树脂脱苦对香橼汁挥发性单萜烯碳氢化合物的影响

牛丽影[1,2]，郁萌[1,3]，李大婧[1,2]，刘春泉[1,2]
（1.江苏省农业科学院农产品加工研究所，江苏南京 210014）（2.国家农业科技华东（江苏）创新中心农产品工程技术研究中心，江苏南京 210014）（3.南京师范大学金陵女子学院，江苏南京 210097）

摘要：香橼为芸香科柑橘属植物(*Citrus wilsonii* Tanaka)，本文对大孔树脂处理后香橼汁挥发性单萜烯碳氢化合物进行了定性定量分析。首先利用固相微萃取-气相色谱-质谱联机（SPME-GC-MS）和保留指数（RI）对香橼汁挥发性的单萜烯碳氢化合物进行定性，共鉴定出 11 种单萜。然后根据保留指数的定性结果，应用顶空-气相色谱-氢火焰离子检测器（HS-GC-FID）对八种单萜烯碳氢化合物 α-蒎烯、β-蒎烯、β-月桂烯、β-水芹烯、α-萜烯、柠檬烯、γ-萜烯、异松油烯，采用部分外标法进行了定量分析。结果显示，脱苦处理后香橼汁顶空中八种物质的含量分别为 90.95、27.5、26.22、8.37、4.17、843.46、107.66、4.24 ng/L，约为对照样品的十分之一，并且脱苦处理未改变各单萜烯碳氢化合物的比例，均表现为柠檬烯的含量最高，其次为 γ-萜烯。

关键词：香橼；单萜烯碳氢化合物；脱苦处理; 气相色谱
文章篇号：1673-9078(2014)1-175-179

Effect of Resin Debittering on the Monoterpene Hydrocarbons Content in the Headspace of Xiangyuan Juice

NIU Li-ying[1,2], YU Meng[1,3], LI Da-jing[1,2], LIU Chun-quan[1,2]
(1.Institute of Farm Product Processing, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)(2.Engineering Research Center for Agricultural Products Processing, National Agricultural Science and Technology Innovation Center in East China, Nanjing 210014, China)(3.Jinling College, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: The monoterpene hydrocarbons in the headspace of Xiangyuan (*Citrus wilsonii* Tanaka) juice after debittering treatment by macroporous resin were identified and qualified. Eleven monoterpene hydrocarbons were identified by solid phase micro extraction gas chromatography-mass spectrometry (SPME-GC-MS) and rentation index (RI) which was calculated from *n*-alkane. Then, eight terpenes (α-Pinene, β-Pinene, β-Myrcene, β-Phellandrene, α-Terpinene, Limonene, γ-Terpinene, α-Terpinolene) were quantified by headspace-gas chromatography-flame ionization detector (HS-GC-FID) using partial external standards method. Results showed that the contents of the eight terpenes after debittering were 90.95, 27.5, 26.22, 8.37, 4.17, 843.46, 107.66 and 4.24 ng/L, respectively, and all values were about one tenth of the control. Moreover, the proportions of the substances were not changed by debittering. the limonene had the highest content, followed by γ-Terpinene.

Key words: Xiangyuan juice; monoterpene hydrocarbons; resin debittering; gas chromatography

香橼（*Citrus wilsonii* Tanaka）为芸香科柑橘属植物，是卫生部批准的药食两用中药。香橼果香气清新独特，但是鲜果极酸，制汁后苦味浓重，这个苦味不仅体现在滋味上，还体现在气味上，这使其在食用上受到了制约。作为传统中药，香橼具有理气宽中，消胀降痰之功效，干制饮片挥发油[1]和鲜果精油[2]的组成已有报道。由于树形优美，果实芳香，近几年来随着栽培技术的发展，香橼作为观赏园林植物而在我国南方地区得到广泛栽培，伴之而来香橼果实产量大增，使香橼鲜果汁的产业化生产成为可能。树脂脱苦法为柑橘类果汁商业生产中最常用的方法[3-4]，关于苦味物质的脱除效果及营养成变化的报道[4]很多，而挥发性风味成分变化的研究则十分匮乏。香橼的香气特征为果汁产品的特色所在，已有数据表明树脂脱苦法可有效脱除香橼汁中的苦味物质，并且改变了顶空中挥发性成分的组成，使得香橼汁再现香橼清新果香[5]，但因未明确风味成分含量变化，而无法建立化学成分与感官属性之间的联系。食品的风味物质数量常常达到几十甚至几百个，在定量分析中，因为风味物质化学

收稿日期：2013-08-29
基金项目：香橼全果精深加工关键技术研究与产业化示范（BE2012403）
作者简介：牛丽影（1977-），女，博士，副研究员，研究方向为果蔬加工
通讯作者：刘春泉（1959-），男，研究员，研究方向为农产品精深加工与产业化

结构、沸点以及热稳定性等差异，往往需要针对不同的物质选择不同的方法。如在 San-Juan 等（2013）[6]对西班牙红葡萄酒香气活性物质的研究中，就对大量物质、微量和痕量物质等分别采取了不同的定量方法。柑橘类果汁顶空中，含量最高的成分为单萜烯碳氢化合物[7]，单萜烯碳氢化合物极性较低，感官阈值高[8]，在高浓度下易表现为苦味，但在适宜浓度下可使果汁香气更为丰满和真实[9]。鉴于实际生产中香橼汁饮料的浓度往往在 10~15%，本文采取香橼汁顶空中含量最高的几种单萜烯类成分进行了定性定量分析，并对稀释及脱苦前后各单萜烯类成分含量和比例的变化进行了测定，结果将为香橼汁香气的变化与挥发性成分变化量效关系的建立提供数据基础。

1 材料与方法

1.1 原料

香橼鲜果采自江苏省靖江市，将鲜果切成 3~5 cm 的碎块，由料理机压榨制得，果汁得率约为 27%。将所得果汁在 6000 r/min 离心 20 min，取上清液并过滤除去肉眼可见悬浮物，备用。

1.2 主要仪器设备

料理机，DK-508 料理机，青岛东亚电子有限公司；离心机，TDL-5A 型，上海安亭科学仪器厂；美国安捷伦公司生产的 7890A/5975C 气相色谱质谱联用仪配备 DB-5 毛细管色谱柱（30×ID 0.25 mm×0.25 μm）；美国 Supelco 公司的固相微萃取装置以及 50/30 μm DVB/CAR/PDMS 萃取头；美国安捷伦公司 7890A 气相色谱仪配备 FID 检测器以及 DB-5 毛细管色谱柱（30×ID 0.32 mm×0.25 μm）和 1 mL 手动加密顶空进样针。

1.3 试验方法

1.3.1 脱苦方法

选用 LSA-600 苯乙烯二乙基苯类大孔树脂（购自西安蓝晓科技新材料股份有限公司）吸附脱去苦味物质。量取活化后的树脂 50 mL 于玻璃层析柱中，用蒸馏水洗涤至中性，将 200 mL 香橼汁以 1.2 mL/min 的流速通过树脂，取后 100 mL 果汁作为脱苦后样品。

1.3.2 GC-MS 对挥发性成分的定性分析

固相微萃取条件：取 5 mL 香橼果汁到 15 mL 顶空瓶，在 40 ℃加热平台上加热平衡 10 min，将萃取针插入顶空瓶中，使之与液面保持 1.5 cm 的距离，萃取 20 min，磁力搅拌速度为 600 r/min，解析 5 min。

GC-MS 测定条件：进样口温度 250 ℃；离子源温度 200 ℃，MS 四极杆温度为 150 ℃，质量扫描范围 33~350 m/z。升温程序：50 ℃保留 2 min，以 4 ℃/min 速度升温至 230 ℃。通过谱图检索和相同色谱条件下系列正构烷烃（C_8~C_{22}，美国 sigma 公司）的保留时间计算 RI 值对成分进行定性分析。

1.3.3 GC-FID 对挥发性成分的定量分析

进样条件：顶空进样分析，取 5 mL 果汁于 15 mL 顶空瓶中，置于室温下平衡 2 h 后，于 40 ℃水浴平衡 30 min，用顶空针抽取 0.2 mL 气体，进样分析。

色谱条件：气相色谱仪进样口温度为 230 ℃，检测器温度为 250 ℃，以高纯氮气（99.999%）为载气，采用不分流模式，设定流速为 1.5 mL/min。升温程序为 50 ℃保留 1 min 后，以 10 ℃/min 升至 140 ℃，250 ℃后运行 1 min。

定量方法 采取外标法进行定量。标准样品 α-蒎烯、β-月桂烯、柠檬烯购自 sigma 公司。分别称取 3.9、4.5、3.8 mg 的上述标准品，用色谱纯甲醇溶解定容至 10 mL 作为母液，根据各成分浓度与响应面积的关系稀释适当倍数直接进样，由 Agilent Open LAB 工作站 C.01.04 进行计算。依据单萜烯结构的相似性，蒎烷型的 α-蒎烯、β-蒎烯以 α-蒎烯的标准曲线计算，苎烷型的 β-水芹烯、α-萜烯、柠檬烯、γ-萜烯、异松油烯由柠檬烯的标准曲线计算，β-月桂烯为无环单萜依其标曲计算。

1.3.4 香橼原汁的稀释

取香橼原汁 5 mL，加入 50 mL 容量瓶，蒸馏水定容后混匀，作为稀释 10 倍的样品。取上述稀释 10 倍的样品 10 mL 于 50 mL 烧杯，再加入 10 mL 蒸馏水，得到稀释 20 倍的样品，混匀后如上稀释 2 倍，得到稀释 40 倍的样品。

2 结果与讨论

2.1 挥发性单萜烯类成分的 GC-MS 及 GC-FID 定性分析

图 1 为 GC-MS 条件下的香橼汁挥发性成分与正构烷烃的总离子流图。可以看到鉴定出的十种单萜烯类物质的保留时间在 4~10 min 内，对应的正构烷烃为 C_9~C_{11}。依据程序升温情况下的保留指数计算公式（1）可计算得到各成分的保留指数，结合 MS 谱图库的检索结果以及与参考文献[10~11]比较保留指数，可鉴定出十种单萜烯类成分。与其他柑橘类果汁相似[8]，香橼汁的挥发性单萜中柠檬烯的含量最高，另外含量较高

的还有γ-萜烯、罗勒烯、α-蒎烯、β-蒎烯、β-月桂烯，水芹烯等十种单萜烯。

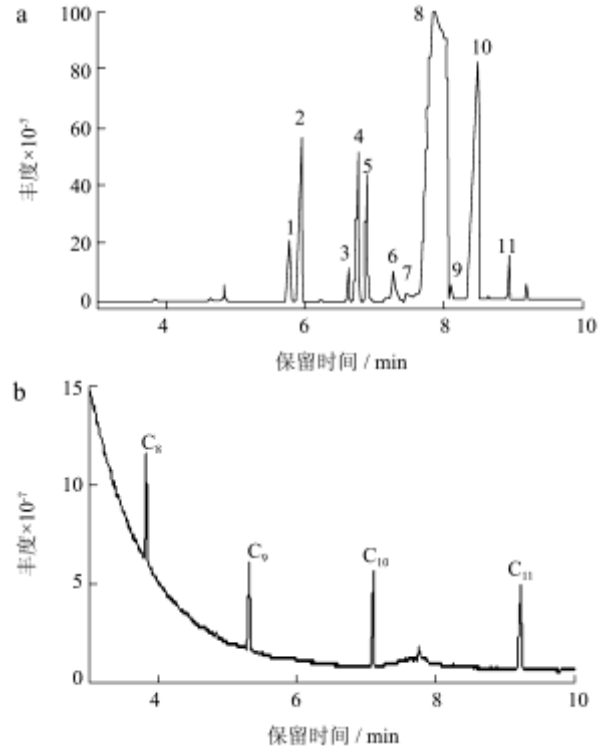


图 1 香橼汁中挥发性单萜烯碳氢化合物及系列正构烷烃的 GC-MS 总离子流图

Fig.1 GC-MS total ion profiles of volatile monoterpene hydrocarbons in Xiangyuan juice and the *n*-alkanes

注：a-香橼挥发性成分的 GC-MS 总离子流图；b-对应保留时间区间的正构烷烃总离子流图

$$I = 100 \times \left[n + \frac{t_{r(unknown)} - t_{r(n)}}{t_{r(N)} - t_{r(n)}} \right] \quad (1)$$

注：I-保留指数；n-较小正构烷烃的碳原子数；N-较大正构烷烃的碳原子数；t_r-保留时间。

表 1 香橼汁挥发性单萜烯碳氢化合物的 GC-MS 定性结果

Table 1 Volatile components of Xiangyuan juice identified by GC-MS

编号	保留时间	名称	MS 匹配度	保留指数	文献保留指数
1	5.790	侧柏烯	953	927	928[11]
2	5.953	α-蒎烯	972	936	936[10]
3	6.649	香桧烯	938	976	976[10]
4	6.786	β-蒎烯	957	984	980[10]
5	6.921	β-月桂烯	956	991	991[10]
6	7.307	β-水芹烯	934	1011	1008[10]
7	7.530	α-萜烯	907	1021	1018[10]
8	8.092	D-柠檬烯	931	1048	1031[10]
9	8.156	罗勒烯	917	1051	1050[11]
10	8.553	γ-萜烯	957	1070	1071[10]
11	9.019	松油烯	886	1092	1091[10]

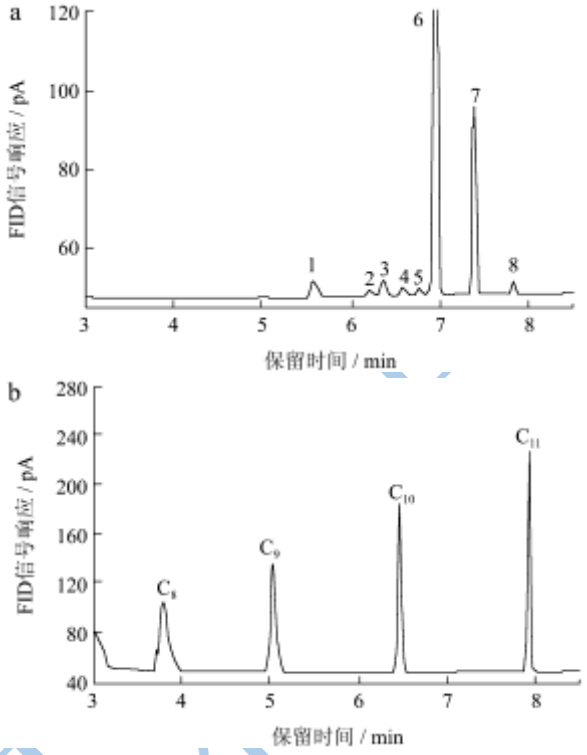


图 2 香橼汁中挥发性单萜烯碳氢化合物及系列正构烷烃的 GC-FID 色谱图

Fig.2 GC-FID profiles of volatile monoterpene hydrocarbons in Xiangyuan juice and the *n*-alkanes

注：a-香橼挥发性成分的 GC-FID 色谱图，b-对应保留时间区间的正构烷烃 GC-FID 色谱图。

图 2 所示为香橼汁顶空进样测定的 GC-FID 图谱。因测定条件的改变，FID 图谱与 GC-MS 图谱存在较大的差别，即便是同一类型的色谱柱，受升温程序及其他因素影响，同一成分的保留时间差别也是很大的。RI 可减少定性中升温条件、压力等具体实验条件的干扰，使数据库中 RI 适用于同类实验的定性[12]，图中标注的八个峰对应的保留指数经计算分别为 938、982、993、1008、1021、1033、1063、1093，与表 1 对应，应为 α-蒎烯、β-蒎烯、β-月桂烯、β-水芹烯、α-萜烯、柠檬烯、γ-萜烯、异松油烯。并且通过与标准样品 α-蒎烯、β-月桂烯、、柠檬烯保留时间相比较，确定定性的准确性。

2.2 脱苦处理对香橼汁挥发性单萜烯类成分的影响

2.2.1 香橼汁稀释倍数与顶空进样 GC-FID 测定峰面积之间的关系

香橼原汁顶空中单萜烯的浓度很高，采用不分流模式测定时存在色谱柱过载的现象，影响定量测定的准确性，并且由于香橼汁高酸等特点，更多是用来制

作 10%左右的果汁饮料。鉴于稀释可能造成单萜烯在气液两相中分配系数的改变[13]，本文对原汁进行了不同倍数的稀释，顶空进样的测定结果见表 1。香橼原汁稀释 10 倍、20 倍、40 倍后，八种单萜烯的峰面积变化在 1.63~2.49 倍之间，经单样本 T 检验，与稀释倍数 2 倍之间不存在显著差异（P>0.05）。

表 2 单萜烯碳氢化合物峰面积随稀释倍数的变化

Table 2 Change of monoterpene hydrocarbons peak areas with dilution

编号	保留时间	名称	稀释倍数			峰面积减小倍数	
			10 倍	20 倍	40 倍	10/20	20/40
1	5.55	α-蒎烯	108.2±14.18	43.38±5.57	25.85±3.56	2.49	1.68
2	6.18	β-蒎烯	41.05±3.06	18.05±5.23	6.73±0.59	2.27	4.83
3	6.34	β-月桂烯	65.93±3.88	31.97±4.09	19.64±0.28	2.06	1.63
4	6.57	β-水芹烯	33.97±1.99	17.28±1.42	7.94±0.66	1.97	2.18
5	6.75	α-萜烯	23.71±1.07	11.43±1.02	4.79±0.38	2.07	2.39
6	6.93	柠檬烯	2163.54±160.58	1188.74±129.34	569.02±33.80	1.82	2.09
7	7.37	γ-萜烯	481.33±48.91	286.51±34.07	128.27±7.85	1.68	2.23
8	7.81	松油烯	26.76±3.58	16.37±1.86	7.28±0.69	1.63	2.25
总和			2944.49±218.05	1613.73±181.83	769.52±41.46	1.82	2.11

2.2.2 单萜烯的定量分析

八种成分的标准曲线见表 3。由于柠檬烯的含量远高于其他成分，除柠檬烯外其他苎烯结构成分的定量依据标准曲线 4 进行定量。

表 3 α-蒎烯、β-月桂烯、柠檬烯的测定峰面积与浓度的关系

Table 3 Relation of peak area and concentration for α- Pinene , β-Myrcene and Limonene determined by GC-FID

编号	名称	标准曲线	相关系数	线性范围/(ng/L)
1	a-蒎烯	y =1.063x+8.31	0.9936	10~120
2	β-月桂烯	y=1.429x+12.69	0.9989	10~120
3	柠檬烯	y=2.170x+203.16	0.9963	100~1000
4	柠檬烯	y=2.188x+11.92	0.9986	10~120

注：y 为峰面积，x 为样品浓度。

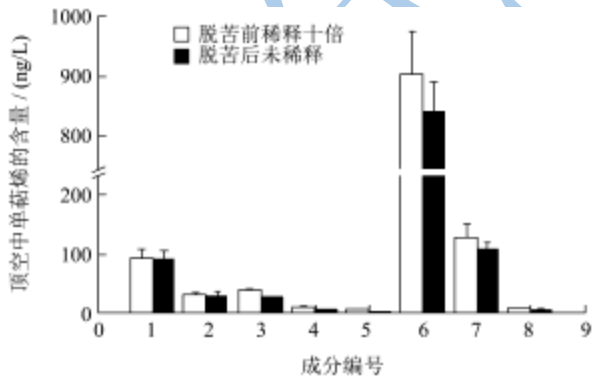


图 3 脱苦处理对香橼汁顶空中挥发性单萜的影响

Fig.3 Effect of debittering on monoterpene hydrocarbons contents in the headspace of Xiangyuan juice

脱苦处理对香橼汁挥发性单萜烯类成分的影响见图 3。脱苦后的样品顶空中 α-蒎烯、β-月桂烯、β-水芹烯、α-萜烯、柠檬烯、γ-萜烯、松油烯的含量分别为 90.95、27.5、26.22、5.47、1.17、843.46、107.66、4.24 ng/L，采用独立样本的 T 检验分析，与稀释十倍的脱苦前样品无显著差异（P>0.05），并且各成分的相对比例未发生显著变化（表 4），以柠檬烯为 100%，其余七种分别按大小顺序排列依次为 γ-萜烯、α-蒎烯、β-月桂烯、β-蒎烯、β-水芹烯、α-萜烯、松油烯。香橼汁挥发性单萜碳氢化合物的比例更接近于柠檬汁[7]而与橙汁[14]差别较大。

表 4 脱苦处理对单萜烯碳氢化合物比例的影响

Table 4 Effect of debittering on monoterpene hydrocarbons ratio

编号	排序编号	名称	各单萜烯碳氢化合物相对于柠檬烯的百分比/%	
			脱苦前	脱苦后
1	3	α-蒎烯	10.40±1.48	10.78 ±1.53
2	5	β-蒎烯	3.41±0.32	3.26 ±1.06
3	4	β-月桂烯	4.13±0.30	3.11 ±0.29
4	6	β-水芹烯	1.12±0.10	0.99 ±0.06
5	8	α-萜烯	0.60±0.09	0.49 ±0.04
6	1	柠檬烯	100.00±8.19	100.00 ±5.61
7	2	γ-萜烯	14.19±2.49	12.76 ±1.35
8	7	松油烯	0.75±0.18	0.50 ±0.08

3 结论

香橼汁的挥发性单萜烯碳氢化合物主要有 α-蒎烯、β-蒎烯、β-月桂烯、β-水芹烯、α-萜烯、柠檬烯、γ-萜烯、异松油烯等，对上述八种成分的定量结果显示，柠檬烯的含量最高，以柠檬烯含量为 100%，γ-萜烯约为 14.19%，α-蒎烯为 10.40%，其他五种成分累计约为 10.00%。香橼原汁用水稀释在 10~40 倍时，

其顶空中单萜烯碳氢化合物的量依稀释倍数而减少，经过聚苯乙烯二乙烯苯树脂处理后，各单萜类碳氢化合物的含量均降低至处理前的十分之一左右。

参考文献

[1] 丁玉萍,韩玲,邱琴,等.超临界 CO_2 流体萃取法提取香橼挥发油化学成分的研究[J].精细化工,2005,22(10):770-772
DING Yu-ping, HAN Ling, QIU Qin, et al. Study of Chemical Constituents of the Essential Oil from Citrus medica L. by Supercritical CO_2 Fluid Extraction [J]. Fine Chemicals, 2005, 22(10): 770-772

[2] 牛丽影,刘夫国,郁萌,等.香橼精油的组成及香气活性成分的 GC-MS-O 分析[J].食品与发酵工业,2013,39(4):186-191
Niu Li-ying, Yu Meng, Liu Fu-guo, et al. Composition and Aroma-active Components Determination of Xiangyuan (Citrus. wilsonii Tanaka) Essential Oil by GC-MS-O [J]. Food and Fermentation Industries, 2013, 39(4): 186-191

[3] 孙志高,黄学根,焦必宁,等.柑桔果实主要苦味成分的分布及橙汁脱苦技术研究[J].食品科学,2006,26(6):146-148
SUN Zhi-gao, HUANG Xue-gen, JIAO Bi-ning, et al. Studied on the Distributing of Main Bitter Components in Citrus Fruit and the Debittering Technology of Orange Juice [J]. Food Science, 2006, 26(6): 146-148

[4] Stinco C M, Fernández-Vázquez R, Hemanz D, et al. Industrial Orange Juice Debittering: Impact On Bioactive Compounds and Nutritional Value [J]. Journal of Food Engineering, 2013, 116 (1): 155-161

[5] 郁萌,刘春泉,牛丽影,等.脱苦处理对香橼汁品质的影响[J].江苏农业科学,2014,2:录用
Yu Meng, Liu Chun-quan, Niu Li-ying, et al. Effect of Resin Debittering on the quality properties of Xiangyuan juice [J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2014, 2: Accecpt

[6] San-Juan F, Ferreira V, Cacho J, et al. Quality and aromatic sensory descriptors (mainly fresh and dry fruit character) of Spanish red wines can be predicted from their aroma-active chemical composition [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2011, 59(14): 7916-7924

[7] Allegrone G, Belliardo F, Cabella P. Comparison of Volatile Concentrations in Hand-Squeezed Juices of Four Different Lemon Varieties [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(5): 1844-1848

[8] Plotto A, Margaría C A, Goodner K L, et al. Odour and flavour Thresholds for Key Aroma Components in an Orange Juice Matrix: Terpenes and Aldehydes [J]. Flavour and Fragrance Journal, 2004, 19: 491-498

[9] Given P, Ringleib C. [DB/OL]. Increasing the concentration of terpene compounds in liquids: United States of America, 8431178 B2 [P] .2012-3-15[2013-7-22]. http://www.patentstorm. us/patents/8431178/claims.html

[10] Florda State, USA: Citrus Research and Education Center, University of Florida. Flavor database [DB/OL]. (2002) [2012-12-7]http://www.crec.ifas.ufl.edu/crec_websites/Rouseff/Website2002/Subpages/database_f_Frameset.htm

[11] Kurose K, Okamura D, Yatagai M. Composition of the essential oils from the leaves of nine Pinus species and the cones of three of Pinus species [J]. Flavour and Fragrance Journal, 2007, 22(1): 10-20

[12] 杨婷旭,李静文,吴时敏,等.气相色谱保留指数及其在香味研究中的应用研究进展[J].食品科学，2009, 30(15): 257-260
YANG Ting-xu, LI Jing-wen, WU Shi-min, et al. Advance in Application of Gas Chromatography Retention Index in Analysis of Aroma Compounds [J]. Food Science, 2009, 30(15):257-260

[13] Kopjar M, Andriot I, Saint Eve A, et al. Retention of aroma compounds: an interlaboratory study on the effect of the composition of food matrices on thermodynamic parameters in comparison with water [J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2010, 90(8): 1285-1292

[14] Moshonas M G, Shaw P E. Quantitative Analysis of Orange Juice Flavor Volatiles by Direct-Injection Gas Chromatography [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1987, 35(1): 161-165