

高效液相色谱法测定柑橘中的柠檬苦素类似物

刘 亮^{1,2}, 戚向阳², 董绪燕³, 李蕙蕙², 刘传菊²

1(武汉工业学院食品科技学院, 湖北武汉, 430023) 2(华中农业大学食品科技学院, 湖北武汉, 430070);

3(中国农业科学院油料作物研究所, 湖北武汉, 430062)

摘 要 建立了同时测定柑橘中柠檬苦素和诺米林 2 种苷元的高效液相色谱方法。色谱柱为 Phenomenex C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为体积分数 45% 乙腈, 流速为 1.0 mL/min, 柱温为 25℃, 检测波长在 210 nm。经考察该方法可行性强, 柠檬苦素和诺米林的平均回收率分别 99.91% 和 98.28%, RSD 分别为 2.55% 和 2.30%。因此用该方法测定了柑橘中的柠檬苦素和诺米林的含量, 并取得了理想的结果。

关键词 柑橘, 高效液相色谱法, 柠檬苦素, 诺米林

柠檬苦素类化合物是一类高度氧化的四环三萜类植物次生代谢产物, 主要存在于芸香科和楝科的植物组织中。柑橘中含量较多柠檬苦素(limonin)和诺米林(nomilin)2 种苷元是引起柑橘汁苦味的主要原因之一^[1]。动物实验表明该类化合物对癌症有化学抑制作用, 能够阻碍肿瘤的形成^[2,3], 近年来还发现该类物质具有抗氧化活性^[4,5]、抑制真菌^[6]和抑制 HIV^[7,8]等活性。因此建立一种可靠的分析方法, 分析不同柑橘品种和不同组织中柠檬苦素和诺米林的变化, 对柑橘产品的开发及柑橘副产物的综合利用具有非常重要的意义。

柠檬苦素类似物的定量分析方法主要有 TLC^[9]、分光光度法(UV)^[10]、放射免疫测定法(RIA)^[11]、HPLC-MS^[12]和毛细管胶束电色谱方法^[13,14]、快速色谱法(flash chromatography)^[15]等。但以上方法存在重现性不理想、灵敏度低或对设备要求较高等原因, 限制了其在分析上的广泛应用。高效液相色谱作为一种常用的分析手段, 具有灵敏度高、重现性好等特点。因此, 本文旨在建立简便、快速的高效液相色谱分析方法, 并分析不同品种柑橘中 2 种苷元的含量, 为柑橘类产品加工时原料的选择提供科学依据。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

美国 Varian 高效液相色谱仪, 335 型 PDA 检测器, PS-210 二元泵, 410 型自动进样器(Varian Co., USA)。

柠檬苦素、诺米林标准品(美国 Sigma 公司); 色

谱纯乙腈, 分析纯二氯甲烷, 娃哈哈纯净水, 0.45 μm 微孔滤膜。

1.2 实验材料

半成熟的红葡萄柚, 尾张蜜柑, 锦橙, 酸橙, 产地均为湖北松滋; 琯溪蜜柚, 产地福建; 脐橙, 产地湖北秭归。

1.3 标准溶液的配制

精确称取一定量的柠檬苦素和诺米林的标准品, 用乙腈溶解并定容, 分别配制成含柠檬苦素 240 μg/mL 和诺米林 220 μg/mL 的标准溶液作为母液备用。

1.4 样品的制备

取不同品种的鲜果, 将其外表皮、内表皮、囊衣、瓣膜等不同组织在 50℃ 恒温干燥下至恒重, 然后研磨成粉末。取上述粉末约 3.0 g 置于烧瓶中, 加入 60 mL 二氯甲烷于 50℃ 下回流提取 1 h。提取液过滤后, 滤液在 50℃ 下旋转蒸发至干, 用乙腈溶解残渣, 并用乙腈定容到 10 mL 备用。

1.5 色谱条件

色谱柱: Phenomenex C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 体积分数 45% 乙腈; 流速: 1.0 mL/min; 柱温: 25℃; 检测波长: 210 nm; 进样量: 5 μL。

2 结果与讨论

2.1 检测波长的确定

以乙腈为空白, 在 200~400 nm 范围内对一定浓度的柠檬苦素和诺米林的标准溶液进行紫外扫描(如图 1 所示)。柠檬苦素和诺米林均在 210 nm 附近有最大吸收, 符合该类物质的特征吸收。

2.2 流动相乙腈浓度的选择

分别以不同比例的乙腈-水为流动相进样, 分析表明, 当乙腈体积分数在 36%~50% 时, 柠檬苦素和

第一作者: 硕士, 助教(戚向阳教授为通讯作者)。

收稿日期: 2007-01-11, 改回日期: 2007-04-04

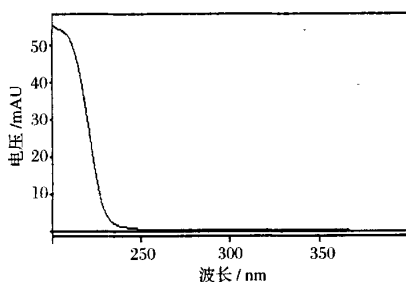
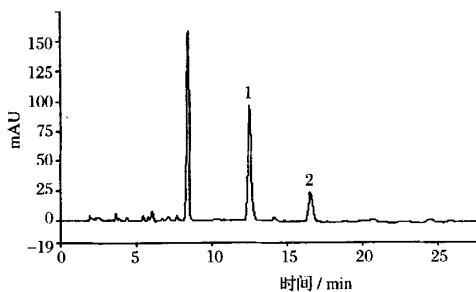
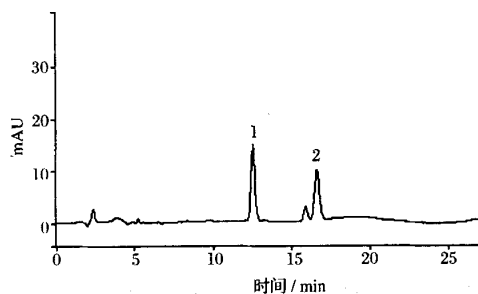


图1 标准品的紫外图谱



峰1 柠檬苦素; 峰2 诺米林

图2 标准品(A)和样品(B)的高效液相色谱图

米林的浓度分别为 24、48、96、144、192 和 22、44、88、132、176 $\mu\text{g/mL}$ 。按照上述方法进行 HPLC 分析,得到以峰面积 Y 对柠檬苦素和诺米林浓度 X ($\mu\text{g/mL}$) 的线性回归方程分别为: $Y=2\,260.5X-3\,020$, $Y=2\,046.6X-2\,316$, 相关系数分别为 0.998 6 和 0.999 2。柠檬苦素和诺米林分别在 24 ~ 192 $\mu\text{g/mL}$ 和 22 ~ 176 $\mu\text{g/mL}$ 范围内线性关系良好。按 $S/N=3$ 计,检测限分别为 27.6 ng 和 25.3 ng。

2.4 精密性与重现性考察

取一定浓度的混合标准溶液 5 μL 进样,平行测定 5 次,以测得的柠檬苦素和诺米林的峰面积 A 为指标,计算相对标准偏差(RSD),以考察方法的精密度,求得 RSD 分别为 2.55% 和 2.30%。取同一批号的供试样品 5 份,进样 5 μL ,以测得的柠檬苦素和诺米林的峰面积 A 为指标,计算相对标准偏差(RSD),以考察方法的重现性,求得 RSD 分别为 1.63% 和 4.52%。该结果表明方法的精密度与重现性均良好。

2.5 回收率实验

向已知柠檬苦素和诺米林含量的样品中加入不同量的混合标液,进行 HPLC 分析,每个样品平行测定 3 次,考察方法的回收率。求得柠檬苦素和诺米林的回收率分别为 97.22% ~ 103.33% 和 98.18% ~ 101.21%。相对标准偏差分别为 0.87% ~ 3.26% 和

诺米林 2 种苷元能够分离开来,但考虑分析时间、乙腈用量和样品中杂质的干扰等因素,本法选择体积分数 45% 乙腈作流动相。该条件下柠檬苦素和诺米林的分离度高,峰形较好,保留时间分别为 12.528 min 和 16.605 min,理论塔板数均在 10 000 以上。标准品和样品的色谱图如图 2 所示。

2.3 标准曲线的绘制

取一定量配制好的标准溶液母液稀释,配制成一列浓度梯度的混合标准溶液。使得柠檬苦素和诺

0.43% ~ 3.65%。该结果表明此方法可行。

2.6 样品的测定

采用高效液相色谱分析方法测定了 5 个柑橘品种不同组织部位中 2 种主要柠檬苦素类似物苷元的含量。5 个品种分别为锦橙(*C. sinensis osbeck* cv. jingcheng)、红葡萄柚(*C. paradisi* macf. var. hongputaoyou)、蜜柑尾张(*C. mandarin* var. weizhang)、琯溪蜜柚(*C. grandis* (L) osbeck. cv. guanximiyou)、脐橙(*C. sinensis* var. navel orange)和酸橙(*C. aurantium* var. suan Cheng)。不同的部位有外皮(flavedo)、内皮(albedo)、瓣膜(segment membrane, SM)、种子(seed)和果肉(juice vesicle, JV)。

由表 2 可知,柠檬苦素类似物苷元的含量因品种、部位和成熟度而异。锦橙、酸橙和红葡萄柚中 2 种苷元的含量明显高于其他品种,尤以酸橙中的含量最高,平均含量高达 1.942 mg/g,蜜柑尾张中含量最少,不到酸橙的 1/2(平均含量仅为 0.877 mg/g)。除果肉外,各品种苷元的平均含量高低顺序依次为:酸橙 > 红葡萄柚 > 锦橙 > 琯溪蜜柚 > 脐橙 > 蜜柑尾张。可见,未成熟果实中 2 种苷元含量高于成熟果实中的含量(蜜柑尾张除外),这可能是由于在成熟过程中,苷元在 UDP-D-葡萄糖转移酶的作用下转化为相应

的糖苷所致^[16]。

一般而言,种子和外皮中苷元的含量高于内皮、瓣膜中的含量,果肉中含量最低,但就琯溪蜜柚而言,外皮中的含量最低,瓣膜中含量最高。其瓣膜中的含量高达 4.847mg/g(干重),比酸橙外皮中的含量还要高 0.17mg/g(干重),其外皮中的含量低于红葡萄柚果肉中的含量[0.124 mg/g(干重)],仅与红葡萄柚内皮中的含量[0.093 mg/g(干重)]相当。

表 2 不同柑橘品种(干重)中柠檬苦素类似物苷元的分析
mg/g(干重)

样 品	柠檬苦素	诺米林	平均含量	含量高低顺序
锦 橙	外皮	0.626	2.344	1.644
	内皮	0.244	0.290	
	瓣膜	0.407	0.355	
	种子	1.597	0.713	
红葡萄柚	外皮	0.634	1.065	1.762 (不含果肉)
	内皮	0.049	0.044	
	瓣膜	0.869	0.741	
	种子	2.616	1.028	
	果肉	0.088	0.036	
脐 橙	外皮	0.908	1.726	1.010
	内皮	0.090	0.067	
	瓣膜	0.426	0.242	
	种子	0.364	0.215	
蜜柑尾张	外皮	0.175	1.331	0.877
	内皮	0.181	0.219	
	瓣膜	0.351	0.374	
琯溪蜜柚	外皮	0.050	0.046	1.326
	内皮	0.187	0.050	
	瓣膜	2.973	1.874	
	种子	0.083	0.040	
酸 橙	外皮	0.394	4.283	1.942
	内皮	0.417	0.074	
	瓣膜	0.245	0.026	
	种子	2.245	0.082	

外皮中,柠檬苦素和诺米林的含量相对较高,且通常诺米林的含量高于柠檬苦素,而种子中柠檬苦素的含量高于诺米林。这在酸橙中表现尤为突出,其外皮中诺米林的含量约是柠檬苦素的 11 倍,而种子中诺米林的不足柠檬苦素含量的 1/27。这可能是由于合成柠檬苦素的前体物质诺米林,在茎中合成后,随着成熟度的加深逐渐向果实中转移,并在柑橘中再转化为柠檬苦素的原因^[16]。

柠檬苦素和诺米林形成的“延迟苦味”,严重影响着柑橘产业的发展。了解不同品种柑橘中 2 种苦味成分的含量与分布,有利于柑橘类产品加工时原料的选择及橘类资源的综合利用。当以获取柑橘汁为目

的时,应选用柠檬苦素类似物苷元含量低的品种,同时应尽可能少破坏果皮和种子,以免使果皮和种子中的柠檬苦素类似物进入柑橘汁中,增加其苦味,降低柑橘汁品质。而对于提取柠檬苦素类似物则应选用其含量较高的品种,其种子和果皮为最佳材料。

参 考 文 献

- Haswgawa F, Berhow M A, Fong C H. Modern Methods of Plant Analysis[M]. Berlin: Springer, 1996. 18:60~80
- Miller E G, Sanders A P G, Couvillon A M, et al. Limonoids as Inhibitors of Oral Carcinogenesis[J]. Food Technol, 1994, 48:110~114
- Miller E G, Lam L K T, Zang J, et al. Citrus limonoid reduction of chemically induced tumorigenesis[J]. Food Technol, 1994, 11:104~108
- Jun Y, Lmmin W, Rosemary L W, et al. Antioxidant activity of citrus limonoids, flavonoids, and coumarins[J]. J Agric Food Chem, 2005, 53:2 009~2 014
- Sun C D, Chen K S, Chen Y, et al. Contents and antioxidant capacity of limonin and nomilin in different tissues of citrus fruit of four cultivars during fruit growth and maturation[J]. Food Chemistry, 2005, 93(4):599~605
- Govindachari T R, Suresh G, Gopalakrishnan G S, et al. Antifungal activity of some tetranortriterpenoids[J]. Fitoterapia, 2000, 71:317~320
- Limnoids strongly inhibit HIV protease activity[N]. Health & Medicine Week, 2004-02-09
- Battinelli L, Mengoni F, Lichtner M. Effect of limonin and nomilin on HIV-1 replication on infected human mononuclear cells[J]. Planta Med, 2003, 69:910~913
- Ohta H. Thin-layer and high-performance liquid chromatographic analyses of limonoids and limonoid glucosides in Citrus seeds[J]. J Chromatogr, 1993, 639:295~302
- Abbasi S, Zandi P, Mirbagheri E. Quantitation of limonin in Iranian orange juice concentrates using high-performance liquid chromatography and spectrophotometric methods[J]. European Food Research and Technology, 2005, 211(1~2):202~207
- Weiler E W, Mansell R E. Radioimmunoassay of limonin using a tritiated tracer[J]. J Agric. Food Chem, 1980, 28:543~545
- Schoch T, Manners G H, Hasegawa S. Analysis of limonoid glucosides from Citrus by electrospray ionization liquid chromatography-mass spectrometry[J]. J Agric Food Chem, 2001, 49(3):1 102~1 108
- Moodley V E, Mulholland D A, Raynor M W. Micellar electrokinetic capillary chromatography of limonoid glucosides from citrus seeds[J]. J Chromatog A, 1995, 718:187~193
- Braddock R J, Bryan C R. Extraction parameters and capillary electrophoresis analysis of limonin glucoside and phlorin in citrus by-products[J]. J Agric Food Chem, 2001, 49:5 982~5 988
- Raman G, Cho M, Brodbelt J S. Isolation and purification

of closely related citrus limonoid glucosides by flash chromatography[J]. Phytochemical Analysis, 2005, 16(3): 155~160

16 Moriguchi T, Kita M, Hasegawa S, et al. Molecular approach to citrus flavonoid and limonoid biosynthesis[J]. J Food Agriculture & Environment, 2003, 1(1): 22~25

Determination of Limonoids in Citrus by High Performance Liquid Chromatography

Liu Liang^{1,2}, Qi Xiangyang², Dong Xuyan³, Li Huihui², Liu Chuanju²

1(College of Food Science and Technology, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

2(College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

3(Institute of Oil Crops Research Chinese Academy of Agriculture Sciences, Wuhan, 430062, China)

ABSTRACT High performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of two limonoid aglycosides, limonin and nomilin was established. Limonin and nomilin were separated by Phenomenex C18 (250×4.6mm, 5μm) column with acetonitrile—water, 45 : 55 (V/V) as mobile phase and flow rate was 1mL/min. The column temperature was controlled at 25℃ and the wavelength of detector was set at 210nm. After exploration, the method was feasible, average recovery ratio of limonin and nomilin was 99.91%和 98.28% respectively, RSD was 2.55% and 2.30% respectively. Thus, the content of limonin and nomilin in different citrus were determined, and the satisfied results were obtained.

Key words citrus, HPLC, Limonin, Nomilin

政策
法规
标准

油脂国家标准 2007 年出台食用油配方将公开

包括食用调和油等在内的 59 项油脂国家标准将在 2007 年内出台。届时,市面上出售的各类调和油除了要在商标上标注其原料外,还要提示消费者各类原料所占的比例。

国内食用调和油每年销售额已达 200 亿元,占食用油脂总量的 20%~30%,但它一直沿用 1986 年制定的行业标准。食用调和油一般由数种食用植物油混合而成,其中比较常见的是将芝麻油、花生油、棕榈油等掺入大豆油、菜籽油进行调和。棕榈油一般被认为是油质最差的食用植物油,由于价格低廉,不少厂家常在食用调和油中掺入它以降低成本。除食用调和油外,还有芝麻油、蓖麻籽油、花椒油等 58 项油脂国家标准年内也将出台。此前,花生油、菜籽油、大豆油、葵花籽油、棉籽油、米糠油、红花籽油、玉米油等强制性国家标准 2003~2004 年已在全国推行。

信
息
窗

茶含片面世 茶饮料升级

我国科研人员日前成功研制出茶含片,变传统的“喝”茶为“含”茶,从而为茶叶这种世界性饮料进一步拓展市场创造了可能。

我国是茶叶的故乡,是世界上最早发现茶树和利用茶树的国家。1990 年代以来,随着世界茶叶市场由供不应求变为供过于求,以及人们生活方式的多元化、现代食品加工技术的发展,包括我国在内的许多国家都在研究和开发新型茶叶产品,茶叶逐渐从传统的? 泡茶饮用方式发展到各种各样的茶叶制剂,如袋泡茶、速溶茶、罐装茶水等。

为使茶叶这一古老的产业焕发出新的活力,长期从事茶叶研究的樊华轩副教授经过近十年的研究,成功将现代制药和食品加工新工艺相结合,通过提取茶叶中的茶多酚、生物碱等有效成分,并加入薄荷等物质,精制成茶含片,并获得国家发明专利。

茶含片掩盖了茶叶的苦涩味,变得清凉爽口。经中国药科大学药理室进行的药效学研究和学生、司乘人员的试服试验,结果表明茶含片能兴奋精神,减轻疲劳,消除睡意。

和传统的袋泡茶、速溶茶等相比,这种茶含片携带方便,且制取方法简单,能最大限度利用茶叶的有效成分,市场前景良好。