

腐植酸叶面肥对柠檬叶挥发油的含量、化学成分组成及抗氧化活性的影响

何孝英¹, 朱春华², 李进学², 杜玉霞², 李宝才¹, 戴伟锋¹, 张 救^{1,①}

(1. 昆明理工大学生命科学与技术学院, 云南 昆明 650500; 2. 云南省农业科学院热带亚热带经济作物研究所, 云南 瑞丽 678600)

摘要:以柠檬(*Citrus limon* (Linn.) Burm. f.)品种‘尤力克’(‘Eureka’)为研究对象,采用GC-MS技术研究了腐植酸水溶肥(WHA)、黄腐酸钾(FAP)和黄腐酸精华液(FAD)3种腐植酸叶面肥对柠檬叶挥发油含量及化学成分组成的影响,且对3个腐植酸叶面肥处理组柠檬叶挥发油的DPPH·清除率进行了比较。结果显示:WHA和FAP处理组柠檬叶挥发油含量显著高于空白对照(CK)组($P < 0.05$)。3个腐植酸叶面肥处理组对柠檬叶挥发油的化学成分类型影响较小,但对其相对含量的影响较大。3个腐植酸叶面肥处理组柠檬叶挥发油中烯类、醛类和醇类化合物的相对含量均较高。随着柠檬叶挥发油质量浓度的提高($13.50 \sim 76.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$),3个腐植酸叶面肥处理组柠檬叶挥发油的DPPH·清除率均显著升高。3个腐植酸叶面肥处理组柠檬叶挥发油的DPPH·清除率均显著高于CK组,其中WHA处理组柠檬叶挥发油的DPPH·清除率最高,FAP和FAD处理组次之。WHA处理组柠檬叶挥发油的DPPH·清除率的半抑制浓度(IC_{50})最小,为 $21.89 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;FAP和FAD处理组的DPPH·清除率的 IC_{50} 值较大,分别为 33.96 和 $41.29 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。上述研究结果表明:喷施含WHA、FAP和FAD的腐植酸叶面肥均对柠檬叶挥发油的含量和抗氧化活性有提高作用,其中,喷施含WHA的腐植酸叶面肥的提高作用最佳。

关键词:腐植酸叶面肥;柠檬叶;挥发油;GC-MS;抗氧化活性

中图分类号:Q946.8;S666.5 文献标志码:A 文章编号:1674-7895(2017)04-0054-06

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2017.04.07

Effect of humic acid foliar fertilizer on content, chemical constituent composition, and antioxidant activity of volatile oil from leaves of *Citrus limon* HE Xiaoying¹, ZHU Chunhua², LI Jinxue², DU Yuxia², LI Baocai¹, DAI Weifeng¹, ZHANG Mi^{1,①} (1. Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China; 2. Institute of Tropical and Subtropical Cash Crops, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Ruili 678600, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2017, 26(4): 54-59, 83

Abstract: Taking cultivar ‘Eureka’ of *Citrus limon* (Linn.) Burm. f. as research object, effects of three humic acid foliar fertilizers of water-soluble fertilizer containing humic acid (WHA), fulvic acid potassium (FAP), and fulvic acid distillate (FAD) on contents and chemical constituent composition of volatile oil from leaves of *C. limon* were studied by GC-MS technique, and DPPH· scavenging rates of volatile oil from leaves of *C. limon* in three humic acid foliar fertilizer treatment groups were compared. The results show that contents of volatile oil from leaves of *C. limon* in WHA and FAP treatment groups are significantly higher than that in blank control (CK) group ($P < 0.05$). Three humic acid foliar fertilizer treatment groups have a little influence on the chemical constituent types of volatile oil from leaves of *C. limon*, but have great influence on their relative contents. Relative contents of alkene, aldehyde, and alcohol compounds in volatile oil from leaves of *C. limon* in three humic acid foliar fertilizer treatment groups are relatively high. With enhancing of mass concentration of volatile oil

收稿日期: 2017-07-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21466018)

作者简介: 何孝英(1992—),女,湖南资兴人,硕士研究生,主要从事腐植酸肥料对柠檬影响方面的研究。

①通信作者 E-mail: midylee@126.com

(13.50–76.50 mg · L⁻¹) in leaves of *C. limon*, DPPH· scavenging rates of volatile oil from leaves of *C. limon* in three humic acid foliar fertilizer treatment groups all increase significantly. DPPH· scavenging rates of volatile oil from leaves of *C. limon* in three humic acid foliar fertilizer treatment groups are all significantly higher than that in CK group, in which, that in WHA treatment group is the highest, followed by FAP and FAD treatment groups. Half-inhibitory concentration (IC_{50}) of DPPH· scavenging rate of volatile oil from leaves of *C. limon* in WHA treatment group is the smallest, which is 21.89 mg · L⁻¹; those in FAP and FDA treatment groups are relatively high, which are 33.96 and 41.29 mg · L⁻¹, respectively. It is suggested that spraying humic acid foliar fertilizers containing WHA, FAP, and FAD can enhance the contents and antioxidant activities of volatile oil from leaves of *C. limon*, in which, spraying humic acid foliar fertilizer containing WHA has the best promotion effect.

Key words: humic acid foliar fertilizer; leaf of *Citrus limon* (Linn.) Burm. f.; volatile oil; GC-MS; antioxidant activity

腐植酸叶面肥是一种喷施于植物叶面的含有腐植酸类物质的绿色生态有机肥,具有补充养分快、吸收快和利用率高等特点^[1],不仅对农作物具有增产增质、抗虫抗逆、刺激代谢和减少农药使用等作用^[2],还能调节土壤 pH 值、增强土壤微生物活性以及防止土壤板结和重金属污染^[3]。目前,在国内大力发展绿色环保农业的背景下,腐植酸叶面肥被越来越广泛的应用到农作物的栽培中。

柠檬(*Citrus limon* (Linn.) Burm. f.)品种‘尤力克’(‘Eureka’)为芸香科(Rutaceae)柑橘属(*Citrus* Linn.)常绿小乔木,因具有产量高和适应性强等特点而成为世界上种植最为广泛的柠檬品种之一,其在国内的主要种植区为四川、云南、重庆和海南。挥发油是柠檬的主要化学成分之一,具有良好的生物活性^[4],是柠檬中极具开发潜力的一类次生代谢产物,也是评价柠檬品质的重要指标之一。柠檬的挥发油主要存在于叶和果皮。近年来,国内外学者对柠檬挥发油的研究较多,包括不同品种、部位、采摘时期和产地的柠檬挥发油的成分变化,以及柠檬挥发油提取工艺的优化等^[5-9]。

云南瑞丽是中国第2大柠檬生产基地,柠檬是当地重要的经济作物之一,但当地柠檬种植普遍存在肥料利用率低、滥用肥料导致土壤遭到破坏和柠檬综合开发利用率低等问题。鉴于腐植酸叶面肥的特点和优势,本研究采用GC-MS技术分别研究了腐植酸水溶肥(WHA)、黄腐酸钾(FAP)和黄腐酸精华液(FAD)3种腐植酸叶面肥对云南瑞丽产柠檬品种‘尤力克’叶中挥发油含量及化学成分组成的影响,并运用DPPH·自由基清除法测定了3种腐植酸叶面肥处理后柠檬叶挥发油的抗氧化活性,以期腐植酸叶面肥的合理应用、柠檬的合理用肥和施肥以及柠檬的综

合开发利用提供参考资料。

1 材料和方法

1.1 材料、试剂和仪器

供试柠檬品种‘尤力克’8年生植株种植在位于云南瑞丽的云南省农业科学院热带亚热带经济作物研究所柠檬种植基地,平均株高2.74 m,平均冠幅2.86 m×3.06 m,生长环境为坡地,土壤类型为黄红壤,土壤pH 5.62,碱解氮、速效磷和速效钾的含量分别为248.00、22.18和195.18 mg · kg⁻¹,有机质含量2.09%。柠檬品种‘尤力克’经云南省农业科学院热带亚热带经济作物研究所李进学副研究员鉴定。

使用的腐植酸水溶肥(WHA)、黄腐酸钾(FAP)和黄腐酸精华液(FAD)3种腐植酸叶面肥均购自云南尚呈生物科技有限公司,其中,腐植酸水溶肥中腐植酸质量浓度大于等于30 g · L⁻¹,黄腐酸钾中黄腐酸含量大于等于15%,黄腐酸精华液中煤基黄腐酸含量大于等于4%。

主要试剂:无水乙醚(成都市科龙化工试剂厂),无水乙醇和无水硫酸钠(天津市风船化学试剂有限公司),以及石油醚(郑州市恩都化工有限公司)均为分析纯;1,1-二苯基-2-三硝基苯肼(DPPH·,美国Sigma公司)的纯度大于98%。

主要仪器:Agilent 7820A型气相色谱仪(氢火焰检测器)和Agilent 5975B型气质联用色谱仪(美国Agilent公司);Tecan Infinite M200 PRO酶标仪(瑞士Tecan公司);SHSL型调温电热套(上海树立仪器仪表有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 施肥处理和采样方法 共设置3个处理组:

腐植酸水溶肥处理组将腐植酸水溶肥用蒸馏水稀释500倍,每株叶面喷5L;黄腐酸钾处理组将黄腐酸钾用蒸馏水稀释2000倍,每株叶面喷5L;黄腐酸精华液处理组将黄腐酸精华液用蒸馏水稀释500倍,每株叶面喷5L;空白对照组每株叶面喷5L蒸馏水。分别于2016年6月29日、7月6日和7月13日喷施3次。每处理组4株植株,3次重复。于2016年9月25日从各处理组柠檬品种‘尤力克’植株的上、下以及东、南、西、北随机采摘老叶用于提取挥发油。

1.2.2 柠檬叶挥发油的提取 挥发油的提取参考赵晨星等^[10]的水蒸汽蒸馏法并改进,具体操作如下:将各处理组叶分别混匀后剪碎,称取100g,按质量体积比1:15加入蒸馏水,蒸馏提取4h后收集挥发油,用无水硫酸钠干燥后称取质量,计算挥发油含量。

1.2.3 GC-MS分析 4个处理组分别取适量挥发油,用无水乙醚配置成质量浓度 $100\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的溶液,然后用孔径 $0.22\mu\text{m}$ 的滤膜过滤到棕色液相小瓶中,备用。

气相色谱条件:HP5-MS毛细管柱($30\text{mm}\times 0.1\text{mm}\times 0.1\mu\text{m}$),载气为氦气(纯度99.99%),流速 $1\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,进样量 $0.1\mu\text{L}$,分流比5:1,进样口温度 $250\text{ }^\circ\text{C}$ 。升温程序为:起始温度 $50\text{ }^\circ\text{C}$,保持5min;然后以 $4\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升温至 $60\text{ }^\circ\text{C}$,保持2min;再以 $5\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升温至 $116\text{ }^\circ\text{C}$,保持2min;最后以 $15\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升温至 $280\text{ }^\circ\text{C}$,保持2min。

质谱条件:EI离子源,接口温度 $250\text{ }^\circ\text{C}$,离子源温度 $230\text{ }^\circ\text{C}$,电离电压70eV,扫描范围30~500amu,四级杆温度 $150\text{ }^\circ\text{C}$ 。

将GC-MS数据与NIST08质谱库检索匹配结果,并结合相关文献^[11-12]确定各化学成分;用峰面积归一化法计算各化学成分的相对含量。

1.2.4 抗氧化活性的测定 参考文献^[13],采用96孔板进行DPPH·自由基清除实验,用无水乙醇配制浓度为 $1\times 10^{-4}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DPPH·溶液,用石油醚溶解并稀释柠檬叶挥发油,使其质量浓度为 $13.50\sim 76.50\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,以 $50\mu\text{L}$ 不同质量浓度挥发油与 $150\mu\text{L}$ DPPH·溶液混合后的吸光度为 A_i ,以 $50\mu\text{L}$ 石油醚与 $150\mu\text{L}$ DPPH·溶液混合后的吸光度为 A_0 ,以 $50\mu\text{L}$ 不同质量浓度挥发油与 $150\mu\text{L}$ 无水乙醇混合后的吸光度为 A_j ,各吸光度分别用酶标仪于波长 517nm 处进行测定。根据公式“ $\text{DPPH}\cdot\text{清除率}=[1-(A_i-A_j)/A_0]\times 100\%$ ”计算DPPH·清除率。以柠檬叶挥发油对

DPPH·的清除率为50%时对应的质量浓度为半抑制浓度(IC_{50})。

1.3 数据分析

采用EXCEL 2003软件对实验数据进行处理,并采用SPSS 20.0统计分析软件中LSD法进行差异显著性分析。

2 结果和分析

2.1 柠檬叶挥发油的含量

不同腐植酸叶面肥处理组柠檬叶挥发油含量的比较结果见表1。由表1可以看出:腐植酸水溶肥(WHA)、黄腐酸钾(FAP)和黄腐酸精华液(FAD)处理组柠檬叶挥发油含量均高于空白对照(CK)组,其中,WHA处理组柠檬叶挥发油含量最高,FAP处理组柠檬叶挥发油含量次之,FAD处理组柠檬叶挥发油含量略高于CK组。差异显著性分析结果显示:WHA和FAP处理组柠檬叶挥发油含量显著高于CK组($P<0.05$),而FAD处理组柠檬叶挥发油含量与CK组无显著差异($P>0.05$),说明WHA和FAP可显著提高柠檬叶挥发油含量,而FAD对柠檬叶挥发油含量的影响较小。

表1 不同腐植酸叶面肥处理组柠檬叶挥发油含量的比较¹⁾
Table 1 Comparison on volatile oil contents in leaves of *Citrus limon* (Linn.) Burm. f. in different humic acid foliar fertilizer treatment groups¹⁾

处理组 ²⁾	Treatment group ²⁾	挥发油含量/%	Volatile oil content
CK	CK	0.570±0.028c	
WHA	WHA	0.622±0.013a	
FAP	FAP	0.580±0.022b	
FAD	FAD	0.572±0.017c	

¹⁾ 同列中不同的小写字母表示差异显著($P<0.05$) Different lowercases in the same column indicate the significant difference ($P<0.05$).

²⁾ CK: 空白对照 Blank control; WHA: 腐植酸水溶肥 Water-soluble fertilizer containing humic acid; FAP: 黄腐酸钾 Fulvic acid potassium; FAD: 黄腐酸精华液 Fulvic acid distillate.

2.2 柠檬叶挥发油的化学成分及其相对含量

不同腐植酸叶面肥处理组柠檬叶挥发油的化学成分及其相对含量见表2。结果显示:从空白对照(CK)组柠檬叶挥发油中鉴定出43种成分,占挥发油色谱峰总面积的71.39%,其中,相对含量在1.00%以上的化学成分由高到低依次为柠檬醛(16.34%)、*d*-柠檬烯(13.77%)、反式-柠檬醛(13.54%)、香叶

醇(4.74%)、橙花醇(4.00%)、香茅醇(2.93%)、 β -蒎烯(2.14%)、乙酸香叶酯(1.92%)、1-石竹烯(1.53%)、芳樟醇(1.12%)、罗勒烯(1.10%)。

从腐植酸水溶肥(WHA)处理组柠檬叶挥发油中鉴定出48种化学成分,占挥发油色谱峰总面积的87.30%,其中,相对含量在1.00%以上的化学成分由高到低依次为*d*-柠檬烯(22.45%)、柠檬醛(13.33%)、反式-柠檬醛(11.96%)、香叶醇(5.65%)、橙花醇(5.25%)、 β -蒎烯(4.30%)、香茅醇(3.33%)、乙酸香叶酯(2.77%)、罗勒烯(2.38%)、1-石竹烯(1.63%)、乙酸橙花酯(1.62%)、香茅醛(1.32%)、芳樟醇(1.29%)、 β -水芹烯(1.08%)。

从黄腐酸钾(FAP)处理组柠檬叶挥发油中鉴定出45种化学成分,占挥发油色谱峰总面积的

75.76%,其中,相对含量在1.00%以上的化学成分由高到低依次为*d*-柠檬烯(17.61%)、柠檬醛(14.12%)、反式-柠檬醛(11.81%)、香叶醇(5.80%)、橙花醇(5.29%)、香茅醇(2.94%)、 β -蒎烯(2.80%)、乙酸香叶酯(1.96%)、1-石竹烯(1.68%)、罗勒烯(1.54%)、乙酸橙花酯(1.06%)、芳樟醇(1.05%)。

从黄腐酸精华液(FAD)处理组柠檬叶挥发油中鉴定出48种成分,占挥发油色谱峰总面积的66.18%,其中,相对含量在1.00%以上的化学成分由高到低依次为*d*-柠檬烯(15.82%)、柠檬醛(10.12%)、反式-柠檬醛(8.41%)、香叶醇(6.21%)、橙花醇(4.87%)、香茅醇(3.32%)、 β -蒎烯(2.28%)、1-石竹烯(2.21%)、乙酸香叶酯(1.53%)、罗勒烯(1.36%)。

表2 不同腐植酸叶面肥处理组柠檬叶挥发油的化学成分及其相对含量

Table 2 Chemical constituents and their relative contents in volatile oil from leaves of *Citrus limon* (Linn.) Burm. f. in different humic acid foliar fertilizer treatment groups

保留时间/min Retention time	化合物 Compound	相对含量/% ¹⁾ Relative content ¹⁾				保留时间/min Retention time	化合物 Compound	相对含量/% ¹⁾ Relative content ¹⁾			
		CK	WHA	FAP	FAD			CK	WHA	FAP	FAD
6.492	α -pinene	0.17	0.33	0.21	0.16	18.748	iso-geraniol	0.41	0.53	0.39	0.45
7.041	camphene	0.03	0.03	0.02	0.01	18.988	cis-citral	13.54	11.96	11.81	8.41
8.088	β -phellandrene	0.55	1.08	0.71	0.58	19.423	geraniol	4.74	5.65	5.80	6.21
8.157	β -pinene	2.14	4.30	2.80	2.28	19.881	citral	16.34	13.33	14.12	10.12
9.038	myrcene	0.45	0.88	0.57	0.49	22.536	2,6-dimethyl-2,6-octadiene	0.12	0.06	0.07	0.20
9.565	α -phellandrene	0.05	0.07	0.05	0.04	22.937	neryl acetate	0.94	1.62	1.06	0.79
9.856	(1S)-(+)-3-carene	0.27	0.62	0.36	0.33	23.520	geranyl acetate	1.92	2.77	1.96	1.53
10.240	2-carene	0.04	0.05	0.03	0.03	24.247	1-caryophyllene	1.53	1.63	1.68	2.21
10.640	<i>p</i> -cymene	0.07	0.08	0.05	0.04	24.608	α -trans-bergamotene	0.14	0.08	0.12	0.14
10.806	<i>d</i> -limonene	13.77	22.45	17.61	15.82	24.905	humulene	0.20	0.25	0.21	0.27
10.921	eucalyptol	0.91	0.90	0.96	0.86	25.603	γ -elemene	0.21	0.46	0.34	0.42
11.441	trans- β -ocimene	0.24	0.52	0.32	0.27	25.706	cis- α -bisabolene	0.03	0.02	0.02	0.02
11.893	ocimene	1.10	2.38	1.54	1.36	25.786	β -bisabolene	0.37	0.30	0.31	0.32
12.254	γ -terpinene	0.14	0.25	0.15	0.14	25.981	<i>d</i> -cadinene	0.06	0.09	0.07	0.07
13.490	terpinolene	0.15	0.25	0.14	0.14	26.656	espatulenol	0.11	0.23	0.13	0.13
14.091	linalool	1.12	1.29	1.05	0.86	27.343	<i>t</i> -muurolol	0.07	0.18	0.06	0.09
14.268	nonanal	0.13	0.12	0.12	0.08	27.480	α -cadinol	0.18	0.31	0.20	0.17
15.183	alloocimene	0.04	0.01	0.02	0.04	27.749	α -bisabolol	0.10	0.21	0.13	0.11
15.681	isopulegol	0.03	0.03	0.02	0.02	28.230	(<i>E,E</i>)-farnesal	—	0.20	0.11	0.11
16.076	citronellal	0.76	1.32	0.74	0.69	28.344	tetradecanoic acid	—	0.02	—	0.06
16.803	4-terpinenol	0.34	0.37	0.26	0.21	29.837	hexadecanoic acid	0.06	0.16	0.04	0.24
17.283	α -terpineol	0.89	0.34	0.79	0.56	30.753	eicosane	—	0.10	—	0.11
18.577	nerol	4.00	5.25	5.29	4.87	30.862	phytol	—	0.51	0.38	0.50
18.622	citronellol	2.93	3.33	2.94	3.32	32.515	tetracosane	—	0.38	—	0.30

¹⁾ CK: 空白对照 Blank control; WHA: 腐植酸水溶肥 Water-soluble fertilizer containing humic acid; FAP: 黄腐酸钾 Fulvic acid potassium; FAD: 黄腐酸精华液 Fulvic acid distillate. —: 未检出 Undetected.

比较结果显示:3个腐植酸叶面肥处理组柠檬叶挥发油的化学成分与CK组基本一致,但各化学成分的相对含量存在差异。其中,3个腐植酸叶面肥处理组柠檬叶挥发油中 β -水芹烯、 β -蒎烯、*d*-柠檬烯、罗勒烯、橙花醇、香茅醇、香叶醇和1-石竹烯的相对含量均高于CK组,而反式-柠檬醛和柠檬醛的相对含量均低于CK组;WHA和FAP处理组柠檬叶挥发油中乙酸橙花酯和乙酸香叶酯的相对含量高于CK组,而二者在FAD处理组的相对含量却低于CK组;WHA处理组柠檬叶挥发油中芳樟醇和香茅醛的相对含量高于CK组,而二者在FAP和FAD处理组的相对含量则低于CK组。3个腐植酸叶面肥处理组与CK组的柠檬叶挥发油的共有化学成分有43种;WHA和FAD处理组较CK组多5种化学成分,分别为(*E,E*)-金合欢醛、肉豆蔻酸、二十烷、叶绿醇和二十四烷,FAP处理组较CK组多2种化学成分,分别为(*E,E*)-金合欢醛和叶绿醇。

不同腐植酸叶面肥处理组柠檬叶挥发油的不同类型化学成分及其相对含量见表3。由表3可以看出:CK组柠檬叶挥发油中醛类化合物的相对含量最高,其次是烯类和醇类化合物,酯类化合物的相对含量较低;3个腐植酸叶面肥处理组柠檬叶挥发油中烯类化合物的相对含量均最高,其次是醛类和醇类化合物,酯类化合物的相对含量较低。CK组和3个腐植酸叶面肥处理组柠檬叶挥发油中酸类、芳香烃类和烷烃类化合物的相对含量均明显低于其他类型化合物。总体来看,3种腐植酸叶面肥对柠檬叶挥发油各类型化学成分的相对含量影响较大,而对其类型的影响较小。

表3 不同腐植酸叶面肥处理组柠檬叶挥发油的不同类型化学成分及其相对含量

Table 3 Different types of chemical constituents and their relative contents in volatile oil from leaves of *Citrus limon* (Linn.) Burm. f. in different humic acid foliar fertilizer treatment groups

化合物类型 Compound type	相对含量/% ¹⁾ Relative content ¹⁾			
	CK	WHA	FAP	FAD
烯类 Alkenes	21.80	36.11	27.35	25.34
醇类 Alcohols	15.83	19.13	18.40	18.36
醛类 Aldehydes	30.77	26.93	26.90	19.41
酯类 Esters	2.86	4.39	3.02	2.32
酸类 Acids	0.06	0.18	0.04	0.30
芳香烃类 Arenes	0.07	0.08	0.05	0.04
烷烃类 Alkanes	—	0.48	—	0.41

¹⁾ CK: 空白对照 Blank control; WHA: 腐植酸水溶肥 Water-soluble fertilizer containing humic acid; FAP: 黄腐酸钾 Fulvic acid potassium; FAD: 黄腐酸精华液 Fulvic acid distillate. —: 未检出 Undetected.

2.3 柠檬叶挥发油对 DPPH· 的清除效果

不同腐植酸叶面肥处理组不同质量浓度柠檬叶挥发油的 DPPH· 清除率见表4。由表4可以看出:随着柠檬叶挥发油质量浓度的提高(13.50~76.50 mg·L⁻¹),各处理组柠檬叶挥发油的 DPPH· 清除率均显著升高($P<0.05$)。

由表4还可以看出:在同一质量浓度柠檬叶挥发油条件下,均为腐植酸水溶肥(WHA)处理组柠檬叶挥发油的 DPPH· 清除率最高,黄腐酸钾(FAP)处理组次之,黄腐酸精华液(FAD)处理组较低,空白对照(CK)组最低,且在同一质量浓度柠檬叶挥发油条件下,各处理组间总体上存在显著差异。

对不同腐植酸叶面肥处理组不同质量浓度柠檬叶挥发油与 DPPH· 清除率的量效关系进行拟合,拟合方程及半抑制浓度(IC_{50})见表5。由表5可以看出:

表4 不同腐植酸叶面肥处理组不同质量浓度柠檬叶挥发油的 DPPH· 清除率

Table 4 DPPH· scavenging rates of different mass concentrations of volatile oil from leaves of *Citrus limon* (Linn.) Burm. f. in different humic acid foliar fertilizer treatment groups

质量浓度/mg·L ⁻¹ Mass concentration	DPPH· 清除率/% ¹⁾ DPPH· scavenging rate ¹⁾			
	CK	WHA	FAP	FAD
13.50	29.11±0.32eC	38.45±0.30eA	30.70±0.40eB	30.51±0.46eB
29.25	41.02±0.26dD	56.30±0.41dA	49.85±0.21dB	43.13±0.21dC
45.00	52.20±0.34cD	76.35±0.30cA	60.91±0.16cB	54.14±0.22cC
60.75	60.48±0.38bD	81.58±0.38bA	71.46±0.37bB	61.51±0.41bC
76.50	72.18±0.25aD	86.78±0.30aA	77.38±0.29aB	72.86±0.28aC

¹⁾ CK: 空白对照 Blank control; WHA: 腐植酸水溶肥 Water-soluble fertilizer containing humic acid; FAP: 黄腐酸钾 Fulvic acid potassium; FAD: 黄腐酸精华液 Fulvic acid distillate. 同列中不同的小写字母表示同一处理组不同质量浓度柠檬叶挥发油对 DPPH· 的清除率存在显著差异($P<0.05$) Different lowercases in the same column indicate the significant difference in DPPH· scavenging rate among different mass concentrations of volatile oil from leaves of *Citrus limon* (Linn.) Burm. f. in the same treatment group ($P<0.05$); 同行中不同的大写字母表示同一质量浓度不同处理组柠檬叶挥发油对 DPPH· 的清除率存在显著差异($P<0.05$) Different capitals in the same row indicate the significant difference in DPPH· scavenging rate of the same mass concentration of volatile oil from leaves of *C. limon* among different treatment groups ($P<0.05$).

在质量浓度为 13.50~76.50 mg·L⁻¹ 范围内,各处理组柠檬叶挥发油的质量浓度与 DPPH·清除率存在良好的线性关系。CK 组柠檬叶挥发油的 DPPH·清除率的 IC₅₀ 值最大,为 43.40 mg·L⁻¹;FAD 处理组柠檬叶挥发油的 DPPH·清除率的 IC₅₀ 值次之,为 41.29 mg·L⁻¹;FAP 处理组柠檬叶挥发油的 DPPH·清除率的 IC₅₀ 值较低,为 33.96 mg·L⁻¹;WHA 处理组柠檬叶挥发油的 DPPH·清除率的 IC₅₀ 值最小,为 21.89 mg·L⁻¹。说明各腐植酸叶面肥处理组柠檬叶挥发油对 DPPH·的清除能力均大于 CK 组,即各腐植酸叶面肥处理组柠檬叶挥发油的体外抗氧化效果均优于 CK 组。

表5 不同腐植酸叶面肥处理组不同质量浓度柠檬叶挥发油与 DPPH·清除率的拟合方程及半抑制浓度 (IC₅₀)
Table 5 Fitting equations and half-inhibitory concentrations (IC₅₀) of DPPH· scavenging rates of different mass concentrations of volatile oil from leaves of *Citrus limon* (Linn.) Burm. f. in different humic acid foliar fertilizer treatment groups

处理组 ¹⁾ Treatment group ¹⁾	DPPH·清除率拟合方程 Fitting equation of DPPH· scavenging rate	r ²	IC ₅₀ /mg·L ⁻¹
CK	y=0.673 0x+20.792 0	0.997 5	43.40
WHA	y=0.775 5x+32.975 0	0.919 3	21.89
FAP	y=0.730 0x+25.211 0	0.960 0	33.96
FAD	y=0.654 5x+22.979 0	0.993 3	41.29

¹⁾CK: 空白对照 Blank control; WHA: 腐植酸水溶肥 Water-soluble fertilizer containing humic acid; FAP: 黄腐酸钾 Fulvic acid potassium; FAD: 黄腐酸精华液 Fulvic acid distillate.

3 讨论和结论

挥发油是柠檬重要的次生代谢产物之一,具有抗菌、抗氧化和降血脂^[14-16]等活性。植物中挥发油的合成和积累受多个因子影响,其中施肥是重要影响因素之一。于静波等^[17]认为,不同施用量的氮、磷和钾肥影响芳樟 [*Cinnamomum camphora* var. *linaloolifera* Fujita] 叶精油的含量及其主成分芳樟醇的含量。刘国顺等^[18]研究认为,有机肥能够改变烟草 (*Nicotiana tabacum* Linn.) 叶片中各香气成分的含量。本研究中,喷施含腐植酸水溶肥 (WHA)、黄腐酸钾 (FAP) 和黄腐酸精华液 (FAD) 的腐植酸叶面肥均能在一定程度上提高柠檬叶挥发油含量,其中, WHA 处理组提高柠檬叶挥发油含量的效果最好;并且,3 种腐植酸叶面肥对柠檬叶挥发油中各化学成分相对含量的影响

较大,但对各化学成分类型的影响较小。这可能与不同腐植酸叶面肥中所含的营养元素不同有关。本实验中的柠檬叶挥发油成分类型与范媛媛等^[19]报道的柠檬品种‘尤力克’叶挥发油中化学成分类型基本一致,但各化学成分的相对含量却有差异,也说明施用腐植酸叶面肥不会改变挥发油的化学成分类型。在同一质量浓度柠檬叶挥发油条件下,喷施 3 种腐植酸叶面肥的柠檬叶挥发油的体外抗氧化效果优于空白对照 (CK) 组,说明这 3 种腐植酸叶面肥对柠檬叶挥发油的体外抗氧化效果有一定的促进作用,推测可能与腐植酸叶面肥提高了柠檬叶挥发油中具有抗氧化效果组分的相对含量有关。

柠檬叶中挥发油的含量和化学成分组成影响挥发油的产量和质量,进而影响果农的收入。本研究结果表明喷施含腐植酸水溶肥、黄腐酸钾和黄腐酸精华液的腐植酸叶面肥能够不同程度提高柠檬叶中挥发油含量,但 3 种腐植酸叶面肥中的具体起效成分还有待进一步研究,其影响柠檬叶挥发油化学成分组成及相对含量的机制也需深入探索。

参考文献:

- [1] 林翠兰. 叶面肥的特点与施用效果[J]. 热带亚热带土壤科学, 1998, 7(1): 88-90.
- [2] 李卓杰, 刘 琼, 周世宁. 腐植酸对植物生长的影响[J]. 腐植酸, 1991(1): 38-41.
- [3] 陈 静, 黄占斌. 腐植酸在土壤修复中的作用[J]. 腐植酸, 2014(4): 30-34, 65.
- [4] DONGMO P M J, TCHOUMBOUGNANG F, BOYOM F F, et al. Antiradical, antioxidant activities and anti-inflammatory potential of the essential oils of the varieties of *Citrus limon* and *Citrus aurantifolia* growing in cameroon [J]. Journal of Asian Scientific Research, 2013, 3: 1046-1057.
- [5] LOTA M L, DE ROCCA SERRA D, TOMI F, et al. Volatile components of peel and leaf oils of lemon and lime species [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50: 796-805.
- [6] VEKIARI S A, PROTOPADAKIS E E, PAPAPOPOULOU P, et al. Composition and seasonal variation of the essential oil from leaves and peel of a cretan lemon variety [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50: 147-153.
- [7] 赵文红, 黄桂颖, 陈悦娇, 等. 柠檬果皮精油挥发性成分的 GC-MS 分析[J]. 食品工业科技, 2009, 30(12): 113-115.
- [8] 涂勋良, 吕秀兰, 李亚波, 等. 不同产地尤力克柠檬果皮精油成分对比分析[J]. 食品与机械, 2016, 32(4): 52-56.
- [9] 孙绪兵, 沈王庆. 柠檬皮中香精油溶剂浸提工艺优化[J]. 湖北农业科学, 2013, 52(16): 3920-3921.

(下转第 83 页 Continued on page 83)