

液相色谱法测定柑橘果实中类黄酮的方法研究

付陈梅^{1,2}, 吴桂苹¹, 苏学素³, 焦必宁^{1,2}

1(西南大学食品学院, 重庆, 400715) 2(中国农业科学院柑桔研究所, 重庆, 400712)

3(西南大学化学化工学院, 重庆, 400715)

摘 要 文中以柑橘中常见的、含量丰富的柚皮素-7- β -芸香糖苷等 10 种类黄酮为研究对象, 建立了同时测定柑橘中黄酮和多甲氧基黄酮含量的高效液相色谱分析方法。采用 Waters Symmetry C₁₈ 色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μ m), 流动相为 0.2% 乙酸水溶液和乙腈, 梯度洗脱, 二极管阵列检测器, 检测波长为 287 nm 和 330 nm, 柱温 25 $^{\circ}$ C, 流速 1.0 mL/min。外标法定量, 柚皮素-7- β -芸香糖苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、香风草苷、柚皮素、橙皮素、甜橙黄酮、川皮苷和桔黄酮等 10 种类黄酮的线性范围为 0.01~27.00 mg/L($r \geq 0.99$), 检出限为 0.01~0.02 mg/L。果汁的平均加标回收率为在 94.20%~106.58% 之间, 相对标准偏差为 1.15%~5.41%; 果皮平均加标回收率为 95.15%~101.19%, 相对标准偏差为 1.47%~3.78%。

关键词 高效液相色谱; 柑桔; 类黄酮

高效液相色谱法具有易操作、灵敏度高和稳定性好等特点, 已成为分析柑橘中类黄酮化合物的主要方法。目前, 国内外已对 HPLC 分离橙皮苷、柚苷和新橙皮苷等柑橘黄酮苷进行了大量的研究, 但对检测强极性的黄酮和弱极性的多甲氧基黄酮的报道不多, 已有方法还存在分析时间较长、分离效果欠佳、实验结果难以重复等问题。Mouly^[1]研究了柑橘汁中柚皮素-7- β -芸香糖苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷、香风草苷、甜橙黄酮、川皮苷和桔黄酮等黄酮和多甲氧基黄酮的 HPLC 测定方法, 但检测时间需 60 min, 多甲氧基黄酮也未能完全分开; Leuzzi 等人^[3]改进了 Mouly 的方法, 对柚皮素-7- β -芸香糖苷、橙皮苷和香风草苷以及多甲氧基黄酮进行了分析, 使检测时间缩短至 40 min; 此外, Manthey^[2]和 Pupin^[4]等专门建立了柑橘中多甲氧基黄酮分析的 HPLC 方法。

随着现代仪器及其分析技术的发展, HPLC-MS 和 HPLC-MS-MS 联用技术也用于定性定量分析柑桔及其提取物中类黄酮成分, Paola Dugo 等人^[5]采用微柱 HPLC-MS 法, 在 50 min 内可检测出 20 种类黄酮物质, 仅需进样 0.65 μ L, 流速 40 μ L/min, 大大节约了样品和流动相用量, 周大勇等人^[6]利用高效液相色谱与电喷雾质谱联用技术分离并检测了枳壳中的 6 种黄酮苷类化合物, 但目前由于这类设备昂贵, 使用较受限制。本研究在前人研究基础上选择了

柑橘中常见的、含量丰富的 10 种黄酮类物质, 包括柚皮素-7- β -芸香糖苷(narirutin)、柚皮苷(naringin)、橙皮苷(hesperidin)、新橙皮苷(neohesperidin)、香风草苷(didymnin)的等 5 种黄酮糖苷, 甜橙黄酮(sinensetin)、川皮苷(nobiletin)和桔黄酮(tangeretin)等 3 种多甲氧基黄酮以及柑桔中最普遍的柚皮素(naringenin)和橙皮素(hesperetin)2 种苷元为研究对象, 通过优化样品前处理和 HPLC 分离条件, 缩短了检测时间, 建立的方法简单、快速、准确, 结果稳定可靠, 可为柑橘果汁加工及其副产品提取提供质量控制依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器

Agilent 1100 系列高效液相色谱仪(美国, Agilent 公司), 由四元低压泵、柱温箱、二极管阵列检测器、自动进样器, 及 chemstation 工作站等组成。FW100 万能粉碎机(天津市泰斯特仪器有限公司); TDL5A 离心机(上海安亭科学仪器厂); KHS200 超声波清洗器(江苏昆山禾创超声仪器有限公司); QL-901 旋涡混合器(江苏海门其林贝尔仪器制造公司); Millipore 超纯水器(美国, Millipore 公司); CP1245 电子天平(德国, Sartorius 公司); 0.45 μ m 孔径过滤头(上海捷盛依科科技有限公司)。

柑橘样品由中国农业科学院柑桔研究所国家柑橘种质资源圃提供。

1.2 主要试剂

橙皮苷(纯度 90%, 瑞士, Fluka 公司), 柚皮苷

第一作者: 博士研究生, 助理研究员(焦必宁研究员为通讯作者)。

* 科技部科研院所公益基金项目(2004DIB4J147), 国家科技支撑计划项目(2007BAD47B07)和(2006BAD22B03-B4)。

收稿日期: 2007-11-16, 改回日期: 2008-02-01。

(纯度 95%，瑞士，Fluka 公司)，新橙皮苷(纯度 99%，瑞士，Fluka 公司)，柚皮素-7-β-芸香糖苷(纯度 99.6%，美国，Chromadex 公司)，香风草苷(纯度 99.9%，美国，Chromadex 公司)，柚皮素(纯度 98%，美国，Sigma 公司)，橙皮素(纯度 98%，美国，Sigma 公司)，甜橙黄酮(纯度 99%，美国，Sigma 公司)，川皮苷(纯度 99%，美国，Sigma 公司)和桔黄酮(纯度 99%，美国，Sigma 公司)。甲醇(分析纯，中国，北京北化精细化学品有限责任公司)、二甲基甲酰胺(DMF)(分析纯，北京北化精细化学品有限责任公司)、乙醇(分析纯，北京北化精细化学品有限责任公司)、乙腈(色谱纯，瑞士，Fluka 公司)，甲醇(色谱纯，美国，Sigma 公司)，实验用水为 Millipore 高纯水。

1.3 对照品溶液的制备

准确称取柚皮素-7-β-芸香糖苷，柚皮苷，橙皮苷，新橙皮苷，香风草苷，柚皮素，橙皮素，甜橙黄酮，川皮苷和桔黄酮各 0.005 g，分别用色谱纯甲醇超声波辅助溶解于 10 mL 容量瓶中，定容，配制成 500 mg/L 标准物质的贮备液。采用逐级稀释法配成一系列浓度的混合标样。

1.4 供试品溶液的制备

柑橘汁样品：取鲜榨柑橘汁 10.0 mL 置于 50 mL 离心管中，加入 10 mL 70% 甲醇溶液旋涡 3 min，以 5 000 r/min 离心 15 min，收集上清液，残渣重复提取 1 次，离心，合并上清液，定容 50 mL，0.45 μm 微孔滤膜过滤，待测。

柑橘果皮样品：取风干果皮 0.1 g 置于 50 mL 离心管中，用 15 mL 50% 二甲基甲酰胺(DMF)振荡 3 min，超声处理 15 min，5 000 r/min 离心 15 min，重复 3 次，合并上清液，定容 50 mL，0.45 μm 微孔滤膜过滤，稀释适宜倍数，待测。

1.5 色谱条件

色谱柱：Waters Symmetry C₁₈ 分析柱(250 mm × 4.6 mm, 5 μm)。流动相：乙腈-乙酸溶液，梯度洗脱。流速为 1.0 mL/min，柱温 25 ℃，进样量 20 μL，检测波长 287 nm 和 330 nm。

2 结果与讨论

2.1 检测波长的选择

通过二极管阵列检测器进行波长扫描，10 种类

黄酮的最大吸收波长分别为：柚皮素-7-β-芸香糖苷 230、285 nm，柚皮苷 230、285 nm，橙皮苷 230、287 nm，新橙皮苷 230、287 nm，香风草苷 230、283 nm，柚皮素 230、287 nm，橙皮素 230、287 nm，甜橙黄酮 230、265 nm 和 330 nm，川皮苷 250 nm、270 nm 和 335 nm，桔黄酮 267 nm 和 325 nm。在保证待测化合物有较好响应的同时，为降低溶剂峰的干扰，选取了 287 nm 和 330 nm 分别作为黄烷酮和多甲氧基黄酮两类化合物的紫外检测波长。实验结果表明，黄烷酮在 287 nm、多甲氧基黄酮在 330 nm 下响应值较好。

2.2 流动相的选择

由于黄酮类化合物带有酚羟基，在水中会发生部分解离并与固定相作用加强，导致拖尾，所以在流动相中加入有机酸调节 pH 以抑制解离，克服拖尾现象。实验研究了以不同配比的乙腈-乙酸水溶液为流动相体系的分离效果，其中以 0.2% 乙酸-乙腈溶液的分离效果较好；另外，由于待分离的 10 种类黄酮的化学结构、性质以及在色谱柱中的保留时间相近，采用等度洗脱不能将待测组分完全分离，经反复实验最终确定梯度洗脱程序条件(见表 1)。实验结果表明，采用表 1 的分析条件，在 34 min 内 10 种类黄酮均得到了很好地分离，图 1 为 10 种类黄酮标准混合液的 HPLC-DAD-UV 色谱图。从图 1 可看出，分离 10 种类黄酮所得峰形尖锐且对称，分离度较好，可以满足多种极性不同类黄酮同时分离的要求；同时这些色谱峰对应化合物的紫外光谱图都呈现黄酮类化合物特有的“双主峰”紫外吸收；10 种类黄酮的流出顺序首先为黄烷酮糖苷，其次为黄烷酮糖苷元，最后为多甲氧基黄酮，这与 He^[7]等人的研究报道一致。

表 1 流动相梯度洗脱程序

流动相	洗脱时间/min							
	0	10	20	30	35	40	45	50
V(0.2%乙酸)	85	75	60	50	0	0	85	85
/	/	/	/	/	/	/	/	/
V(乙腈)	15	25	40	50	100	100	15	15

图 1-a 为黄烷酮(柚皮素-7-β-芸香糖苷，t=12.32；柚皮苷，t=13.20；橙皮苷，t=13.66；新橙皮苷，t=14.49；香风草苷，t=18.63；柚皮素，t=23.10；橙皮素，t=24.03)的谱图；图 1-b 为多甲氧基黄酮(甜橙黄酮，t=26.99；川皮苷，t=30.06；桔黄酮，t=33.89)的谱图。

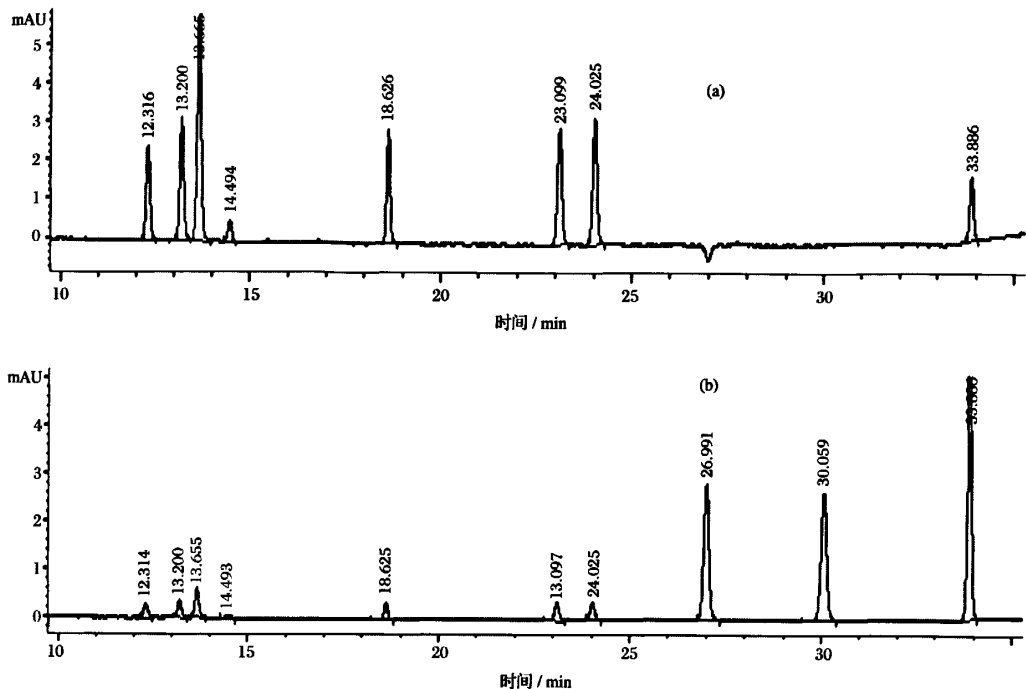


图1 10种类黄酮标准混合物的色谱图

2.3 样品前处理条件的选择

由于柑橘样品成分复杂,存在一定的基体干扰;待测组分性质也有一定差异,前处理条件对回收率有较大影响。因此,对柑橘果汁和果皮样品的前处理条件进行了优化。

2.3.1 柑橘果汁前处理条件的选择

分别比较了不同浓度甲醇、无水乙醇和DMF的提取效果。结果表明,无水乙醇的提取效果最差,其次是无水甲醇、DMF和85%甲醇,提取效果最好的是70%的甲醇,确定选用70%甲醇为提取溶剂。

2.3.2 柑橘果皮样品前处理条件的选择

果皮成分复杂,且类黄酮物质含量丰富。实验比较了不同浓度的DMF和甲醇水溶液的提取效果。结果表明,50%DMF溶液对两类黄酮成分的提取效果最好,确定用50%DMF溶液作为果皮中类黄酮的提取剂,室温下采取振荡-超声波-离心的方法重复3次即能提取充分。

2.4 线性关系及检出限

在确定的最佳色谱条件下,确定各种类黄酮物质的保留时间;并配制一系列不同浓度的混合标准溶液进行色谱测定,以各组分的峰面积(Y)对浓度(X , mg/L)绘制标准曲线,计算回归方程、相关系数、线性范围和检出限(见表2)。结果表明10种类黄酮化合

物均得到很好的分离,线性方程的相关系数达到0.9902~0.9999,检出限低于0.02 mg/L,能够满足柑桔果实中黄酮类物质定量分析的需要。

2.5 方法的回收率和精密度试验

取混合标准溶液重复进样6次,计算标准溶液的变异系数,确定仪器的精密度,相对标准偏差介于0.30%~1.56%。准确称取已知类黄酮含量的柑桔果汁和果皮样品,分为6份,分别添加一定浓度的10种类黄酮物质混合标准溶液,进行回收率实验,结果如表3所示。结果表明:果汁中类黄酮的平均回收率为94.20%~106.58%,相对标准偏差为1.15%~5.41%;果皮中类黄酮的平均回收率为95.15%~101.19%,相对标准偏差为1.47%~3.78%。说明该方法可用来分析柑橘果汁和果皮中的类黄酮。

2.6 方法的稳定性实验

将柑橘果汁的待测溶液置于室温下放置48 h,并在放置1、3、5、8、12、24和48 h后测定10种类黄酮物质的含量。结果表明:黄酮类化合物性质较为稳定,RSD值为0.30%~1.96%,而多甲氧基黄酮类化合物稳定性较差,RSD值为9.26%~11.27%;放置时间低于5 h时,RSD值均低于5%。因此,样品处理后应在5 h内检测,若不能及时检测,应将待测溶液放置在低温下。

表 2 十种类黄酮色谱分析的保留时间、线性方程、相关系数、线性范围及检测限

类黄酮	保留时间 /min	线性方程	相关系数	线性范围 /mg · L ⁻¹	检出限(S/N=3) /mg · L ⁻¹
柚皮素-7-β-芸香糖苷	12.32	y = 39.08x - 0.13	0.990 2	0.01 ~ 7.50	0.01
柚皮苷	13.20	y = 32.27x - 2.82	0.999 0	0.02 ~ 9.50	0.01
橙皮苷	13.66	y = 30.90x + 1.43	0.997 7	0.04 ~ 27.00	0.01
新橙皮苷	14.49	y = 25.19x - 0.11	0.998 1	0.04 ~ 3.00	0.02
香风草甙	18.63	y = 45.24x + 1.32	0.999 2	0.01 ~ 20.00	0.01
柚皮素	23.10	y = 64.39x + 2.32	0.999 7	0.01 ~ 20.00	0.01
橙皮素	24.03	y = 69.42x + 0.24	0.999 9	0.01 ~ 22.00	0.01
甜橙黄酮	26.99	y = 42.68x - 0.29	0.999 9	0.02 ~ 20.00	0.01
川皮苷	30.06	y = 41.31x - 0.66	0.995 8	0.02 ~ 20.00	0.01
桔黄酮	33.89	y = 47.90x - 0.07	0.999 9	0.02 ~ 20.00	0.01

表 3 方法的精密度和回收率测定结果(n=6)

类黄酮	标准溶液	柑橘果汁			果皮		
	RSD (%)	加入量 /mg · L ⁻¹	平均回收率 /%	RSD /%	加入量 /mg · L ⁻¹	平均回收率 /%	RSD /%
柚皮素-7-β-芸香糖苷	0.54	33.41	94.91	2.12	61.30	98.45	3.12
柚皮苷	1.02	2.06	94.20	2.71	21.30	98.59	2.46
橙皮苷	0.30	36.64	96.27	3.53	203.46	97.68	3.78
新橙皮苷	1.56	13.71	102.43	5.41	13.40	101.19	3.45
香风草甙	0.83	34.11	95.23	2.70	87.90	98.23	1.98
柚皮素	1.44	16.17	102.83	1.66	23.10	95.15	2.16
橙皮素	0.55	29.29	104.70	1.48	25.40	97.44	2.71
甜橙黄酮	0.78	2.64	106.58	1.27	56.70	97.37	1.47
川皮苷	0.31	3.09	103.49	1.34	57.80	101.06	1.59
桔黄酮	0.47	3.16	98.79	1.15	54.90	98.49	1.76

2.7 实际样品测定

在中国农业科学院国家柑橘种质资源圃取分属于橙类(脐橙、甜橙)和宽皮橘类(温州蜜柑、椪柑、朱桔)的 5 个样品,按 2.2 方法对果汁和果皮中类黄酮含量进行检测(结果见表 4)。实验结果表明,柑橘果皮中黄烷酮和多甲氧基黄酮含量要远远高于果汁含量,尤其是多甲氧基黄酮的含量几乎是果汁中的几千

倍。橙类和宽皮橘类样品中类黄酮的种类比较接近,主要是橙皮苷、柚皮素-7-β-芸香糖苷和香风草苷等黄烷酮以及甜橙黄酮、桔黄酮和川皮苷等,但含量有明显差异,橙类果汁中黄烷酮含量要高于宽皮柑橘,而多甲氧基黄酮在宽皮柑橘中含量更为丰富。宽皮柑橘由于品种来源十分复杂,不同品种的种类黄酮组成及其含量差异较大,如温州蜜柑果汁中检出了橙皮苷、

表 4 不同品种柑桔样品中类黄酮含量测定结果

类黄酮	柑桔果汁/mg&L ⁻¹					果皮/mg · kg ⁻¹				
	奉节脐橙	甜橙	温州蜜柑	椪柑	朱桔	奉节脐橙	甜橙	温州蜜柑	椪柑	朱桔
橙皮苷	356.72	218.54	239.43	206.15	558.06	2.69×10 ⁴	4.84×10 ⁴	2.70×10 ⁴	3.97×10 ⁴	3.42×10 ⁴
柚皮素-7-β-芸香糖苷	339.81	114.30	234.8	42.94	83.72	5.42×10 ³	9.54×10 ³	1.18×10 ⁴	2.22×10 ³	1.90×10 ³
香风草甙	126.92	50.59	51.52	27.45	75.83	2.93×10 ³	5.40×10 ³	2.65×10 ³	1.98×10 ³	1.86×10 ³
柚皮苷	ND	ND	ND	ND	3.05	ND	ND	ND	ND	ND
新橙皮苷	ND	ND	ND	0.85	1.61	ND	ND	ND	ND	ND
柚皮素	ND	ND	ND	ND	1.57	ND	ND	ND	ND	ND
橙皮素	ND	ND	ND	ND	19.44	ND	ND	ND	ND	ND
甜橙黄酮	1.66	1.84	0.20	1.75	0.25	4.41×10 ³	7.63×10 ³	1.20×10 ²	1.03×10 ³	7.10×10 ²
川皮苷	1.67	1.65	3.15	5.20	2.48	8.12×10 ³	6.62×10 ³	4.00×10 ³	1.09×10 ⁴	7.78×10 ³
桔黄酮	1.31	1.34	1.89	4.11	1.46	2.08×10 ³	2.05×10 ³	1.72×10 ³	8.31×10 ³	3.97×10 ³

ND:未检出。

柚皮素-7- β -芸香糖苷、香风草苷、甜橙黄酮、川皮苷和桔黄酮;桉柑果汁较温州蜜柑多检出新橙皮苷;朱桔果汁则检出了所分析的橙皮苷等10种类黄酮。桉柑果汁和果皮中多甲氧基黄酮含量均高于温州蜜柑和朱橘,在桉柑果皮中还含有3种未知成分,根据参考文献[6,7],其可能为七甲氧基黄酮、六甲氧基黄酮和黄芩配基;在朱橘果汁和果皮中还检出多种根据文献无法判定的未知成分,需要用质谱等方法进行进一步确认。

致谢:感谢中国农业科学院饲料研究所中心实验室张萍主任和刘庆生老师对本研究的指导和帮助。

参 考 文 献

- 1 Mouly P, Emile M G, Alain A. Simultaneous separation of flavanone glycosides and polymethoxylated flavones in citrus juices using liquid chromatography [J]. J Chromatogr A, 1998, 800 (2): 171~179
- 2 Manthey J A, Grohmann K. Phenols in citrus peel by-products concentrations of hydroxycinnamates and polymethoxylated flavones in citrus peel [J]. J Agric Food Chem, 2001, 49(7): 3 268~3 273
- 3 Leuzzi U, Caristi C, Panzera V, Licandr G. Flavonoids in pigmented orange juice and secong-pressure [J]. J Agric Food Chem, 2000, 48(11): 5 501~5 506
- 4 Pupin A M, Dennis M J, Toledo M C F. Polymethoxylated flavones in Brazilian orange juice [J]. Food Chem, 1998, 63(4): 513~518
- 5 Dugo P, Presti M L, Ohman M, Fazio A, Dugo G, Mondello L. Determination of flavonoids in citrus juices by micro-HPLC-ESI/MS [J]. J Sep Sci, 2005, 28: 1 149~1 156
- 6 周大勇,徐青,薛兴亚,等. 高效液相色谱-电喷雾质谱法测定枳壳中黄酮苷类化合物[J]. 分析化学, 2006, 34: S31~S35
- 7 He X G, Lian L Z, Lin L Z, Bernart M W. High-performance liquid chromatography-electrospray mass spectrometry in phytochemical analysis of sour orange (*Citrus aurantium* L.) [J]. J Chromatogr A, 1997, 791(1~2): 127~134

Study on the HPLC Method for Determination of Flavonoids in Citrus Fruits by High Performance Liquid Chromatography

Fu Chenmei^{1,2}, Wu Guiping¹, Su Xuesu³, Jiao Bining^{1,2}

1(College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China)

2(Citrus Research Institute of CAAS, Chongqing 400712, China)

3(Chemistry and Chemical Engineering College, Southwest University, Chongqing 400715, China)

ABSTRACT Flavonoids, which are rich in citrus fruits, are good to health. Therefore, studies on how to determine the amount of flavonoids had become a hot research field. A method was established for the identification and quantification of flavonoids including flavanones and polymethoxyflavones in citrus fruits by reverse-phase HPLC coupled with photodiode array detection using Waters Symmetry C18 column. The mobile phase used was 0.2% acetic acid solvent and acetonitrile, in a concentration gradient, and the column temperature was 25 °C, the UV detection wavelengths were 287 nm and 330 nm. The flavonoids were quantified by external standard method. The linear ranges of 10 flavonoids were 0.01~27.00 mg/L($r \geq 0.99$), and the detection limits were 0.01~0.02 mg/L. The average recoveries of flavonoids in juice and dry peel powder were 94.20%~106.58% and 95.15%~101.19%, RSD were 1.15%~5.41% and 1.47%~3.78% respectively. The analytic parameters showed that the method was sensitive, reliable, accurate and reproducible.

Key words high performance liquid chromatography, citrus, flavonoids

信
息
窗

新加坡首创低糖高纤维白面包

糖尿病患者再也不必担心吃白面包会导致血糖指数升高了。新加坡淡马锡理工学院与登生面包店一起研制出了采用低血糖指数原料制作的白面包,让糖尿病患者可以吃得安心。

这种面包是用低血糖指数的原料制成的,略带甜味,相当可口。这类低血糖指数原料制作的白面包,会逐步释放所含的糖分,不会太迅速地提高食用者血液中的血糖含量,而且比一般白面包含有更高的纤维,非常耐饱,也适合运动员食用。这种白面包所含的碳水化合物较低,所以比一般食品糖少。