

# 小青柑表面白霜成分鉴定及安全性评价

杨梦雪<sup>1,2</sup>, 詹若挺<sup>1</sup>, 王婉婷<sup>2</sup>, 樊正炎<sup>2</sup>, 朱从一<sup>2</sup>, 陈婉冰<sup>2\*</sup>, 曾继吾<sup>2\*</sup>

(1. 广州中医药大学中药学院, 广东广州 510006) (2. 广东省农业科学院果树研究所, 农业农村部亚热带果树生物学与遗传资源利用重点实验室, 广东省热带亚热带果树研究重点实验室, 广东广州 510640)

**摘要:** 小青柑是广受消费者喜爱的新式茶品, 在储藏过程中表面会形成“白霜”, 为明确“白霜”的主要成分及安全性, 对正常、白霜和发霉的小青柑的显微结构、表面成分、真菌毒素含量和微生物多样性进行分析。扫描电子显微镜 (SEM) 观察到小青柑表面白霜为针状和块状结晶; 通过 UPLC/Q-TOF 分析表明白霜小青柑表皮洗涤液中主要成分为多甲氧基黄酮。定量分析表明白霜小青柑表皮洗涤液中川陈皮素含量是正常和发霉小青柑表皮洗涤液的 9.15 倍和 14.9 倍, 橘皮素含量是正常和发霉小青柑的 26.9 倍和 78.8 倍。小青柑表面的真菌和细菌进行多样性分析表明发霉小青柑中 *Ogataea*、*Penicillium* 和 *Alternaria* 真菌属显著增加, 而白霜小青柑中以上菌属水平与正常组接近。真菌毒素分析中仅发霉小青柑中检出 430  $\mu\text{g}/\text{kg}$  玉米赤霉烯酮。由此可见, 小青柑表面白霜为多甲氧基黄酮析出, 主要成分为川陈皮素和橘皮素, 并且白霜不影响产品安全性, 为小青柑产品标准的制定、产品品质控制提供理论依据。

**关键词:** 小青柑; 白霜; 发霉; 微生物多样性

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2026.1.1538

## Component Identification and Safety Evaluation of the White-Frosted *Citrus reticulata* 'Chachi'

YANG Mengxue<sup>1,2</sup>, ZHAN Ruoting<sup>1</sup>, WANG Wanting<sup>2</sup>, FAN Zhengyan<sup>2</sup>, ZHU Congyi<sup>2</sup>, CHEN Wanbing<sup>2\*</sup>, ZENG Jiwu<sup>2\*</sup>

(1.School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China)

(2.Institute of Fruit Tree Research, Guangdong Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of South Subtropical Fruit Biology and Genetic Resource Utilization, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangdong Provincial Key Laboratory of Tropical and Subtropical Fruit Tree Research, Guangzhou 510640, China)

**Abstract:** Xiaqinggan (XQG), the green small fruit of *Citrus reticulata* 'Chachi', is the raw material used for processing Citrus Pu'er tea, but many XQG have "white frost" on their surface during storage. Currently, the composition, safety, and formation mechanism of the "white frost" remain unknown. Therefore, the microscopic morphology, surface composition, mycotoxin content, and microbial diversity of normal, white-frosted, and moldy XQG were analyzed. Using scanning electron microscope, the "white frost" on the surface of XQG was found to consist of blocky and needle-like crystals. Through UPLC/Q-TOF analysis, the main components of the surface wash solution from white-frosted XQG were polymethoxyflavones. Through quantitative analysis, the nobiletin content in the surface wash solution of white-frosted XQG was found to be 9.15 times and 14.9 times higher than that of normal and moldy XQG, respectively, while the tangeretin content was 26.9 times and 78.8 times higher, respectively. The diversity analysis of fungi and bacterial communities on the surface of the XQG showed that *Ogataea*, *Penicillium*, and *Alternaria* in the moldy XQG increased significantly, while the microbiota levels on the white-frosted XQG surface were found to be similar to those from the normal group. In the mycotoxin analysis, only moldy XQG was found to contain 430  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of zearalenone. This indicates that the "white frost" on the surface of XQG is formed by the precipitation of polymethoxyflavones, with nobiletin and tangeretin as the main components. Additionally, the microbial profile on the surface of white-frosted XQG is similar to that of normal XQG,

收稿日期: 2024-10-16; 修回日期: 2024-11-18; 接受日期: 2024-11-22

基金项目: 国家现代农业 (柑橘) 产业技术体系 (No.CARS-26)、广东省现代农业产业技术体系创新团队建设项目 (柑橘产业技术体系) (2024CXTD10)、广东省乡村振兴战略专项 (2024-NPY-00-029、2023-NBH-00-011)

作者简介: 杨梦雪 (1999-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 药食两用柑橘研究与应用, E-mail: mengxueyang0929@163.com。

通讯作者: 陈婉冰 (1993-), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 药食两用柑橘研究与应用, E-mail: chenwanbing@gdaas.cn; 共同通讯作者: 曾继吾 (1975-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 柑橘栽培与育种, E-mail: jiwuzeng@163.com

with no fungal contamination or no risk of mycotoxin exposure, suggesting that the white-frosted XQG are harmless to humans. The results provided theoretical basis for product classification and product quality control of XQG.

**Key words:** *Citrus reticulata* ‘Chachi’; white frost; mold growth; microbial diversity

茶枝柑 (*Citrus reticulata* ‘Chachi’) 主产于广东新会, 又称新会柑, 为芸香科 (Rutaceae) 柑橘属 (*Citrus*) 植物, 其果皮常用于加工“广陈皮”和“柑普茶”。未成熟的茶枝柑果皮为青绿色, 生产上按柑果的直径大小, 将其分为胎柑、小青柑和青柑<sup>[1]</sup>。小青柑一般是指每年 7 月至 8 月采摘的茶枝柑幼果, 此时果实直径 3~5 cm, 果实油胞微凹且密集, 质硬皮薄, 味辛气香<sup>[2]</sup>, 具有理气健胃、化痰止咳、减肥消脂、疏肝破气、消积化滞、消炎等功效<sup>[3]</sup>。加工过程中, 将小青柑的果肉取出、清洗、晾晒干燥后, 在果内空腔部分填充普洱茶, 经干燥后制成受消费者青睐的柑普茶。

已有资料显示, “析霜”在干制食品和中药材中较常见, 柿饼、芒果干、山楂片以及某些药材长期暴露在空气中时, 也可形成表面“白霜”<sup>[4]</sup>, 其成因主要是其中某些化学成分与空气中的水分、氧气等发生作用, 逐渐析出并在药材表面形成结晶<sup>[5]</sup>。中药表面的“霜”是评价部分药材质量优劣及其道地性的参考指标<sup>[6]</sup>, 析霜现象与药材的种类、炮制方法和存储条件等因素有关, 与中药品种、等级、质量密切相关, 有些药材“析霜”后其品质更优, 如牡丹皮、余甘子等<sup>[7]</sup>。

小青柑在加工和储藏过程中, 发现部分果实的表面形成“白霜”。此前认为“白霜”是“柑油晶”析出的结果, 也有认为是柠檬烯氧化后形成的结晶, 但也有消费者怀疑“白霜”是果实发霉形成霉菌斑, 担心产品的安全性。目前当地认为有白霜小青柑比无白霜小青柑品质更好, 但无相关实验依据。有关小青柑表面的“白霜”具体成分和形成原因尚未明晰, 是否与品质有关也无定论。基于此, 该研究从生产中收集正常、白霜和发霉小青柑样品, 观察白霜的显微结构, 分析鉴定白霜的主要成分及含量, 同时, 对果实表面微生物多样性进行分析, 以期小青柑安全生产和质量控制提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与试剂

正常小青柑和有白霜的小青柑, 购自广东省江门新会区岭南臻宝陈皮食品有限公司, 发霉小青柑取产于广东省江门新会区新鲜的茶枝柑, 均为同一批次。置于潮湿环境中使其自然霉变, 然后晒干制得。

川陈皮素、橘皮素、橙皮苷 (HPLC 纯度大于 98%)、4',5,7,8-四甲氧基黄酮、七甲氧基黄酮、5-去甲氧基川陈皮素, 四川维克奇生物科技有限公司; AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒, AXYGEN 公司; TransStart Fastpfu DNA Polymerase, TransGen。

### 1.2 仪器与设备

1290 Infinity II 超高效液相色谱仪, 美国安捷伦公司; F-040SD 超声波清洗机, 深圳福洋科技集团有限公司; SHZ-DIII 循环水式多用真空泵, 巩义市予华仪器有限责任公司; DM4 B 生物显微镜, 德国徕卡公司; SZ810 体视显微镜, 重庆奥特光学仪器有限责任公司; SQP 电子分析天平, 德国赛多利斯科学仪器有限公司; Q-TOF 6500 液质联用仪, 美国安捷伦公司; ABI 9700 PCR 仪, 美国应用生物系统公司; JSM-IT210 扫描电子显微镜, 日本电子株式会社 (JEOL)。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 小青柑表面白霜的观察

取小青柑表面 2×2 cm 方形切片置于体视镜载物台, 调节适当放大倍数观察小青柑表面形态。用洁净棉签将小青柑表面轻柔地粘在导电胶上, 喷金镀膜 1 min 后, 置于扫描电镜中观察拍照。分别在 200 左右、500 左右、和 2 000 左右倍数下, 选取具有代表性的视野拍照。将川陈皮素、橘皮素对照品粉末均匀粘在导电胶上, 喷金镀膜 1 min 后, 置于扫描电镜中观察拍照。在 2 000 倍数下, 选取具有代表性的视野拍照<sup>[8]</sup>。

#### 1.3.2 小青柑白霜成分的 UPLC/Q-TOF 分析

用一次性拭子蘸取 50% 甲醇擦拭白霜、发霉和正常小青柑表面, 然后用 3 mL 50% 甲醇洗涤将洗涤液用 50% 甲醇定容到 5 mL, 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜滤后待测。Thermo Scientific Accucore C18 色谱柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 2.6  $\mu\text{m}$ ), 流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A) -100% 甲醇乙腈 (B), 梯度洗脱程序如下: 0 min, 90% A; 2 min, 90% A; 10 min, 80% A; 20 min, 20% A; 25 min, 0% A; 25.5 min, 90% A。洗脱流速为 0.4 mL/min, 柱温为 35  $^{\circ}\text{C}$ , 进样量为 2  $\mu\text{L}$ 。质谱采用电喷雾离子源 (ESI), 正离子模式检测, 雾化器压力 35 psi, 毛细管电压 3.5 kV, 干燥气温度 320  $^{\circ}\text{C}$ , 干燥气流速 8 L/min, 鞘气温度 350  $^{\circ}\text{C}$ , 鞘气流速为 11 L/min, 离子传输管温度为 320  $^{\circ}\text{C}$ , 离子扫描范围为 ( $m/z$ ) 100~1700。

### 1.3.3 小青柑表面白霜的 HPLC 定量分析

样品制备同 1.3.2。橙皮苷、川陈皮素、橘皮素对照品用 80% 甲醇溶解成 500~31.25  $\mu\text{g/mL}$  浓度溶液用于标准曲线绘制。采用 Hypersil GOLD C4 柱色谱柱 (2.1 mm $\times$ 100 mm, 1.9  $\mu\text{m}$ ), A 流动相为 0.1% 的甲酸溶液, B 流动相为纯乙腈。流动相洗脱条件为: 0 min, 90% A; 2 min, 90% A; 10 min, 70% A; 15 min, 50% A; 20 min, 10 A; 后平衡 5 min。进样体积为 2  $\mu\text{L}$ , 流速 0.3 mL/min, 柱温 35  $^{\circ}\text{C}$ 。橙皮苷紫外检测波长设置为 280 nm, 川陈皮素和橘皮素设置为 330 nm。

### 1.3.4 小青柑中真菌毒素检测

黄曲霉毒素 B1、黄曲霉毒素 B2、黄曲霉毒素总量参考 GB5009.22-2016 第一法; 展青霉素参考 GB5009.185-2016 第一法; 赭曲霉毒素 A 参考 GB5009.96-2016 第一法; 玉米赤霉烯酮参考 GB5009.209-2016 第一法; 脱氧雪腐镰刀菌烯醇 (呕吐毒素) 参考 GB5009.111-2016 第二法; 伏马毒素 B2 参考 GB5009.240-2023 第二法。

### 1.3.5 小青柑表面微生物多样性分析

使用无菌一次性拭子蘸取生理盐水在小青柑表面擦拭, 然后用 2 mL 生理盐水洗涤拭子, 收集洗涤液采用 CTAB 法提取基因组 DNA。以提取到的基因组 DNA 为模板参照文献, 采用带有 Barcode 序列的引 338F/806R 和 ITS1F/ITS2R 分别对细菌 16S rDNA V3-V4 区和真菌 ITS1 区基因进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系参照文献<sup>[9]</sup>。PCR 产物使用 2% 琼脂糖凝胶进行电泳检测, 根据 PCR 产物浓度进行等量混样, 充分混匀后使用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物, 对目的条带使用胶回收。使用公司的 Tru Seq DNA PCR-Free Sample Preparation Kit 文库试剂盒进行文库构建, 构建好的文库经 Qubit 和 Q-PCR 定量, 文库合格后, 用 HiSeq2500 PE250 进行上机测序。

### 1.3.6 数据分析

所得数据使用 SPSS Statistics 27 软件和 GraphPadPrism 8.0.2 软件进行统计分析和绘图, 数据结果用“平均值 $\pm$ 标准差”(x $\pm$ s) 的形式表示。对数据进行正态性检验后选择单因素方差分析评估各组间差异的显著性。

## 2 结果与讨论

### 2.1 小青柑表面白霜的显微结构

正常、白霜和发霉小青柑的外观如图 A1-A3。由图可知, 正常小青柑表皮呈棕绿色, 均匀分布橙黄色油胞; 白霜小青柑表面白霜均匀分布, 油胞凹陷; 发霉小青柑表皮有点状白色物质。通过体视显微镜进一步观察小青柑表面如图 B1-B3, 正常小青柑表面可见明亮的油胞室; 白霜组小青柑表面均匀覆盖白霜, 油胞室较小且颜色较浅; 而发霉小青柑表面可观察到褶皱状菌落, 油胞室较小。在扫描电镜下观察小青柑表面如图 C1-C3 和 D1-D3, 正常小青柑整体较为平整, 均匀分布有凸起状蜡质; 白霜小青柑表面附有针状和块状的结晶; 而发霉小青柑表面可观察到大量真菌菌丝、分生孢子头和孢子。图 C4、D4 为川陈皮素、橘皮素对照品粉末形态, 川陈皮素晶体成块状, 直径约为 5~15  $\mu\text{m}$ ; 橘皮素晶体成棒状, 直径约为 5  $\mu\text{m}$ 。白霜小青柑的外观以及体视镜和扫描电镜下的形态都明显区别于发霉小青柑, 推测白霜小青柑表面的白霜, 并不是真菌污染的结果。

干制品和药材在干燥和储藏过程, 常常出现“析霜”现象, 又与“发霉”相似。发霉通常表现为干制品和药材表面出现较厚的白色或灰色物质, 颜色可能较之前深, 严重时会有霉味, 药材含水分较高<sup>[10]</sup>。而析霜则表现为药材表面出现较薄的白色结晶, 分布不均匀, 容易脱落, 且药材通常较干燥。“析霜”现象在干制品和中药材中较为常见, 药材表面“白霜”多为有效成分析出。例如, 茅苍术主要是分泌结构“油室”中倍半萜合成途径关键酶的活性与表达受到影响, 导致茅术醇和 $\beta$ -桉叶醇积累析出结晶<sup>[11]</sup>。同时, 析霜会影响药材的品质和药效, 余甘子药材表面

白霜主要是小分子有机酸及多酚类物质,“起霜”后酸味、涩味和苦味有所增强,生津与健胃消食作用增强<sup>[7]</sup>。厚朴经姜炮制析霜后,能有效提高厚朴酚及和厚朴酚的含量<sup>[12]</sup>,并且出霜姜厚朴促进胃肠运动的作用明显优于析霜后及未出霜姜厚朴<sup>[13]</sup>。

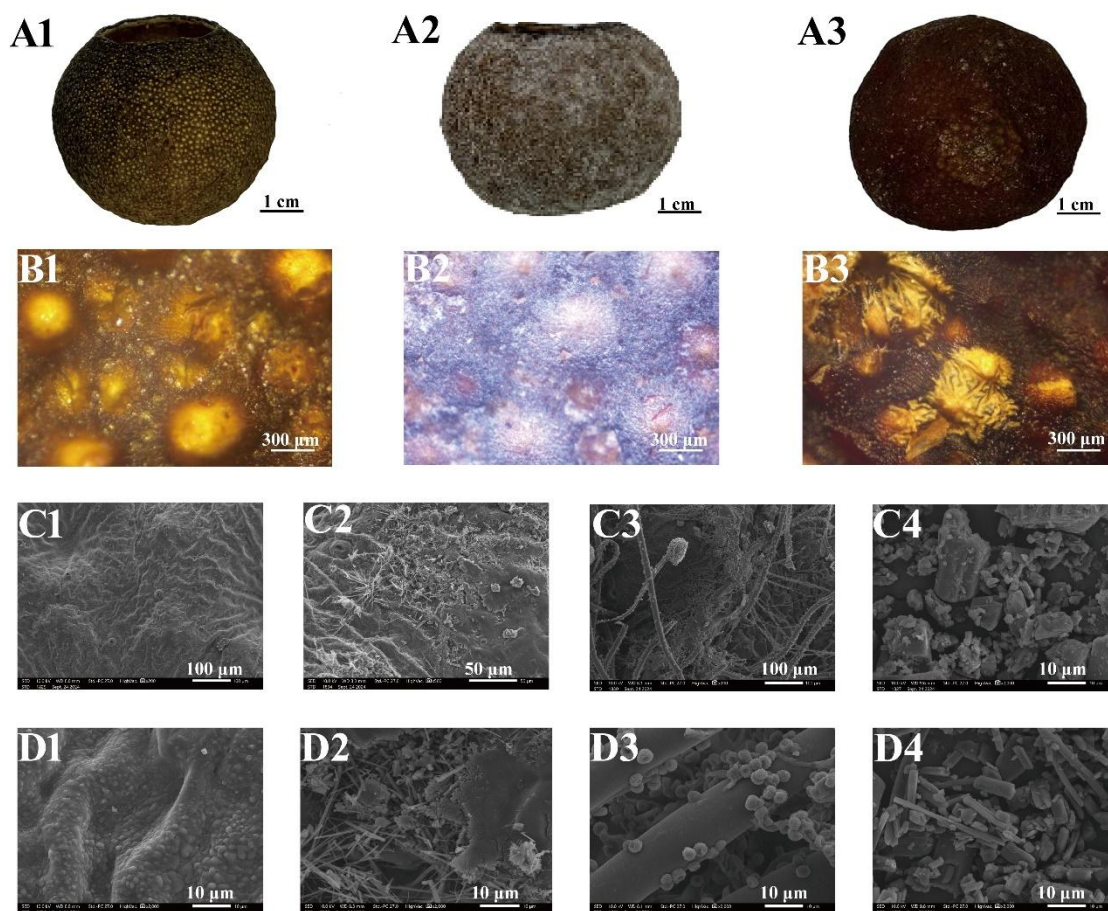


图1 正常、白霜和发霉小青柑的外观以及体视镜、扫描电镜下的形态

Fig.1 the appearance of Normal , White frost , and Moldy XQG in terms of appearance, and their morphology under stereomicroscope and scanning electron microscope

注: 图 A1-A3, B1-B3 分别为正常、白霜和发霉小青柑外观和体视镜下表面形态; 图 C1-C3, D1-D3 分别为正常、白霜和发霉小青柑扫描电镜下表面形态 (200×, 2000×); 图 C4 & D4 分别为川陈皮素和橘皮素对照品粉末形态。

## 2.2 小青柑表面白霜成分鉴定

为明确青柑表面白霜的主要成分,对正常、白霜和发霉小青柑的表皮洗涤液进行 UPLC/Q-TOF 分析,其结果如表 1。经过对质谱裂解规律的分析,结合对照品及文献报道<sup>[14]</sup>,共鉴定出 19 种化合物(如表 1)。

其中多甲氧基黄酮类化合物 15 种,分别为两种二羟基三甲氧基黄酮、二羧基四甲氧基黄酮、二羟基五甲氧基黄酮、两种单羟基五甲氧基黄酮、四甲氧基黄酮、单羟基四甲氧基黄酮、4',5,7,8-四甲氧基黄酮、川陈皮素、七甲氧基黄酮、单羟基六甲氧基黄酮、橘皮素、5-去甲氧基川陈皮素、橙花素。此外,还鉴定出其他类黄酮化合物橙皮苷、地奥司明和橙皮素,以及三萜类化合物柠檬苦素。通过以上化合物质谱峰的强度初步推测其含量,两种二羟基三甲氧基黄酮、二羧基四甲氧基黄酮、单羟基四甲氧基黄酮、七甲氧基黄酮、单羟基六甲氧基黄酮、单羟基五甲氧基黄酮、橘皮素、5-去甲氧基川陈皮素、橙花素在白霜小青柑中的质谱峰强度高于正常和发霉小青柑。由此可见,白霜小青柑表面洗涤液中多甲氧基黄酮的含量高于正常和发霉组,推测小青柑表面的白霜可能为多甲氧基黄酮析出所致。

表 1 正常、白霜和发霉小青柑的 UPLC/Q-TOF 分析

Table 1 UPLC/Q-TOF analysis of Normal , White frost , and Moldy XQG

| 序号 | 保留时间/min | 化合物 <sup>(1)</sup>               | 结构式                                             | [M+H] <sup>+</sup> | 误差/ppm | Normal <sup>(2)</sup> | White frost <sup>(2)</sup> | Moldy <sup>(2)</sup> | 文献   |
|----|----------|----------------------------------|-------------------------------------------------|--------------------|--------|-----------------------|----------------------------|----------------------|------|
| 1  | 14.58    | 橙皮苷 <sup>a</sup>                 | C <sub>28</sub> H <sub>34</sub> O <sub>15</sub> | 611.1981           | -1.73  | +++                   | +++                        | +++                  |      |
| 2  | 15.02    | 地奥司明                             | C <sub>28</sub> H <sub>32</sub> O <sub>15</sub> | 609.1828           | -2.31  | ++                    | +++                        | ++                   | [14] |
| 3  | 16.176   | 柠檬苦素                             | C <sub>26</sub> H <sub>30</sub> O <sub>8</sub>  | 471.2024           | -2.25  | +++                   | +++                        | +++                  | [14] |
| 4  | 16.534   | 橙皮素 <sup>l</sup>                 | C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub>  | 303.087            | -2.27  | +                     | ++                         | +++                  | [14] |
| 5  | 16.326   | 二羟基三甲氧基<br>黄酮 (1)                | C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>  | 345.0983           | -4.13  | +                     | +++                        | +                    | [15] |
| 6  | 16.775   | 二羟基三甲氧基<br>黄酮 (2)                | C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>7</sub>  | 345.0979           | -2.97  | +                     | +++                        | ++                   | [15] |
| 7  | 16.933   | 二羧基四甲氧基<br>黄酮                    | C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>8</sub>  | 375.1085           | -2.82  | +                     | +++                        | +                    | [15] |
| 8  | 16.933   | 二羟基五甲氧基<br>黄酮                    | C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>9</sub>  | 405.1194           | -3.44  | +++                   | +++                        | ++                   | [15] |
| 9  | 17.282   | 单羟基五甲氧基<br>黄酮 (1)                | C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>8</sub>  | 389.1243           | -3.11  | +++                   | +++                        | ++                   | [14] |
| 10 | 18.421   | 四甲氧基黄酮                           | C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>  | 343.1195           | -5.51  | +++                   | ++++                       | +++                  | [15] |
| 11 | 18.554   | 单羟基四甲氧基<br>黄酮                    | C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>7</sub>  | 359.1136           | -2.99  | +++                   | ++++                       | -                    | [14] |
| 12 | 18.729   | 4',5,7,8-四甲氧基<br>黄酮 <sup>a</sup> | C <sub>19</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>  | 343.1191           | -4.34  | +++                   | +++                        | +++                  |      |
| 13 | 18.954   | 川陈皮素 <sup>a</sup>                | C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>8</sub>  | 403.1398           | -2.63  | +++                   | +++                        | ++                   |      |
| 14 | 18.954   | 七甲氧基黄酮 <sup>a</sup>              | C <sub>22</sub> H <sub>24</sub> O <sub>9</sub>  | 433.1493           | 0.02   | +++                   | ++++                       | +++                  |      |
| 15 | 19.145   | 单羟基六甲氧基<br>黄酮                    | C <sub>21</sub> H <sub>22</sub> O <sub>9</sub>  | 419.1337           | -0.1   | +++                   | ++++                       | ++                   | [14] |
| 16 | 19.32    | 单羟基五甲氧基<br>黄酮 (2)                | C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>8</sub>  | 389.1248           | -4.4   | +++                   | ++++                       | +++                  | [14] |
| 17 | 19.461   | 橘皮素 <sup>a</sup>                 | C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>  | 373.1298           | -4.35  | +++                   | ++++                       | +++                  |      |
| 18 | 19.951   | 5-去甲氧基川陈<br>皮素 <sup>a</sup>      | C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>8</sub>  | 389.1245           | -3.62  | +++                   | ++++                       | ++                   |      |
| 19 | 20.509   | 橙花素                              | C <sub>20</sub> H <sub>20</sub> O <sub>7</sub>  | 373.1282           | -0.06  | ++                    | +++                        | -                    | [14] |

注：（1）a-经过对照品确认，其他化合物的鉴定参考现有文献。（2）质谱峰强度，-表示未检出，+表示强度为 10<sup>3</sup>，++表示强度为 10<sup>4</sup>，+++表示强度为 10<sup>5</sup>，++++表示强度为 10<sup>6</sup>。

2.3 小青柑表面白霜成分定量分析

为明确小青柑表面白霜的多甲氧基黄酮含量，对小青柑表面洗涤液中橙皮苷、川陈皮素和橘皮素进行 HPLC 分析。橙皮苷、川陈皮素和橘皮素对照品以及正常、白霜和发霉组的液相色谱图如图 2。白霜小青柑组中川陈皮素含量是正常小青柑的 9.15 倍，是发霉小青柑的 14.9 倍（图 3）；橘皮素是正常小青柑的 26.9 倍，是发霉小青柑的 78.8 倍，差异达到极显著水平（ $P<0.01$ ）。白霜小青柑组中橙皮苷含量也显著高于正常组和白霜组（ $P<0.01$ ），但变化倍数不及川陈皮素和橘皮素。由此推断，小青柑表面白霜主要成分是川陈皮素和橘皮素。

川陈皮素和橘皮素是常见的多甲氧基黄酮，是陈皮和小青柑中的主要功效成分<sup>[16]</sup>。川陈皮素通常存在于芸香科及大戟科植物的茎叶及果皮中，有着毒性低、活性高的特点，具有良好的抗炎、抗肿瘤、保护治疗神经系统等作用<sup>[17]</sup>，如川陈皮素在人乳腺癌细胞中激活 CYP1 发挥抗癌作用<sup>[18]</sup>，抑制某些细胞中 NF-κB DNA 结合活性因子，从而减少活性氧的产生<sup>[19]</sup>。橘皮素是具有重要药理活性和低副作用的天然植物成分，具有抗炎<sup>[20,21]</sup>、抗氧化<sup>[22]</sup>、

抗癌<sup>[23]</sup>、抗代谢失调<sup>[24]</sup>、神经保护<sup>[25]</sup>等活性。小青柑表面白霜形成可能与茶枝柑不同的生长期有关。茶枝柑幼果期加工成的小青柑易形成白霜，而茶枝柑近成熟果加工成的青皮和成熟果加工成的陈皮都不易形成白霜，可能与不同生长期茶枝柑中川陈皮素、橘皮素含量变化有关，研究发现从茶枝柑的幼果期到成熟期，多甲氧基黄酮含量呈下降趋势<sup>[26]</sup>。因此小青柑中的多甲氧基黄酮含量更高，更易析出。也可能与不同加工方式有关。日晒和鼓风干燥的小青柑样品表面微观结构破坏程度不同，导致表面白霜析出程度不同。茶枝柑整果中橙皮苷含量高于川陈皮素和橘皮素<sup>[26]</sup>，但研究发现白霜小青柑中川陈皮素和橘皮素析出较多，而橙皮苷析出较少，可能原因需要进一步研究。小青柑多用于制作柑普茶，川陈皮素和橘皮素的析出可能影响柑普茶中在泡制过程中的成分溶出，导致茶汤的成分、风味和功效变化。

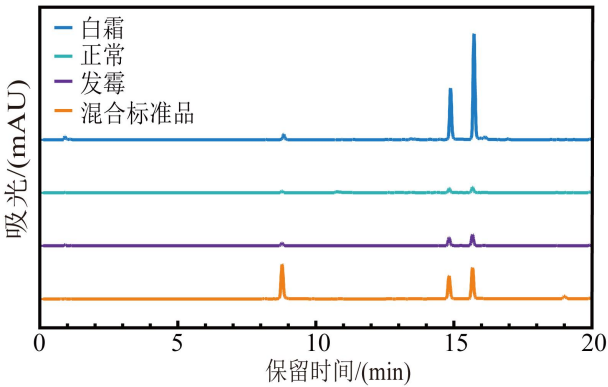


图2 正常、白霜、发霉组和橙皮苷(8.8 min)、川陈皮素(14.8 min)、橘皮素(15.7 min)对照品的在 280 nm 下的液相色谱图  
Fig.2 HPLC chromatogram of Normal , White frost, and Moldy group and hesperidin (8.8 min), nobiletin (14.8 min), and tangeretin (15.7 min) standards at 280 nm

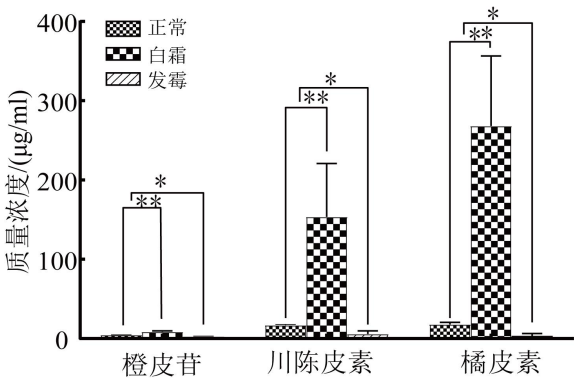


图3 正常、白霜和发霉小青柑表面洗涤液中橙皮苷、川陈皮素、橘皮素含量

Fig.3 The contents of hesperidin, nobiletin, and tangeretin in the surface washing solution of Normal , White frost, and Moldy XQG  
注: \*表示显著性水平为 0.1, \*\*表示显著性水平为 0.05。

2.4 小青柑中真菌毒素检测

陈皮与真菌之间关系复杂，一方面陈皮表面真菌在陈皮陈化过程中起重要作用<sup>[27]</sup>。陈化是陈皮品质提升的关键过程，其类黄酮含量会随陈化年限增加而升高<sup>[28]</sup>。在陈化过程中，微生物通过分解、转化果皮中的化合物，产生新的风味成分，使陈皮具有独特的香味<sup>[29]</sup>。同时，微生物的转化作用也能促进黄酮类化合物等活性物质的积累<sup>[30]</sup>，增强陈皮的理气健胃、化痰止咳、减肥消脂等功效。另一方面，真菌在陈皮表面的过度繁殖又会导致陈皮霉变，产生真菌毒素，影响安全性<sup>[31]</sup>。

为明确白霜小青柑的真菌污染和食用安全性情况。本试验对正常、白霜和发霉小青柑中常见真菌毒素进行检测如表 2，其中黄曲霉毒素 B1、黄曲霉毒素 B2、黄曲霉毒素总量、展青霉素、赭曲霉毒素 A、脱氧雪腐镰刀菌烯醇（呕吐毒素）、伏马毒素 B2 在所有组中均未检出，而发霉小青柑中检出玉米赤霉烯酮，含量为 430 μg/kg。由此说明白霜小青柑未受上述真菌毒素污染，发霉小青柑被玉米赤霉烯酮污染，可能存在安全性风险。

玉米赤霉烯酮是一类主要由镰刀菌产生的非甾体雌激素真菌毒素，具有肝毒性、血液毒性、免疫毒性和遗传毒性<sup>[32]</sup>。玉米赤霉烯酮主要暴露于玉米、大麦、小麦、高粱和其他谷物饲料及其副产品中<sup>[33]</sup>，也可在果实种子类和根茎类中药材中生长残留，如意苡仁、何首乌、人参、佛手和陈皮等<sup>[34]</sup>，是污染上述产品的有害物质之一。

表 2 小青柑中真菌毒素含量

Table 2 The contents of fungal toxin in XQG (μg/kg)

| 真菌毒素            | 定量限 | 正常 Normal | 白霜 White frost | 发霉 Moldy |
|-----------------|-----|-----------|----------------|----------|
| 黄曲霉毒素 B1        | 0.1 | ND        | ND             | ND       |
| 黄曲霉毒素 B2        | 0.1 | ND        | ND             | ND       |
| 黄曲霉毒素总量         | 0.1 | ND        | ND             | ND       |
| 展青霉素            | 10  | ND        | ND             | ND       |
| 赈曲霉毒素 A         | 1   | ND        | ND             | ND       |
| 玉米赤霉烯酮          | 17  | ND        | ND             | 430      |
| 脱氧雪腐镰刀菌烯醇（呕吐毒素） | 200 | ND        | ND             | ND       |
| 伏马毒素 B2         | 100 | ND        | ND             | ND       |

2.5 微生物多样性鉴定分析

对不同批次的小青柑样品进行微生物群落结构和多样性测序分析，质控后细菌共得到 1 303 842 条有效数据，对有效序列进行聚类分析<sup>[35]</sup>，以 97%的一致性将序列聚类为 OTUs，共得到可分类 OTUs 数目约为 90 033 个，范围为 1 769~3 616。真菌共得到 10 080 条有效数据，以 97%的一致性将序列聚类为 OTUs，累计得到可分类 OTUs 数目约为 7 886 个，范围在 126~435。在 OUT 水平上，对各组小青柑的真菌和细菌组成进行主坐标分析（Principal co-ordinates analysis, PcoA），得分图（图 4）显示正常组、白霜组和发霉组小青柑表面真菌和细菌组成都具有显著差异。

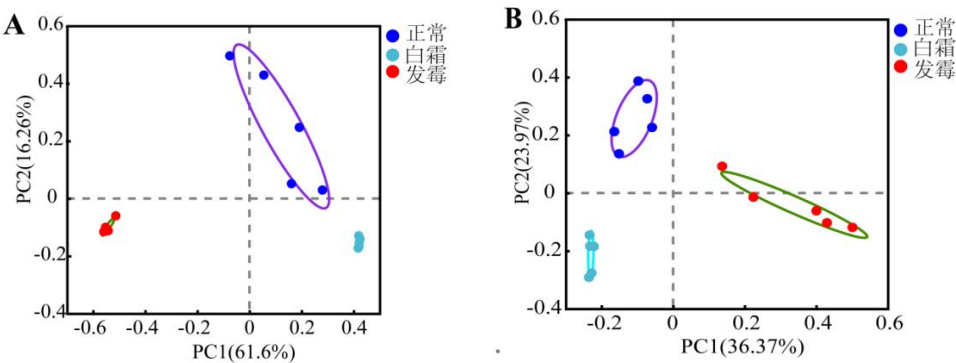


图 4 OUT 水平上小青柑表面真菌 (A) 及细菌 (B) PCoA 分析

Fig.4 PCoA analysis of fungi (A) and bacteria (B) on the surface of XQG at OUT level

白霜、正常和发霉小青柑门水平细菌和真菌群落组成如图 5 所示。子囊菌门（Ascomycota）为正常、白霜、发霉小青柑中的主要优势真菌菌门，其次为担子菌门（Basidiomycota），并且担子菌门在正常组和发霉组中水平高于白霜组。正常和白霜小青柑中还含有一类未分类的真菌菌门，其在白霜组中的占比仅次于子囊菌门。变形菌门（Proteobacteria）、厚壁菌门（Firmicutes）、放线菌门（Actinobacteriota）为白霜、正常和发霉小青柑优势细菌菌门，其中变形菌门（Proteobacteria）在三组中的相对丰度都高于 60%。厚壁菌门（Firmicutes）在白霜小青柑中相对丰度高于正常组和发霉组。放线菌门（Actinobacteria）在发霉小青柑中的相对丰度高于白霜组和正常组。

从属水平分析各组小青柑的真菌和细菌组成差异，将其中丰度排名前 50 的物种相对丰度以热图展示（图 6）。正常、白霜和发霉小青柑的真菌菌落在属水平上表现出显著差异，正常组和白霜组的真菌组成和相对丰度较为接近，而发霉组中布勒掷孢酵母属（Bullera）、白冬孢酵母（Leucosporidium）、座壳孢菌（Aschersonia）、黑酵母菌（Aureobasidium）、长谷川赤担孢酵母（Erythrobasidium）、奥默柯达菌（Kodamaea）、黄蓝状菌（Talaromyces）、罗伦隐球菌（Papiliotrema）、地丝菌（Geotrichum）、葡萄孢菌（Botrytis）、德巴利酵母属（Debaryomyces）、Fusicolla、假丝酵母菌（Candida）、樱桃花色线黑粉菌（Filobasidium）、芽枝霉菌（Cladosporium）、桃壳梭孢菌

（*Aternaria*）、亨利绪方酵母（*Ogataea*）、青霉菌（*Penicillium*）等真菌菌属的丰度都高于正常组和发霉组。正常、白霜和发霉小青柑的细菌菌落在属水平上差异不明显，白霜组和发霉组中类芽胞杆菌（*Paenibacillus*）、*norank\_f\_\_Caulobacteraceae*、*norank\_f\_\_Fimbriimonadaceae*、罗尔斯顿菌属（*Ralstonia*）、*Mitsuaria* 的丰度略高于正常组。

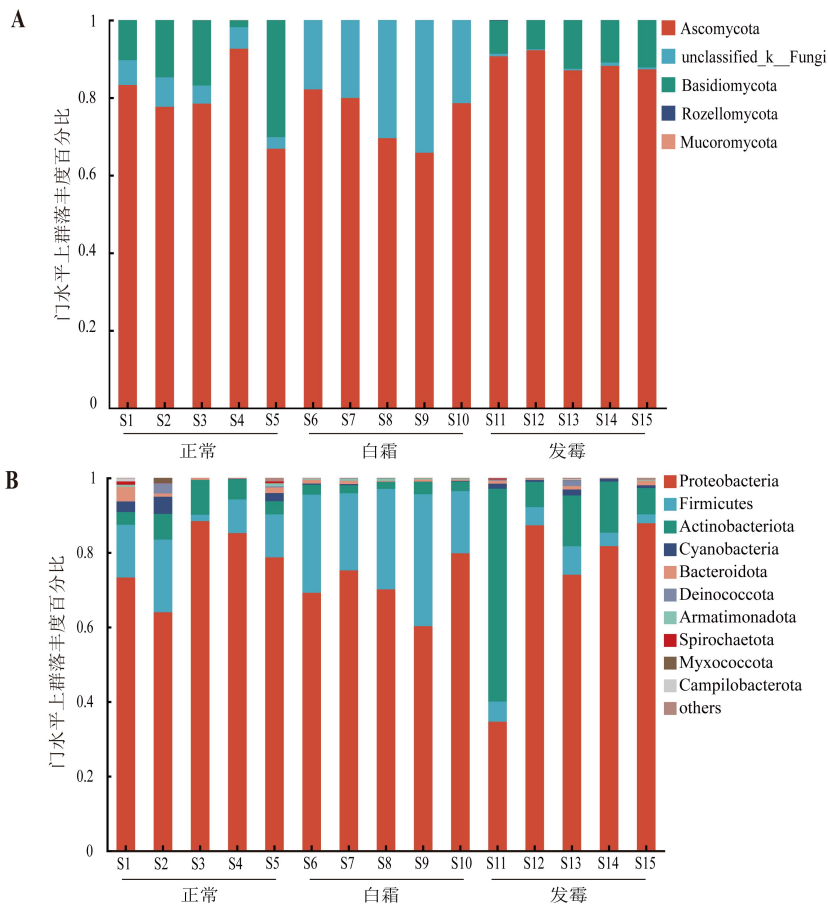


图 5 门水平上小青柑表面真菌（A）及细菌（B）群落组成

Fig.5 Composition of fungal (A) and bacterial (B) communities on the surface of XQG at phyla level

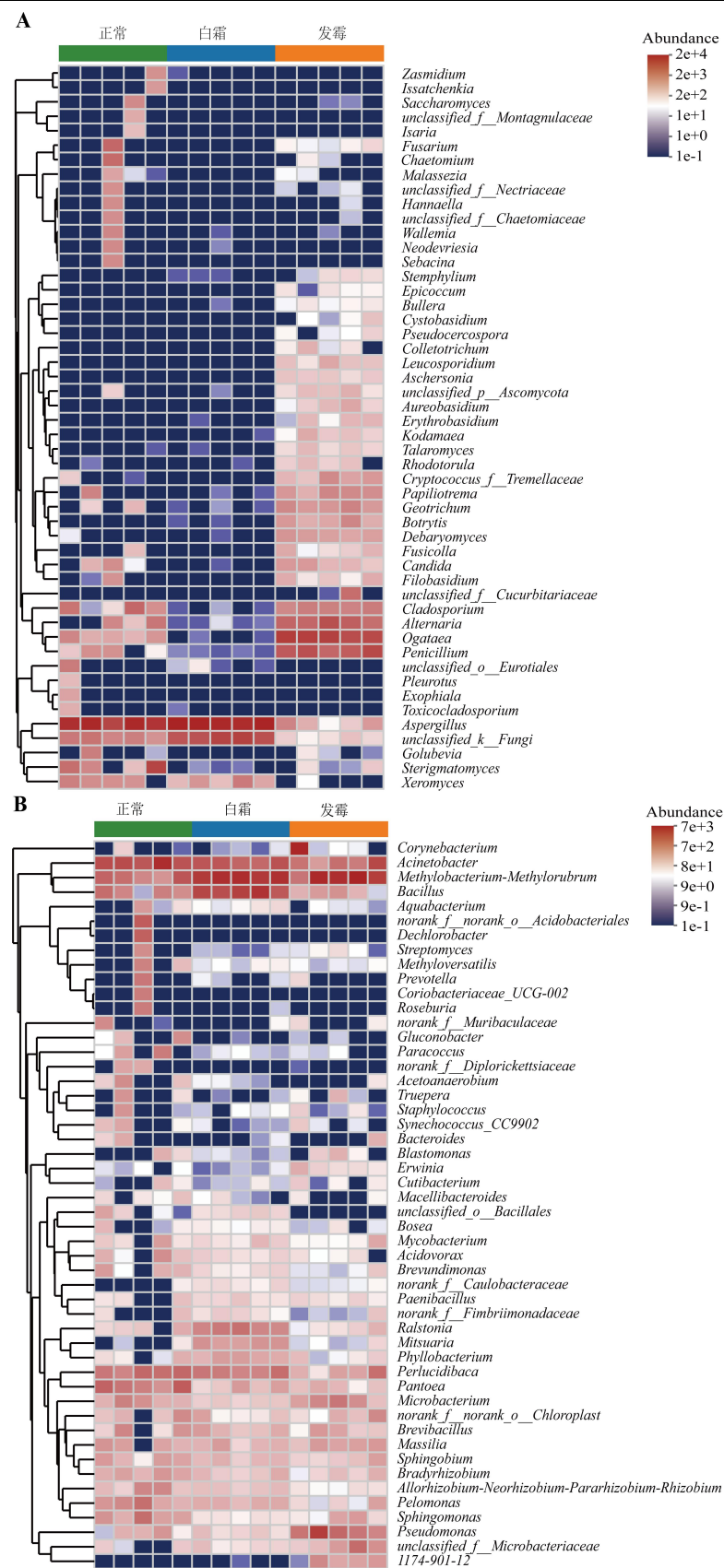


图 6 属水平上小青柑表面真菌(A)及细菌(B)群落结构

Fig.6 Community structure of fungi (A) and bacteria (B) on the surface of XQG at genus levels

由于正常组、白霜组和发霉组小青柑的真菌组成在属水平上具有显著差异，进一步筛选出差异的真菌菌属。由图 7 可知，白霜组和正常组中曲霉（*Aspergillus*）占真菌菌群比例分别为 72.43%和 53.32%，远高于发霉组

（ $P<0.001$ ）；发霉组的中亨利绪方酵母（*Ogataea*）、青霉菌（*Penicillium*）和链格孢霉（*Alternaria*）占真菌菌群比例分别为 31.55%、17.84%和 13.43%，远高于正常组和白霜组（ $P<0.001$ ）。

该实验对发霉和白霜小青柑表面的真菌和细菌菌落进行分析，表明发霉小青柑中亨利绪方酵母、青霉菌和链格孢霉真菌属显著增加，而白霜和正常小青柑中优势真菌为曲霉属。目前，有关茶枝柑果皮制品表面微生物的研究多集中在陈皮上，有关小青柑和柑普茶的研究较少，研究报道陈皮表面的优势细菌菌属包括 *Bacillus*、*Pseudomonas*、*Sphingomonas*、*Methylobacterium*、*Acinetobacter* 等<sup>[36]</sup>，优势真菌菌属包括 *Xeromyces*、*Alternaria*、*Aspergillus*、*Cladosporium* 等<sup>[37]</sup>，该研究结果显示，上述陈皮表面主要微生物群也存在于小青柑表面，说明小青柑表皮的微生物与陈皮表面的微生物相近。另外，也有研究从陈皮表面分离真菌<sup>[38]</sup>，得到包含黑曲霉（*Aspergillus niger*）、*Aspergillus jensenii*、青霉菌（*Penicillium*）、链格孢（*Alternaria alternata*）、草酸青霉（*Penicillium oxalicum*）、毛霉属（*Mucor*）、稻根曲霉（*Rhizopus oryzae*）等<sup>[39,40]</sup>。

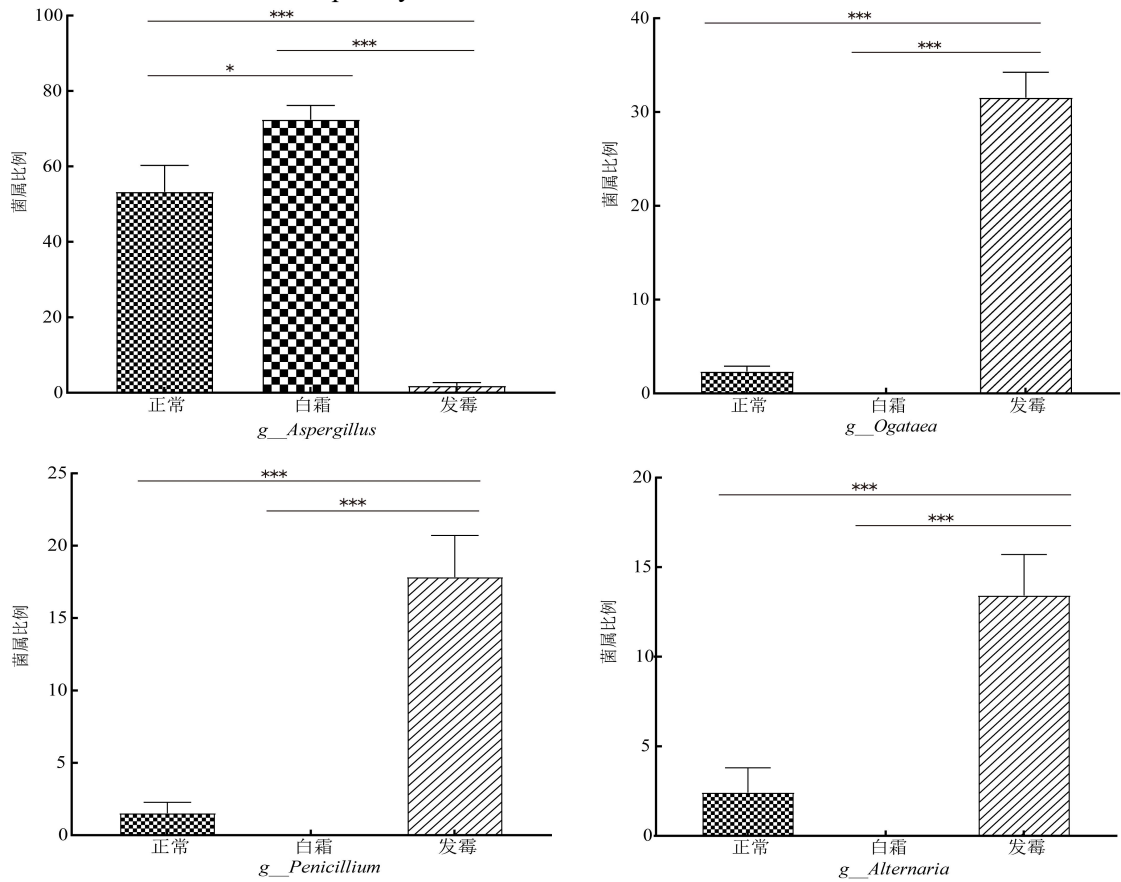


图 7 属水平上小青柑表面差异真菌

Fig.7 Different fungi on the surface of XQG at genus levels

注：\*表示显著性水平为 0.1，\*\*\*表示显著性水平位 0.01。

3 结论

该文通过对白霜小青柑表面成分和微生物的研究，确定小青柑表面白霜为多甲氧基黄酮成分分析出，主要成分为川陈皮素和橘皮素，并且白霜小青柑表面微生物与正常小青柑接近，未见有害真菌污染。传统认为小青柑表面白霜为“柑油晶”，白霜小青柑的品质更佳，但“柑油晶”的具体成分并不清楚，该研究的结果为小青柑产品标准的制定、产品品质控制提供理论依据，以期促进小青柑产业的健康稳定发展。

参考文献

[1] 江津津,贾强,谢佩桦,等.新会青柑茶与橘皮普洱茶的风味差异分析[J].现代食品科技,2021,37(8):266-274.

- [2] 刘桥辉,闫国琦,屈佳蕾,等.茶枝柑(广陈皮)初加工机械装备技术现状与对策[J].中国农机化学报,2021,42(7):91-98.
- [3] 徐健,曾万祥,王晓东,等.陈皮的化学成分与药理学作用研究进展[J].中国野生植物资源,2022,41(10):72-76+106.
- [4] 宋霞,刘亚蓉,张国英,等.山萸肉表面泛霜和发霉的鉴别[J].中成药,2020,42(12):3221-3227.
- [5] 王佩铃,叶荣彬,范晓良,等.常见表面析霜中药饮片及其鉴别要点[J].中国乡村医药,2022,29(7):23-24.
- [6] 于大庆,查良平,彭华胜.“析霜”类药材的种类及其历史源流[J].中国中药杂志,2018,43(12):2624-2627.
- [7] 谭庆尧,黄浩洲,林俊芝,等.余甘子药材表面白霜的化学成分及“析霜”科学内涵初探[J].中草药,2022,53(11):3487-3495.
- [8] 齐秀娟,王然,兰彦平,等.3个猕猴桃栽培种花粉形态扫描电镜观察[J].果树学报,2017,34(11):1365-1373.
- [9] 胡媛,吴蓓,易达,等.基于广泛靶向代谢组学技术与高通量测序技术探究广陈皮陈化机制[J].天然产物研究与开发,2022,34(4):553-562.
- [10] 零伟德.浅谈中药饮片霉变的原因及对策[J].中国民族民间医药,2013,22(9):68.
- [11] 于大庆.不同化学型茅苍术“起霜”成分及挥发油比较研究[D].合肥:安徽中医药大学,2020.
- [12] 钟凌云,霍慧君,龚千锋.RP-HPLC法测定不同姜制法对厚朴成分的影响[C]//中华中医药学会中药炮制分会.贵阳:中华中医药学会中药炮制分会2011年学术年会论文集.江西中医学院药学院,2011:6.
- [13] 张淑洁,钟凌云.厚朴不同炮制品对胃肠运动功能的影响[J].中药材,2014,37(10):1762-1765.
- [14] LUO Y, ZENG W, HUANG K E, et al. Discrimination of *Citrus reticulata* Blanco and *Citrus reticulata* ‘Chachi’ as well as the *Citrus reticulata* ‘Chachi’ within different storage years using ultra high performance liquid chromatography quadrupole/time-of-flight mass spectrometry based metabolomics approach [J]. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2019, 171: 218-231.
- [15] CHEN J B, WANG Y, ZHU T L, et al. Beneficial regulatory effects of polymethoxyflavone-rich fraction from Ougan (*Citrus reticulata* cv. Suavissima) fruit on gut microbiota and identification of its intestinal metabolites in mice [J]. Antioxidants (Basel). 2020, 9(9): 831.
- [16] 许引,吕小健,李明,等.14种柑橘皮中多甲氧基黄酮成分分析[J].食品科学,2019,40(8):136-140.
- [17] 辛力,龚文慧,郭静英,等.天然产物川陈皮素的成分差异及抗肿瘤作用机制研究进展[J].中华中医药学刊,2025,43(1):191-195.
- [18] SOMCHAIYA S, RANDOLPH R A, KETAN R, et al. Nobiletin bioactivation in MDA-MB-468 breast cancer cells by cytochrome P450 CYP1 enzymes [J]. Food and Chemical Toxicology, 2018, 113: 228-235.
- [19] 叶喜德,黄兆胜,骆利平,等.川陈皮素研究概况[J].江西中医学院学报,2013,25(3):42-45.
- [20] XU S, KONG Y G, JIAO W E, et al. Tangeretin promotes regulatory T cell differentiation by inhibiting Notch1/Jagged1 signaling in allergic rhinitis [J]. International Immunopharmacology. 2019, 72: 402-412.
- [21] LI X, XIE P G, HOU Y, et al. Tangeretin inhibits oxidative stress and inflammation via upregulating Nrf-2 signaling pathway in collagen-induced arthritic rats [J]. Pharmacology. 2019, 104(3-4): 187-195.
- [22] YU Y L, EUN J L, JIN S P, et al. Anti-Inflammatory and antioxidant mechanism of Tangeretin in activated microglia [J]. Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology, 2016, 11(2): 294-305.
- [23] LAN W J, PATRICIA S C, XIA Y, et al. Targeting NUPR1 with the small compound ZZW-115 is an efficient strategy to treat hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Letters, 2020, 486(prepublish): 8-17.
- [24] JULIA M A, ERIN E M, MURRAY W H. Citrus flavonoids and lipid metabolism [J]. Current opinion in lipidology, 2013, 24(1): 34-40.
- [25] GUO X Q, CAO Y L, HAO F, et al. Tangeretin alters neuronal apoptosis and ameliorates the severity of seizures in experimental epilepsy-induced rats by modulating apoptotic protein expressions, regulating matrix metalloproteinases, and activating the PI3K/Akt cell survival pathway [J]. Advances in Medical Sciences. 2017, 62(2): 246-253.
- [26] 李昕琪.茶枝柑果实生长发育过程中主要次生代谢物变化规律分析[D].武汉:华中农业大学,2023.
- [27] CHEN L H, XIAO G S, XU Y J, et al. Effects of aging on the bioactive flavonoids and fungal diversity of Pericarpium Citri Reticulatae (*Citrus reticulata* ‘Chachi’) [J]. LWT-Food Science and Technology, 2024, 200: 116135.
- [28] 潘志维,颜庆佳.不同陈化年限广陈皮中类黄酮含量测定及其抗氧化能力研究[J].中国处方药,2022,20(10):24-26.
- [29] LIU Y, WEN H, KONG J T, et al. Flavor characterization of Citri Reticulatae Pericarpium (*Citrus reticulata* 'Chachiensis') with different aging years via sensory and metabolomic approaches [J]. Food chemistry, 2024, 443: 138616.
- [30] 杨放晴.广陈皮陈化微生物演变及黄酮类成分变化研究[D].成都:成都中医药大学,2021.
- [31] 王福.陈皮真菌与药效物质基础变化的相关性研究[D].成都:成都中医药大学,2017.
- [32] 冯雪莲,周英焕,李留安,等.玉米赤霉烯酮的危害及物理吸附剂脱毒效果研究进展[J].现代农业科技,2021,21:133-135.

- [33] 毛丹,许勇,郑荣,等.中药中玉米赤霉烯酮的残留测定[J].齐鲁药事,2012,31(7):392-394.
- [34] 刘云翔,高鹏超,詹志来,等.基于酶联免疫分析的中药薏苡仁玉米赤霉烯酮残留快速检测技术研究[J].中国中药杂志,2023,48(11):2919-2924.
- [35] 杨放晴,何丽英,杨丹,等.不同陈化时间广陈皮表面细菌和真菌多样性变化分析[J].食品与发酵工业,2021,47(15):267-275.
- [36] 杨放晴,何丽英,杨丹,等.基于高通量测序技术分析不同地区自然陈化广陈皮表面微生物群落多样性[J].中国酿造,2021,40(9):31-36.
- [37] ZHOU L, WU B, LIU X M, et al. Fungal community analysis of two edible herbs: Citri Reticulatae Pericarpium and polygalae radix [J]. Journal of Agriculture and Food Research, 2024, 16: 101055.
- [38] 傅曼琴,陈玉婷,吴继军,等.陈皮表面微生物及其转化黄酮类物质的研究进展[J].现代食品科技,2022,38(4):282-291.
- [39] 刘瑞婷.广陈皮陈化过程真菌变化和黄酮类物质变化及相关性研究[D].武汉:华中农业大学,2023.
- [40] 李红霞.陈皮等六种中药饮片表面真菌鉴定及对黄曲霉菌生长作用的研究[D].北京:北京中医药大学,2018.