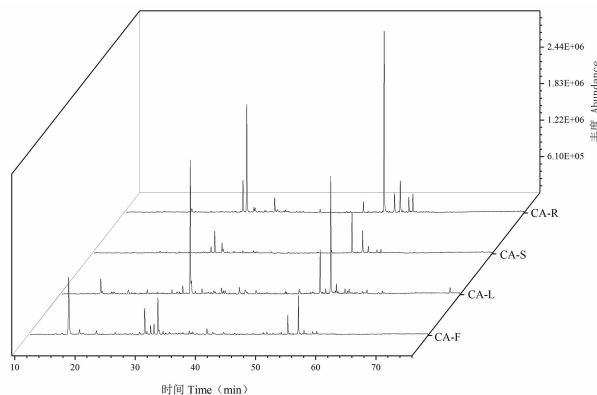


图2 酸橙不同部位 GC-MS 总离子流图

Fig. 2 TIC of different parts of *C. aurantium* by GC-MS

由结果可知,8个时期酸橙果实样品共检测挥发性成分69种;其中6月3日样品共检测出44种挥发性成分;6月11日样品共检测出37种化学成分;6月17日样品共检测出39种化学成分;7月1日样品共检测出43种化学成分;7月8日样品共检

表 1 酸橙果实不同时期挥发性成分组成

Table 1 Composition of volatile components of *C. aurantium* fruits in different periods

峰号 Peak	保留时间 t_R (min)	成分 Component	分子式 Molecular formula	相对含量 Relative content (%)							
				CA-1	CA-2	CA-3	CA-4	CA-5	CA-6	CA-7	CA-8
1	11.182	α -蒎烯 α -Pinene	$C_{10}H_{16}$	-	-	-	-	-	0.35 \pm 0.00	-	-
2	15.164	β -月桂烯 β -Myrcene	$C_{10}H_{16}$	-	-	0.92 \pm 0.00	0.54 \pm 0.11	0.37 \pm 0.10	1.53 \pm 0.00	0.23 \pm 0.05	0.43 \pm 0.00
3*	16.301	<i>D</i> -柠檬烯 <i>D</i> -Limonene	$C_{10}H_{16}$	16.27 \pm 3.80	13.54 \pm 1.33	27.98 \pm 17.06	22.61 \pm 6.83	14.44 \pm 1.19	11.40 \pm 2.33	21.99 \pm 3.50	13.89 \pm 4.39
4*	18.083	γ -松油烯 γ -Terpinene	$C_{10}H_{16}$	3.83 \pm 3.18	1.40 \pm 0.36	3.33 \pm 3.83	1.56 \pm 0.64	0.70 \pm 0.25	1.88 \pm 1.66	0.44 \pm 0.13	0.52 \pm 0.12
5	18.32	2,6,11-三甲基-十二烷 Trimethyl-dodecane	$C_{15}H_{32}$	0.63 \pm 0.22	0.56 \pm 0.05	0.69 \pm 0.01	-	0.34 \pm 0.13	0.31 \pm 0.04	0.51 \pm 0.22	0.71 \pm 0.11
6	18.53	(<i>Z</i>)-3,7-二甲基-1,3,6-十八烷三烯 (<i>Z</i>)-3,7-Dimethyl-1,3,6-octatriene	$C_{10}H_{16}$	-	-	0.69 \pm 0.00	0.22 \pm 0.07	-	0.22 \pm 0.05	-	-
7	18.77	(2 <i>R</i> ,5 <i>R</i>)-2-Methyl-5-(prop-1-en-2-yl)-2-vinyltetrahydrofuran	$C_{10}H_{16}O$	-	-	-	0.41 \pm 0.29	0.53 \pm 0.34	0.39 \pm 0.14	0.21 \pm 0.11	-
8	19.24	3-Methyl-6-(1-methylethylidene)-cyclohexene	$C_{10}H_{16}$	-	-	0.43 \pm 0.00	-	-	0.23 \pm 0.03	-	-
9	20.33	(2 <i>R</i> ,5 <i>S</i>)-2-Methyl-5-(prop-1-en-2-yl)-2-vinyltetrahydrofuran	$C_{10}H_{16}O$	-	-	-	0.46 \pm 0.00	0.33 \pm 0.02	0.46 \pm 0.03	-	-
10	20.886	<i>trans</i> -3-Caren-2-ol	$C_{10}H_{16}O$	-	-	-	-	-	-	-	1.75 \pm 0.11
11	20.927	4-异丙基甲苯 <i>p</i> -Cymene	$C_{10}H_{14}$	2.28 \pm 1.53	1.45 \pm 0.28	2.39 \pm 1.46	1.93 \pm 0.21	1.16 \pm 0.26	1.46 \pm 1.40	1.20 \pm 0.31	-
12	21.456	苯乙烯 Styrene	C_8H_8	-	-	-	-	-	-	-	0.65 \pm 0.63
13	24.924	α -荜澄茄油烯 α -Cubebene	$C_{15}H_{24}$	0.26 \pm 0.05	0.57 \pm 0.04	0.37 \pm 0.07	-	0.45 \pm 0.08	0.21 \pm 0.15	0.43 \pm 0.25	0.53 \pm 0.14
14	26.94	1,3-二叔丁基苯 1,3-Bis(1,1-dimethylethyl)-Benzene	$C_{14}H_{22}$	-	-	-	-	-	-	-	0.27 \pm 0.14
15	27.248	(<i>E</i>)-2-庚烯醛 (<i>E</i>)-2-Heptenal	$C_7H_{12}O$	-	-	-	-	-	-	-	0.35 \pm 0.21
16	27.951	1-Methyl-3-(1-methylethenyl)-benzene	$C_{10}H_{12}$	-	-	-	-	-	0.24 \pm 0.10	-	-
17	28.098	壬醛 Nonanal	$C_9H_{18}O$	-	1.26 \pm 0.25	1.47 \pm 0.39	0.86 \pm 0.19	1.01 \pm 0.20	0.79 \pm 0.41	0.71 \pm 0.13	1.12 \pm 0.38
18	28.926	反式-芳樟醇氧化物 (呋喃类) <i>trans</i> -Linalool oxide (furanoid)	$C_{10}H_{18}O_2$	2.71 \pm 1.29	4.92 \pm 1.75	5.11 \pm 2.92	16.81 \pm 4.27	16.45 \pm 2.47	18.75 \pm 3.14	11.31 \pm 1.22	14.10 \pm 1.73
19	29.294	1,7-Dimethyl-7-(4-methyl-3-pentenyl)-(-)-tricyclo[2.2.1.0(2,6)]heptane	$C_{15}H_{24}$	1.01 \pm 0.78	1.54 \pm 0.07	0.59 \pm 0.30	1.08 \pm 0.28	4.90 \pm 7.03	0.60 \pm 0.50	0.46 \pm 0.25	0.33 \pm 0.07
20	29.905	Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene, 2,6-dimethyl-6-(4-methyl-3-pentenyl)	$C_{15}H_{24}$	1.09 \pm 0.66	4.88 \pm 0.48	1.83 \pm 0.60	3.34 \pm 0.44	2.22 \pm 1.00	2.51 \pm 1.86	1.81 \pm 0.62	1.62 \pm 0.31
21*	31.116	芳樟醇 Linalool	$C_{10}H_{18}O$	5.21 \pm 1.60	7.14 \pm 2.13	6.72 \pm 2.97	9.78 \pm 1.39	6.43 \pm 0.49	8.35 \pm 3.57	4.93 \pm 0.19	5.10 \pm 1.72
22	31.315	[1 <i>S</i> -(1 α , 2 β , 4 β)]-1-Ethenyl-1-methyl-2,4-bis(1-methylethenyl)-cyclohexane	$C_{15}H_{24}$	2.37 \pm 0.53	2.62 \pm 0.26	2.60 \pm 0.73	1.87 \pm 0.20	2.22 \pm 0.28	1.74 \pm 0.85	2.15 \pm 0.25	2.04 \pm 1.17
23	31.991	反式-2-癸烯醇 (<i>E</i>)-2-Decen-1-ol	$C_{10}H_{20}O$	1.59 \pm 0.55	-	1.14 \pm 0.51	1.79 \pm 0.36	2.87 \pm 0.26	2.71 \pm 1.45	2.89 \pm 0.38	3.65 \pm 1.56
24	32.376	当归内酯 α -Angelicalactone	$C_5H_6O_2$	0.49 \pm 0.27	-	-	0.66 \pm 0.18	1.05 \pm 0.31	1.30 \pm 1.09	1.40 \pm 0.39	5.42 \pm 2.58
25	33.078	石竹烯 Caryophyllene	$C_{15}H_{24}$	1.32 \pm 0.32	1.52 \pm 0.05	1.52 \pm 0.28	0.90 \pm 0.10	1.43 \pm 0.26	1.04 \pm 0.62	1.33 \pm 0.18	1.27 \pm 0.62

续表 1 (Continued Tab. 1)

峰号 Peak	保留时间 t_R (min)	成分 Component	分子式 Molecular formula	相对含量 Relative content (%)							
				CA-1	CA-2	CA-3	CA-4	CA-5	CA-6	CA-7	CA-8
26	33.587	4a, 8-Dimethyl-2-(prop-1-en-2-yl)-1,2,3,4,4a,5,6,7-octahydronaphthalene	C ₁₅ H ₂₄	0.18 ± 0.10	-	-	-	-	0.13 ± 0.10	-	-
27	34.01	2-乙酰基呋喃 1-(2-Furanyl)-ethanone	C ₆ H ₆ O ₂	-	-	-	0.30 ± 0.15	0.68 ± 0.65	-	-	-
28	34.112	γ-衣兰油烯 γ-Muurolene	C ₁₅ H ₂₄	1.03 ± 0.29	1.05 ± 0.32	1.03 ± 0.24	0.49 ± 0.20	1.20 ± 0.37	0.87 ± 0.64	1.06 ± 0.36	0.94 ± 0.55
29	34.556	顺式-β-金合欢烯 cis-β-Farnesene	C ₁₅ H ₂₄	0.65 ± 0.32	0.79 ± 0.08	0.37 ± 0.05	0.51 ± 0.06	0.42 ± 0.17	0.51 ± 0.22	0.29 ± 0.09	0.42 ± 0.17
30	35.048	苯甲醛 Benzaldehyde	C ₇ H ₆ O	-	-	-	-	-	0.69 ± 0.46	0.91 ± 0.12	0.79 ± 0.55
31	35.285	α-衣兰油烯 α-Muurolene	C ₁₅ H ₂₄	0.50 ± 0.09	0.56 ± 0.02	-	0.63 ± 0.12	0.77 ± 0.14	0.68 ± 0.05	0.47 ± 0.12	0.49 ± 0.18
32	36.332	δ-杜松烯 δ-Cadinene	C ₁₅ H ₂₄	2.71 ± 0.64	3.06 ± 0.15	2.86 ± 0.84	1.56 ± 0.36	2.85 ± 0.63	1.99 ± 1.51	2.73 ± 0.50	2.54 ± 1.16
33	36.628	萘 Naphthalene	C ₁₅ H ₂₄	1.02 ± 0.28	1.15 ± 0.09	1.19 ± 0.33	0.59 ± 0.11	1.14 ± 0.12	0.83 ± 0.34	1.03 ± 0.14	0.90 ± 0.49
34	36.909	巴伦西亚橘烯 Valencen	C ₁₅ H ₂₄	1.63 ± 0.44	1.70 ± 0.18	1.74 ± 0.55	1.02 ± 0.05	1.69 ± 0.20	1.03 ± 0.79	1.63 ± 0.17	1.59 ± 0.85
35	37.629	大根香叶烯 D Germacrene D	C ₁₅ H ₂₄	1.31 ± 0.28	0.77 ± 0.13	0.77 ± 0.13	-	-	0.83 ± 0.65	-	-
36	38.062	古巴烯 Copaene	C ₁₅ H ₂₄	0.45 ± 0.08	-	0.35 ± 0.09	-	0.43 ± 0.07	0.27 ± 0.09	0.42 ± 0.06	0.36 ± 0.07
37	38.62	5-Methyl-2-furancarboxaldehyde (R)-α, α, 4-三甲基-3-环己烯-1-甲醇	-	-	-	-	0.23 ± 0.15	0.31 ± 0.10	0.69 ± 0.52	0.38 ± 0.18	-
38	39.271	(R)-α, α, 4-Trimethyl-3-cyclohexene-1-methanol	C ₁₀ H ₁₈ O	1.16 ± 0.54	1.44 ± 0.28	1.01 ± 0.42	1.95 ± 0.26	1.50 ± 0.35	1.24 ± 0.88	1.09 ± 0.28	1.24 ± 0.23
39	40.219	(+)-苡醇 (+)-Borneol	C ₁₀ H ₁₈ O	0.81 ± 0.46	2.11 ± 0.59	2.15 ± 1.00	1.12 ± 0.38	1.83 ± 0.06	1.90 ± 1.18	1.32 ± 0.35	2.07 ± 0.83
40	42.007	橙花醇 (Z)-Geraniol	C ₁₀ H ₁₈ O	1.10 ± 0.47	1.39 ± 0.54	1.17 ± 0.70	0.84 ± 0.37	1.19 ± 0.31	1.82 ± 0.89	0.59 ± 0.23	0.60 ± 0.17
41	42.565	苯乙醛 Benzeneacetaldehyde	C ₈ H ₈ O	0.52 ± 0.26	0.43 ± 0.26	0.55 ± 0.00	0.31 ± 0.19	0.41 ± 0.15	0.49 ± 0.33	-	-
42	42.934	顺-菖蒲烯 cis-Calamenene	C ₁₅ H ₂₂	-	-	-	-	0.22 ± 0.02	-	0.09 ± 0.08	-
43	46.983	香叶基丙酮 Geranylacetone	C ₁₃ H ₂₂ O	0.17 ± 0.04	-	-	0.25 ± 0.09	0.21 ± 0.04	-	0.12 ± 0.05	-
44	48.458	苯甲醇 Benzyl alcohol	C ₇ H ₈ O	0.19 ± 0.17	-	-	0.26 ± 0.04	0.27 ± 0.05	-	-	-
45	48.7	5-Methyl-2(5H)-furanone	C ₅ H ₆ O ₂	0.86 ± 0.55	0.74 ± 0.17	0.60 ± 0.29	0.95 ± 0.32	1.29 ± 0.44	1.28 ± 1.28	1.49 ± 0.52	2.85 ± 1.29
46	49.223	反式-橙花叔醇 trans-Nerolidol	C ₁₅ H ₂₆ O	1.46 ± 0.54	1.67 ± 0.22	1.20 ± 0.35	1.06 ± 0.47	1.01 ± 0.24	0.90 ± 0.60	1.03 ± 0.16	0.78 ± 0.20
47	49.73	紫苏醇 Perilla alcohol	C ₁₀ H ₁₆ O	-	-	0.22 ± 0.10	0.18 ± 0.08	-	-	-	-
48	50.215	苯乙醇 Phenylethyl alcohol	C ₈ H ₁₀ O	0.40 ± 0.16	0.60 ± 0.21	0.55 ± 0.25	0.56 ± 0.10	0.51 ± 0.05	0.45 ± 0.23	-	-
49	51.262	2(5H)-呋喃酮 2(5H)-Furanone	C ₄ H ₄ O ₂	-	-	-	-	-	0.24 ± 0.07	0.56 ± 0.06	0.59 ± 0.35
50	51.612	2-乙酰基吡咯 2-Acetyl pyrrole	C ₆ H ₇ NO	0.83 ± 0.28	0.72 ± 0.10	0.54 ± 0.23	0.86 ± 0.22	1.12 ± 0.35	0.97 ± 0.75	1.38 ± 0.41	1.61 ± 0.54
51	52.23	2-Pentyl-2-nonenal	C ₁₄ H ₂₆ O	-	-	-	0.23 ± 0.10	-	-	-	-

续表 1 (Continued Tab. 1)

峰号 Peak	保留时间 t_R (min)	成分 Component	分子式 Molecular formula	相对含量 Relative content (%)							
				CA-1	CA-2	CA-3	CA-4	CA-5	CA-6	CA-7	CA-8
52	52.718	Cyclohexanemethanol, 4-ethenyl- α , α ,4-trimethyl-3-(1-methylethenyl)-, [1 <i>R</i> -(1 α ,3 α ,4 β)]-	C ₁₅ H ₂₆ O	9.21 ± 5.51	13.70 ± 1.11	6.92 ± 2.15	5.69 ± 0.77	5.02 ± 0.78	6.23 ± 1.53	4.07 ± 0.39	3.72 ± 1.91
53	52.917	甲基丁香酚 Methyleugenol	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	-	4.69 ± 7.84	-	-	-	-	0.08 ± 0.12	-
54	53.07	十六烷酸甲酯 Hexadecanoic acidmethyl ester	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	0.30 ± 0.02	0.31 ± 0.03	0.37 ± 0.07	-	-	-	-	-
55	53.629	氧化石竹烯 Caryophyllene oxide	C ₁₅ H ₂₄ O	0.28 ± 0.09	0.24 ± 0.09	0.20 ± 0.16	0.23 ± 0.07	0.25 ± 0.10	-	0.17 ± 0.04	-
56	54.469	香芹酚 Thymol	C ₁₀ H ₁₄ O	12.57 ± 3.76	13.98 ± 1.54	13.61 ± 4.45	11.93 ± 1.18	12.63 ± 3.13	11.88 ± 1.28	9.32 ± 1.96	11.23 ± 2.18
57	54.765	呋喃基羟甲基酮 Furyl hydroxymethyl ketone	C ₆ H ₆ O ₃	0.45 ± 0.29	0.14 ± 0.12	-	0.32 ± 0.22	0.39 ± 0.22	0.78 ± 0.71	2.70 ± 0.11	3.96 ± 2.80
58	55.407	β -衣兰烯 β -Ylangene	C ₁₅ H ₂₄	-	-	-	-	1.10 ± 0.22	-	-	-
59	55.675	香芹酚 Isothymol	C ₁₀ H ₁₄ O	0.29 ± 0.14	0.29 ± 0.08	0.72 ± 0.95	0.18 ± 0.07	0.52 ± 0.39	-	0.19 ± 0.06	-
60	55.832	沉香螺醇 Agarospirol	C ₁₅ H ₂₆ O	0.13 ± 0.03	0.12 ± 0.03	-	-	-	-	-	-
61	56.835	α -桉叶醇 α -Eudesmol	C ₁₅ H ₂₆ O	1.42 ± 0.59	1.83 ± 0.22	1.56 ± 0.47	0.91 ± 0.24	0.94 ± 0.24	0.85 ± 0.49	-	-
62	57.211	Isospathulenol	C ₁₅ H ₂₄ O	0.17 ± 0.00	-	-	-	-	-	-	-
63	57.509	β -桉叶醇 β -Eudesmol	C ₁₅ H ₂₆ O	1.44 ± 0.53	2.09 ± 0.33	1.50 ± 0.64	0.62 ± 0.45	1.00 ± 0.26	0.76 ± 0.48	0.74 ± 0.06	0.68 ± 0.15
64	58.086	Neointermedeol	C ₁₅ H ₂₆ O	0.15 ± 0.06	-	-	-	-	-	-	-
65	58.918	4H-Pyran-4-one, 2, 3-dihydro-3, 5- dihydroxy-6-methyl-	C ₆ H ₈ O ₄	-	-	-	-	-	-	1.44 ± 0.12	0.75 ± 0.13
66	60.061	泛酰内酯 Pantolactone	C ₆ H ₁₀ O ₃	-	-	-	-	-	-	0.30 ± 0.04	-
67	60.435	1-Methyl-4-(1-methylethenyl)-1, 2- cyclohexanediol	C ₁₀ H ₁₈ O ₂	-	-	-	-	-	-	0.23 ± 0.05	0.27 ± 0.14
68	62.057	5-乙酰氧基甲基呋喃醛 5-Acetoxyethyl-2-furaldehyde	C ₈ H ₈ O ₄	-	-	-	-	-	-	0.29 ± 0.02	-
69	72.616	5-羟甲基糠醛 5-Hydroxymethylfurfural	C ₆ H ₆ O ₃	-	-	-	-	-	-	10.40 ± 2.86	6.42 ± 1.46

注:“*”表示与标准品比对确认的化合物;“-”表示为未检测到该化合物。

Note:“*” refers to the compound confirmed by standard substance comparison;“-” indicates that the compound component is not detected.

测出 45 种化学成分;7 月 21 日样品共检测出 46 种化学成分;8 月 22 日样品共检测出 46 种化学成分;9 月 22 日样品共检测出 40 种化学成分。*D*-柠檬烯、芳樟醇是其主要共有成分。对酸橙的不同部位(根、茎、叶、果)干燥样品进行挥发性成分测定,共鉴定出 64 种化合物,包括萜烯类(18 种)、酮类(9 种)、萜烯醇类(8 种)、醛类(6 种)化合物等,且不同部位挥发性成分的组成与含量差异较大(见图 3、图 6)。不同部位酸橙挥发性化学成分组成存在差异(见图 3、图 4),萜烯类、萜烯醇类化合物是四个部位的主要成分;根、茎中烷烃与烯烃类化合物相对含

量(17.64%、16.67)高于叶、果(9.52%、8.57%);叶中酮类化合物显著高于其他三个部位(16.67%);果实中主要以萜烯类、萜烯醇类化合物为主,二者相对含量超过 60%。酸橙不同部位中共有成分有 19 种(见图 4)。根中特有成分有 10 种,主要以烷烃、烯烃为主;茎中特有成分有 9 种,氧化物成分相对较多;叶中特有成分有 11 种,且在叶中检测到醚类化合物;叶和果实中检测出香芹酚、百里酚等酚类化合物。

8 个时期酸橙果实样品中,*D*-柠檬烯、 γ -松油烯、芳樟醇三种成分相对含量存有较大差异;*D*-柠檬

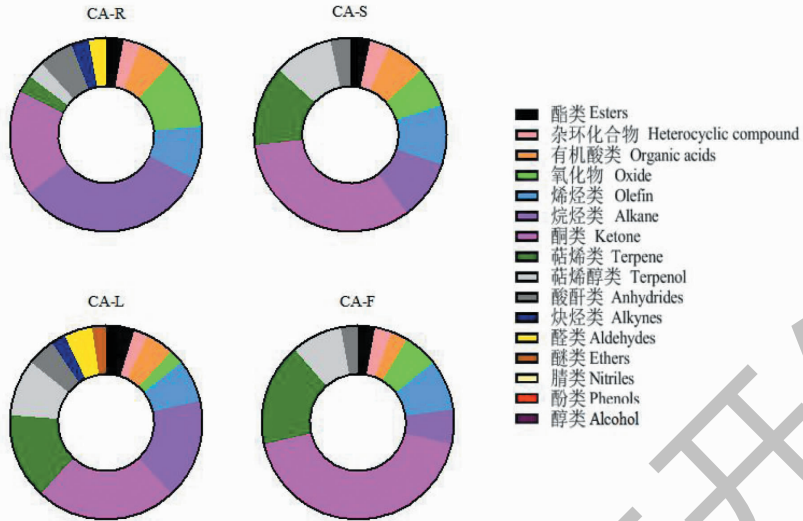


图3 不同部位酸橙挥发性成分种类差异图

Fig. 3 Difference map of volatile components in different parts of *C. aurantium*

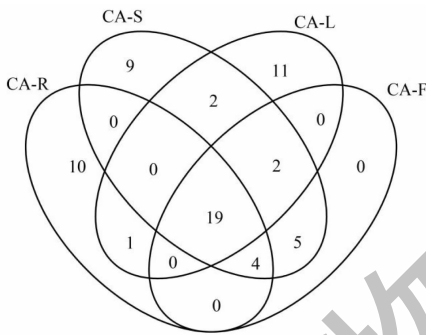


图4 不同部位酸橙挥发性成分 Venn 图

Fig. 4 Venn map of volatile components in different parts of *C. aurantium*

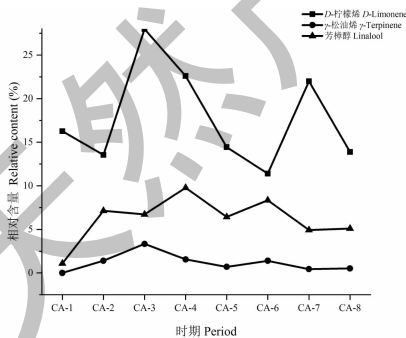


图5 三种成分相对含量变化趋势

Fig. 5 Relative content trend of three volatile components in different periods of *C. aurantium*

烯为 8 个时期样品中相对含量最高的物质;三种成分总相对含量在 6 月 17 日、7 月 1 日两个时期相对含量较高(分别为 38.03%、33.95%)。三种成分总

量整体而言呈现先上升再下降的变化趋势,在 6 月中旬到 7 月初这段时期达到顶点(见图 5);D-柠檬烯相对含量在 6 月初到 6 月中旬呈现上升趋势,随后在 7 月初开始逐渐下降,直至 7 月下旬;从 7 月下旬到 8 月下旬又开始小幅上升;8 月下旬到 9 月下旬又开始呈现下降趋势。芳樟醇相对含量从 6 月初开始逐步上升,在 7 月初达到顶点;随后逐渐下降。相对而言, γ -松油烯的相对含量变化幅度较小,但仍有先上升后下降的变化趋势。

根据分析结果来看(见图 6),D-柠檬烯和芳樟醇主要集中在酸橙叶、果部位;芳樟醇在酸橙茎中也有较高含量(8.92%),推测主要因植物不同器官生理代谢功能不同,从而使其释放的挥发性成分组成产生较大差异;酸橙叶、果气味明显,芳樟醇、柠檬烯、罗勒烯等萜类化合物是其果香、清香的重要物质基础。

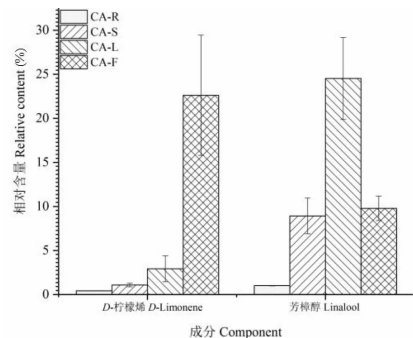


图6 不同部位酸橙两种挥发性成分含量差异

Fig. 6 Differences of two volatile components in different parts of *C. aurantium*

将整理好的酸橙果实不同时期数据文件分别进行层聚类分析(HCA),如图7所示,八个时期的酸橙果实样品被划分为三大组,6月3日、6月17日、6月21日为第一大组;7月1日、7月8日、7月21日为第二大组;8月22日、9月22日为第三大组,表明酸橙果实不同时期样品挥发性化学成分组成变化较为明显;样品中挥发性成分含量的变化趋势也出现集群现象,可明显划分出明显的上升(红色)、下降(蓝色)区域;其中第一大组中萜烯醇类化合物含量较高;第二大组化萜烯类化合物含量较高;第三大组化合物主要以酯类、烯炔类化合物为主;随着生长期的增长,酸橙果实中挥发性成分从醇类、萜烯类化合物逐步转变为酯类、烯炔类。同时发现三个异常组

分,即图中1-3、3-1、6-3三个样品,因植物源挥发性成分含量变化受外界因素影响较大,如温度、胁迫、光照、CO₂体积分数等,这些因素均会导致不同生物学重复样品中挥发性成分组成、含量上的差异。故其含量与同时期其他两组重复样品产生差异的原因推测为不同生物学重复的差异。

继续利用主成分分析(PCA)对上述各处理组数据进一步分析(见图8)。数据经主成分分析共提取了五个主成分,它们的方差贡献依次为第一主成分(70.4%)、第二主成分(13.1%)、第三主成分(6%)、第四主成分(3%)和第五主成分(2.1%),其中主成分一、二和为83.5%,所以选取主成分一二基本能涵盖样品的大部分成分信息。分别以主成分

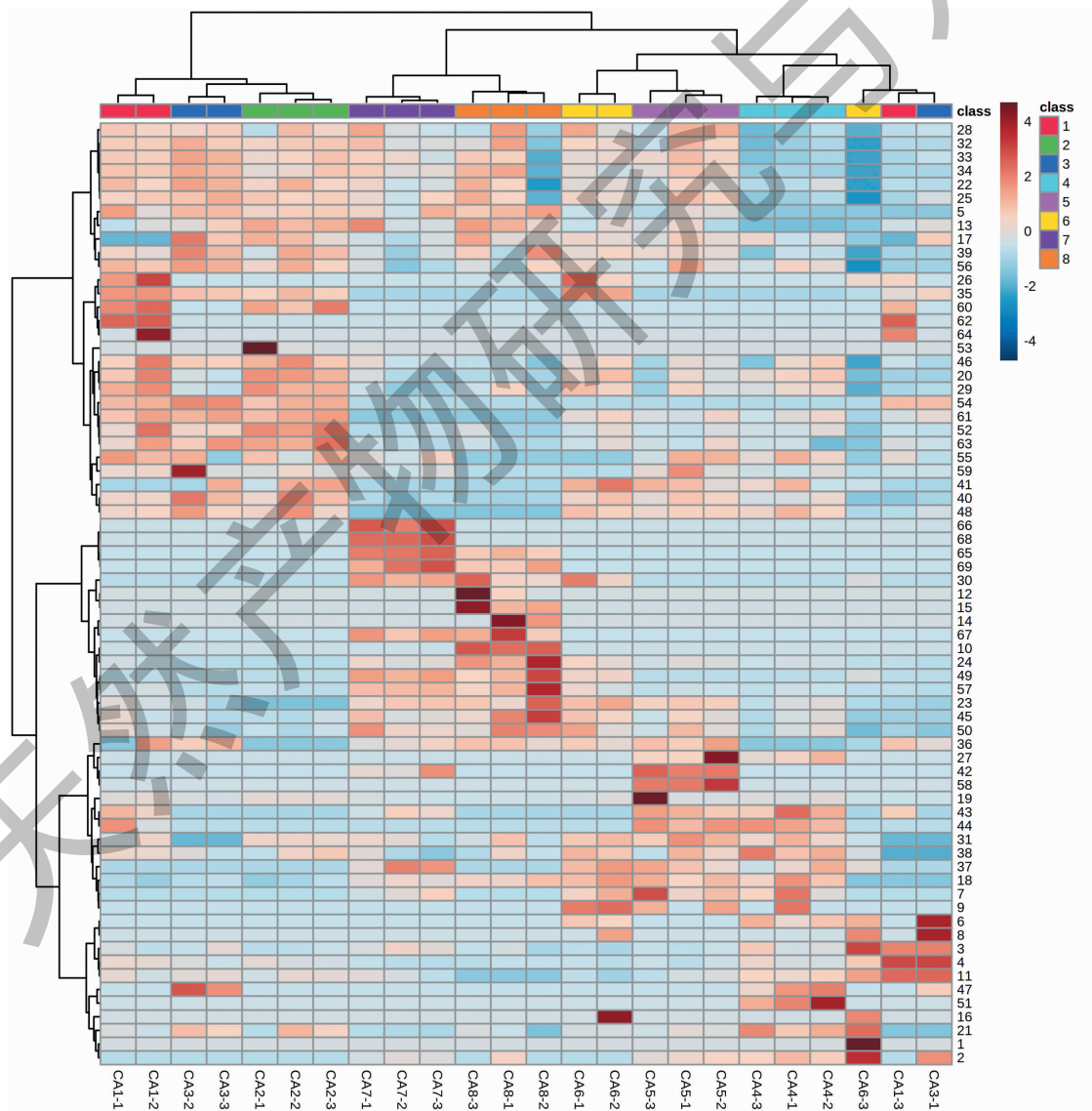


图7 不同时期酸橙挥发性成分聚类热图

Fig. 7 Cluster heat map of volatile components in different periods of *C. aurantium*

注:右侧编号为表1中化合物。Note: The right numbers are the compounds in table 1.

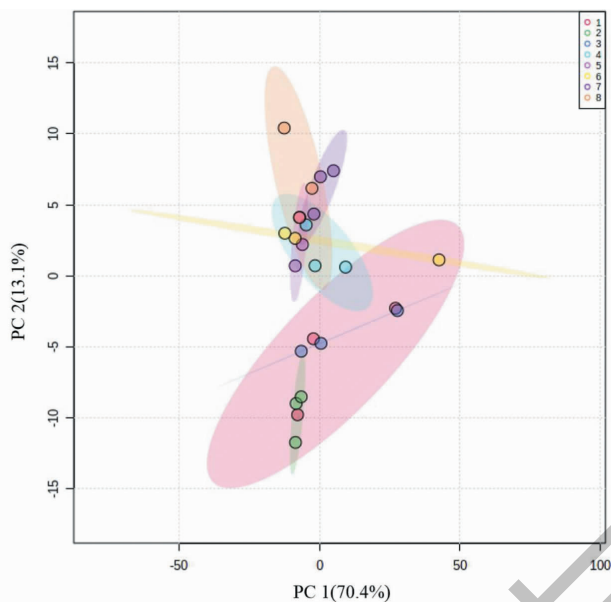


图 8 不同时期酸橙挥发性成分 PCA 得分图

Fig. 8 PCA score plot of volatile components in different periods of *C. aurantium*

一和二做 PCA 得分图,如图 7 所示,明显看出各样品组内呈现出很好的聚集趋势,酸橙果实不同时期样品存在着较明显的组间差异,表明酸橙果实不同时期挥发性化学成分发生显著变化。其中 6 月初至 6 月底三个时期的样品为一大组,7 月初至 9 月底五个时期的样品为一大组,成分差异明显。

3 讨论与结论

酸橙果实中化学成分丰富,种类繁多,其中挥发油类、黄酮类、生物碱类是其药理作用的物质基础^[14]。酸橙果实挥发性成分主要为单萜化合物及单萜的含氧衍生物,目前测定出的挥发性成分已经有 50 多种,如柠檬烯、芳樟醇、 α -蒎烯、 β -蒎烯等^[15],大多数酸橙中挥发油的主要成分为柠檬烯和芳樟醇^[16-19];不同产地的酸橙含有挥发油的主要成分不同,此外也与后续的炮制工艺等因素有较大关联。柠檬烯是酸橙果实含量最高的挥发油成分,具有镇咳、祛痰、抗菌和溶胆结石等生理活性^[18]。通过其药理分析认为柠檬烯是其饮片枳壳、枳实具有理气作用的组成成分^[20]。芳樟醇也是酸橙果实挥发性成分的重要成分之一,为链状单萜,被广泛应用于医药、食品、日化等各类领域^[8],是合成维生素 E、A 的重要中间体;另外具有镇痛、抗焦虑、镇静催眠、抗炎、抗肿瘤、抗菌和抗氧化等作用^[19,20],且天然芳樟醇因具有旋光性,从而更具有医学价值。同时发现除酸橙果实外,酸橙茎、叶中有效挥发性成分含量

也有着较高水平,如芳樟醇在酸橙叶样品中的相对含量超过了 24%,在酸橙茎样品中的相对含量超过了 8%;酸橙茎中榄香醇(23.98%)、百里酚(17.29%)也有着较高的相对含量,二者在叶样品中相对含量也较高(23.49%、10.35%)。课题组前期采用 UHPLC-ESI-Q-TOF/MS 对酸橙不同部位进行了植物化学成分及主要活性成分含量测定,6 月中下旬至 7 月初采收的酸橙果实表现出极强的抗氧化能力,并且发现酸橙叶和茎提取物也显示出一定程度的潜在抗氧化活性^[21]。

现阶段而言,人们对酸橙根、茎、叶中的有效成分进行分析研究相对较少。传统的酸橙采收方式主要以果实采收为主,其根、茎、叶在采收过程中并未得到开发利用,但这些非药用部位生物产量多,具有丰富的药效成分,开发利用前景较大。许多挥发性成分还具有促进种子传播、植物间相互作用、抗胁迫等功能,对环境、植物自身及人类生存具有重要意义;利用代谢组检测结合转录组分析,从分子水平阐明植物挥发性成分的生物合成途径,已成为植物源挥发性成分研究热点。

本次实验运用顶空固相微萃取-气质联用技术(HS-SPME-GC-MS)测定酸橙不同时期果实、不同部位中挥发性成分,阐明其关键成分相对含量的时期变化规律及不同部位间组成差异,为对酸橙中挥发性成分的进一步开发利用提供了数据参考;同时建

立了基于顶空固相微萃取技术的挥发性成分检测方法,具有快速、高效、灵敏等特点,可以较真实地反映样品中挥发性成分组成,也为检测鉴定酸橙挥发性成分提供了新的技术思路,为进一步开发利用酸橙非药用部位提供了数据和技术参考。

参考文献

- 1 Chinese Pharmacopoeia Commission. Pharmacopoeia of the People's Republic of China[M](中华人民共和国药典)[M]. Beijing:China Medical Science Press,2020.
- 2 He YJ,Liu DB,Tang Q,et al. Advance on chemical constituents of Fructus Aurantii(Immaturus)[J]. J Chin Med Mater(中药材),2017,40(6):1-7.
- 3 Gong B,Li Q,Hu XH,et al. Advances in chemical constituents and pharmacological activities of Fructus Aurantii[J]. South China Forest Sci(南方林业科学),2019,47(3):40-45.
- 4 Li CX,Yang YH,Leng DS,et al. Research progress on chemical constituents and quality evaluation of Fructus Aurantii[J]. J Liaoning Univ Tradit Chin Med(辽宁中医药大学学报),2019,21:158-161.
- 5 Su ZP,Hu SF,Zai YD,et al. Studies on the chemical constituents and pharmacological effects of Fructus Aurantii[J]. Technol Innov Appl(科技创新与应用),2012(17):8-9.
- 6 Yuan D,Wang Q,Wang QL,et al. Quality evaluation of raw materials and extract of *Citrus aurantium*[J]. Chin J Pharm(中国药学杂志),2005,40:1178-1181.
- 7 Liao FX,Xin LT,Chen H,et al. Analysis of the constituents of volatile oil from Fructus Aurantii Immaturus and Aructus Furantii as traditional Chinese medicine[J]. J Chongqing Univ;Nat Sci(重庆大学学报:自科版),2004,27(5):38-40.
- 8 Zong Z,Cheng L,Chen ZJ,et al. Research progress on biosynthesis of terpenoids for food[J]. China Brewing(中国酿造),2018,37(9):22-27.
- 9 Kang WY,Wang JM,ji ZQ,et al. Analysisofthe volatile constituents from *Jasminum nudiflorum* Lindl. by HS-SPME-GC-MS[J]. Nat Prod Re Dev(天然产物研究与开发),2009,21:84- 86.
- 10 Kang WY,ji ZQ,Wang JM,et al. Analysisofthe volatile constituentsfrom *Pyrrrosia petiolosa* (Christ) Ching. by HS-SPME-GC-M[J]. Chin Tradit Herb Drugs(中草药),2008,39:994-995.
- 11 Liu JH,Chen MF,Zhong XH,et al. Analysis of volatile compositions in different varieties flower of *Hemerocallis citrina* Baroni by HS-SPME-GC-MS[J]. Nat Prod Re Dev(天然产物研究与开发),2020,32:269-277.
- 12 Liu JH,Liu W,Qing ZX,et al. Analysis of volatile composition of various parts in *Hemerocallis citrina* Baroni by HS-SPME-GC-MS[J]. Nat Prod Re Dev(天然产物研究与开发),2020,32:464-472.
- 13 Luo FY,Tang Q,Chen MF,et al. Determination of volatile components in simotang oral solution by HS-SPME[J]. Chin Tradit Pat Med(中成药),2019,41:353-357.
- 14 Xu Y,Xu J,Bai B,et al. Progress in extraction process and quality control of chemical constituents of Aurantii Fructus[J]. Food Drug(食品与药品),2018,20:244-247.
- 15 Chen RL,HE XZ,Gong QF. Influence on volatile oil of preparing Fructus Aurantii Immaturus[J]. J Jiangxi Univ Tradit Chin Med(江西中医学院学报),2004,16(1):44-47.
- 16 Tan H. Study on the Chemical constituents and pharmacological action of Fructus Aurantii[J]. Guide China Med(中国医药指南),2017,15(27):14-15.
- 17 Shi XJ,Zhang JH,Wei Z,et al. Comparative studies on chemical composition of essential oil from Aurantii Fructus Immaturus and Aurantii Fructus[J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med(中药药理与临床)2012,3(2):21-24.
- 18 He YJ. Construction of fingerprint and analysis of bioactive ingredients from Hunan Aurantii Fructus[D] Changsha:Hunan Agricultural University(湖南农业大学),2018.
- 19 Jiang DM,Zhu Y,Yu JN,et al. Advances in research of pharmacological effects and formulation studies of linalool[J]. China J Chin Mater Med(中国中药杂志),2015,40:3530-3533.
- 20 Chen SX,Zhao LH,Xu XJ. Natural linalool resource and its development and utilization[J]. J Forest Eng(林业科技开发),2013,27(2):13-17.
- 21 Tang Q,Zhang RY,Zhou JL,et al. The levels of bioactive ingredients in *Citrus aurantium* L. at different harvest periods and antioxidant effects on H₂O₂-induced RIN-m5F cells[J]. J Sci Food Agr,2021,101:1479-1490.