

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

席冬华¹, 李维霞¹, 高晶², 阿塔吾拉·铁木尔³, 李玲¹, 吴斌^{3,*}

(1.新疆大学化学化工学院, 新疆 乌鲁木齐 830046; 2.新疆大学理化测试中心, 新疆 乌鲁木齐 830046;

3.新疆农业科学院农产品贮藏加工研究所, 新疆 乌鲁木齐 830091)

摘要: 建立一种非衍生化样品前处理的液相色谱-质谱和高效液相色谱方法, 对籽瓜中的L-瓜氨酸进行定性、定量分析, 通过单因素试验和正交试验优化提取条件。液相色谱-质谱条件: Acuity C₁₈ (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm) 色谱柱; 流动相: 10%乙腈和90%甲醇溶液 (甲醇-水体积比1:1); 流速0.2 mL/min; 柱温: 40 ℃; 进样量10 μL。在电喷雾离子源正模式、多反应监测扫描方式下分析, L-瓜氨酸的定性离子对为 m/z 176.09/158.9, m/z 176.09/112.9, 定量离子对为 m/z 176.09/158.9。高效液相色谱条件: Platisil ODS C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱, 以0.03 mmol/L磷酸为流动相, 流速0.7 mL/min, 柱温30 ℃, 检测波长202 nm。结果表明: L-瓜氨酸标准品在0.5~100 μg/mL范围内线性关系良好 ($R^2=0.999\ 9$), 平均回收率在95.12%~104.21%之间, 相对标准偏差为1.86%~4.75% ($n=3$)。籽瓜中含有丰富的L-瓜氨酸, 本方法测得籽瓜样品中L-瓜氨酸的平均含量为0.656~2.563 mg/g。

关键词: 籽瓜; L-瓜氨酸; 非衍生化; 液相色谱-质谱法; 高效液相色谱法

Identification and Quantitation of L-Citrulline in Seeding Watermelon by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry and Rapid High Performance Liquid Chromatography

XI Dong-hua¹, LI Wei-xia¹, GAO Jing², ATAWULLA·Tiemur³, LI Ling¹, WU Bin^{3,*}

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, Xinjiang University, Ürümqi 830046, China;

2. Center for Physics and Chemistry Analysis, Xinjiang University, Ürümqi 830046, China;

3. Institute of Agro-Products Storage and Processing, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Ürümqi 830091, China)

Abstract: In this work, certification of L-citrulline in seeding watermelon extract by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS), and rapid determination of underivatized L-citrulline in seeding watermelon by high performance liquid chromatography (HPLC) were established. Single factor and orthogonal experiments were used to optimize the extraction conditions. LC-MS-MS analysis was carried out using Acuity C₁₈ (50 mm×2.1 mm, 1.7 μm) as the stationary phase and a mixture of 10% acetonitrile and 90% methanol-water (50:50, V/V) as the mobile phase at a flow rate of 0.2 mL/min with a column temperature of 40 ℃. The electrospray ionization (ESI) source was applied and operated in a positive ion mode. The diagnostic product ions of L-citrulline were m/z 176.09/158.9 and m/z 176.09/112.9. Moreover, the ion pair of m/z 176.09/158.9 was used for quantification. HPLC separation was performed using Platisil ODS C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) as the stationary phase and 0.03 mmol/L phosphoric acid as the mobile phase at a flow rate of 0.7 mL/min with a column temperature of 30 ℃, and the detection wavelength was set at 202 nm. The results showed that a good linear relationship was obtained for L-citrulline in the concentration range of 0.5–100 μg/mL with $R^2 = 0.999\ 9$. Average recoveries varied from 95.12% to 104.21% with RSD of 1.86%–4.75% ($n = 3$). The content of L-citrulline in seeding watermelon was determined to be 0.656–2.563 mg/g.

Key words: seeding watermelon; L-citrulline; non-derivatization; liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS-MS); high performance liquid chromatography (HPLC)

中图分类号: O657.72

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2014) 24-0271-06

doi:10.7506/spkx1002-6630-201424052

收稿日期: 2014-03-21

基金项目: 新疆维吾尔自治区公益性科研院所基本科研业务费专项 (KY2013045; KY2014038)

作者简介: 席冬华 (1990—), 女, 硕士研究生, 研究方向为天然产物的分析。E-mail: 553764469@qq.com

*通信作者: 吴斌 (1973—), 男, 副研究员, 博士, 研究方向为农产品贮藏与加工。E-mail: xjuwubin0320@sina.com

瓜氨酸名称来源于西瓜的拉丁名 *Citrullus vulgaris*, 是首先从西瓜汁中发现的人体内非蛋白质 α -氨基酸, 它具有肽键形成的能力, 但是不参与蛋白质的合成, 与大多数氨基酸构像一样为L型, 故又称为L-瓜氨酸^[1]。L-瓜氨酸具有防治前列腺疾病, 提高男性性功能、抗衰老、增强免疫力、保持胆固醇正常、诊断类风湿性关节炎、维护关节运动技能、平衡正常的血糖水平、提高脑力清晰度、护肤祛斑等功效^[2]。L-瓜氨酸可以通过化学合成^[3]、发酵法、酶法合成^[4]和天然产物分离提取^[5-6]等方法获得。化学合成L-瓜氨酸的方法存在产品纯度不够和环境危害, 应用受到限制; 发酵法生产的难点在于单位体积L-瓜氨酸产率低, 最高仅为1.7 g/L, 成本较高^[7]; 酶法合成L-瓜氨酸产物浓度高, 但是转化率较低, 同时会产生杂酶, 影响瓜氨酸的生产; 而天然产物中分离的L-瓜氨酸纯度较好, 具有绿色、无毒副作用等特点倍受青睐。西瓜、天花粉和栝楼根中含有L-瓜氨酸^[8-9], 但受到原料来源有限和含量不高制约, 生产规模较小。因此找到一种广泛生长的富含L-瓜氨酸的植物也是一种很好的研究方向^[2]。

目前, 分析L-瓜氨酸的方法主要有阿氏法^[10]、薄层色谱法^[11]、酶法^[12]、分光光度法^[6,13]、高效液相色谱 (high performance liquid chromatography, HPLC) 法^[14-16]、气相色谱-质谱法^[17]和液相色谱-串联质谱 (liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS-MS) 法^[18-19]等。由于L-瓜氨酸具有高的亲水特性和弱的紫外吸收, 大多数研究报道的分析方法均需要衍生, 衍生过程较复杂, 衍生试剂毒性较高。因此建立一种非衍生化分析检测L-瓜氨酸的方法成为近年来研究方向之一。

籽瓜 (又称打瓜) 是葫芦科西瓜属普通西瓜的栽培变种, 一种极具地域特色的农产品, 籽瓜主要产于中国, 新疆是中国籽瓜最大的产区。目前, 对籽瓜的利用只有取籽加工, 其余约占瓜质量95%以上的部分都作为废物而被丢弃^[20], 造成极大的资源浪费。本实验建立一种非衍生化的前处理LC-MS-MS法对籽瓜中L-瓜氨酸做了定性分析, 以及HPLC方法快速简便测定籽瓜中L-瓜氨酸含量, 为籽瓜功能性成分研究和籽瓜资源的深加工提供了理论依据, 也为植物源L-瓜氨酸的研究与应用提供新的原料来源。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

不同籽瓜品种材料来源见表1; L-瓜氨酸标准品 (纯度 $\geq 98\%$) 中国食品药品检定研究院; 甲醇、乙腈 (均为色谱纯) 霍尼韦尔贸易有限公司; 磷酸、甲醇 (均为分析纯) 天津市福晨化学试剂厂。实验室用水均为高纯水 ($\geq 18\text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$)。

表1 不同品种籽瓜材料
Table 1 Different seeding watermelon cultivars

| 品种代号 | 品种名称 | 产地 | 果实皮色 | 果实瓤色 | 果实籽色 |
|------|------------|-----------------|------|------|------|
| SW1 | 黑大片 | 昌吉垦区 | 墨绿 | 白 | 黑 |
| SW2 | 黑丰1号 (黑大片) | 阿勒泰阿苇滩乡分区农场 | 墨绿 | 白 | 黑 |
| SW3 | 新籽8号 | 塔城也门勒乡 | 黄白 | 白 | 黑 |
| SW4 | 内蒙古中片 | 塔城也门勒乡 | 浅绿 | 白 | 黑 |
| SW5 | 内蒙古中片 | 塔城喀拉哈巴克乡 | 深绿 | 白 | 黑 |
| SW6 | 紫金红 (红中片) | 新疆农业科学院安宁渠综合试验场 | 深绿 | 黄 | 红 |
| SW7 | 红小片 | 昌吉垦区 | 深绿 | 浅黄 | 红 |

1.2 仪器与设备

1260 HPLC仪 (配有可变波长紫外检测器、示差折光检测器和EZChrom Elite工作站) 美国安捷伦公司; Platisil ODS C₁₈ (250 mm \times 4.6 mm, 5 μm) 色谱柱 北京迪马科技有限公司; Quattro Premier LC-MS-MS 联用仪 (配有电喷雾离子源和MassLynx4.1软件操作系统) 美国Waters公司; UV-2600紫外-可见分光光度计 日本岛津公司; DZG-303A “艾柯”实验室专用超纯水仪 成都唐氏康宁科技发展有限公司; Anke GL-20G-II型高速冷冻离心机 上海安亭科学仪器厂; IKA® A 11基本型研磨机 广州仪科实验室技术有限公司; LGJ-10冷冻干燥机 北京松源华兴科技发展有限公司; SK720H型超声波清洗器 上海科导超声仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 样品前处理

将籽瓜清洗去籽, 去表皮, 分离瓜心、瓜瓤和瓜皮, 冷冻, 粉碎, 保存在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱待用。称取1.0 g籽瓜样品, 精确至0.01 g, 置于50 mL离心管, 加入40 mL提取剂 (甲醇-1 mol/L盐酸 (9:1, V/V)) 摇匀后, 超声提取30 min, 加入8 mL 0.5 mol/L的氢氧化钠溶液调节pH值, 用滤纸过滤, 12 000 r/min离心20 min, 取上清液用0.22 μm 有机滤膜过滤, 待测。

1.3.2 标准溶液的配制

精确称取0.020 0 g L-瓜氨酸标准品, 用50%甲醇溶液溶解定容至100 mL, 该储备液质量浓度为200 $\mu\text{g/mL}$, 再依次配制0.5、1.0、5.0、10、20、50、100 $\mu\text{g/mL}$ 一系列不同质量浓度的标准工作溶液。

1.3.3 液相色谱-质谱分析条件

色谱条件: Acuity C₁₈ (50 mm \times 2.1 mm, 1.7 μm); 流动相: 10%乙腈和90%甲醇溶液 (甲醇-水 (1:1, V/V)); 流速0.2 mL/min; 柱温: 40 $^{\circ}\text{C}$; 进样量10 μL 。

质谱条件: 毛细管电压3.0 kV; 脱溶剂温度350 $^{\circ}\text{C}$; 锥孔气流量50 L/h; 干燥气为氮气, 流量为650 L/h, 碰撞气体为氩气, 流量为0.18 mL/min; 电喷雾离子源; 正离子模式扫描; 多反应监测 (multi reaction monitoring mode, MRM) 方式检测。其他参数见表2。

表2 检测L-瓜氨酸的质谱条件
Table 2 MS conditions for the detection of L-citrulline

| 分析物 | 保留时间/min | 母离子(<i>m/z</i>) | 定性离子(<i>m/z</i>) | 定量离子(<i>m/z</i>) | 驻留时间/ms | 锥孔电压/V | 碰撞能量/eV |
|-------|----------|-------------------|--------------------|--------------------|---------|--------|---------|
| L-瓜氨酸 | 0.64 | 176.09 | 176.09>158.9 | 176.09>158.9 | 0.1 | 19 | 12 |
| | | | 176.09>112.9 | | 0.1 | 19 | 16 |

1.3.4 HPLC分析条件

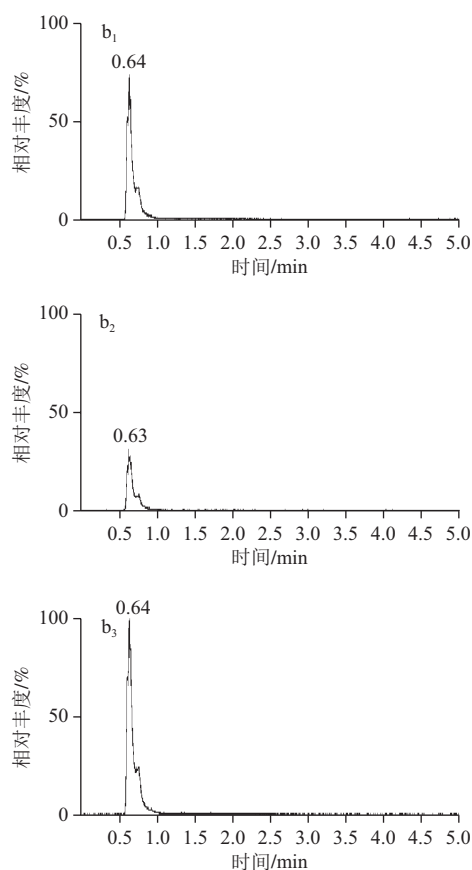
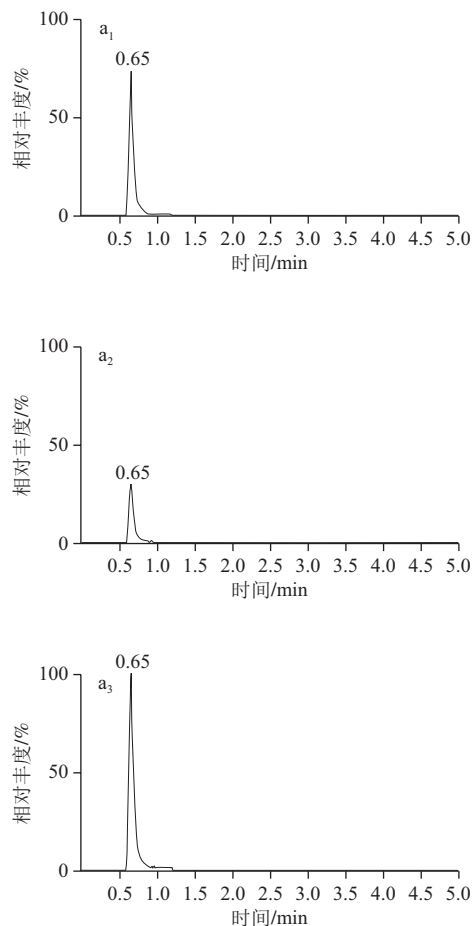
色谱柱: Platisil ODS C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相: 0.03 mmol/L磷酸; 流速: 0.7 mL/min; 柱温: 30 ℃; 检测波长: 202 nm; 进样量20 μL。

1.3.5 提取条件优化

提取条件单因素水平: 提取剂为a(甲醇-1 mol/L盐酸(9:1))、b(甲醇-1 mol/L盐酸(18:1))、c(乙醇-1 mol/L盐酸(9:1))、d(乙醇-1 mol/L盐酸(18:1))、e(pH值为3的盐酸溶液)、f(高纯水); 料液比(g/mL)为1:10、1:20、1:30、1:40、1:50; 提取时间为5、10、20、30、45、60 min(超声时用温度计实时监测温度, 控制温度变化小于5 ℃)。

2 结果与分析

2.1 籽瓜中L-瓜氨酸的鉴定



a. L-瓜氨酸; b.籽瓜样品; 下脚标1、2、3分别为定量/定性离子 *m/z* 176.09/158.9、定性离子 *m/z* 176.09/112.9、总离子流图。

图1 L-瓜氨酸标准品和籽瓜样品MRM色谱图

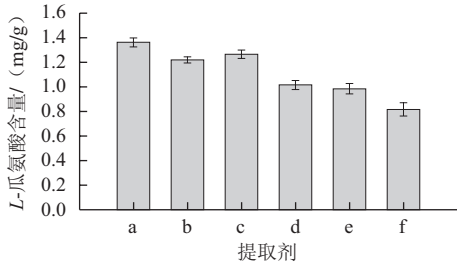
Fig.1 MRM chromatograms of L-citrulline in standard solution and seeding watermelon sample

对1 μg/mL L-瓜氨酸标准物质进行一级全扫描和子离子扫描, 确定L-瓜氨酸的母离子和子离子, 选择两个丰度较高、干扰较少的子离子作为定性离子和定量离子, 其MRM色谱图如图1a所示。将籽瓜瓤样品按样品处理方法处理稀释后, 进样10 μL, 得到MRM色谱图如图1b所示。可以看出籽瓜样品中目标物质的峰与L-瓜氨酸标准品的峰保留时间一致, 选择的特征离子的保留时间及丰度之比与标准品的一致, 确定目标物质为L-瓜氨酸, 该方法能够用于籽瓜样品中L-瓜氨酸的定性分析。在此基础上, 本实验建立了一种快速简便的HPLC方法检测籽瓜中L-瓜氨酸的含量。

2.2 提取条件的优化

以L-瓜氨酸的提取量为指标, 采用单因素试验和正交试验对提取条件进行了优化。由于甲醇的沸点为64.5 ℃, 提取温度过高容易造成提取剂的损失, 影响实验结果, 钱骅等^[9]研究表明25 ℃时瓜氨酸提取率较高, 提取一次即可提取完全。因此选择考察提取剂、料液比和提取时间3个参数。

2.2.1 提取溶剂的优化



a. 甲醇-1 mol/L 盐酸 (9:1); b. 甲醇-1 mol/L 盐酸 (18:1); c. 乙醇-1 mol/L 盐酸 (9:1); d. 乙醇-1 mol/L 盐酸 (18:1); e. pH 值为3的盐酸溶液; f. 高纯水。

图2 提取剂对籽瓜中L-瓜氨酸含量的影响

Fig.2 Effect of extraction solvents on L-citrulline recovery from seeding watermelon

提取液中加入盐酸是为了调节提取液pH值呈酸性, 提取液pH值在L-瓜氨酸等电点 (pH 5.97) 时, 溶解性最低, 提取效果不好, 呈酸性时水溶性增大, 也避免了碱性条件下的糊化现象, 提取效果较好^[5]。如图2所示, 在相同酸性条件下, 由于甲醇穿透细胞壁的能力比乙醇强, L-瓜氨酸的提取量: a高于c, b高于d; 在无机提取剂的条件下, 盐酸溶液提取量比高纯水高, 说明酸性条件下有利于提取L-瓜氨酸, 本实验选择a作提取液。甲醇毒性大, 宜用于分析测试过程中少量提取, 在实际大量生产提取时, 可选择价格低廉、无毒的乙醇或者盐酸溶液做提取溶剂。

2.2.2 料液比的优化

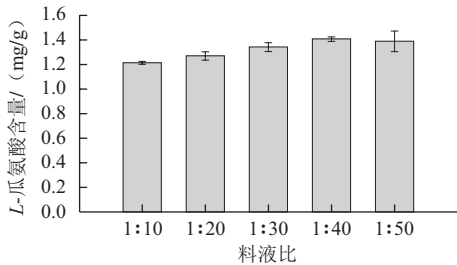


图3 料液比对籽瓜中L-瓜氨酸含量的影响

Fig.3 Effect of material/liquid ratio on L-citrulline recovery from seeding watermelon

由图3可知, 提取液使用量越大, L-瓜氨酸含量越高, 在料液比为1:40时, L-瓜氨酸的含量不再随着提取液用量增大而提高, 提取液浓度太低也会增加后续分离工作的负担, 故选择料液比为1:40提取。

2.2.3 提取时间的优化

由图4所示, 提取时间低于30 min时, L-瓜氨酸的提取量随时间的延长又较明显的提高, 随后呈下降趋势, 可能由于杂质增多影响L-瓜氨酸的提取分离。

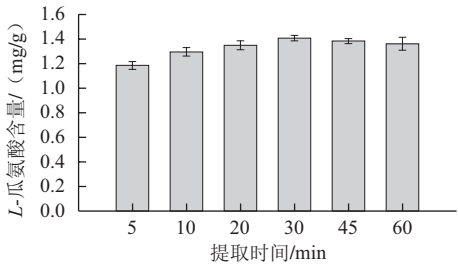


图4 提取时间对籽瓜中L-瓜氨酸含量的影响

Fig.4 Effect of extraction duration on L-citrulline recovery from seeding watermelon

2.2.4 正交试验

在单因素试验基础上, 对提取剂、料液比和提取时间3个因素设计L₉(3³) 正交试验设计及结果见表3。

表3 正交试验设计及结果

Table 3 Results of orthogonal experiments and range analysis

| 试验号 | A料液比 | B提取剂 | C提取时间/min | L-瓜氨酸含量/(mg/g) | 排序 |
|----------------|----------|-------|-----------|----------------|----|
| 1 | 1 (1:30) | 1 (a) | 1 (20) | 1.378 | 5 |
| 2 | 1 | 2 (b) | 2 (30) | 1.236 | 9 |
| 3 | 1 | 3 (c) | 3 (45) | 1.352 | 6 |
| 4 | 2 (1:40) | 1 | 2 | 1.412 | 1 |
| 5 | 2 | 2 | 1 | 1.267 | 7 |
| 6 | 2 | 3 | 3 | 1.386 | 3 |
| 7 | 3 (1:50) | 1 | 3 | 1.392 | 2 |
| 8 | 3 | 2 | 1 | 1.246 | 8 |
| 9 | 3 | 3 | 2 | 1.384 | 4 |
| k ₁ | 1.322 | 1.394 | 1.297 | | |
| k ₂ | 1.355 | 1.250 | 1.344 | | |
| k ₃ | 1.341 | 1.374 | 1.377 | | |
| R | 0.033 | 0.144 | 0.047 | | |

由表3可知, 影响籽瓜中L-瓜氨酸提取量主次因素为B>C>A, 即提取剂为最主要因素, 料液比和提取时间为次要因素。从各因素极差分析结果得出最佳提取条件为A₂B₁C₂, 正交试验中4号试验恰好是此条件的组合, 故最优提取条件为甲醇-1 mol/L盐酸溶液 (9:1, V/V) 作提取剂、料液比1:40、提取时间30 min。

2.3 液相分离条件优化

研究表明C₁₈柱能分离西瓜中的L-瓜氨酸^[14], 为了选择适合分析籽瓜样品的色谱柱, 本实验选用Platisil ODS C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 和Anilent Technologies C₁₈ (100 mm×4.6 mm, 3.5 μm) 色谱柱进行分离实验。实验结果表明Platisil ODS C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm) 分离效果较好。同时考察不同浓度的磷酸的分离效果, 最终确定0.03 mmol/L磷酸作为流动相。通过紫外-可见分光光度计在190~400 nm扫描, 优化检测波长为202 nm。

2.4 标准品及籽瓜中L-瓜氨酸的色谱图

将L-瓜氨酸标准品和籽瓜样品提取液分别注入HPLC仪, 色谱图见图5。可见L-瓜氨酸信号峰能与其他杂质峰分离, 此方法可用来分析籽瓜中的L-瓜氨酸。

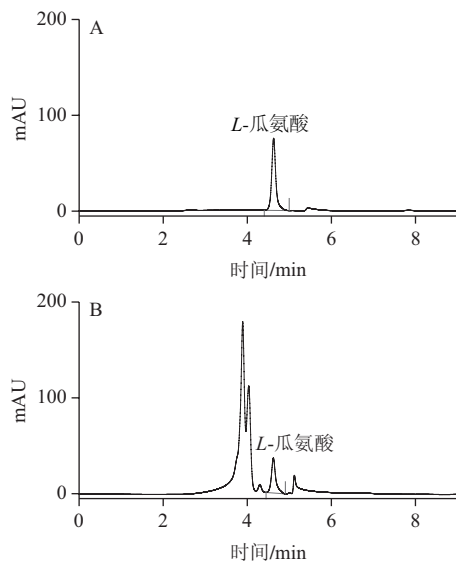


图5 L-瓜氨酸标准品(A)和籽瓜样品(B) HPLC色谱图

Fig.5 Chromatograms of L-citrulline standard (A) and seeding watermelon sample (B)

2.5 方法考察

2.5.1 标准曲线和检出限

外标法以标准品溶液的峰面积 Y 和其质量浓度 $X/(\mu\text{g}/\text{mL})$ 作图,如图6所示,得回归方程 $Y=183\,581.261\,76X+30\,791.954\,61$, $R^2=0.999\,9$ 。将最小质量浓度的标准品溶液无限稀释,按照既定方法进样测定空白和稀释的标准品溶液,计算信噪比,3倍信噪比对应的标准品质量浓度确定的检出限为 $0.02\,\mu\text{g}/\text{mL}$,10倍信噪比对应的标准品质量浓度确定的定量限为 $0.08\,\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

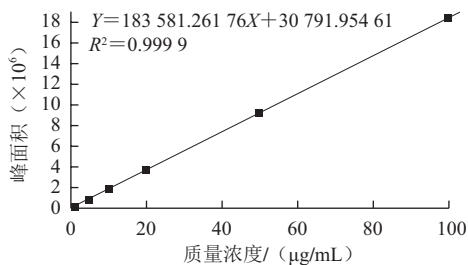


图6 L-瓜氨酸标准曲线

Fig.6 Standard calibration curve of L-citrulline

2.5.2 方法精密度

表4 精密度实验结果 ($n=5$)Table 4 Results of precise tests ($n=5$)

| 标准品 | 峰面积 | |
|----------|----------------------------|----------------------------|
| | 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ | 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ |
| 1 | 1 880 054 | 9 269 571 |
| 2 | 1 864 444 | 9 237 939 |
| 3 | 1 880 357 | 9 217 478 |
| 4 | 1 851 175 | 9 216 725 |
| 5 | 1 854 242 | 9 192 063 |
| 平均值 | 1 866 055 | 9 226 755 |
| 相对标准偏差/% | 0.74 | 0.31 |

在HPLC色谱条件下,分别对 $10\,\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $50\,\mu\text{g}/\text{mL}$ 的L-瓜氨酸标准品溶液,进样量 $20\,\mu\text{L}$,重复进样5次,计算相对标准偏差分别为 0.74% 和 0.31% ,表明仪器精密度高。

2.5.3 重复性实验

精密称取同一籽瓜样品5份,制备成供试样品溶液,用HPLC分别测定,计算相对标准偏差为 3.16% ,表明该方法重复性较好。

表5 重复性实验结果 ($n=5$)Table 5 Results of repeatability tests ($n=5$)

| 样品 | 峰面积 | 平均值 | 相对标准偏差/% |
|----|------------|------------|----------|
| 1 | 11 272 417 | 11 665 534 | 3.16 |
| 2 | 12 120 660 | | |
| 3 | 11 947 475 | | |
| 4 | 11 638 753 | | |
| 5 | 11 348 364 | | |

2.5.4 加标回收实验

在黑丰1号籽瓜的瓜心、瓜瓤和瓜皮样品中分别加入一定量外源标准L-瓜氨酸,然后按照样品溶液测定步骤进行定量分析。根据标准曲线,利用峰面积计算平均回收率和相对标准偏差,见表6。该方法回收率在 $95.12\%\sim 104.21\%$ 之间,相对标准偏差在 $1.86\%\sim 4.75\%$ 之间,表明该方法能准确测定籽瓜中L-瓜氨酸的含量。

表6 加标回收实验结果 ($n=3$)Table 6 Results of recovery tests ($n=3$)

| 样品 | L-瓜氨酸 含量/ (mg/g) | 标准加入 量/ (mg/g) | L-瓜氨酸/ (mg/g) | | 回收 率/% | 相对标准偏 差/% |
|----|-------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|------------------|-----------|--------------|
| | | | 预期值 | 实际值 | | |
| 瓜心 | 1.166 ± 0.006 | 1.000 | 2.166 | 2.155 ± 0.048 | 98.89 | 2.96 |
| | 1.168 ± 0.011 | 0.500 | 1.668 | 1.689 ± 0.042 | 104.21 | 2.54 |
| 瓜瓤 | 1.369 ± 0.030 | 1.000 | 2.369 | 2.347 ± 0.035 | 97.80 | 1.86 |
| | 1.377 ± 0.009 | 0.500 | 1.877 | 1.884 ± 0.052 | 101.41 | 3.27 |
| 瓜皮 | 1.512 ± 0.012 | 1.000 | 2.512 | 2.463 ± 0.043 | 95.12 | 4.75 |
| | 1.507 ± 0.008 | 0.500 | 2.007 | 1.994 ± 0.038 | 97.38 | 3.63 |

2.6 实际样品分析

采用本实验建立的HPLC方法对实际样品进行测试。由表7可见,新疆主要种植的籽瓜品种果实中L-瓜氨酸平均含量在 $0.656\sim 2.563\,\text{mg}/\text{g}$ 。不同品种间瓜氨酸含量差异明显,其中SW6平均含量最高,达到 $2.563\,\text{mg}/\text{g}$,其次是SW1,含量为 $2.374\,\text{mg}/\text{g}$,含量最低的是SW3,只有 $0.656\,\text{mg}/\text{g}$ 。同品种的籽瓜种植在不同产区L-瓜氨酸含量存在差异,见SW1和SW2,SW4和SW5,存在差异的原因可能与气候、土壤、人工管理等因素有关,有待进一步研究。对于同一个籽瓜而言,不同部位的L-瓜氨酸含量有所不同,SW1和SW2中L-瓜氨酸含量:瓜皮>瓜瓤>瓜心;SW3、SW5、SW6和SW7中L-瓜氨酸含量:瓜心>瓜瓤>瓜皮;而SW4则是瓜瓤>瓜心>瓜皮。

表7 不同籽瓜品种果实不同部位L-瓜氨酸含量 (n=3)
Table 7 L-Citrulline contents in different parts of seedling watermelon from different varieties (n = 3)

| 品种代号 | L-瓜氨酸含量 | | | mg/g |
|------|-------------|-------------|-------------|-------|
| | 瓜心 | 瓜瓢 | 瓜皮 | |
| SW1 | 2.304±0.068 | 2.388±0.088 | 2.429±0.071 | 2.374 |
| SW2 | 1.165±0.008 | 1.369±0.030 | 1.512±0.005 | 1.349 |
| SW3 | 0.762±0.020 | 0.639±0.091 | 0.567±0.018 | 0.656 |
| SW4 | 1.424±0.017 | 1.578±0.007 | 1.381±0.024 | 1.461 |
| SW5 | 0.979±0.003 | 0.871±0.022 | 0.568±0.008 | 0.805 |
| SW6 | 2.688±0.009 | 2.587±0.019 | 2.415±0.009 | 2.563 |
| SW7 | 1.783±0.018 | 1.598±0.061 | 1.217±0.010 | 1.533 |

3 结 论

本研究表明，籽瓜中含有丰富的L-瓜氨酸，LC-MS-MS法可对籽瓜中的L-瓜氨酸进行准确定性，HPLC法可以快速、灵敏检测籽瓜中L-瓜氨酸的含量。本方法前处理步骤简单、无需衍生、重复性好、回收率符合要求。通过对实际样品的检测，可知新疆主要种植的籽瓜品种果实中L-瓜氨酸平均含量在0.656~2.563 mg/g，不同品种籽瓜中L-瓜氨酸含量存在差异，同一个籽瓜不同部位L-瓜氨酸含量有所不同，相同品种的籽瓜种植的地区不同也会影响L-瓜氨酸含量，存在含量差异的因素需要进一步研究。本实验为籽瓜副产物的充分利用提供参考依据。

参考文献：

[1] WADA M. Uber citrulline, eine neue aminosäure im pressaft der wassermelone, citrullus vulgaris schrad[J]. Biochemische Zeitchrift, 1930, 224: 420-429.

[2] 刘娟, 路欣欣, 孟慧. 瓜氨酸的药理作用及生产方法的研究进展[J]. 药学实践杂志, 2011, 29(3): 173-175.

[3] 丁威, 李爱平, 张征林, 等. L-瓜氨酸和L-高瓜氨酸的制备[J]. 化工时刊, 2006, 20(2): 16-17.

[4] 曹瑜, 李加友, 焦庆才. 酶法转化制备L-瓜氨酸[J]. 精细化工, 2005, 22(10): 759-761.

[5] 程志强, 刘文革, 邓云, 等. 西瓜果实中L-瓜氨酸的提取与测定[J]. 果树学报, 2010, 27(4): 650-654.

[6] 刘文, 陈文秋, 潘健, 等. 天花粉中瓜氨酸与γ-氨基丁酸的含量测定[J]. 中国药业, 2012, 21(4): 26-28.

[7] 沈淑英, 管正洁, 冯容保. 瓜氨酸酶法生产的研究[J]. 工业微生物, 1981(4): 11-14.

[8] 刘青青, 金传山, 王振华, 等. 不同品种天花粉样品中瓜氨酸的含量测定[J]. 安徽中医学院学报, 2012, 31(4): 75-77.

[9] 钱骅, 焦洋, 赵伯涛, 等. 栝楼根中L-瓜氨酸的提取和含量测定[J]. 食品工业科技, 2010, 31(7): 287-289.

[10] ARCHIBALD R M. Determination of citrulline and allantoin and demonstration of citrulline in blood plasma[J]. Journal of Biological Chemistry, 1944, 156: 121-142.

[11] DAVIS A R, FISH W, LEVI A, et al. L-citrulline levels in watermelon cultivars from three locations[J]. Cucurbit Genetics Cooperative Report, 2010, 33: 36-39.

[12] 李加友, 曹瑜, 刘茜, 等. 酶法测定人尿中L-瓜氨酸含量[J]. 分析化学, 2006, 34(3): 379-381.

[13] 梁新红, 孙俊良, 曾洁. 分光光度法测定葡萄酒中瓜氨酸含量[J]. 食品科学, 2010, 31(14): 234-237.

[14] 周慧, 郝宁, 严明, 等. 柱前衍生化HPLC法测定发酵液中L-瓜氨酸和L-鸟氨酸含量[J]. 南京工业大学学报: 自然科学版, 2009, 31(2): 77-80.

[15] JAYAPRAKASHA G K, CHIDAMBARA MURTHY K N, PATIL B S. Rapid HPLC-UV method for quantification of L-citrulline in watermelon and its potential role on smooth muscle relaxation markers[J]. Food Chemistry, 2011, 127(1): 240-248.

[16] MAO H M, CHEN B G, WANG W M, et al. Simultaneous analysis of citrulline and arginine in serum and tissue[J]. Microchemical Journal, 2011, 97(2): 291-295.

[17] RIMANDO A M, PERKINS-VEAZIE P M. Determination of citrulline in watermelon rind[J]. Journal of Chromatography A, 2005, 1078(1): 196-200.

[18] WANG H Y, HU P, JIANG J. Rapid determination of underivatized arginine, ornithine, citrulline and symmetric/asymmetric dimethylarginine in human plasma by LC-MS[J]. Chromatographia, 2010, 71(9/10): 933-939.

[19] SHIN S, FUNG S M, MOHAN S, et al. Simultaneous bioanalysis of l-arginine, l-citrulline, and dimethylarginines by LC-MS/MS[J]. Journal of Chromatography B, 2011, 879(7): 467-474.

[20] 武冬梅, 李冀新, 赵志永, 等. 新疆籽瓜主栽品种营养成分分析比较[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(8): 177-179.