

不同产地枳实、枳壳中柠檬苦素含量比较研究

施学骄^{1,2}, 刘友平^{1,*}

(1. 成都中医药大学, 成都 611137;

2. 中药资源系统研究与开发利用省部共建国家重点实验室培育基地, 成都 611137)

摘要: 目的: 建立枳实、枳壳中柠檬苦素的含量测定方法, 并测定和比较不同产地枳实、枳壳中柠檬苦素的含量。方法: 采用高效液相色谱法 (HPLC) 测定, 色谱柱为 Hypersil BDS C₁₈ (4.6mm × 200mm, 5μm), 流动相为乙腈-水 (42:58), 柱温 25℃, 流速 1.0mL·min⁻¹, 检测波长为 210nm。结果: 枳实、枳壳中柠檬苦素含量测定方法的线性关系良好, 线性范围和相关系数为 0.0202 ~ 5.05μg (r=0.9999), 回归方程为 Y=709794X-5168.9; 平均回收率为 98.64%, RSD=1.08% (n=6)。结论: 该方法精密度、重现性和分离效果好, 分析快速准确, 操作简便, 可用于枳实、枳壳中柠檬苦素的含量测定。枳实中柠檬苦素含量总体上高于枳壳, 不同产地枳实、枳壳中柠檬苦素含量差别较大。

关键词: 枳实; 枳壳; 柠檬苦素; 高效液相色谱

中图分类号: TS202.3

文献标识码: A

文章编号: 1006-2513(2011)05-0126-04

The determination on limonin in fructus aurantii immaturus and fructus aurantii from different areas

SHI Xue-jiao^{1,2}, LIU You-ping^{1,*}

(1. Chengdu University of T. C. M, Chengdu 611137;

2. The Breeding Base of State Key Laboratory of Resources System Research and Development Utilization of Chinese Herbal Medicines Co-constructioned by The Ministry of Science and Technology of the PRC and Sichuan Province, Chengdu 611137)

Abstract: Objective: To establish the method of detecting the limonin in fructus aurantii immaturus and fructus aurantii; Determine and compare the content of limonin in fructus aurantii immaturus and fructus aurantii from different areas. Methods: HPLC was applied. The column was Hypersil BDS C₁₈ (4.6mm × 200mm, 5μm), the mobile phase was Acetonitrile: H₂O=42:58, the temperature of column was 25℃, the flow rate was 1.0mL·min⁻¹, the detection wavelength was 210nm. Results: The method of determination limonin in fructus aurantii immaturus and fructus aurantii had good linear relationship. The linearity of limonin was in the range of 0.0202 ~ 5.05μg (r=0.9999); regression equation was Y=709794X-5168.9; the average recovery of limonin was 98.64% (RSD=1.08%, n=6). Conclusion: The method has good precision, reproducibility and separation. It is simple, quick and reliable. It can be used for the determination of limonin in fructus aurantii immaturus and fructus aurantii. The content of limonin in fructus aurantii immaturus was generally higher than that of fructus aurantii and the content varied greatly among different areas.

Key words: fructus aurantii immaturus; fructus aurantii; limonin; HPLC

收稿日期: 2011-06-22

* 通讯作者

基金项目: 四川省教育厅自然科学重点项目 (NO.09ZA033)。

作者简介: 施学骄, 男 (1985-), 在读硕士研究生, 从事中药化学成分与质量标准化研究。

柠檬苦素类似物是一类四环三萜类植物次生代谢产物,其中以柠檬苦素和诺米林最具代表性,主要存在于柑橘属的多种植物中,是以苷元和糖苷两种形式存在。其中柠檬苦素苷元是引起苦味的主要物质,而糖苷几乎没有苦味^[1]。研究证明柠檬苦素类似物具有广泛的药理活性,如抗炎、镇痛、抑菌、抗癌等^[2]。随着对柠檬苦素类似物生理活性的研究,国内外对柠檬苦素类似物的开发利用也越加广泛,如作为功能性食品添加剂、杀虫剂^[3]等。柑橘属中柠檬苦素的研究多数集中在柚、柑、柠檬等品种,在食品饮料行业因为其苦味影响口感而作为除杂对象,无形中造成了资源浪费。目前,对同样来源于柑橘属的药食兼备的枳实、枳壳中柠檬苦素的研究较少,通过比较分析不同产地枳实、枳壳中柠檬苦素的含量变化,为枳实、枳壳的综合利用开发提供参考。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

岛津 LC-10A 高效液相色谱仪、CLASS-VP 工作站(日本岛津公司)、SPD-10A 紫外检测器(日本岛津公司);高效液相色谱柱 [Hypersil

BDS C₁₈ (200mm × 4.6mm, 5μm), 大连依利特公司]; KQ-500DE 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司); BP211D (十万分之一)、BP121S (万分之一) 型电子分析天平(德国 Sartorius 公司)。

1.2 试剂

柠檬苦素对照品(成都曼斯特生物科技有限公司,供含量测定用,批号 20100610); 乙腈为色谱纯,水为超纯水;其余试剂均为分析纯。

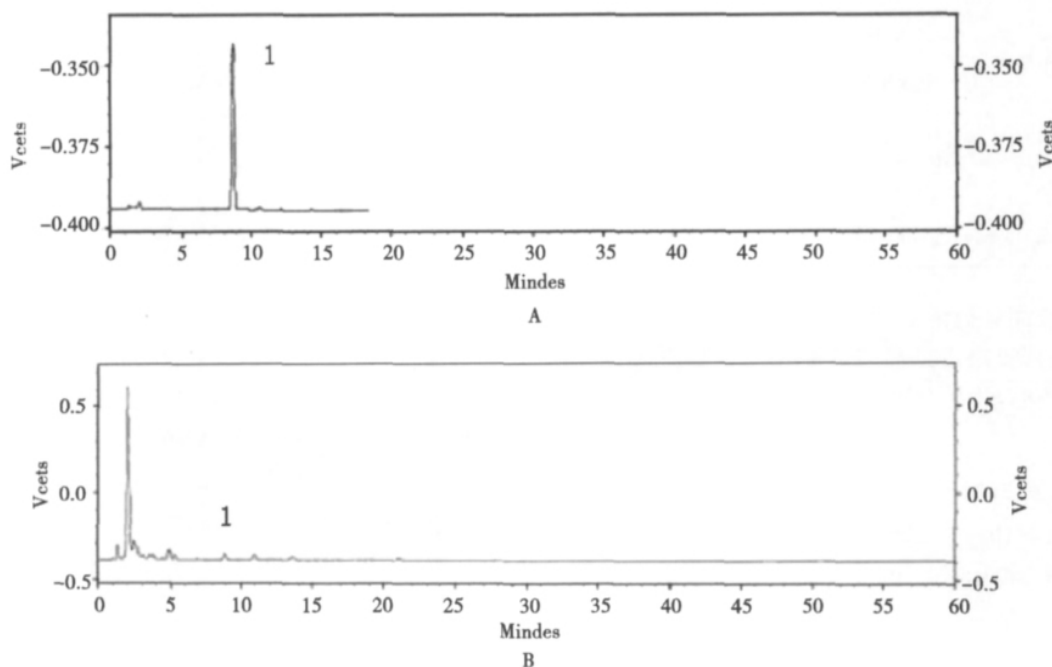
1.3 样品

药材购自不同产地,经成都中医药大学标本馆卢先明教授鉴定为芸香科植物酸橙 *Citrus aurantium* L. 及其栽培变种的干燥未成熟果实。

2 方法与结果

2.1 色谱条件

色谱柱为 Hypersil BDS C₁₈ (4.6mm × 200mm, 5μm); 流动相为乙腈-水(42:58); 检测波长 210nm; 流速 1.0mL · min⁻¹; 柱温 25℃; 进样量 10μL。对照品溶液、样品溶液的色谱图见图 1。



A. 对照品; B. 样品; 1. 柠檬苦素

图 1 对照品、样品溶液色谱图

2.2 对照品溶液的制备

取柠檬苦素对照品适量，精密称定，加乙腈溶解制成浓度为 $1.01\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品储备液。精密吸取对照品储备液，加乙腈稀释成浓度分别为 $10.1\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 、 $0.101\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液。

2.3 供试品溶液的制备

取药材粉末 0.1g ，精密称定，精密加入丙酮 2mL ，室温条件下超声提取 2 次，每次 30min ，离心，合并上清液，减压回收丙酮至干，加乙腈溶解并定容成 5mL ，过微孔滤膜，即得^[4]。

2.4 标准曲线绘制

在上述色谱条件下分别精密吸取各自浓度的对照品溶液适量进样，记录各自峰面积，得回归方程 $Y = 709794X - 5168.9$ ， $r = 0.9999$ ，柠檬苦素含量在 $0.0202 \sim 5.05\mu\text{g}$ 范围内与峰面积积分值呈良好的线性关系。

2.5 精密度试验

取对照品溶液，重复进样 6 次，每次 $5\mu\text{L}$ ，

柠檬苦素峰面积积分值 RSD 为 0.58% 。表明精密度符合要求。

2.6 稳定性试验

取药材粉末，按“2.3”项下的方法制备供试品溶液，室温放置，在 0 、 2 、 4 、 6 、 8 、 12h 分别进样 $10\mu\text{L}$ ，测得柠檬苦素含量的 RSD 为 0.93% 。实验表明样品溶液在 12h 内基本稳定。

2.7 重复性试验

取药材粉末，精密称取 6 份，分别按“2.3”项下的方法制备供试品溶液，分别测定柠檬苦素含量，测得柠檬苦素含量的 RSD 为 1.03% 。

2.8 加样回收率试验

取已知柠檬苦素含量的药材粉末 6 份，每份 0.05g 。精密称定，精密加入 $0.101\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的对照品溶液 1mL ，分别按“2.3”项下的方法制备供试品溶液，计算加样回收率。结果见表 1。

表 1 柠檬苦素加样回收率试验结果 ($n=6$)

样品号	样品含量/mg	加入量/mg	测得量/mg	回收率/%	$\bar{x}/\%$	RSD/%
1	0.10002	0.101	0.19804	97.05	98.64	1.08
2	0.09994	0.101	0.20001	99.08		
3	0.09996	0.101	0.20107	100.11		
4	0.10006	0.101	0.19984	98.79		
5	0.09992	0.101	0.19875	97.85		
6	0.10008	0.101	0.20004	98.97		

2.9 样品含量测定

精密吸取供试品溶液 $10\mu\text{L}$ 进样，按上述色谱条件测定样品含量。结果见表 2。

3 结果与讨论

(1) 由于产地、品种、不同果实部位等因素，导致柑橘属中柠檬苦素含量存在差异^[5-6]。种子中含量最高，达到干重的 $0.5\% \sim 1.0\%$ ，在果实组织中为 $0.05\% \sim 0.2\%$ ，囊衣中的含量远远高于果皮，果肉中含量低于果皮，而在果汁中含量最低，仅为 $1 \sim 50\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。以上含量测定

结果表明，同一产地的枳实比枳壳中柠檬苦素含量要高，不同产地枳实、枳壳药材中柠檬苦素含量存在差异，枳实中柠檬苦素含量总体高于枳壳。其中湖南产枳实中柠檬苦素含量较高，达到 1.57% ；江西产枳壳中柠檬苦素含量较高。通过与以往文献中柑橘属其它品种柠檬苦素的含量比较发现，酸橙枳实中柠檬苦素的含量总体上要高，枳实有进一步开发成天然功能性食品添加剂的潜力，但柑橘属中其他品种间柠檬苦素的含量差异有待进一步深入研究。

表2 不同产地枳实、枳壳中柠檬苦素百分含量 (%)

编号	药材来源	柠檬苦素
S-1	重庆荣昌	0.87
S-2	重庆璧山	0.50
S-3	重庆铜梁	0.40
S-4	成都荷花池药市	1.27
S-5	成都荷花池药市	1.02
S-6	成都金堂	0.37
S-7	简阳	0.52
S-8	遂宁	0.20
S-9	湖南沅江三眼塘	1.57
S-10	湖南新宁县	1.09
S-11	江西	0.95
S-12	广西	0.60
K-1	重庆荣昌	0.24
K-2	重庆江津	0.27
K-3	重庆铜梁	0.04
K-4	重庆璧山	0.14
K-5	四川内江	0.31
K-6	成都荷花池药市	0.49
K-7	湖南沅江三眼塘	0.15
K-8	江西	0.47

注 “S” 表示枳实, “K” 表示枳壳。

(2) 选择流动相时, 发现甲醇-水的流动相体系不如乙腈-水的分离效果好, 适当调整乙腈-水的比例可以实现供试品溶液中柠檬苦素色谱峰的良好分离。

参考文献:

- [1] BERNAY S. Limonin [J]. Annalen, 1841, 40: 317-319.
- [2] 赵雪梅, 费洪荣, 王桂玲, 等. 柑桔属中柠檬苦素类化合物研究进展 [J]. 中国药房, 2007, 18 (36): 2860-2862.
- [3] Alford A R, Murray K D. Prospects for citrus limonoids in insect pest management [J]. ACS Symp Ser, 2000, 758: 201.
- [4] 江萍. 柑橘幼果中主要功能性成分分析及抗氧化作用的研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2008.
- [5] 彭腾, 邱建平, 李鸿翔, 等. 川产柑橘属不同品种成熟果皮中柠檬苦素的含量测定 [J]. 成都中医药大学学报, 2010, 33 (3): 69-71.
- [6] 刘亮, 戚向阳, 董绪燕, 等. 高效液相色谱法测定柑橘属中的柠檬苦素类似物 [J]. 食品与发酵工业, 2007, 33 (4): 130-133.
- [7] 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.

《中国食品添加剂》杂志—双核心期刊, 欢迎投稿!