

文章编号 :1009-038X(2000)01-0076-04

甜橙种子中柠檬苦素类似物 配糖体的测定^{*}

田庆国¹, 丁霄霖¹, 陶冠军², 王林祥², 戴 军²

(1. 无锡轻工大学食品学院,江苏无锡 214036; 2. 无锡轻工大学测试中心,江苏无锡 214036)

摘 要 利用液质联用(LC-ESI-MS)技术对甜橙种子的乙醇提取物进行了检测,从中发现了两种柠檬苦素类似物的配糖体——奥巴叩酮配糖体和诺米林配糖体.采用¹³C和¹H核磁共振谱法对化合物的结构进行了进一步证实.

关键词:液质联用;制备液相色谱;柠檬苦素类似物配糖体;奥巴叩酮配糖体

中图分类号:S666.4 **文献标识码**:A

Analysis of Limonoid Glucosides in Seeds of *Citrus sinensis Osbeck* by LC-ESIMS

TIAN Qing-guo¹, DING Xiao-lin¹, TAO Guan-jun², WANG Lin-xiang², DAI Jun²

(1. School of Food Science and Technology, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036;

2. Analytical Center, Wuxi University of Light Industry, Wuxi 214036)

Abstract: Liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry(LC-ESIMS) was applied to characterize the limonoid glucosides in ethanol extract of seeds of *Citrus sinensis Osbeck*. The results show that LC-ESIMS can directly determine the presence of limonoid glucosides without further purification. The method developed in the paper was accurate, fast and convenient.

Key words: liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry(LC-ESIMS); preparative HPLC; limonoid glucosides; obacunone glucoside

柠檬苦素类似物(Limonoids)是存在于芸香科(Rutaceae)和楝科(Meliaceae)植物中的一类三萜类化合物,特别在柑桔属(*Citrus*)中含量丰富^[1].柠檬苦素类似物是引起桔汁苦味的主要原因之一,迄今为止,柑桔属中已分离出36种柠檬苦素类化合物的甙元和17种配糖体^[2].近年来研究表明,柠檬苦素类化合物能够较强地激活体内的主要解毒酶——谷胱甘肽转移酶(GSH-S-transferase)的活性.

大量的动物试验表明,柠檬苦素类化合物具有抑制由化学物质导致的肝癌、小肠癌、口腔癌和皮肤癌等作用^[3~6].由于柠檬苦素类化合物主要存在于柑桔加工的副产物中,所以是一类开发价值很高的生理活性物质.特别是柠檬苦素类似物的配糖体具有水溶性好、无苦味等特点,更适宜用作功能性食品添加剂.目前日本、美国已报道了柠檬苦素类似物制作功能性食品和饮料的专利^[7],但由于柠檬苦素

^{*} 收稿日期:1999-04-07;修订日期:1999-11-12.

作者简介:田庆国(1968年5月生),男,山东邹平人,食品科学博士研究生.

万方数据

类似物配糖体的极性很强 ,纯化相当困难 ,所以在这方面的研究远远落后于柠檬苦素类似物甙元方面的研究.

作者利用液相色谱(HPLC)和电喷雾质谱(ES-IMS)联用技术对甜橙(*Citrus sinensis* Osbeck)种子的乙醇提取物进行了定向检测 ,发现了甜橙种子中二种主要的柠檬苦素类化合物的配糖体——奥巴叩酮配糖体(obacunone glucoside , OG)和诺米林配糖体(nomilin glucoside , NG) ,采用核磁共振波谱法对所得化合物的结构作了进一步证实.

1 材料与amp;方法

1.1 仪器

platform LCZ 4000 液质联用仪(Waters 公司生产) ,Waters 600 制备液相色谱仪(Waters 公司生产) ,Varian-300 核磁共振仪(Varian 公司生产).

1.2 试剂和药品

氯化钠、甲酸、浓盐酸、氢氧化钠、无水乙醇均为分析纯 ;乙腈为色谱纯 ;D 3520 大孔吸附树脂、D 301 弱碱性阴离子交换树脂 ,为南开大学化工厂产品.

1.3 分析条件

HPLC 色谱条件 C18 柱($D 4.6\text{ mm}\times 20\text{ cm }5\text{ }\mu\text{m}$,Waters) ;流动相体积比为乙腈 :水 :甲酸 = 15 : 85 : 0.02 ;流速为 $1\text{ mL}/\text{min}$;检测波长 210 nm ,二极管阵列检测器 ;液相色谱的流出组分经三通分流 ,使进入质谱的流速为 $10\text{ }\mu\text{L}/\text{min}$.

质谱条件 ESI + ;毛细管电压 3.5 kV ;脱溶温度 $280\text{ }^{\circ}\text{C}$;源温 $120\text{ }^{\circ}\text{C}$;离子能量 0.5 eV ;倍增器电压 650 V ;第一级锥孔电压 45 V ;第二级锥孔电压 5

V ;氮气流量 $3.6\text{ L}/\text{h}$.
制备色谱条件 :色谱柱为 HYPER HS C18 半制备柱($D 20.0\text{ mm}\times 25\text{ cm}$, $10\text{ }\mu\text{m}$,大连依利特科学仪器公司) ;流动相为乙腈-水-三氟乙酸(体积比 25 : 75 : 0.02) ;流速为 $6\text{ mL}/\text{min}$;检测波长 210 nm ;进样体积 $200\text{ }\mu\text{L}$.

1.4 样品处理

将干燥并粉碎的甜橙种子(四川江津产) 1.0 kg 用石油醚($60\sim 90\text{ }^{\circ}\text{C}$)彻底脱脂后 ,用丙酮提取柠檬苦素类似物的甙元 ,然后用 70% 乙醇回流提取 3 次 ,每次 1 h ,合并乙醇提取物 ,把乙醇提取物减压蒸去乙醇 ,过滤除去沉淀析出的黄酮类等化合物 ,滤液用 0.1 mol/L 盐酸调 pH 值至 4.5 ,上 D 3520 大孔吸附树脂色谱柱 ,用去离子水彻底洗去未被吸附的物质 ,再用 70% 乙醇洗脱柠檬苦素类似物配糖体 .将洗脱液减压蒸去乙醇 ,用 0.1 mol/L 氢氧化钠调 pH 值为 6.5 后上 D 301 阴离子交换柱 ,用去离子水洗彻底后改用 0.5 mol/L 氯化钠水溶液洗脱柠檬苦素类似物配糖体 .洗脱液再经 D 3520 吸附树脂柱脱盐 ,用无水乙醇洗脱柠檬苦素类似物配糖体 ,将洗脱液冷冻干燥得 5.12 g 粗品.

用所得粗品配成 $300\text{ mg}/\text{mL}$ 的水溶液 ,取 1 mL 稀释 100 倍后用于 LC-ESIMS 测定 ,进样体积流量 $10\text{ }\mu\text{L}/\text{min}$,色谱图和总离子流图见图 1 ,质谱图见图 2 3 所示 .针对奥巴叩酮配糖体和诺米林配糖体组分进行制备高效液相色谱纯化 .共进样 0.6 mL 收集两个主要组分 ,经冷冻干燥得组分 I 15.4 mg 组分 II 62 mg .并把所收集组分再用 LC-ESIMS 检测.

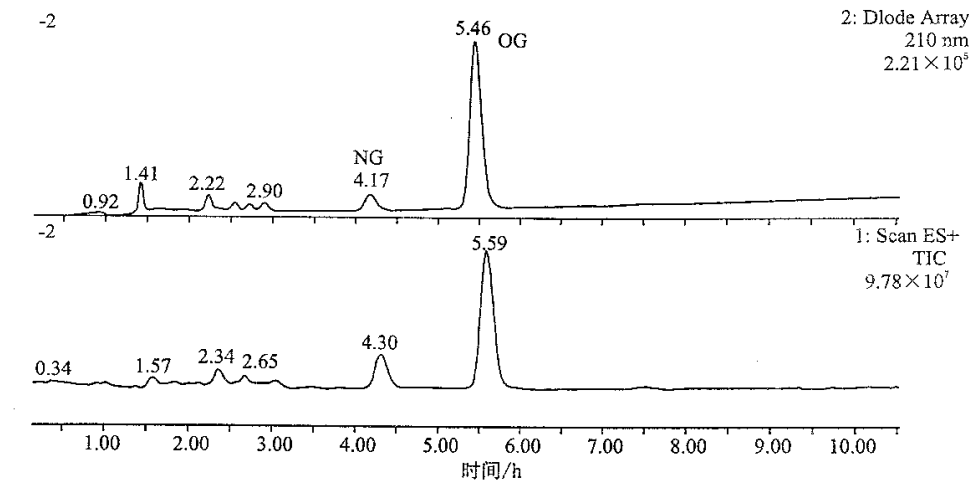


图 1 液相色谱图及总离子流图
万方数据 Fig.1 LC and TIC spectra of ethanol extract of seeds of *Citrus sinensis* Osbeck

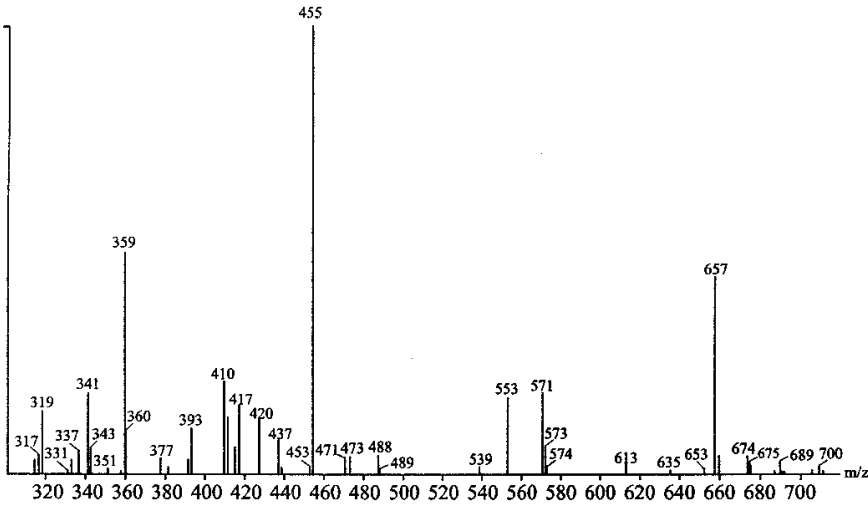


图 2 奥巴叩酮配糖体的质谱图

Fig.2 ESI-MS spectrum of obacunone glucoside

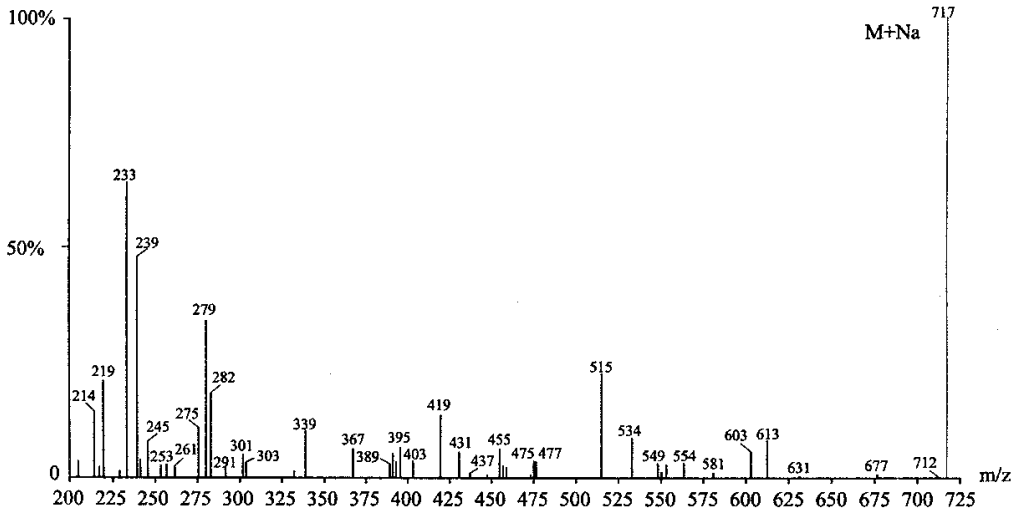


图 3 诺米林配糖体的 ESI/MS 图

Fig.3 ESI-MS spectrum of nomilin glucoside

2 结果与讨论

2.1 结果

质谱中发现存在奥巴叩酮配糖体(657 ,M + Na)和诺米林配糖体(717 ,M + Na).

1) 组分 I 核磁共振数据

¹H NMR(DMSO-d₆ , δ , 90 °C 测定): α-呋喃 : 7.512 , 7.427 ; β-呋喃 : 6.538 ; H-1 : 6.392(d , J 12.6) ; H-2 : 5.877(d , J 12.3) ; H-17 : 5.137 ; 葡萄糖 H-1 : 4.101(d , J 7.8) ; H-15 : 3.054 ; C-甲基氢 : 1.382 , 1.343 , 1.288 , 1.057 , 0.801 . ¹³C NMR(DMSO-d₆ , δ , 90 °C 测定) 208.030(C-7) , 168.728(C-16) , 164.94(C-3) , 149.86(C-1) , 141.24(C-21) , 140.35(C-23) , 125.71(C-20) , 119.14(C-2) , 112.23

(C-22) , 104.06(Glucose C-1) , 82.82(C-4) , 77.57(C-17) , 70.48(C-14) , 61.26(Glucose C-6) , 57.01(C-15) , 51.04(C-8) , 50.96(C-5) , 46.34(C-9) , 44.044(C-13) , 44.04(C-10) , 39.57(C-6) , 16.95(C-11) , 26.35(C-12) , C-甲基 : 29.55 , 25.03 , 22.81 , 19.03 , 14.77 ; 葡萄糖 C2-C4 : 76.63 , 75.84 , 73.80 , 70.28

以上数据均与文献^[8]报道的奥巴叩酮配糖体的氢谱和碳谱一致. 结构见图 4.

2) 组分 II 核磁共振数据

¹H NMR(DMSO-d₆ , δ , 90 °C 测定): 7.499 , 7.415 β-呋喃 : 6.524 ; H-1 : 4.683(d , J 6.6) ; H-17 : 5.15 ; H-15 : 3.048 ; 乙酰基氢 : 2.023 ; C-甲基氢 : 0.800 , 0.982 , 1.32 , 1.352 , 1.432 ; 葡萄糖 H-1 : 4.

099(d, J7.2)

以上数据与文献报道的诺米林配糖体的氢谱数据一致^[8], 结构见图 5。

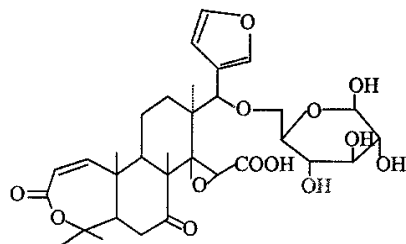


图 4 奥巴叩酮配糖体的结构式

Fig.4 Structure of obacunone glucoside

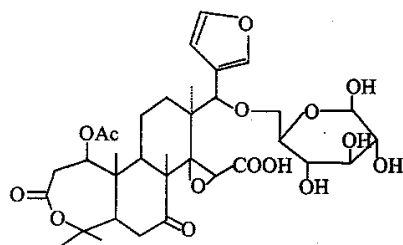


图 5 诺米林配糖体的结构式

Fig.5 Structure of nomilin glucoside

2.2 讨论

2.2.1 酸对色谱条件的影响 在 LC-ESIMS 测定中, 流动相中添加适量的酸对峰形保持和分离效果是必需的, 单从分析角度看, 磷酸、三氟乙酸及甲酸可以起同样的作用, 但是不挥发的缓冲液如磷酸不能使用, 因为它会导致质谱离子电流降低和取样孔

阻塞。使用三氟乙酸需经柱后衍生, 否则离子流信号很低。甲酸和丙酸是较适合的酸。在制备液相中也必须用易于挥发性的酸, 否则冷冻干燥过程中不能将酸除去, 影响下一步的纯化和测定。由于三氟乙酸沸点较低, 所以选用三氟乙酸。

2.2.2 电喷雾电离方式(ESI) LC-MS 采用电喷雾电离接口方式具有很大的优点, ESI 是一种非常软的电离方式, 可以很方便地用于强极性、难挥发性化合物的离子化, 是用质谱进行大分子化合物相对分子质量测量的一个重大突破。通常的电离方式如 EI 法, 根本无法得到柠檬苦素类似物配糖体的分子离子峰。ESI 电离方式的出现使这一问题迎刃而解。另外, ESI 电离方式样品用量极少, 不易污染离子源, 谱图干净, 灵敏度高, 它的检测限可达 $10^{-15} \sim 10^{-12}$ g。不论是一般的天然有机极性小分子或者是生物大分子都能进行相对分子质量测定。

2.2.3 LC-ESIMS 测定的缺陷 ESI 作为 LC-MS 接口, 其灵敏度受流动相组分和流速的影响较大, 流速增加, 洗脱液中水在甲醇或乙腈中的比例升高, 灵敏度显著降低。所以 HPLC 部分和质谱部分的匹配问题是一个关键因素。

3 结 论

LC-MS 联用技术是一种快速灵敏的检测技术, 不用标样就可直接对物质进行定性分析。可以避免样品繁杂的纯化, 结果准确, 可靠、迅速。

参考文献

- [1] CHAMPANE D E, KOUL O, ISMAN M B, et al. Biological activity of limonoids from rutales[J]. *Phytochemistry*, 1992, 31: 377~394
- [2] HASEGAWA S, MIYAKE Y. Biochemistry and biological functions of citrus limonoid[J]. *Food Rev Int*, 1996, 12: 413~435
- [3] LAM L K T, LI Y, HASEGAWA S. Effect of citrus limonoids on glutathione transferase in mice[J]. *J Agric Food Chem*, 1989, 37: 878~880
- [4] MILLER E G, FANOUS R, RIVERA-HIDALGO F, et al. The effect of citrus limonoids on hamster buccal pouch carcinogenesis[J]. *Carcinogenesis*, 1989, 10: 1535~1537
- [5] LAM L K T, HASEGAWA S. Inhibition of benzo[α]pyrene-induced forestomack neoplasia in mice by citrus limonoids[J]. *Nutr Cancer*, 1989, 12: 43~47
- [6] MILLER L K T, GONZALES-SANDERS A P, Couvillon A M, et al. Inhibition of hamster buccal pouch carcinogenesis by limonin 17- β -D-glucopyranoside[J]. *Nutr Cancer*, 1992, 1: 1~7
- [7] HASEGAW Shin, LUKE K T. Antitumor agents[P]. 美国专利: USP 5041425.
- [8] HASEGAWA S, BENNETT R D, HERMAN Z et al. Limonoid glucosides in citrus[J]. *Phytochemistry*, 1989, 28: 1717~1720.