

反相高效液相色谱同步对酸橙汁中柚皮苷和橙皮苷的定量分析研究

何建新, 张群, 林树花

(湖南省农产品加工研究所, 湖南省食品测试分析中心, 湖南 长沙 410125)

摘要: 研究了 RP-HPLC 同步测定酸橙汁中的柚皮苷和橙皮苷法的色谱条件, 并对甲醇溶解+超声处理与水溶解+静置处理进行比较, 并对结果进行准确度和精密度试验。其色谱条件为 $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=40:60$, 固定相 ODS-C18, 柱子 $4.6\ \mu\text{m}\times 150\ \text{mm}$, 流速 $1\ \text{mL}/\text{min}$, 检测波长 $285\ \text{nm}$; 甲醇溶解+超声处理测得的酸橙汁中柚皮苷、橙皮苷含量高于水溶解+静置处理, 含量分别提高了 32% 和 4.4%; 试验操作简便, 结果准确可靠。

关键词: 反相高效液相色谱; 同时测定; 酸橙汁; 柚皮苷; 橙皮苷

中图分类号: TS207.3; 文献标识码: A; 文章编号: 1673-9078(2008)01-0083-03

Quantitative Analysis of Narigin and Hesperidin contents in Citrus Aurantium Juice by Reverse-phase High-performance Liquid Chromatography

Liquid Chromatography

HE Jian-xin, ZHANG Qun, LIN Shu-hua

(Food Test and Analysis Center of Hunan Province, Hunan Agricultural product processing Institute, Changsha 410125, China)

Abstract: The chromatographic conditions for quantitative analysis of narigin and hesperidin contents in citrus aurantium juice were investigated and the optimal reverse-phase chromatogram conditions were found as follows: methanol/water being of 40/60, column being of ODS-C18 ($4.6\ \mu\text{m}\times 150\ \text{mm}$), flow rate of $1\ \text{mL}/\text{min}$ and the detection wavelength being of $285\ \text{nm}$. It was also found that the contents of narigin and hesperidin in citrus aurantium juice via methanol dissolve and supersonic treatment were 32% and 4.4% higher than those via water dissolve and standing storage, respectively. The method was simple and accurate.

Key words: reverse-phase HPLC detection; simultaneous detection; citrus aurantium juice; narigin and hesperidin

酸橙是一种天然杂交的柑橘品种, 主要分布于湖南沅江, 其果实味酸可食, 酸橙汁中氨基酸和 V_C 的含量均高于温州蜜柑和南柑, 有较高的营养和药用价值^[1], 可利用酸橙调配复合果蔬汁^[2]。另酸橙幼果干可制成药用枳壳, 其性微寒, 味苦、辛、酸, 入肺、脾、大肠, 具有理气宽中, 行滞消胀之功效, 临床常用于食积痞满、脘腹胀痛等症, 经研究其主要药用成分为黄酮类, 黄酮类成分中又以柚皮苷和橙皮苷相对含量较高, 它们具有独特的芳香性和显著的药理学作用^[3]。

柚皮苷和橙皮苷易于分离, 未成熟的柑橘果实中

的柚皮苷和橙皮苷含量比成熟的柑橘多, 并且在柑橘果实的不同部位的含量有差别。由于柚皮苷和橙皮苷都是类黄酮物质, 性质相近, 所以同时测定酸橙汁中的柚皮苷和橙皮苷含量对类黄酮的研究开发具有重要意义。

测定橙皮苷的方法有分光光度法^[4]、HPLC 法^[5], 测定柚皮苷的方法有 HPLC 法^[6]。采用 RP-HPLC 法同步测定酸橙汁中的两种类黄酮物质——柚皮苷和橙皮苷在国内尚未见报道, 本文对样品的处理方法及 RP-HPLC 的测定条件进行了研究。

1 实验部分

1.1 材料、仪器与试剂

酸橙: 湖南沅江。

收稿日期: 2007-09-24

基金项目: 湖南省“十一五”重大专项《现代柑桔产业化关键技术研究与示范项目》(NO. 2006NK1002)

作者简介: 何建新, 副研究员, 研究方向为农产品深加工

超声提取器 (SK2200LH); 日本岛津 LC-20AT, SPD-M20A (配有二极管阵列 PDA)。

柚皮苷、橙皮苷标准品 (中国药品生物制品检定所); 甲醇 (色谱醇)。

1.2 色谱条件

流动相: $V_{\text{甲醇}}:V_{\text{水}}=40:60$, 固定相: ODS-C18, 柱径和柱长: $6\ \mu\text{m}\times 150\ \text{mm}$, 流速: $1\ \text{mL}/\text{min}$, 检测波长: $285\ \text{nm}$ 。

1.3 样品的制备

1.3.1 柚皮苷和橙皮苷标准溶液

分别准确称取柚皮苷 $2.7\ \text{mg}$ 和橙皮苷标准样品 $6.2\ \text{mg}$, 置于 $25\ \text{mL}$ 容量瓶中, 加甲醇定容, 摇匀后得到柚皮苷、橙皮苷标准储备液。分别取适量两种标准储备液, 用甲醇稀释, 得到柚皮苷质量浓度为 $0.0108\ \mu\text{g}/\text{mL}$, $0.054\ \mu\text{g}/\text{mL}$, $0.108\ \mu\text{g}/\text{mL}$, $1.08\ \mu\text{g}/\text{mL}$, $10.8\ \mu\text{g}/\text{mL}$, $32.4\ \mu\text{g}/\text{mL}$, $54\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 的系列标准溶液; 橙皮苷质量浓度为 $0.0248\ \mu\text{g}/\text{mL}$, $0.124\ \mu\text{g}/\text{mL}$, $0.248\ \mu\text{g}/\text{mL}$, $2.48\ \mu\text{g}/\text{mL}$, $24.8\ \mu\text{g}/\text{mL}$, $74.4\ \mu\text{g}/\text{mL}$, $124\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 的系列标准溶液。

1.3.2 酸橙果汁的取汁工艺流程

酸橙→切瓣→锥形榨汁→4层纱布过滤→离心分离 ($5000\ \text{r}/\text{min}$, $10\ \text{min}$)→原果汁

1.3.3 供试品溶液

1.3.3.1 直接取离心后的果汁 $5\ \text{mL}$ 2份, 一份用水定容到 $10\ \text{mL}$, 摇匀, 静置 $40\ \text{min}$, 过 $0.45\ \mu\text{m}$ 膜, 进样进行测定。另一份加入浓度为 $10.8\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 柚皮苷标准溶液 $1\ \text{mL}$, 加入浓度为 $24.8\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 橙皮苷标准溶液 $1\ \text{mL}$, 用水定容到 $10\ \text{mL}$, 摇匀, 静置 $40\ \text{min}$, 过 $0.45\ \mu\text{m}$ 膜, 进样进行测定。

1.3.3.2 直接取离心后的果汁 $5\ \text{mL}$ 2份, 一份用水定容到 $10\ \text{mL}$, 摇匀, 超声 $40\ \text{min}$ ^[7], 过 $0.45\ \mu\text{m}$ 膜, 进样进行测定。另一份加入浓度为 $10.8\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 柚皮苷标准溶液 $1\ \text{mL}$, 加入浓度为 $24.8\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 橙皮苷标准溶液 $1\ \text{mL}$, 用水定容到 $10\ \text{mL}$, 摇匀, 超声 $40\ \text{min}$ ^[7], 过 $0.45\ \mu\text{m}$ 膜, 进样进行测定。

1.3.3.3 直接取离心后的果汁 $5\ \text{mL}$ 2份, 一份用甲醇定容到 $10\ \text{mL}$, 摇匀, 静置 $40\ \text{min}$, 过 $0.45\ \mu\text{m}$ 膜, 进样进行测定, 进样进行测定。另一份加入浓度为 $10.8\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 柚皮苷标准溶液 $1\ \text{mL}$, 加入浓度为 $24.8\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 橙皮苷标准溶液 $1\ \text{mL}$, 用甲醇定容到 $10\ \text{mL}$, 摇匀, 静置 $40\ \text{min}$, 过 $0.45\ \mu\text{m}$ 膜, 进样进行测定。

1.3.3.4 直接取离心后的果汁 $5\ \text{mL}$ 2份, 一份用甲醇定容到 $10\ \text{mL}$, 摇匀, 超声 $40\ \text{min}$ ^[7], 过 $0.45\ \mu\text{m}$ 膜, 进样进行测定。另一份加入浓度为 $10.8\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 柚皮苷

标准溶液 $1\ \text{mL}$, 加入浓度为 $24.8\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 橙皮苷标准溶液 $1\ \text{mL}$, 用甲醇定容到 $10\ \text{mL}$, 摇匀, 超声 $40\ \text{min}$ ^[7], 过 $0.45\ \mu\text{m}$ 膜, 进样进行测定。

2 结果与讨论

2.1 检测波长的选择

取适当浓度的柚皮苷和橙皮苷标准溶液, 在日本岛津 SPD-M20A 二极管阵列紫外可见分光光度计于 $190\sim 400\ \text{nm}$ 处进行波长扫描, 得到柚皮苷和橙皮苷标准紫外吸收光谱图, 如图 1 所示。柚皮苷紫外最大吸收波长 $284\ \text{nm}$, 橙皮苷 $286\ \text{nm}$, 为照顾两种被测组分的灵敏度, 本文采用测定波长 $285\ \text{nm}$ 。

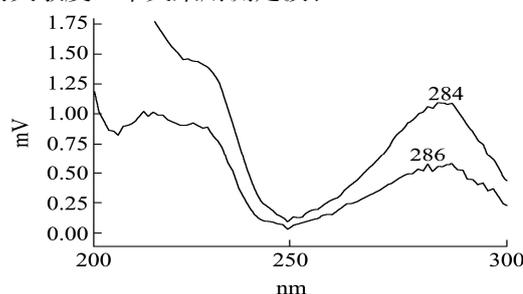


图 1 柚皮苷和橙皮苷的标准紫外吸收光谱

2.2 线性范围及检测限

配置一系列不同稀释度的系列标准溶液在拟定的色谱条件下进样测定, 以浓度 $C(\mu\text{g}/\text{mL})$ 为横坐标, 峰面积 A 为纵坐标绘制标准曲线, 结果表明线性良好, 回归方程, 相关性和检测限, 检测限以信号为 3 倍噪声为准。具体方程及检测限, 见表 1。

表 1 标准曲线和检测限

化合物	回归方程	浓度范围 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	相关系数	检测限 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
标准曲线 $Y=ax+b$				
柚皮苷	$a=5.610233e-005$ $b=8.274765e-002$	0.108~54	$R=0.9998828$	0.054
标准曲线 $Y=ax+b$				
橙皮苷	$a=4.552969e-005$ $b=0.3360357$	0.248~124	$R=0.9994457$	0.124

注: 表 1 所有实验数据是三次重复实验的平均值。

2.3 准确度和精密度试验

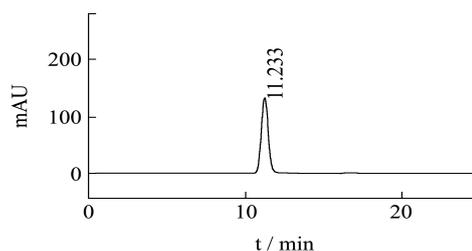


图 2 橙皮苷单标图谱

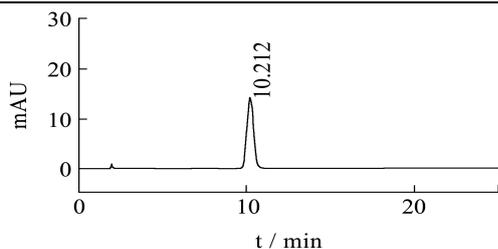


图3 柚皮苷单标图谱

单标图谱, 混标图谱及样品图谱见图 2~5。不同样品的处理方式及测定结果和回收率见表 2。从表 2 可以看出酸橙汁中柚皮苷的含量要高于橙皮苷的含量, 且不同的处理方法其柚皮苷含量比橙皮苷含量高出的倍数不同。1.3.3.4 甲醇溶解+超声处理测得的柚皮苷含量比 1.3.3.1 水溶解+静置处理测得的含量要高出 32%, 1.3.3.4 甲醇+超声处理测得的橙皮苷含量比 1.3.3.1 水溶解+静置处理测得的含量要高出 4.4%, 可以得出用甲醇溶解+超声处理比较适合测定酸橙汁中柚皮苷和橙皮苷的含量。

从色谱图 2~5 可以看出, 在拟定的色谱条件下柚皮苷和橙皮苷可以分开, 并且峰形尖锐。在样品测定中, 柚皮苷加标回收率范围在 101.7%~108.6%, 橙皮苷的加标回收率范围在 91.3%~98.3%之间, 两种物质

回收率范围可取。且每个样品按照上述色谱条件连续重复进样 6 次, 测定峰面积, 其柚皮苷峰面积的 RSD 范围 1.2%~1.5%, 橙皮苷峰面积的 RSD 范围在 1.6%~2.0%。

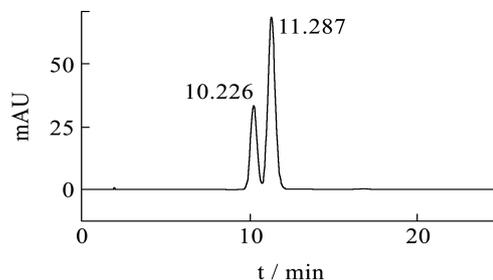


图4 柚皮苷与橙皮苷的混标

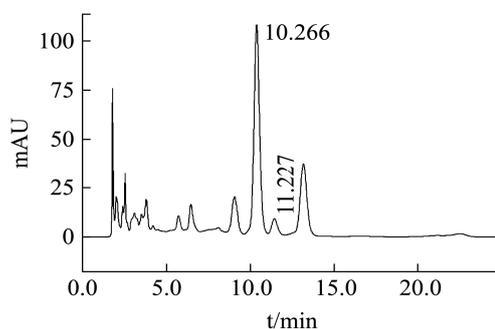


图5 果汁图谱

表 2 样品加标回收率及精密度

样品 1.3.3 中的样品处理方法	测定项目	本底值/(mg/mL)	加标量/mg	测定均值(mg/mL)	回收率/%	RSD (% , n=6)
1.3.3.1	柚皮苷	0.10476	0.0108	0.11160	105.5	1.5
	橙皮苷	0.01005	0.0248	0.01183	93.3	1.8
1.3.3.2	柚皮苷	0.10649	0.0108	0.11449	106.5	1.4
	橙皮苷	0.01110	0.0248	0.01276	92.6	2.0
1.3.3.3	柚皮苷	0.14066	0.0108	0.14413	101.7	1.2
	橙皮苷	0.01159	0.0248	0.01306	91.3	1.8
1.3.3.4	柚皮苷	0.14149	0.0108	0.15476	108.6	1.3
	橙皮苷	0.01913	0.0248	0.02129	98.3	1.6

注: 表 2 所有实验数据是三次重复实验的平均值。

3 结论

本研究建立了用甲醇超声提取酸橙汁中的柚皮苷和橙皮苷, 采用反相高效液相色谱法同时测定酸橙果汁中的柚皮苷和橙皮苷含量的方法。此方法具有简便快捷、准确度好、灵敏度高的特点。

参考文献

[1] 王四春,陈朝明.酸橙柚皮苷的高效液相色谱测定研究[J].衡阳医学院学报,1995(1):4-7

[2] 程湘东,兰孝峰,高呼,等.酸橙在复合果蔬汁和果酱中的应用[J].食品科学,1992(12):49-53

[3] 卫生部药政管理局中国药品生物制品检定所.现代实用本草.中册[M].北京:人民卫生出版社,2000,243-243

[4] 周添浓,陈佃,刘权,等.蛇胆陈皮末工艺质量研究-紫外分光光度法测定橙皮苷含量[J].中成药, 1993 (4): 8-9

[5] 童荣生,孙世明,吴齐贤.RP-HPLC 测定枳实中橙皮苷的含量[J].华西药理学杂志,2000,15(6):454-455

[6] 陈静,高彦祥,吴伟莉,等.高效液相色谱法测定柑橘汁中的柠檬苦素和柚皮苷[J].色谱,2006(3):157-160