

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2018.06.028

# 藏红花侧芽中 L-瓜氨酸的提取与测定

李数数<sup>1</sup>, 王 静<sup>1</sup>, 侯 静<sup>1</sup>, 彭 彤<sup>1</sup>, 何韵云<sup>1</sup>, 魏 琴<sup>2</sup>, 白 洁<sup>1</sup>

(1. 四川大学生命科学学院 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610065;

2. 宜宾学院 香料植物资源开发与利用四川省高校重点实验室, 宜宾 644000)

**摘要:** 对藏红花(*Crocus sativus* L.)侧芽中的 L-瓜氨酸进行定性定量分析, 并对提取方法进行优化. 样品采用超声波法提取, 2,4-二硝基氟苯(FDNB)柱前衍生, 通过超高效液相色谱进行分析. 实验结果表明 L-瓜氨酸在 0.98~62.50 μg/mL ( $R^2 = 0.9998$ ) 范围内线性关系良好, 检测限(S/N=3) 0.2440 ng/mL, 样品平均回收率为 101.15% ( $n=6$ ,  $RSD=1.00\%$ ). 藏红花侧芽中含有丰富的 L-瓜氨酸, 提取条件经优化后, 测得藏红花侧芽中 L-瓜氨酸的含量约为 26.69 mg/g.

**关键词:** 藏红花侧芽; L-瓜氨酸; 超高效液相色谱法; 提取; 含量测定

中图分类号: Q945 文献标识码: A 文章编号: 0490-6756(2018)06-1297-04

## Extraction and determination of L-citrulline in the lateral bud of saffron

LI Shu-Shu<sup>1</sup>, WANG Jing<sup>1</sup>, HOU Jing<sup>1</sup>, PENG Tong<sup>1</sup>, HE Yun Yun<sup>1</sup>, WEI Qin<sup>2</sup>, BAI Jie<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory Bio-resources and Eco-environment of Ministry Education,

College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610065, China; 2. Key Lab of Aromatic Plant Resources Exploitation and Utilization in Sichuan Higher Education, Yibin University, Sichuan 644000, China)

**Abstract:** L-citrulline in the lateral bud of saffron was quantitatively analyzed for the first time and the extraction method was optimized. After ultrasonic extraction, the samples were derived with 2,4-dinitrofluorobenzene (FDNB) and analyzed by Ultra High Performance Liquid Chromatography. The results showed that a good linear relationship was obtained for L-citrulline in the concentration range of 0.98~62.50 μg/mL with  $R^2 = 0.9998$ , the detection limit of L-citrulline was 0.2440 ng/mL (S/N=3), and the average recovery was 101.15% ( $n=6$ ,  $RSD=1.00\%$ ). After the extraction method was optimized, the content of L-citrulline in the lateral bud of saffron was determined to be about 26.69 mg/g.

**Keywords:** Lateral bud; L-citrulline; Ultra-high performance liquid chromatography; Extraction; Content determination

## 1 引言

藏红花(*Crocus sativus* L.)又名西红花、番红花,是鸢尾科番红花属多年生球茎类草本植物,其柱头自古以来就作为药材、香料或染料被广泛应用<sup>[1]</sup>. 生产 1kg 柱头需要将近 150000 朵花,因其产

量低,资源有限,致使其价格昂贵,素有“植物黄金”之称. 但在生产过程中也产生大量副产物,约 350kg 花被,1500kg 叶子<sup>[2]</sup>以及大量侧芽. 已有研究表明这些副产物在抗氧化、抗肿瘤、抗衰老、抗癌、抑菌等方面<sup>[3]</sup>表现出较好的效果. 另外,藏红花还含有丰富的氨基酸,其中作为次级代谢产物或者

收稿日期: 2017-12-05

基金项目: 四川省高校重点实验室开放基金(2016XLZ002); 西红花规模化生产技术服务(HS20100601106684)

作者简介: 李数数(1992-),女,河南驻马店,硕士研究生,主要研究天然产物领域. E-mail: 2522308792@qq.com

通讯作者: 白洁. E-mail: baijie@scu.edu.cn

中间代谢产物的非蛋白质氨基酸与制药、临床及食品领域的相关性不可忽视<sup>[4]</sup>。

L-瓜氨酸(L-citrulline)首次从西瓜中发现,是人体内非蛋白质氨基酸,也是人体尿素循环的一个重要中间代谢物,具有增强男子性能力,促进血液循环,保护心血管,抗衰老,提高免疫力和护肤去斑等重要作用<sup>[5]</sup>。L-瓜氨酸不能从蛋白质食物中摄取,可以在肝脏和肠道内通过其它氨基酸转化而来,广泛存在于葫芦科植物中<sup>[6]</sup>,天花粉<sup>[7]</sup>、核桃幼苗中也存在一定含量的 L-瓜氨酸<sup>[8]</sup>。李蒙蒙等<sup>[9]</sup>对 195 份二倍体西瓜种质资源的瓜氨酸含量进行测定,结果表明瓜氨酸含量为 0.49~2.55 mg/g。Rimando 等<sup>[10]</sup>对不同品种西瓜果肉和果皮中瓜氨酸含量进行测定,结果表明果肉鲜重含量 1.00~3.50 mg/g,干重 7.90~28.50 mg/g;果皮鲜重含量 0.80~1.50 mg/g,干重含量 15.60~29.40 mg/g。

由于藏红花球茎侧芽生长会影响来年球茎的大小和质量,因此生产上会摘除侧芽促使球茎增大<sup>[11]</sup>。藏红花侧芽作为废弃物而被丢弃,不仅带来了环境压力,也是对潜在资源的极大浪费。目前还未见藏红花侧芽中有 L-瓜氨酸的报道,本研究对藏红花侧芽中 L-瓜氨酸的提取方法进行优化并利用超高效液相色谱进行定量分析,为提高藏红花副产物侧芽的资源利用率提供科学依据。

## 2 材料与方法

### 2.1 材料

藏红花侧芽(长 10~15cm)于 2016 年及 2017 年购自浙江安吉县,50℃烘干至恒重后用粉碎机粉碎,过 40 目筛后-20℃冰箱保存备用。对照品 L-瓜氨酸(纯度 99%),J&K 百灵威科技;液相用乙腈为色谱级(Fisher Scientific,USA);2,4-二硝基氟苯(FDNB)、碳酸钠( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )、甲酸(FA)、盐酸均为分析纯(成都市科龙化工试剂厂);水为超纯水。

### 2.2 仪器

超高效液相色谱仪(UPLC),配备二极管阵列检测器(PDA)(美国 Waters 公司);KH-300DB 型数控超声清洗器;Mettler-Toledo 分析天平;5418 型离心机(德国 Eppendorf 公司);RM-220 纯水仪(成都威斯达智能公司)。

### 2.3 分析方法

2.3.1 UPLC 色谱条件 色谱柱 kinetex (C18, 150×2.1 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ),梯度洗脱条件采用彭彤<sup>[13]</sup>方法,检测波长为 360 nm;流速为 0.50 mL/

min;柱温:35℃,进样量 1  $\mu\text{L}$ 。

2.3.2 提取条件的选择 将提取剂的 pH、温度和提取时间作为影响因素,以 L-瓜氨酸含量为评价指标,在 pH、提取时间不变的情况下,考察温度对 L-瓜氨酸提取含量的影响。在提取剂的温度和提取时间不变的情况下,考察 pH 对 L-瓜氨酸含量的影响。在提取剂温度、pH 不变情况下,考察提取时间对 L-瓜氨酸含量的影响。

2.3.3 供试品溶液的制备 称取侧芽样品 0.15g,加入 1.50 mL 水(pH=4),20℃超声 30 min 后 12000 r/min 离心 5 min,取上清 100  $\mu\text{L}$  加入 100  $\mu\text{L}$   $\text{Na}_2\text{CO}_3$ (pH=9)及 100  $\mu\text{L}$  0.10%的 FDNB,60℃避光水浴 1 小时进行衍生,加入 700  $\mu\text{L}$  0.40%FA 终止反应。12000 r/min 离心 5 min,离心两次后稀释 100 倍,过 0.22  $\mu\text{m}$  微孔滤膜后 UPLC 分析。

2.3.4 对照品溶液的制备 称取 L-瓜氨酸对照品适量,用水溶解为 0.25 mg/mL 的 L-瓜氨酸对照品溶液;按 2.3.3 方法进行衍生,依次稀释为 62.50、31.25、15.62、7.81、3.90、1.95、0.97  $\mu\text{g/mL}$  的 L-瓜氨酸对照品衍生溶液。

## 3 结果与分析

### 3.1 提取条件分析

3.1.1 温度对瓜氨酸含量的影响 由图 1(a)可知,提取温度对 L-瓜氨酸提取的效率影响较大,随着温度的增加,瓜氨酸含量逐渐下降,40℃后趋于稳定。因此在 20℃以下提取效果较好。

3.1.2 pH 对瓜氨酸含量的影响 由图 1(b)可以看出,当 pH 为 4 时,提取效果最好。

3.1.3 提取时间对瓜氨酸含量的影响 本实验比较了超声时间分别为 5min、10min、20min、40min 以及 60min 时瓜氨酸含量,由图 1(c)可以看出随着时间增加,瓜氨酸含量逐渐上升,40min 后趋于稳定。综合瓜氨酸提取含量、时间成本及能源消耗,本实验选取试验时间为 30min。

### 3.2 线性关系的考察

利用超高效液相色谱仪测定各溶液中 L-瓜氨酸的峰面积(图 2),L-瓜氨酸为主要氨基酸,占总氨基酸含量约 31%。以峰面积的积分平均值为纵坐标,以 L-瓜氨酸对照品浓度为横坐标,绘制瓜氨酸标准曲线:L-瓜氨酸在 0.98~62.50  $\mu\text{g/mL}$  范围内呈良好的线性关系(图 3),其回归方程为: $y = 8.8567x - 2.4799$ ( $R^2 = 0.9998$ ),并以信噪比

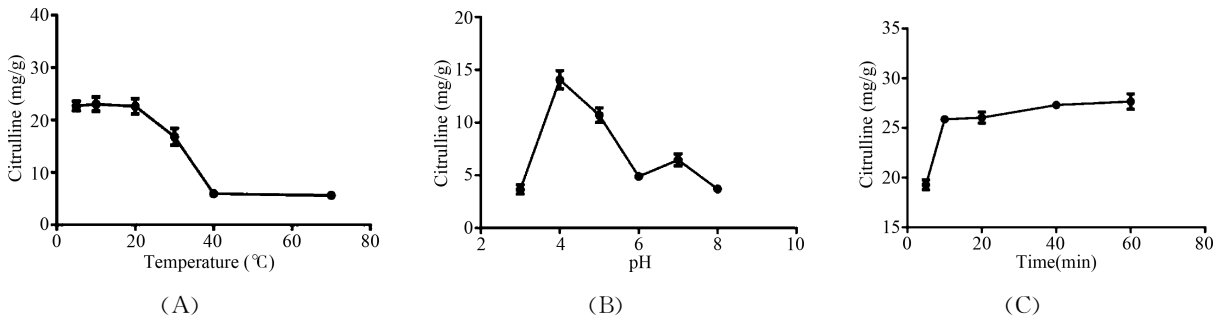


图 1 温度(A)、pH(B)、时间(C)对瓜氨酸含量的影响

Fig. 1 The effect of temperature(A), pH(B), time(C) on citrulline content

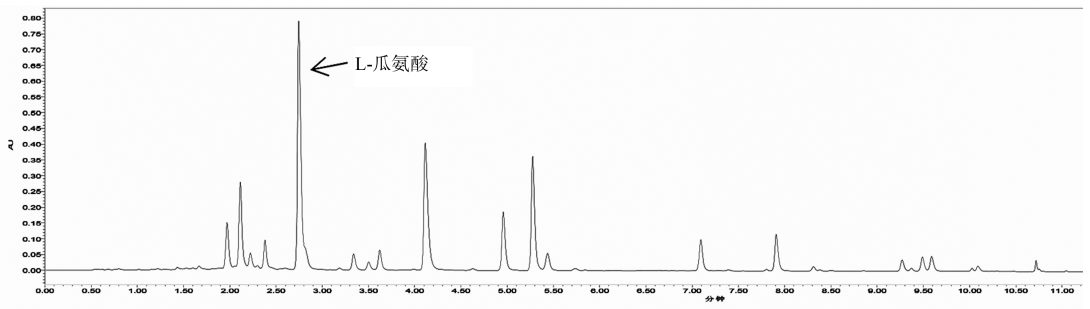


图 2 侧芽超高效液相色谱图

Fig. 2 UPLC chromatogram of the lateral bud of saffron

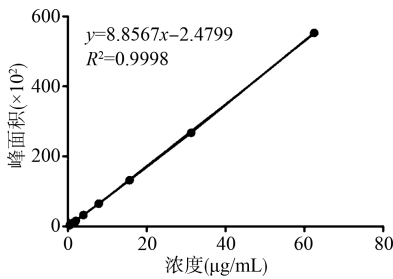


图 3 L-瓜氨酸标准曲线

Fig. 3 Standard curve of L-citrulline

(S/N)等于 3 为标准,测得 L-瓜氨酸的检测限为 0.2440ng/mL.

### 3.3 精密度试验

超高效液相色谱仪精密吸取 L-瓜氨酸对照品溶液 1 $\mu$ L,连续进样 6 次,记录峰面积,测得 L-瓜氨酸峰面积值 RSD 为 0.25% ( $n=6$ ),表明仪器的精密度良好.

### 3.4 稳定性试验

吸取同一份供试品溶液,于 0、2、4、8、24、48 h 分别进样,测定 L-瓜氨酸的峰面积值,测得 RSD 为 0.50% ( $n=6$ ),表明该供试品溶液在 48 h 内稳定.

### 3.5 重复性试验

称取 6 份藏红花侧芽样品,按照相同的提取及衍生条件制备侧芽供试品溶液,测定并计算 L-瓜氨酸的含量,RSD 为 0.39% ( $n=6$ ),表明该处理方

法测定 L-瓜氨酸含量的重复性良好.

### 3.6 加样回收率试验

取供试品溶液,先分别测出其中的 L-瓜氨酸的质量浓度,再加入一定量的 L-氨基酸对照品,按 2:1、1:1、1:2 比例添加,分为低、中、高浓度三个组,按前述方法测定,样品平均回收率为 101.15%,RSD 为 1.00%,结果见表 1.

### 3.7 样品测定结果

通过对温度、pH 及提取时间三种因素的试验分析,确定了最优提取条件为 20 $^{\circ}$ C、pH=4、超声 30min 的方法,使用该方法对藏红花侧芽中 L-瓜氨酸的含量进行测定,测得侧芽中 L-瓜氨酸的含量约为 26.69 mg/g(图 3).同时,对存放一年的去年同一阶段侧芽的瓜氨酸含量也用相同条件进行测定,测得瓜氨酸含量约为 23.15 mg/g,瓜氨酸较为稳定,因此干燥后的侧芽在保存一年期内对瓜氨酸含量影响较小.

## 4 讨论

本实验首次发现藏红花侧芽中的 L-瓜氨酸,通过提取方法的优化,确定了提取方法为水溶剂 (pH=4)、温度 20 $^{\circ}$ C、超声 30min 的方法,测得侧芽中 L-瓜氨酸的含量约为 26.69 mg/g.席冬华等<sup>[12]</sup>优化籽瓜中的 L-瓜氨酸提取条件为溶剂甲醇-1 mol/L 盐酸溶液(9:1,v/v)、料液比 1:40 (g/mL)、

表 1 回收率实验结果  
Tab. 1 Results of recovery test

实验号	本底量 ( $\mu\text{g/mL}$ )	加标量 ( $\mu\text{g/mL}$ )	测得值 ( $\mu\text{g/mL}$ )	回收率 (%)	平均回收率 (%)	RSD (%)
1	2.60	2.45	5.07	100.60		
2	2.60	2.45	5.04	99.63		
3	1.95	3.68	5.70	102.24		
4	1.95	3.68	5.66	100.76	101.15	1.00
5	1.29	4.90	6.26	101.50		
6	1.29	4.90	6.30	102.17		

超声提取时间 30 min. 本实验方法溶剂获取容易, 溶剂比为 1 : 10 (g/mL), 大大节省了溶剂, 20℃ 条件下超声 30min 即可, 操作简单, 提取效率高.

从上世纪 90 年代至今, 全球氨基酸市场始终处于上升趋势, 我国瓜氨酸的市场需求量约为 2000 吨/年, 2011 年仅我国对 L-瓜氨酸的需求量就达到 1800 吨, 其中食品占 76.30%, 医药占 20.1%, 2015 年 L-瓜氨酸全球总销量首次突破 1 万吨, 未来 L-瓜氨酸产品市场潜力巨大, 发展前景广阔, 因此找到丰富的源材料很有必要. 经统计, 每亩藏红花可以产生约 400kg 侧芽, 且藏红花侧芽中 L-瓜氨酸含量高, 在藏红花侧芽中为主要氨基酸, 藏红花侧芽作为富含 L-瓜氨酸的植物源废弃物, 若能得到合理应用, 实现变“废”为“宝”, 必将产生良好的经济、生态和社会效益.

#### 参考文献:

- [1] 曲绮雯, 魏琴, 李数数, 等. 三种提取藏红花废弃物挥发油方法比较[J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2017, 54: 1306.
- [2] Sanchez-Vioque R, Rodriguez-Conde M F, Reina-Urena J V, *et al.* In vitro antioxidant and metal chelating properties of corm, tepal and leaf from saffron (*Crocus sativus* L.) [J]. Ind Crops Prod, 2012, 39: 149.
- [3] Abbasvali M, Ranaei A, Shekarforoush S S, *et al.* The effects of Aqueous and Alcoholic Saffron (*Crocus sativus*) tepal extracts on quality and shelf-life

- of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) during iced storage [J]. J Food Quality, 2016, 39: 732.
- [4] Priscila Del Campo C, Garde-Cerdán T, Sánchez A M, *et al.* Determination of free amino acids and ammonium ion in saffron (*Crocus sativus* L.) from different geographical origins [J]. Food Chem, 2009, 114: 1542.
- [5] 李爱峰, 柳仁民, 张永清. 高效液相色谱-蒸发光散射测定瓜蒌中 L-瓜氨酸的含量 [J]. 食品工业科技, 2013, 34: 314.
- [6] 万学闪, 刘文革, 阎志红, 等. 无籽西瓜果实不同部位瓜氨酸含量测定 [J]. 中国瓜菜, 2010, 23: 11.
- [7] 杨玉琴, 张丽艳, 李健, 等. 不同产地天花粉药材中瓜氨酸的含量测定 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20: 1360.
- [8] Mapelli S, Brambilla I, Bertani A. Free amino acids in walnut kernels and young seedlings [J]. Tree Physiol, 2001, 21: 1299.
- [9] 李蒙蒙, 路绪强, 赵胜杰, 等. 西瓜种质资源的瓜氨酸含量分析及评价 [J]. 果树学报, 2017: 482.
- [10] Rimando A M, Perkins-Veazie P M. Determination of citrulline in watermelon rind [J]. J Chromatogr A, 2005, 1078: 196.
- [11] 余蓓珍, 颜婉如. 不同时期摘除侧芽对番红花球茎重量的影响 [J]. 北京师院学报: 自然科学版, 1985: 75.
- [12] 席冬华, 李维霞, 高晶, 等. 液相色谱-质谱法和高效液相色谱法定性定量测定籽瓜中的 L-瓜氨酸 [J]. 食品科学, 2014, 35: 271.

#### 引用本文格式:

- 中文: 李数数, 王静, 侯静, 等. 藏红花侧芽中 L-瓜氨酸的提取与测定 [J]. 四川大学学报: 自然科学版, 2018, 55: 1297.
- 英文: Li S S, Wang J, Hou J, *et al.* Extraction and determination of L-Citrulline in the lateral bud of saffron [J]. J Sichuan Univ: Nat Sci Ed, 2018, 55: 1297.