

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2021.03.009

海苔和茶叶中铝的亚细胞分布及风险评估

Subcellular distribution and risk assessment of aluminum in seaweed and tea

宋政¹ 马丽霞² 彭青枝¹ 黄徽¹ 程银琪¹SONG Zheng¹ MA Li-xia² PENG Qing-zhi¹ HUANG Hui¹ CHENG Yin-qi¹

(1. 湖北省食品质量监督检验研究院, 湖北 武汉 430075;

2. 国家知识产权局专利局专利审查协作湖北中心, 湖北 武汉 430075)

(1. Hubei Provincial Institute for Food Supervision and Test, Wuhan, Hubei 430075, China;

2. Patent Examination Cooperation Hubei Center of the Patent Office, CNIPA, Wuhan, Hubei 430075, China)

摘要:以海苔和茶叶为研究对象,采用差速离心法结合微波消解—电感耦合等离子体质谱法分析茶叶和海苔中铝的亚细胞分布,结果表明,茶叶中铝在细胞壁、细胞器、细胞质中占比分别为 78.4%,11.2%,9.5%,海苔中铝在细胞壁、细胞器、细胞质中占比分别为 91.60%,6.95%,1.33%。结合透射电子显微镜—能谱法对茶叶和海苔中铝的分布在单细胞范围内进行面扫分析,直观地揭示了茶叶和海苔中铝主要分布在细胞壁中。人工模拟胃液提取茶叶和海苔及其亚细胞组分中的铝,直接提取茶叶中铝的提取率为 9.0% 左右,其亚细胞组分提取率均不足 3.0%;海苔及其亚细胞组分中铝的提取率均低于 1.5%,提示茶叶和海苔中铝摄入的食品安全风险较低。

关键词:铝;茶叶;海苔;差速离心法;透射电子显微镜—能谱法

Abstract: The subcellular distribution of aluminium in seaweed and tea leaves was analyzed by differential centrifugation with microwave digestion and inductively coupled plasma mass spectrometer. The results showed that the proportion of aluminium in cell wall, organelle and cytoplasm of tea leaves were 78.4%, 11.2% and 9.5%, respectively; the proportion of aluminium in cell wall, organelle and cytoplasm of seaweed were 91.60%, 6.95% and 1.33%, respectively. Using transmission electron microscope with energy dispersive spectroscopy, surface scanning analysis was carried out on the distribution of aluminum in the single cell of tea leaves and seaweed, intuitively revealing that aluminum was mainly distributed in the cell wall of tea leaves and seaweed. The extraction of aluminium from tea leaves, seaweed and its

subcellular components by simulated gastric juice was studied. The extraction rate of aluminium in tea leaves was about 9.0%, but the extraction rate of its subcellular components was less than 3.0%. The extraction rate of aluminum in seaweed and its subcellular components was less than 1.5%, suggesting that the food safety risk of ingestion of aluminum in tea and seaweed was low.

Keywords: aluminium; tea; seaweed; differential centrifugation; transmission electron microscope-energy dispersive spectrometer

茶叶和海苔是典型的铝超富集植物。渠心静等^[1]调查了 22 种山茶科植物叶片中的铝含量,其中茶树新叶中的总铝含量为 3 910 mg/kg,老叶中总铝含量高达 11 124 mg/kg;尚德荣等^[2]对中国主要海藻养殖区的紫菜和海带中铝含量进行检测,坛紫菜中总铝含量为 53.2~2 714.6 mg/kg;笔者实验室也曾发现某海苔(条斑紫菜)样品中的总铝含量高达 5 000 mg/kg。据统计^[3],中国自 2007—2019 年的茶叶年消费量由 83.6 万 t 增长至 200.0 万 t,茶叶消费群体达到 4.9 亿。泡水饮用是茶叶的食用方式之一,这种方式被证明是安全的^[4-6],茶水中仅含有少量的铝,这部分铝几乎不被吸收,而茶叶中富集的高含量铝残留在茶叶片中未被摄入人体。茶叶和海苔的另一种食用方式是直接摄入,茶叶与海苔作为常用的食品原材料通常被用来制作含茶或含海苔食品(如抹茶糕点、海苔麻花、即食海苔等),在食用此类食品时,茶叶和海苔中的铝均被全部直接摄入体内,这些由茶叶和海苔引入的铝的毒性尚不明确,相关研究也鲜有报道。

铝的毒性与形态相关^[7],铝离子毒性最大^[8-9],而有机铝、络合铝无毒。铝的形态取决于所处体系的 pH 值、配体种类及浓度和总溶解有机碳等因素,在细胞层级,不同的细胞部位化学环境存在差异,铝分布在不同细胞部位时,其存在形态也不同。因此研究茶叶和海苔中铝的亚细胞分布是解析其毒性的关键。Yoichi 等^[10]用微束质

基金项目:湖北省食品药品监督管理局科研项目(编号:201802003)

作者简介:宋政(1993—),男,湖北省食品质量监督检验研究院工程师,硕士。E-mail:814469053@qq.com

收稿日期:2020-11-08

子激发 X 射线荧光(micro-beam PIXE)分析成熟茶叶表皮细胞中铝的分布,Roser 等^[11]用低能 X 射线荧光光谱法(LEXRF)定位茶叶表皮细胞中的铝,而 Carr 等^[12]采用的是能量色散 X 射线显微分析(EDXMA)法。这些光谱类方法的优点在于直观地揭示出茶叶细胞中铝的亚细胞分布,但分辨率有限。研究拟采用分辨率更高的透射电子显微镜—能谱法(TEM-EDS)分析茶叶和海苔中铝的亚细胞分布,结合差速离心法和微波消解—电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)解析铝在茶叶和海苔亚细胞尺度上的分布特征,探讨茶叶和海苔中的铝对人体的毒性作用,以期对茶叶和海苔中铝的深入毒理学研究积累数据。

1 材料与方 法

1.1 仪器与试剂

1.1.1 主要仪器设备

场发射透射电子显微镜:Talos F200X 型,赛默飞世尔科技有限公司;

超薄切片机:UC7 型,徕卡显微系统贸易有限公司;

电感耦合等离子体质谱仪:NexION 350X 型,珀金埃尔默有限公司;

高速离心机:5810R 型,艾本德有限公司;

涡旋混匀仪:Trayster digital 型,艾卡仪器设备有限公司;

紫外—可见分光光度计:UH5300 型,日立有限公司;

微波消解仪:Multiwave PRO 型,安东帕商贸有限公司。

1.1.2 材料与试剂

茶叶:绿茶,湖北武汉某茶山;

海苔:条斑紫菜,江苏连云港某水产养殖基地;

电镜固定液、812 包埋剂:武汉赛维尔生物科技有限公司;

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、无水乙醇、丙酮、蔗糖、硫酸铵、硼氢化钠、草酸铵、氢氧化钾:分析纯,国药集团化学试剂有限公司;

盐酸:优级纯,国药集团化学试剂有限公司;

二硫赤藓糖醇:生物试剂,上海麦克林生化科技有限公司;

Tris 试剂:纯度 $\geq 99\%$,上海麦克林生化科技有限公司;

纤维素酶:50 U/mg,上海麦克林生化科技有限公司;

果胶酶:100 U/mg,上海麦克林生化科技有限公司;

碱性蛋白酶:200 U/mg,上海麦克林生化科技有限公司。

1.2 方 法

1.2.1 茶叶与海苔中铝的分布 采用 TEM-EDS 法。取

茶叶和海苔样品,组织体积一般不超过 $1\text{ mm} \times 1\text{ mm} \times 1\text{ mm}$,迅速投入电镜固定液固定,并用真空泵抽气直至沉底,室温放置 2 h,转入 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱。 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 PBS(pH 7.4)漂洗 3 次,每次 15 min。 1% 的钨酸和 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 PBS(pH 7.4)室温($20\text{ }^\circ\text{C}$)固定 5 h。 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 PBS(pH 7.4)漂洗 3 次,每次 15 min。组织依次加入体积分数 30% 、 50% 、 70% 、 80% 、 90% 、 95% 乙醇和无水乙醇中进行脱水,每次 1 h。依次用 $V_{\text{乙醇}}:V_{\text{丙酮}}$ 为 $3:1$ 、 $1:1$ 、 $1:3$ 的无水乙醇—丙酮混合液脱水,每次 0.5 h,再纯丙酮脱水 1 h。然后依次用 $V_{\text{丙酮}}:V_{\text{812 包埋剂}}$ 为 $3:1$ 、 $1:1$ 、 $1:3$ 的丙酮—812 包埋剂混合液分别处理 $2\sim 4$ 、 $12,2\sim 4\text{ h}$,再用纯 812 包埋剂包埋 $5\sim 8\text{ h}$,将纯 812 包埋剂倒入包埋板,将样品插入包埋板后 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 烤箱过夜。 $60\text{ }^\circ\text{C}$ 烤箱聚合 48 h。用超薄切片机切成 $60\sim 80\text{ nm}$ 的超薄切片。在场发射透射电子显微镜下观察、照相,并进行能谱分析铝元素面扫。

1.2.2 差速离心法分离茶叶与海苔细胞壁、细胞器和细胞质组分 根据 Gao 等^[13]提出的方法分离海苔和茶叶的细胞壁、细胞器及细胞质组分。取 2.0 g 海苔或茶叶于玛瑙研钵中,加入 10 mL 研磨介质(含 250 mmol/L 蔗糖溶液、 1 mmol/L 二硫赤藓糖醇溶液和 50 mmol/L pH 为 7.5 的 Tris-HCl)研磨均质 30 min,所有步骤均在 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 下操作。将均质后的样品装入 50 mL 离心管用高速冷冻离心机于 $300 \times g$ 下离心 5 min,收集上清液,用研磨介质清洗离心后的沉淀物,重复操作两次,合并上清液,得到沉淀物为细胞壁组分。上清液继续用高速冷冻离心机于 $20\,000 \times g$ 下离心 45 min,得到沉淀为细胞器碎片组分,上清液为细胞质组分。通过检测细胞色素 c 氧化酶(线粒体的标记物)和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(细胞质的标记物)的活性来检验各组分的纯度^[14-15]。

1.2.3 细胞壁中果胶、半纤维素、纤维素的分离 细胞壁的化学成分为果胶、半纤维素、纤维素等^[16]。根据 Zhong 等^[17]的方法对细胞壁中果胶、半纤维素、纤维素进行分离提取。取 1.2.2 步骤中的细胞壁 0.5 g 于 50 mL 塑料离心管中,加入 5 mL 硼氢化钠(质量浓度 0.1%)与草酸铵(质量浓度 0.5%)混合溶液,沸水浴 1 h, $10\,000 \times g$ 下离心 15 min,重复提取 3 次后合并上清液,上清液中为果胶成分。沉淀中加入 5 mL 氢氧化钾(质量浓度 4%)与硼氢化钠(质量浓度 0.1%)混合溶液,室温下以 200 r/min 振荡 8 h, $10\,000 \times g$ 下离心 15 min,重复 3 次后,换成氢氧化钾(质量浓度 24%)与硼氢化钠(质量浓度 0.1%)混合溶液继续提取 3 次,混合上清液,此步骤上清液为半纤维素成分。余下沉淀为纤维素成分。将得到的果胶、半纤维素溶液按王媛莉等^[18]的方法进行处理,即加热浓缩滤液至有少量固形物出现后,加 1.2 倍体积 pH 为 $2\sim 3$ 的体积分数 95% 的乙醇溶液,有絮凝物析出后静置 1 h,抽滤,

弃去滤液,滤饼用体积分数 95% 的乙醇溶液洗涤 2 次,再抽滤后得棉絮状果胶,45 °C 烘干备用,半纤维素同理可得。

1.2.4 人工模拟胃液提取试验 取 1.2.3 步骤中 0.5 g 细胞壁分离的茶叶和海苔细胞壁果胶、细胞壁半纤维素、细胞壁纤维素组分,及茶叶细胞器组分、海苔细胞器组分、茶叶粉末、海苔粉末各 0.2 g,用人工模拟胃液(按 2015 版药典配制)5 mL,在 37 °C 恒温水浴下分别提取 0.5,1.0,2.0,4.0,6.0,8.0 h。测定各提取液中铝含量及各组分铝的总含量,计算铝的提取率。

1.2.5 铝含量的测定 按 GB 5009.182—2017 的第二法——微波消解—电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)法执行。

1.2.6 数据处理 各指标测定均重复 3 次,以 3 次的平均值标示。

2 结果与讨论

2.1 海苔和茶叶中铝的亚细胞分布

2.1.1 差速离心法

(1) 海苔和茶叶细胞壁、细胞器、细胞可溶性组分中铝的分布:如表 1 所示,茶叶中用微波消解-ICP-MS 法测定的总铝含量为 398.0 mg/kg,按差速离心法分离的各组分中铝含量加和为 385.6 mg/kg,差速离心法的铝回收率为 96.9%,表明差速离心法破碎细胞过程中铝的损失较小,仅为 2.1%。茶叶细胞壁组分、细胞器组分和细胞质组分中铝的含量分别为 304.0,43.5,38.1 mg/kg,结果表明,茶叶中 78.8% 的铝分布在细胞壁中、11.3% 的铝分布在细胞器组分中,细胞质组分中的铝含量占 9.9%。

海苔的亚细胞分布结果见表 1,海苔中用微波消解-ICP-MS 法测定的总铝含量为 735.00 mg/kg,按差速离心法分离的各组分中铝含量加和为 717.60 mg/kg,差速离

心法的铝回收率为 97.6%。海苔细胞壁组分、细胞器组分和细胞可溶性组分中铝的含量分别为 658.00,49.80,9.76 mg/kg,结果表明,海苔中 91.70% 的铝分布在细胞壁中、6.94% 的铝分布在细胞器组分中,而细胞质组分中的铝含量占 1.36%。表明海苔生长过程中,吸收的大量铝富集在细胞壁中。

茶树中有高含量的铝,其对铝的毒性具有很高的耐受性^[19],表明茶树可能有特殊的解毒机制。海苔生长在铝含量较高的海水中,高含量铝的海水环境可能也促使海苔形成了类似茶叶的解毒机制,在这种机制的作用下,茶叶或海苔细胞可以将吸收的铝元素隔离在细胞中的特定区域,如细胞壁或液泡表面,而不影响其生命活动的正常进行,Gao 等^[13]对茶叶根和叶细胞的研究表明,茶叶根细胞壁中含有 69.8% 的铝,叶细胞中含有 75.2% 的铝,叶细胞壁中有 97.3% 的铝与果胶和半纤维素结合。Rengel 等^[20]报道了珊瑚轮藻细胞中 99.99% 的铝分布在细胞壁;Chang 等^[21]分析了烟叶中铝的亚细胞分布,发现 76% 的铝与烟叶细胞壁结合,与试验中海苔和茶叶中铝主要分布在细胞壁中的结论一致。

(2) 铝在茶叶和海苔细胞壁果胶、半纤维素、纤维素中的分布:由表 2 可知,茶叶细胞壁中铝在果胶中的分布占 53.4%、铝在半纤维素中占 45.0%,而纤维素中铝含量较低,仅为 1.6%;海苔细胞壁中,铝在果胶中的分布占比 2.8%,在半纤维素中占比 29.0%,而纤维素中铝含量占 68.2%。茶叶和海苔细胞壁果胶中铝含量的差异可能是由茶叶和海苔中果胶甲酯化酶含量的差异造成,茶叶中果胶甲酯化程度较低,羧基含量较高,因此对铝的吸附量高,海苔中果胶甲酯化程度较高,羧基含量少,对铝的吸附量降低。而半纤维素和纤维素中的铝含量差异推测是由于结合在其中的有机酸类物质含量差异造成的。

表 1 茶叶和海苔中铝在细胞壁、细胞器、细胞质中的分布

Table 1 Distribution of Al in cell wall, organelle, cytoplasm and protein in tea and seaweed

样品	细胞壁		细胞器		细胞质		铝总含量/ (mg · kg ⁻¹)	回收率/ %
	铝含量/ (mg · kg ⁻¹)	比例/ %	铝含量/ (mg · kg ⁻¹)	比例/ %	铝含量/ (mg · kg ⁻¹)	比例/ %		
茶叶	304.00	78.80	43.50	11.30	38.10	9.90	398.00	96.90
海苔	658.00	91.70	49.80	6.94	9.76	1.36	735.00	97.60

表 2 茶叶和海苔细胞壁果胶、半纤维素、纤维素中铝的分布

Table 2 Distribution of Al in pectin, hemicellulose and cellulose in cell wall of tea and seaweed

样品	果胶		半纤维素		纤维素		细胞壁中铝总 含量/(mg · kg ⁻¹)	回收率/ %
	铝含量/ (mg · kg ⁻¹)	比例/ %	铝含量/ (mg · kg ⁻¹)	比例/ %	铝含量/ (mg · kg ⁻¹)	比例/ %		
茶叶	236.00	53.40	198.60	45.00	7.08	1.60	464.00	95.20
海苔	27.60	2.80	286.00	29.00	672.00	68.20	1 010.00	97.60

2.1.2 TEM-EDS分析 图1可见清晰完整的茶叶细胞显微结构,包括细胞壁、原生质体、液泡结构及部分其他细胞器。对比同一细胞中铝的EDS面扫分布结果(图2),细胞壁及液泡结构上铝元素分布密集,而细胞质中铝元素分布稀少,表明铝主要在茶叶的细胞壁和液泡上富集,这一结果与差速离心法吻合。

图3为海苔细胞的TEM显微图,可见海苔细胞的单层片状排布细胞结构,单个细胞中细胞壁结构完整。对比相同位置铝的EDS面扫分布结果(图4),可见细胞壁及细胞器碎片上铝元素分布密集,而细胞质中铝元素分布稀少,这一结果与差速离心法吻合。

2.2 海苔和茶叶中铝的模拟摄入和风险分析

由于茶叶和海苔中的铝在细胞壁和细胞器中的含量占铝总含量的比例较高,茶叶为89.6%,海苔为98.6%,因此,细胞壁和细胞器中的铝的形态是解析其生物毒性的关键。用人工模拟胃液提取了茶叶粉末、茶叶细胞器组分和茶叶细胞壁组分进一步分离的果胶、半纤维素、纤维素等。由图5可知,果胶、半纤维素和纤维素组分中的铝提取率均较低,仅为1%左右,而细胞器中铝的提取率略高于细胞壁,细胞壁和细胞器中铝的提取率随提取时间变化幅度较小;直接提取粉碎后的新鲜茶叶样品,经过8h提取后提取率达到9.48%。粉碎的新鲜茶叶中人工模拟胃液提取出的铝推测主要是由茶叶细胞质组分贡献

的,极少部分来自细胞壁和细胞器。

由图6可知,海苔中果胶、半纤维素、纤维素和细胞器中经8h提取的铝均低于1.0%,直接提取粉碎的海苔鲜样,铝的提取率也仅为1.3%,表明海苔细胞壁和细胞器中的铝难以被人工模拟胃液溶出,而海苔细胞质中的铝可能以离子或可溶性盐的状态被人工模拟胃液提取。

茶叶和海苔的特殊解铝毒机制,使其在生长过程中将吸收的铝转运至细胞壁,细胞壁中的铝除了与果胶多糖的羧基结合外^[21],在茶叶中,铝也和细胞壁半纤维素和纤维素中的有机酸及酚类物质结合^[22-23],作用位点同样

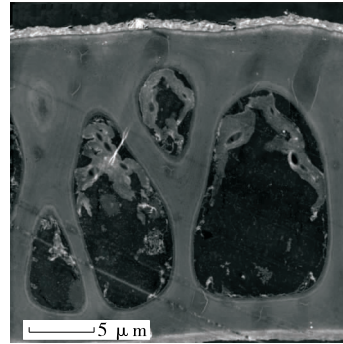


图3 海苔细胞TEM图

Figure 3 Cell of seaweed by TEM

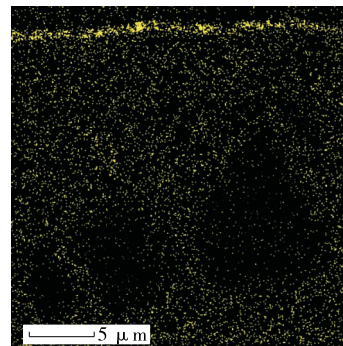


图4 海苔细胞中铝的分布

Figure 4 Distribution of Al in seaweed cell

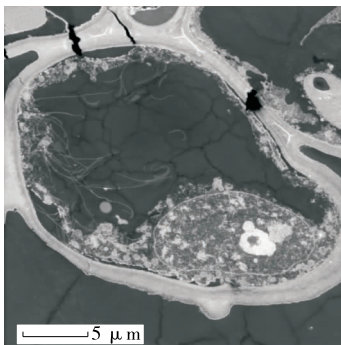


图1 茶叶细胞TEM图

Figure 1 Cell of tea leaves by TEM

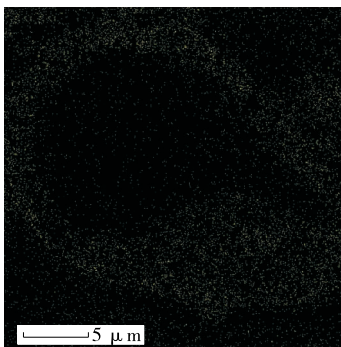


图2 茶叶细胞中铝的分布

Figure 2 Distribution of Al in tea leaves cell

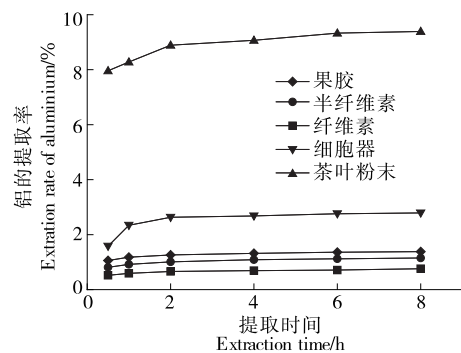


图5 人工模拟胃液提取茶叶各组分中的铝

Figure 5 Extraction of Al from tea by simulated gastric juice

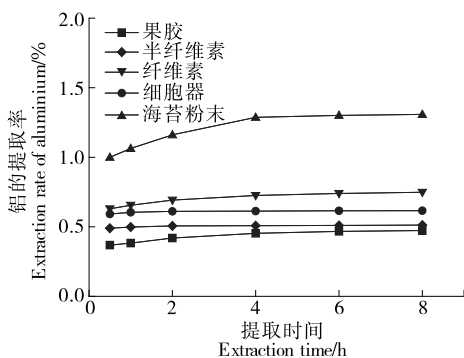


图 6 人工模拟胃液提取海苔各组分中的铝

Figure 6 Extraction of Al from seaweed by simulated gastric juice

是羧基,而在海苔中,此类研究鲜有报道,推测海苔在高浓度铝的刺激下分泌某种有机酸进入细胞壁中与铝紧密结合。由于茶叶和海苔细胞壁中铝的特殊结合状态,人体在摄食后,无法分解其细胞壁,细胞器中的铝也难以被胃液溶出,因此可能产生毒性的铝含量较低。即使摄入含有可溶性铝的茶汤,人体血浆中铝的浓度也没有增加^[24],而动物试验^[25]结果表明,喂食茶汤和茶叶后,小鼠肝脏及血液中铝含量均未增加,表明茶叶中铝的生物利用度极低。这可能归因于茶叶中的铝主要存在于细胞壁和细胞器中,不能被胃液溶出,而细胞质中的可溶性状态的铝与有机酸或酚类物质络合,难以被吸收。因此,茶叶和海苔中天然富集的高含量铝的摄入风险较低。

3 结论

透射电子显微镜—能谱法直观地揭示出茶叶和海苔细胞中铝的亚细胞分布特征,并且茶叶与海苔具有高度相似性,铝在茶叶和海苔中均主要分布在细胞壁中。差速离心法从亚细胞分布及细胞壁化学组成的角度定量地得出茶叶和海苔中铝的分布数据,茶叶和海苔中的铝主要分布在细胞壁中,其中茶叶细胞壁中的铝占茶叶铝总含量的 78.8%,海苔细胞壁中的铝占海苔铝总含量的 91.7%;茶叶细胞壁中铝又主要分布在果胶和半纤维素中,占比分别为 53.4%和 45.0%,海苔细胞壁中铝主要分布在半纤维素和纤维素中,占比分别为 29.0%和 68.2%。基于茶叶和海苔中铝的分布特征,采用人工模拟胃液提取法探讨直接摄入茶叶和海苔的风险性,结果表明,茶叶中的铝难以被溶出和吸收,因此风险性较小;而海苔中的铝由于缺乏相应毒理学研究,仅从海苔细胞中铝的分布特征及人工模拟胃液溶出性来看,其较茶叶细胞中的铝风险性更低。要确切地解析海苔中铝的生物毒性问题,尚需要基于铝亚细胞分布的深入的毒理学研究。

参考文献

[1] 渠心静,陈雪燕,戴生玉,等. 22 种山茶科植物叶片铝含量

及其亚细胞分布[J]. 分子植物育种, 2018, 16(3): 997-1006.

- [2] 尚德荣,赵艳芳,宁劲松,等. 海藻中铝的化学形态分析[J]. 水产学报, 2011, 35(4): 539-542.
- [3] 李佳禾. 2019 中国茶叶消费市场报告[J]. 茶世界, 2019(11): 43-51.
- [4] YOKE L R A, FLORENCE R L. Aluminum bioavailability from tea infusion[J]. Food & Chemical Toxicology, 2008, 46(12): 3659-3663.
- [5] WU Jun, ZHOU Chao-yan, WONG M K, et al. Urine levels of aluminum after drinking tea[J]. Biological Trace Element Research, 1997, 33(8): 1213-1219.
- [6] GLYNN A W, SPAREN A, DANIELSSON L G, et al. Bioavailability of labile aluminium in acidic drinking water: A study in the rat[J]. Food & Chemical Toxicology An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association, 1995, 33(5): 403.
- [7] 杨小弟,章福平,王先龙,等. 环境与生物体系中铝形态分析技术的新进展[J]. 分析化学, 2003(9): 1131-1138.
- [8] 黄国伟,张文治. 铝对体外人胚大脑神经细胞毒作用的研究[J]. 中华预防医学杂志, 2000, 15(3): 791-795.
- [9] BUSHINSKY D A, SPRAGUE S M, HALLEGOT P, et al. Effects of aluminum on bone surface ion composition[J]. Journal of Bone & Mineral Research, 2010, 10(12): 1988-1997.
- [10] YOICHI H, TSUGUHISA F, KEISUKE Y, et al. Localization of aluminum in epidermal cells of mature tea leaves[J]. Quantum Beam Sci, 2019, 3(9): 1365-1371.
- [11] ROSER T, VOGEL-MIKU K, HAJIBOLAND R, et al. Localization of aluminium in tea (*Camellia sinensis*) leaves using low energy X-ray fluorescence spectro-microscopy[J]. Journal of Plant Research, 2011, 124(1): 165-172.
- [12] CARR H P, LOMBI E K, WONG M H, et al. Accumulation and distribution of aluminium and other elements in tea (*Camellia sinensis*) leaves[J]. Agronomie, 2003, 23(6): 705-710.
- [13] GAO Hong-jian, ZHAO Qiang, ZHANG Xian-chen, et al. Localization of fluoride and aluminum in subcellular fractions of tea leaves and roots[J]. Agric Food Chem, 2014, 62(10): 2313-2319.
- [14] LEONARD R T, HODGES D H K. Membrane-bound adenosine triphosphatase activities of oat roots[J]. Plant Physiology, 1973, 51(4): 749-754.
- [15] HAUSLER E, PETERSEN M, ALFERMANN A W. Isolation of protoplasts and vacuoles from cell suspension cultures of *Coleus blumei* Benth[J]. Plant Cell Reports, 1993, 12(9): 510-512.
- [16] IRAKI N M, BRESSAN R A, HASEGAWA P M, et al. Alteration of the physical and chemical structure of the primary cell wall of growth-limited plant cells adapted to osmotic stress[J]. Plant Physiology, 1989, 91(1): 39-47.

(下转第 63 页)

表 5 不同柚子品种与部位的 5 种成分质量分数

Table 5 Contents of five components in different pomelo varieties and parts

样品	芸香柚皮苷	柚皮苷/%	橙皮苷/%	新橙皮苷/%	柠檬苦素/%	文献来源
台湾平柚皮	—	2.98	0.34	0.09	—	[8]
化州柚幼果	—	9.85	—	—	—	[9]
柚子籽	—	—	—	—	1.15	[10]
柚皮	—	—	—	—	0.47	[11]
马甲柚汁	—	2.06	5.30	4.10	0.48	[12]

† —表示未检测。

3 结论

试验建立的高效液相色谱法在 20 min 内,利用 PDA 检测器在 283 nm 与 220 nm 分别完成了对柚子幼果及柚子果汁中芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷和柠檬苦素 5 种关键的黄酮类和苦味物质的同时定量测定,测得柚子幼果中 5 种成分的质量分数分别为 8.49%, 8.05%, 1.30%, 1.31%, 1.46%, 柚子果汁中芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷和柠檬苦素的质量分数分别为 1.41%, 2.63%, 0.23%, 0.16%, 0.78%。但最终确定的方法中,新橙皮苷与柠檬苦素峰[图 2(g)]之间的时间间隔仍然较长,后续可使用不同流动相组分或洗脱方法予以减少。

参考文献

- [1] 周金花. 柚果废弃物中活性成分的提取分离及活性研究[D]. 长沙: 中南大学, 2007: 1-2.
- [2] 王松林, 彭荣, 崔榕, 等. 类柠檬苦素生物转化与脱苦研究进展[J]. 食品科学, 2015, 36(9): 279-283.
- [3] 冯桂仁, 姚晓玲, 袁奇, 等. 热处理与胡柚汁中柠檬苦素变化的相关性分析[J]. 食品与机械, 2012, 28(4): 26-28.
- [4] 朱露, 雷鹏, 黄琪, 等. 反相高效液相色谱法测定枳实中芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的含量[J]. 中南药学, 2013, 11(12): 934-937.
- [5] 蔡艳芳, 江国荣. 反相高效液相色谱法测定枳实中柠檬苦素的含量[J]. 临床合理用药杂志, 2015, 8(32): 90-91.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 三部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 419.
- [7] 邓琪, 袁仲安, 黄雪松. 高效液相双柱法测定油脂中的甘油三酯氧化聚合物[J]. 食品科学, 2020, 41(2): 321-326.
- [8] WANG Y C, CHUANG Y C, HSU H W. The flavonoid, carotenoid and pectin content in peels of citrus cultivated in Taiwan[J]. Food Chemistry, 2008, 106(1): 277-284.
- [9] 李泮霖, 李锋, 余剑军, 等. 化州柚幼果生长过程中柚皮苷含量的动态变化研究[J]. 中药材, 2012, 35(4): 538-539.
- [10] QIN Si, LV Cheng-hao, WANG Qing-shan, et al. Extraction, identification, and antioxidant property evaluation of limonin from pummelo seeds[J]. Animal Nutrition, 2018, 4(3): 281-287.
- [11] YANG Yuan-fan, ZHANG Liang-zheng, DU Xi-ping, et al. Recovery and purification of limonin from pummelo citrus grandis peel using water extraction, ammonium sulfate precipitation and resin adsorption[J]. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2017, 1 060: 150-157.
- [12] 高歌. 超高压技术在红柚汁加工与柚皮果胶提取中应用研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2018: 1-2.
- [13] 王松林, 彭荣, 崔榕, 等. 类柠檬苦素生物转化与脱苦研究进展[J]. 食品科学, 2015, 36(9): 279-283.
- [14] 冯桂仁, 姚晓玲, 袁奇, 等. 热处理与胡柚汁中柠檬苦素变化的相关性分析[J]. 食品与机械, 2012, 28(4): 26-28.
- [15] 朱露, 雷鹏, 黄琪, 等. 反相高效液相色谱法测定枳实中芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的含量[J]. 中南药学, 2013, 11(12): 934-937.
- [16] 蔡艳芳, 江国荣. 反相高效液相色谱法测定枳实中柠檬苦素的含量[J]. 临床合理用药杂志, 2015, 8(32): 90-91.
- [17] ZHONG Hai-lin, LAUCHLI A. Changes of cell wall composition and polymer size in primary roots of cotton seedlings under high salinity[J]. Journal of Experimental Botany, 1993(4): 4.
- [18] 王媛莉, 李梅青, 董明, 等. 草酸铵超声辅助提取豆腐柴果胶[J]. 食品科学, 2011(10): 88-91.
- [19] XIE Zhong-lei, CHEN Zhuo, SUN Wen-tian, et al. Distribution of aluminum and fluoride in tea plant and soil of teagarden in central and southwest China[J]. Chinese Geographical Science, 2007, 17: 376-382.
- [20] RENGEL Z, REID R J. Uptake of Al across the plasma membrane of plant cells[J]. Plant & Soil, 1997, 192(1): 31-35.
- [21] CHANG Y C, YAMAMOTO Y, MATSUMOTO H. Accumulation of aluminium in the cell wall pectin in cultured tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) cells treated with a combination of aluminium and iron [J]. Plant Cell & Environment, 2010, 22(8): 1 009-1 017.
- [22] WALLACE G, FRY S. Phenolic components of the plant cellwall[J]. International Review of Cytology, 1994, 151: 229-267.
- [23] STRACK D, JÜRGEN H, MMKEN M, et al. Cell wall-conjugated phenolics from coniferae leaves[J]. Phytochemistry, 1988, 27(11): 3 517-3 521.
- [24] DREWITT P N, BUTTERWORTH K R, SPRINGALL C D, et al. Plasma levels of aluminium after tea ingestion in healthy volunteers [J]. Food and Chemical Toxicology, 1993, 31(1): 19.
- [25] FAIRWEATHER-TAIT S J, PIPER Z, FATEMIS J A, et al. The effect of tea on iron and aluminium metabolism in the rat [J]. British Journal of Nutrition, 1991, 65(1): 61-68.

(上接第 50 页)