

# 分散固相萃取-液相色谱-串联质谱法测定不同品种 柑橘果实不同部位中3种柠檬苦素类似物的含量

秦芸桦<sup>1,2</sup>, 钟世欢<sup>2,3</sup>, 陈青俊<sup>1,3\*</sup>, 王京<sup>1,3</sup>, 王岳<sup>4</sup>, 叶佳明<sup>2,3</sup>, 陈云义<sup>4</sup>, 孙崇德<sup>4</sup>

(1. 赞宇科技集团股份有限公司, 杭州 310030; 2. 浙江公正检验中心有限公司, 杭州 311305;

3. 浙江省食品安全重点实验室, 杭州 310009; 4. 浙江大学 果实品质生物学实验室, 杭州 310058)

**摘要:** 提出了分散固相萃取-液相色谱-串联质谱法同时测定4个品种柑橘果实的4个部位(油胞层、白皮层、囊衣、果肉)中柠檬苦素、诺米林、黄柏酮含量的方法。取5.0 g均质后的样品, 加入5 mL水, 涡旋混匀后加入20 mL体积比5:5的丙酮-乙腈混合溶液, 混匀后超声提取10 min, 离心5 min。用3 mL水活化2 g EMR-Lipid吸附剂, 加至上清液中, 涡旋30 s, 加入5 g质量比1:4的氯化钠-硫酸镁混合物和15 mg石墨化碳黑, 迅速摇匀后离心1 min。吸取全部上清液, 于40 °C氮吹至近干, 残渣用10.0 mL体积比9:1的0.1%(体积分数, 下同)甲酸溶液和乙腈的混合溶液复溶, 过0.22 μm滤膜, 滤液按照优化的仪器工作条件测定。进行色谱分析时, 以CAPCELL PAK ADME HR色谱柱作固定相, 以不同体积比的0.1%甲酸溶液和乙腈的混合溶液作流动相进行梯度洗脱分离; 进行质谱分析时, 以电喷雾离子源正离子(ESI<sup>+</sup>)和多反应监测(MRM)模式检测。结果显示:3种柠檬苦素类似物的质量浓度在0.10~10.0 mg·L<sup>-1</sup>内和对应的峰面积呈线性关系, 检出限(3S/N)均为0.01 mg·kg<sup>-1</sup>; 按标准加入法进行回收试验, 回收率为83.1%~90.5%, 测定值的相对标准偏差(*n*=6)为2.6%~5.6%; 方法用于30个实际样品的分析, 柠檬苦素类似物在不同品种柑橘果实及其不同部位中的含量分布差异显著, 柚类品种中柠檬苦素类似物总测定值较高且主要分布在囊衣部位, 其他品种主要分布在白皮层和油包层。

**关键词:** 分散固相萃取; 液相色谱-串联质谱法; 柠檬苦素类似物; 分布; 柑橘果实

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1001-4020(2024)02-0171-09

柑橘果实中含有多种有益于人体健康的物质, 如维生素、矿物质、纤维素以及类胡萝卜素、类黄酮、柠檬苦素类似物等次生代谢物质。其中, 柠檬苦素类似物是一类含有呋喃环的以异戊二烯为基本结构单元的高度氧化的四环三萜类化合物, 是柑橘果实中的重要功能性成分, 也是产生苦味的主要物质之一。柠檬苦素类似物具有抗肿瘤、镇痛、抗炎、除虫杀虫、抗氧化性、抗菌、降血糖以及预防心血管疾病等作用<sup>[1-4]</sup>。

目前, 柠檬苦素类似物的检测方法主要有荧光检测法<sup>[5]</sup>、分光光度法<sup>[6]</sup>、放射性免疫测定

法<sup>[7]</sup>、液相色谱法<sup>[8-12]</sup>、液相色谱-质谱法<sup>[13-14]</sup>等。不同品种柑橘果实的不同部位中柠檬苦素类似物的种类和含量具有较大差异性, 而上述方法检测对象多局限于柑橘果实的单一部位, 且同时检测柠檬苦素、诺米林和黄柏酮等柠檬苦素类似物的报道较少; 柑橘果实基质复杂, 采用液相色谱法测定时, 无法准确测定低含量样品<sup>[15]</sup>; 采用液相色谱-质谱法测定时, 检测对象多为干燥样品和发酵液, 缺乏新鲜样品的相关研究。为实现不同品种柑橘果实的不同部位中柠檬苦素类化合物种类和含量的比较和鉴别, 本工作提出了分散固相萃取-液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)同时测定不同品种柑橘果实的不同部位中柠檬苦素、诺米林、黄柏酮的含量, 可为柑橘果实中柠檬苦素类化合物在食品、医药、畜牧业和农业等领域中合理高效的开发与应用提供科学依据与技术支撑。

收稿日期: 2022-09-18

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(LQY18C200001)

作者简介: 秦芸桦, 工程师, 硕士, 研究方向为食品质量与安全分析

\* 通信联系人。chenqj@zanyu.com



## 1 试验部分

### 1.1 仪器与试剂

1260 II-6495型液相色谱-质谱仪;Centrifuge 5804R型冷冻离心机;MultiReax型涡旋振荡器;EVAP11型氮吹仪;Milli-Q型纯水仪;KH-5000B型超声波仪。

混合标准储备溶液:100 mg·L<sup>-1</sup>,取0.01 g柠檬苦素、诺米林、黄柏酮标准品,用乙腈溶解并定容至100 mL,摇匀备用。

混合标准溶液系列:取适量混合标准储备溶液,用初始流动相逐级稀释,配制成柠檬苦素、诺米林、黄柏酮的质量浓度为0.10,0.50,2.5,5.0,7.5,10.0 mg·L<sup>-1</sup>的混合标准溶液系列。

柠檬苦素、诺米林、黄柏酮标准品的纯度不小于99%;乙腈、丙酮、甲酸均为色谱纯;石油醚、硫酸镁、氯化钠、二氯甲烷均为分析纯;增强型去脂吸附剂EMR-Lipid;石墨化碳黑(GCB);试验用水为超纯水。

30个柑橘果实样品均采摘于种植基地,包含12个柚类品种(楚门文旦、奥郎布朗科葡萄柚、强德勒柚、脆香甜柚、安江香柚、五布红心柚、早熟暹罗柚、大庸菊花芯(柚)、金堂无核柚、上杭蜜柚、马家柚、舒化柚),5个柑类品种[华农本地早(柑)、无籽瓯柑、口之津(柑)、沙柑、沅江建柑],8个橘类品种[阳山橘、八月橘、蔓生红橘、安江红橘、年橘、川田(橘)、静冈1080(橘)、白川温州(橘)],5个橙类品种[伏令夏橙、金山橙、晚熟6号(橙)、江津长叶橙、摩洛哥酸橙]。将各品种果实的油胞层、白皮层、囊衣、果肉进行分离,分别冷冻粉碎后于-18℃保存备用。

### 1.2 仪器工作条件

#### 1.2.1 色谱条件

CAPCELL PAK ADME HR色谱柱(100 mm×2.1 mm,2.0 μm);柱温35℃;流量0.3 mL·min<sup>-1</sup>;进样量10 μL;流动相A为0.1%(体积分数,下同)甲酸溶液,B为乙腈。梯度洗脱程序:0~5.0 min,B为10%;5.0~7.0 min,B由10%升至25%;7.0~9.0 min,B由25%升至45%;9.0~12.0 min,B由45%升至75%;12.0~15.0 min,B由75%升至95%,保持3.0 min;18.0~18.5 min,B由95%降至10%。

#### 1.2.2 质谱条件

电喷雾离子(ESI)源,正离子(ESI<sup>+</sup>)扫描模式;

多反应监测(MRM)模式;鞘气流量10 L·min<sup>-1</sup>;干燥气流量8 L·min<sup>-1</sup>;干燥气温度300℃;雾化气压力0.21 MPa;毛细管电压4 000 V;裂解电压166 V。其他质谱参数见表1,“\*”代表定量离子对。

表1 质谱参数

Tab. 1 MS parameters

化合物	离子对质荷比( <i>m/z</i> )	碰撞能量/eV
柠檬苦素	471/425*,471/161	17,24
诺米林	515/469*,515/161	15,29
黄柏酮	455/409*,455/161	15,25

### 1.3 试验方法

取5.0 g均质后的样品于50 mL离心管中,加入5 mL水,涡旋混匀后加入20 mL体积比5:5的丙酮-乙腈混合溶液,混匀后超声提取10 min,以8 000 r·min<sup>-1</sup>转速离心5 min,收集上清液。用3 mL水活化2 g EMR-Lipid吸附剂,加至上清液中,涡旋30 s,加入5 g质量比1:4的氯化钠-硫酸镁混合物和15 mg GCB,迅速摇匀,以8 000 r·min<sup>-1</sup>转速离心1 min。吸取全部上清液,于40℃氮吹至干,残渣用10.0 mL初始流动相复溶,过0.22 μm滤膜,滤液供LC-MS/MS测定。

### 1.4 数据处理

采用Agilent MassHunter软件进行数据分析和图谱处理,采用Microsoft Excel与Origin lab软件绘制图表;试验数据为至少重复测定3次的结果,采用SPSS19.0软件进行统计分析,采用方差分析进行多组数据鉴定比较,采用Tukey法进行显著性检验。

## 2 结果与讨论

### 2.1 质谱条件的优化

在ESI<sup>+</sup>全扫描(SCAN)模式下,依次进样分析1.0 mg·L<sup>-1</sup>柠檬苦素、诺米林、黄柏酮的单标准溶液,3种待测物均形成了准分子离子[M+H]<sup>+</sup>。启用离子漏斗模块,在产物离子扫描(Product Ion)和MRM模式分析中选择定性离子对和定量离子对,同时优化碰撞能量,使各特征离子对的响应达到最大,优化的结果见1.2.2节。

### 2.2 色谱条件的优化

柠檬苦素类似物的结构相近,在二级质谱中均会产生*m/z* 161子离子碎片,对色谱分离能力有一定要求。试验考察了ZORBAX Eclipse Plus C<sub>18</sub>色谱柱(100 mm×2.1 mm,1.8 μm)、CAPCELL

PAK ADME HR 色谱柱( $100\text{ mm} \times 2.1\text{ mm}$ ,  $2.0\text{ }\mu\text{m}$ )、XBridge C<sub>18</sub> 色谱柱( $100\text{ mm} \times 2.1\text{ mm}$ ,  $1.7\text{ }\mu\text{m}$ )作为固定相时对3种待测物分离效果的影响。结果显示:在梯度洗脱条件下,3种化合物均能有效分离,但 XBridge C<sub>18</sub> 色谱柱( $100\text{ mm} \times 2.1\text{ mm}$ ,  $1.7\text{ }\mu\text{m}$ )和 ZORBAX Eclipse Plus C<sub>18</sub> 色谱柱( $100\text{ mm} \times 2.1\text{ mm}$ ,  $1.8\text{ }\mu\text{m}$ )对系统压力要求更高,且分析时间更长。综合考虑,试验选择采用 CAPCELL PAK ADME HR 色谱柱( $100\text{ mm} \times 2.1\text{ mm}$ ,  $2.0\text{ }\mu\text{m}$ )作固定相。

以乙腈-水、甲醇-水、乙腈-甲酸溶液、甲醇-甲酸溶液、乙腈-甲酸铵溶液、甲醇-甲酸铵溶液体系作流

动相,比较了不同体系下3种待测物的灵敏度和分离度。结果显示:在 ESI<sup>+</sup> 扫描模式下,在水相中添加一定量甲酸能显著提高待测物的离子化效率,当甲酸体积分数为 0.1% 时 3 种待测物的灵敏度和分离度均最佳;在水相中加入甲酸铵也能显著提高待测物的离子化效率,且增强效果和甲酸的基本相当,但是添加甲酸更为简便;与甲醇相比,乙腈具有更强的反相洗脱能力,更小的基线噪音,且其极性与待测物的更接近。综上,试验选择的流动相为乙腈-0.1% 甲酸溶液体系。

按照试验方法分析大庸菊花芯(柚)油胞层,其中的3种柠檬苦素类似物的典型色谱图见图 1。

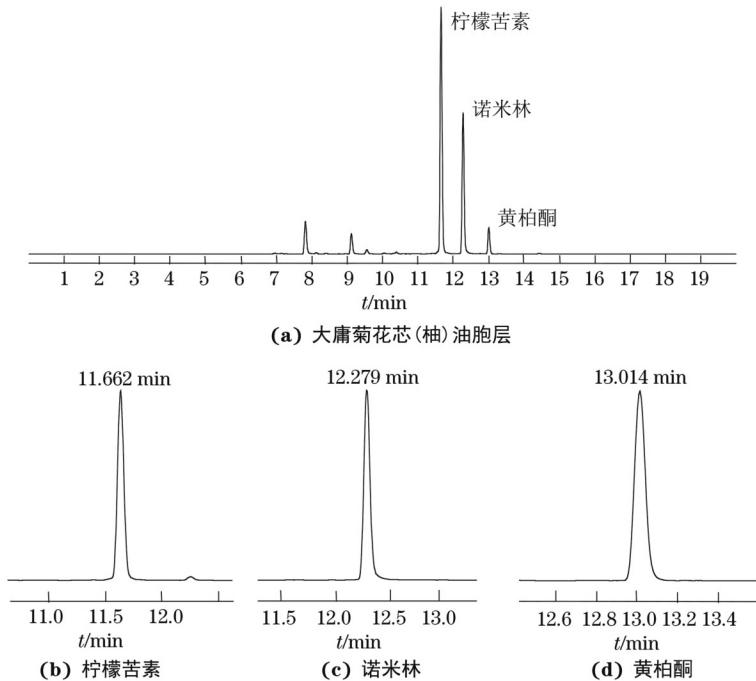


图 1 3 种柠檬苦素类似物的色谱图  
Fig. 1 Chromatograms of the 3 limonin analogues

### 2.3 预处理方法的选择

柑橘果实中含大量的有机酸、糖类、色素、黄酮等物质,在液相色谱-质谱的离子化过程中会与待测物竞争电子,从而引起较强的基质效应,影响待测物的准确测定。在优化的仪器工作条件下,选择有效降低基质效应的预处理方法至关重要。柠檬苦素、诺米林、黄柏酮的极性较弱,基质干扰物质主要是出峰时间相近的脂质等弱极性物质,需要通过优化提取、净化等条件降低基质干扰。对于天然植物样品,常用的提取方法有超声、回流等,常用的提取溶剂主要有甲醇、乙腈、丙酮、二氯甲烷等<sup>[6-13]</sup>。基于上述文献,进行了提取方法、提取溶剂和分散固相萃取吸附剂的优化试验。

#### 2.3.1 提取方法

以加标舒化柚的油胞层样品(加标量  $50\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )为待测对象,试验比较了分散固相萃取法、超声溶剂萃取法、回流溶剂萃取法(分别标记为方法 1<sup>#</sup>、方法 2<sup>#</sup> 和方法 3<sup>#</sup>)下加标样品中 3 种待测物的回收率,结果见图 2。其中:参考文献[9]进行超声溶剂萃取,即取经均质的样品  $5.0\text{ g}$ ,置于  $250\text{ mL}$  烧瓶中,加入  $40\text{ mL}$  石油醚( $30\sim60\text{ }^\circ\text{C}$ ),于  $40\text{ }^\circ\text{C}$  超声脱脂  $30\text{ min}$ ,抽滤后弃去滤液,加入  $50\text{ mL}$  丙酮,于  $40\text{ }^\circ\text{C}$  超声提取  $30\text{ min}$ ,滤纸过滤,滤液氮吹至干,用  $10\text{ mL}$  50%(体积分数)乙腈溶液复溶,过  $0.22\text{ }\mu\text{m}$  滤膜,滤液供 LC-MS/MS 分析;参考文献[10]进行回流溶剂萃取,即取经均质的样品  $5.0\text{ g}$ ,

置于250 mL烧瓶中,加入60 mL二氯甲烷,于50 °C回流提取1 h,过滤,将滤液于50 °C旋转蒸发至干,加入10 mL乙腈溶解残渣,过0.22 μm滤膜,滤液供LC-MS/MS分析;图2柱子上方不同字母a,b代表P<0.05水平下的差异有统计学意义。

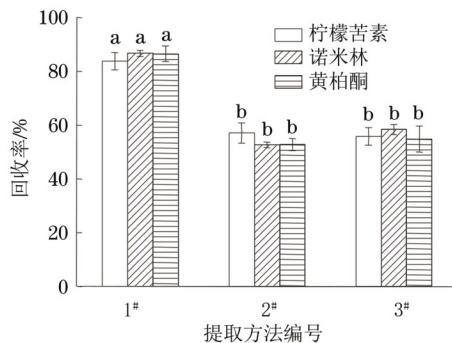


图2 不同提取方法下3种柠檬苦素类似物的回收率

Fig.2 Recoveries of the 3 limonin analogues under different extraction methods

由图2可知,超声溶剂萃取法和回流溶剂萃取法所得3种待测物的回收率均小于60.0%,而分散固相萃取法所得回收率大于80.0%。因此,试验选择的提取方法为分散固相萃取法。

### 2.3.2 提取溶剂

对甲醇、乙腈、丙酮、二氯甲烷等的提取效果进行考察时发现:以丙酮、二氯甲烷提取时,提取液中存在较多的色素、脂质等共提取物,尤其是油胞层和囊衣部位,后续净化难度较高;以油胞层为待测对象,以甲醇、乙腈提取时黄柏酮的单次提取回收率小于50.0%;以丙酮和乙腈的混合溶液提取时,3种待测物的提取回收率相对较高。因此,试验进一步考察了丙酮和乙腈的体积比分别为1:9、3:7、5:5、7:3、9:1时对2.3.1节加标样品中3种待测物回收率的影响,结果见图3。

由图3可知,混合溶液中丙酮和乙腈体积比为5:5时3种待测物的回收率均大于80.0%,因此试验选择的提取溶剂为体积比5:5的丙酮-乙腈混合溶液。

### 2.3.3 分散固相萃取吸附剂

分散固相萃取技术净化效果好、操作简便、效率高,是色谱分析中常用的净化手段,常用的吸附剂有十八烷基键合硅胶(C<sub>18</sub>)、N-丙基乙二胺固相吸附剂(PSA)、聚酰胺粉、GCB、活性炭、氧化铝、硅酸镁、EMR-Lipid等。其中:C<sub>18</sub>主要用于吸附脂质,亲脂类待测物的回收率偏低;GCB主要用于吸附色素,但对具有平面结构的待测物也存在共吸附;氧化铝包括酸性、中性和碱性氧化铝,根据其酸碱性的不

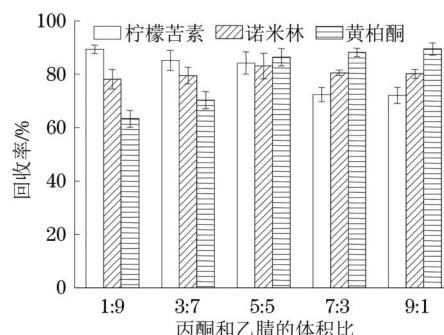


图3 不同体积比丙酮和乙腈的混合溶液下3种柠檬苦素类似物的回收率

Fig.3 Recoveries of the 3 limonin analogues under acetone and acetonitrile mixed solutions with different volume ratios

同,可用来分离不同酸度化合物,其专一性较差;EMR-Lipid是基于体积排阻和疏水相互作用机制来去除脂质的,可吸附脂质中C<sub>5</sub>及具有更长碳链的物质,具有高选择性、高效率的特点。根据柠檬苦素、诺米林、黄柏酮的化学性质,试验考察了分别以C<sub>18</sub>、中性氧化铝、EMR-Lipid等3种脱脂型吸附剂净化时对2.3.1节加标样品中3种待测物回收率的影响,结果见图4。其中,不同字母a,b,c代表P<0.05水平下的差异有统计学意义。

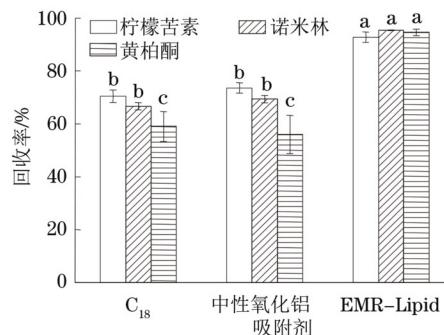


图4 不同吸附剂下3种柠檬苦素类似物的回收率  
Fig.4 Recoveries of the 3 limonin analogues with different adsorbents

由图4可知,C<sub>18</sub>和中性氧化铝对黄柏酮的吸附较明显,其回收率仅为57.1%和51.9%,而EMR-Lipid对柠檬苦素、诺米林、黄柏酮均无明显吸附,且回收率均大于90.0%。因此,试验选择的吸附剂为EMR-Lipid。

利用EMR-Lipid吸附剂除脂后,部分样品需加入适量GCB去除样品溶液中的色素,因此试验进一步考察了GCB用量(5,15,30 mg)对2.3.1节加标样品中3种待测物回收率的影响。结果显示:加入5 mg GCB时,柠檬苦素的回收率小于60.0%,且样品溶液颜色较深;加入15 mg GCB时,3种待测物的回收率均大于90.0%,且样品溶液较为澄清透明;

加入30 mg GCB时,样品溶液完全澄清透明,但共吸附情况显著,待测物的平均回收率不到40.0%。因此,试验选择加入的GCB用量为15 mg。

#### 2.3.4 优化的预处理条件消除基质效应的效果

由于空白样品溶液无法获取,试验以加标舒化柚的油胞层样品(加标量 $10.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ )为待测对象,比较了分别以标准加入法<sup>[16]</sup>和本方法测定时柠檬苦素、诺米林、黄柏酮的回收率。结果显示:采用标准加入法测定时,柠檬苦素、诺米林、黄柏酮的回收率为93.2%,94.5%和91.9%;采用本方法测定时,上述3种待测物的回收率为90.5%,97.1%和92.4%,本方法的回收率和标准加入法的基本一致,

均达到90.0%以上,说明上述优化的预处理条件消除基质效应的效果较好。

#### 2.4 方法学考察

##### 2.4.1 标准曲线、检出限和测定下限

按照仪器工作条件测定混合标准溶液系列,以各待测物的质量浓度为横坐标,其对应的峰面积为纵坐标绘制标准曲线。结果显示,各待测物的质量浓度均在 $0.10 \sim 10.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 内和对应的峰面积呈线性关系,其他线性参数见表2。

分别以3,10倍信噪比(S/N)计算检出限( $3S/N$ )和测定下限( $10S/N$ ),所得结果见表2,同时与液相色谱法<sup>[26]</sup>的检出限进行比较,结果见表2。

表2 线性参数、检出限和测定下限

Tab. 2 Linearity parameters, detection limits and lower limits of determination

化合物	线性回归方程	相关系数	检出限 $w/( \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$	测定下限 $w/( \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$	液相色谱法检出限 $w/( \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$
柠檬苦素	$y = 1.359 \times 10^4 x + 3.242 \times 10^2$	0.9997	0.01	0.03	0.5
诺米林	$y = 1.228 \times 10^4 x - 7.412 \times 10$	0.9998	0.01	0.03	0.5
黄柏酮	$y = 1.205 \times 10^4 x + 5.933 \times 10^2$	0.9996	0.01	0.03	0.15

由表2可知,本方法的检出限低于文献报道方法的,满足实际样品的分析需求。

#### 2.4.2 精密度和回收试验

按照试验方法对五布红心柚的油胞层、白皮

层、囊衣、果肉等4个部位进行3个浓度水平的加标回收试验,每个浓度水平进行6次重复测定,计算回收率和测定值的相对标准偏差(RSD),结果见表3。

表3 精密度和回收率试验结果( $n=6$ )

Tab. 3 Results of tests for precision and recovery( $n=6$ )

化合物	加标量 $w/( \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$	油胞层		白皮层		囊衣		果肉	
		回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%	回收率/%	RSD/%
柠檬苦素	10	83.5	3.5	90.5	4.2	88.9	5.1	85.9	4.9
	50	83.9	3.1	88.4	3.9	86.8	4.5	89.8	3.6
	200	87.5	2.9	83.9	3.2	87.4	4.1	90.1	2.9
诺米林	10	89.2	5.1	85.2	4.8	84.9	5.5	84.2	5.6
	50	85.8	4.5	87.8	4.5	86.8	4.1	86.1	4.2
	200	87.1	3.8	89.1	2.6	87.2	4.6	89.7	3.4
黄柏酮	10	83.1	4.9	84.9	5.1	86.1	3.4	90.3	5.1
	50	86.5	4.2	85.6	4.6	88.3	4.5	90.5	4.7
	200	88.2	3.7	90.3	4.1	89.5	2.9	89.6	4.1

由表3可知,3种待测物的回收率为83.1%~90.5%,测定值的RSD为2.6%~5.6%,表明该方法具有较好的精密度和准确度,能满足实际样品的检测需要。

#### 2.5 样品分析

采用本方法对30个品种柑橘果实样品的不

同部位中3种柠檬苦素类似物的含量进行测定,每个部位各测定3次,所得结果见表4。其中,柑类、橘类、橙类等柑橘果实的囊衣部位样品量较小,无法用本方法进行分离测定,表4仅显示柑橘果实其他3个部位的结果。

表4 不同品种柑橘果实不同部位中柠檬苦素类似物的测定值  
Tab. 4 Determined values of the 3 limonin analogues in different parts of citrus fruits of different varieties

样品	化合物	测定值 $w/(mg \cdot kg^{-1})$			
		油胞层	白皮层	囊衣	果肉
楚门文旦	柠檬苦素	13.5±0.41	18.8±0.73	442±18.51	27.4±0.95
	诺米林	4.31±0.19	14.9±0.58	627±26.33	34.4±1.37
	黄柏酮	0.0711±0.003	0.592±0.03	35.3±1.20	1.95±0.09
奥郎布朗科葡萄柚	柠檬苦素	58.8±2.51	70.8±2.46	—	20.0±0.81
	诺米林	2.94±0.10	9.18±0.31	—	3.90±0.13
	黄柏酮	—	—	—	—
强德勒柚	柠檬苦素	16.8±0.51	35.5±1.33	418±17.56	57.9±2.10
	诺米林	25.5±1.15	63.9±2.33	703±29.08	82.2±3.29
	黄柏酮	1.18±0.04	3.64±0.18	39.4±1.34	4.87±0.23
脆香甜柚	柠檬苦素	8.98±0.27	8.04±0.31	290±12.18	20.1±0.70
	诺米林	1.03±0.05	5.31±0.21	265±11.10	7.06±0.28
	黄柏酮	—	0.0542±0.002	13.4±0.46	0.315±0.010
安江香柚	柠檬苦素	3.07±0.12	2.18±0.09	85.1±3.21	21.8±0.81
	诺米林	3.68±0.11	3.08±0.11	144±5.05	51.8±1.81
	黄柏酮	—	—	0.870±0.040	0.310±0.010
五布红心柚	柠檬苦素	15.8±0.45	16.3±0.63	338±14.21	72.4±2.08
	诺米林	9.81±0.44	13.2±0.51	479±20.12	80.8±3.23
	黄柏酮	0.322±0.010	0.387±0.02	27.3±0.92	4.67±0.22
早熟暹罗柚	柠檬苦素	72.5±2.11	5.56±0.22	495±20.11	27.3±0.95
	诺米林	98.9±4.41	6.37±0.25	713±29.95	46.7±1.87
	黄柏酮	5.34±0.21	0.171±0.009	39.9±1.36	2.89±0.14
大庸菊花芯(柚)	柠檬苦素	59.4±2.18	16.5±0.61	291±12.26	16.4±0.61
	诺米林	40.9±1.31	20.2±0.58	254±8.19	30.8±1.06
	黄柏酮	6.49±0.33	—	5.15±0.26	—
金堂无核柚	柠檬苦素	81.9±3.12	59.1±2.51	317±12.12	83.5±3.15
	诺米林	20.3±0.65	29.9±1.01	259±9.11	57.4±2.01
	黄柏酮	—	—	0.81±0.04	—
上杭蜜柚	柠檬苦素	48.0±2.01	55.9±2.12	—	56.0±2.01
	诺米林	72.6±2.12	50.6±1.65	—	25.6±0.81
	黄柏酮	0.79±0.04	—	—	0.21±0.01
马家柚	柠檬苦素	2.46±0.07	5.31±0.20	181±7.61	2.77±0.09
	诺米林	1.94±0.08	12.4±0.49	407±17.01	5.34±0.22
	黄柏酮	—	0.432±0.02	23.4±0.79	0.192±0.009
舒化柚	柠檬苦素	5.62±0.16	11.2±0.44	389±16.33	50.6±1.71
	诺米林	23.3±1.05	23.9±0.93	774±32.51	109±4.36
	黄柏酮	1.16±0.05	1.16±0.05	42.5±1.44	6.44±0.31
华农本地早(柑)	柠檬苦素	20.0±0.81	65.3±2.71	—	5.27±0.21
	诺米林	0.860±0.030	29.9±1.02	—	1.29±0.05
	黄柏酮	—	—	—	—

表4(续1)

样品	化合物	测定值 $w/(mg \cdot kg^{-1})$			
		油胞层	白皮层	囊衣	果肉
无籽瓯柑	柠檬苦素	114±3.41	160±5.86	—	18.9±0.66
	诺米林	25.7±1.16	133±5.19	—	15.1±0.61
	黄柏酮	1.39±0.06	7.57±0.38	—	0.732±0.03
口之津(柑)	柠檬苦素	9.96±0.41	40.81±1.71	—	8.57±0.36
	诺米林	0.46±0.01	7.21±0.21	—	0.99±0.03
	黄柏酮	—	—	—	—
沙柑	柠檬苦素	67.8±2.81	51.8±2.16	—	19.4±0.81
	诺米林	0.66±0.02	2.23±0.07	—	2.99±0.11
	黄柏酮	—	—	—	—
沅江建柑	柠檬苦素	39.6±1.61	172±7.12	—	32.8±1.38
	诺米林	0.35±0.01	19.6±0.65	—	3.52±0.12
	黄柏酮	—	—	—	—
阳山橘	柠檬苦素	89.0±3.71	254±10.11	—	37.0±1.51
	诺米林	6.94±0.24	133±4.66	—	25.8±0.91
	黄柏酮	—	0.46±0.02	—	—
八月橘	柠檬苦素	74.6±3.12	198±8.35	—	42.5±1.77
	诺米林	6.25±0.21	49.1±1.65	—	7.79±0.28
	黄柏酮	—	—	—	—
蔓生红橘	柠檬苦素	28.2±1.12	39.2±1.66	—	7.67±0.28
	诺米林	0.35±0.01	1.15±0.04	—	—
	黄柏酮	—	—	—	—
安江红橘	柠檬苦素	51.5±2.11	192±8.01	—	40.3±1.43
	诺米林	1.20±0.04	28.6±1.01	—	0.54±0.01
	黄柏酮	—	—	—	—
年橘	柠檬苦素	183±7.51	98.9±4.01	—	8.53±0.31
	诺米林	5.87±0.21	3.25±0.11	—	0.43±0.02
	黄柏酮	—	—	—	—
川田(橘)	柠檬苦素	4.45±0.15	20.9±0.81	—	1.56±0.06
	诺米林	0.19±0.007	7.48±0.21	—	0.10±0.004
	黄柏酮	—	—	—	—
静冈 1080(橘)	柠檬苦素	3.12±0.12	7.80±0.31	—	0.38±0.02
	诺米林	—	0.33±0.01	—	—
	黄柏酮	—	—	—	—
白川温州(橘)	柠檬苦素	2.27±0.08	5.20±0.21	—	8.73±0.31
	诺米林	—	1.21±0.05	—	0.91±0.03
	黄柏酮	—	—	—	—
江津长叶橙	柠檬苦素	70.8±2.59	61.3±2.31	—	8.88±0.36
	诺米林	0.24±0.008	2.15±0.07	—	0.40±0.01
	黄柏酮	—	—	—	—

表4(续2)

样品	化合物	测定值 $w/(mg\cdot kg^{-1})$			
		油胞层	白皮层	囊衣	果肉
摩洛哥酸橙	柠檬苦素	222±6.21	314±10.77	—	18.6±0.65
	诺米林	41.6±1.81	146±5.69	—	7.91±0.32
	黄柏酮	2.31±0.09	8.27±0.41	—	0.335±0.01
伏令夏橙	柠檬苦素	17.9±0.71	21.4±0.95	—	5.74±0.21
	诺米林	—	0.79±0.02	—	0.17±0.006
	黄柏酮	—	—	—	—
金山橙	柠檬苦素	68.0±2.66	55.1±2.12	—	12.9±0.51
	诺米林	3.53±0.12	4.69±0.16	—	3.40±0.12
	黄柏酮	—	—	—	—
晚熟6号(橙)	柠檬苦素	70.4±2.88	29.9±1.13	—	6.18±0.25
	诺米林	0.14±0.005	0.38±0.01	—	—
	黄柏酮	—	—	—	—

由表4可知,不同品种柑橘果实的不同部位中3种柠檬苦素类似物含量和分布差异显著。比较不同品种柑橘果实中3种柠檬苦素类似物总含量,由大到小排序依次为柚类、柑类、橙类、橘类品种,其中柚类品种中早熟暹罗柚( $1513 mg\cdot kg^{-1}$ )、强德勒柚( $1452 mg\cdot kg^{-1}$ )和舒化柚( $1437 mg\cdot kg^{-1}$ )中柠檬苦素类化合物的总测定值较高,柑类品种中无籽瓯柑柠檬苦素类化合物的总测定值较高,橙类品种摩洛哥酸橙中柠檬苦素类似物总测定值( $761 mg\cdot kg^{-1}$ )较高,而橘类品种静冈1080(橘)中柠檬苦素类似物总测定值( $11.6 mg\cdot kg^{-1}$ )最低。比较不同部位中3种柠檬苦素类似物的总含量,柚类品种中柠檬苦素类似物主要分布在囊衣部位,柑类、橙类、橘类品种中柠檬苦素类似物主要分布在白皮层和油胞层部位。比较30种柑橘果实中柠檬苦素类似物的种类,柚类中柠檬苦素类似物主要以柠檬苦素、诺米林为主,黄柏酮含量较低;柑类、橙类、橘类中柠檬苦素类似物主要以柠檬苦素为主,黄柏酮检出率较低。

本工作提出以分散固相萃取-LC-MS/MS同时测定柑橘果实中3种柠檬苦素类似物的含量,有效解决了柑橘果实不同部位的基质干扰,且方法简便、快速、检出限低。方法用于30个不同品种柑橘果实的不同部位中柠檬苦素、诺米林、黄柏酮等3种柠檬苦素类似物的检测,柠檬苦素类似物的含量在品种、部位分布上差异显著。本方法可为柑橘果实中柠檬苦素类似物的鉴别、资源评价及应用开发提供技术支撑。

## 参考文献:

- [1] 张群琳,何雅静,李甜,等.柠檬苦素类化合物抗病原体作用及机制研究进展[J].天然产物研究与开发,2020,32(6):1078-1085.
- [2] ZHAO W, WU M Y, CUI L J, et al. Limonin attenuates the stemness of cervical carcinoma cells by promoting YAP nuclear-cytoplasmic translocation[J]. Food and Chemical Toxicology, 2019, 125:621-628.
- [3] 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.
- [4] 汪开拓,蒋永波,王富敏,等.柠檬籽粒中柠檬苦素离子液体双水相提取体系的优化与抗氧化活性分析[J].核农学报,2020,34(11):2507-2518.
- [5] BREKSA A P, MANNERS G D. Determination of limonin D-ring lactone hydrolase activity by solid phase extraction with indirect fluorescence detection [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2004, 52(12):3772-3775.
- [6] 许海丹,顾霞敏,梁丹霞.柑橘中类柠檬苦素的含量测定方法研究[J].应用化工,2012,41(11):2006-2008.
- [7] MCINTOSH C A. Quantification of limonin and limonoate A-ring monolactone during growth and development of citrus fruit and vegetative tissues by radioimmunoassay [M]//ACS Symposium Series. Washington,DC:American Chemical Society,2000:73-95.
- [8] 孙崇德,陈昆松,陈青俊,等.柑桔果实中天然柠檬苦素和诺米林的提取、鉴别与检测[J].中国食品学报,2004,4(1):6-11.

- [9] 涂勋良,张利,等. HPLC 法测定不同产地和品种柠檬果皮中柠檬苦素和诺米林含量[J]. 广西植物, 2020, 40(5): 744-750.
- [10] 刘亮,戚向阳,董绪燕,等. 高效液相色谱法测定柑橘中的柠檬苦素类似物[J]. 食品与发酵工业, 2007, 33(4): 130-133.
- [11] 郁林娜,程盛勇,付洋,等. 响应面法优化橘核中3种柠檬苦素类成分的超声辅助提取工艺[J]. 食品研究与开发, 2019, 40(5): 133-137.
- [12] 张珊,黄雪松. 高效液相色谱法同时测定柚子中的4种黄酮苷和柠檬苦素[J]. 食品与机械, 2021, 37(3): 58-63.
- [13] 江海,李新生,吴三桥,等. UPLC-MS/MS 分析橘汁发酵液中柠檬苦素的变化趋势[J]. 食品科学, 2013, 34(4): 208-211.
- [14] YU H, WANG C, DENG S T, et al. Optimization of ultrasonic-assisted extraction and UPLC-TOF/MS analysis of limonoids from lemon seed [J]. LWT, 2017, 84: 135-142.
- [15] 钟世欢,陈青俊,王京,等. QuEChERS-HPLC 测定柚类果实中柠檬苦素类化合物[J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(4): 261-265.
- [16] 苏萌,艾连峰. 液相色谱-串联质谱基质效应及其消除方法[J]. 食品安全质量检测学报, 2014(2): 511-515.

## Determination of 3 Limonin Analogues in Different Parts of Citrus Fruits of Different Varieties by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry with Dispersed Solid Phase Extraction

QIN Yunhua<sup>1,2</sup>, ZHONG Shihuan<sup>2,3</sup>, CHEN Qingjun<sup>1,3\*</sup>, WANG Jing<sup>1,3</sup>, WANG Yue<sup>4</sup>,  
YE Jiaming<sup>2,3</sup>, HEN Yunyi<sup>4</sup>, SUN Chongde<sup>4</sup>

(1. Zanyu Technology Group Co., Ltd., Hangzhou 310030, China;

2. Zhejiang Gongzheng Inspection Center Inc., Hangzhou 311305, China;

3. Food Safety Key Laboratory of Zhejiang Province, Hangzhou 310009, China;

4. Fruit Quality Biology Laboratory, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

**Abstract:** The method of liquid chromatography-tandem mass spectrometry with dispersion solid phase extraction was proposed to simultaneously determine limonin, normillin, and phellosterone in 4 parts (oil cell layer, white layer, capsule, and pulp) of citrus fruits of different varieties. The 5.0 g of homogenized sample was taken, and 5 mL of water was added. The mixture was mixed well by vortex, and 20 mL of mixed solution composed of acetone and acetonitrile at volume ratio of 5:5 was added. After mixing, ultrasonic extraction was made for 10 min, and centrifugation was made for 5 min. The 2 g of EMR-Lipid adsorbent was activated by 3 mL of water, which was added into the above supernatant. The mixture was vortexed for 30 s, and 5 g of sodium chloride and magnesium sulfate at mass ratio of 1:4 and 15 mg of graphitized carbon black were added. After quickly shaking well, the mixture was centrifuged for 1 min, and all the supernatant was collected, and blown to near dryness by nitrogen at 40 °C. The residue was dissolved in 10.0 mL of mixed solution consisted of 0.1% (volume fraction, the same below) formic acid solution and acetonitrile at volume ratio of 9:1, and the solution was passed through a 0.22 μm filter membrane. The filtrate was determined according to the optimized instrument working conditions. In chromatographic analysis, CAPCELL PAK ADME HR chromatographic column was used as the stationary phase, and mixed solutions composed of 0.1% formic acid solution and acetonitrile at different volume ratios were used as the mobile phase for gradient elution separation. In MS analysis, the modes of electric spray ion source positive ion (ESI<sup>+</sup>) and multiple reaction monitoring (MRM) were used for detection. It was shown that linear relationships between values of the mass concentration and peak area of 3 limonin analogues were kept in the range of 0.10—10.0 mg · L<sup>-1</sup>, with detection limits (3S/N) of 0.01 mg · kg<sup>-1</sup>. Test for recovery was made according to the standard addition method, giving recoveries in the range of 83.1%—90.5%, and RSDs (*n*=6) of the determined values ranged from 2.6% to 5.6%. The proposed method was used for the analysis of 30 actual samples. The distribution of limonin analogues in different parts of citrus fruits of different varieties showed significant differences. Among pummelo varieties, the total determined values of limonin analogues were higher and mainly distributed in the capsule part, while other varieties were mainly distributed in the white and oil layers.

**Keywords:** disperse solid phase extraction; liquid chromatography-tandem mass spectrometry; limonin analogue; distribution; citrus fruit