

DOI: 10.13652/j.issn.1003-5788.2021.03.011

高效液相色谱法同时测定柚子中的 4 种黄酮苷和柠檬苦素

Simultaneous determination of four flavonoid glycosides and limonin in pomelo by HPLC

张 珊 黄雪松

ZHANG Shan HUANG Xue-song

(暨南大学理工学院, 广东 广州 510632)

(Food Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China)

摘要:为同时测定柚子中芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷和柠檬苦素,研究了高效液相色谱的洗脱条件、测定波长等对测定结果的影响。结果表明,优选的测定条件为色谱柱:Bio-Bond 5 μm C₁₈(4.6 mm \times 250 mm);进样量 10 μL ;黄酮苷与柠檬苦素的检测波长分别为 283 nm 和 220 nm;流动相:乙腈(A)和水(B),梯度洗脱:0 min, 22% A;8 min, 22% A;10 min, 95% A;16 min, 95% A;18 min, 22% A;20 min, 22% A,流速 1 mL/min。该测定条件下,上述 5 种成分分离良好;其标准曲线相关系数均大于 0.999 7,检出限为 0.69~1.72 mg/L,定量限为 1.51~3.15 mg/L,重复性相对标准偏差小于 2%。加样回收率均大于 98%,加样回收率相对标准偏差均小于 2%。

关键词:柚子;幼果;果汁;高效液相色谱;黄酮苷;柠檬苦素

Abstract: In order to simultaneously determine narirutin, naringin, hesperidin, neohesperidin and limonin in pomelo, the effects of elution conditions and measurement wavelength of high-pressure liquid chromatography on the determination results were studied. The results showed that the optimal measurement conditions were as follows. Chromatographic column of Bio-Bond 5 μm C₁₈(4.6 mm \times 250 mm) was used, and the injection volume was 10 μL ; the detection wavelengths of flavonoid glycosides and limonin were 283 nm and 220 nm, respectively; The phase: included acetonitrile (A) and water (B) with gradient elution of 0 min, 22% A, 8 min, 22% A, 10 min, 95% A, 16 min, 95% A, 18 min, 22% A, and 20 min, 22% A, with 1 mL/min flow

rate. Under the control of these conditions, the above five components were well separated; the correlation coefficient of the standard curve was greater than 0.999 7, and the detection limit was 0.69~1.72 mg/L. The quantification limit was 1.51~3.15 mg/L, and the relative standard deviation of repeatability was less than 2%. The sample recovery rates were all greater than 98%, and the relative standard deviation of the sample recovery rates were all less than 2%.

Keywords: pomelo; fruitlets; juice; high performance liquid chromatography; flavonoid glycoside; limonin

二氢黄酮类化合物(包括芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷)^[1]和三萜内酯化合物柠檬苦素均为柚子中的活性成分,其中柚皮苷和柠檬苦素为苦味物质,前者造成“直接”苦味,后者呈现“后苦”现象^[2-3],两类物质的含量是衡量柚子加工产品质量和保健功效的重要品质指标,因此两类物质的测定方法成为相关领域研究的热点。

但现有标准及报道中,这两类物质都是分别测定的,如:GB 1886.262—2016 仅规定了柚皮苷的高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)测定方法;NY/T 2014—2011 规定了同时测定橙皮苷、柚皮苷的 HPLC 方法;朱露等^[4]提出同时测定枳实中芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷的 HPLC 方法;蔡艳芳等^[5]提出测定枳实中柠檬苦素的 HPLC 方法,迄今尚未见柠檬苦素与黄酮类物质同时测定的报道。试验拟以柚子幼果和柚子果汁为样品,研究一种方便、快速、准确且同时测定芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷和柠檬苦素 5 种成分的 HPLC 方法。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂

白肉蜜柚幼果(直径小于 5 cm)、白肉蜜柚:广东顺兴

基金项目:广东省重点研发计划项目(编号:2018B020239001)

作者简介:张珊,女,暨南大学在读硕士研究生。

通信作者:黄雪松(1957—),男,暨南大学教授,博士。

E-mail: thxs@jnu.edu.cn

收稿日期:2020-10-10

种养股份有限公司;

芸香柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷标准品:成都普菲生物技术有限公司;

柚皮苷标准品:上海麦克林生化科技有限公司;

柠檬苦素标准品:上海源叶生物科技有限公司;

甲醇、乙腈:色谱纯:瑞典欧森巴克化学公司。

1.2 仪器与设备

高效液相色谱仪:LC-20A nence 型,配 SPD-M20A 紫外检测器,岛津(广州)检测技术有限公司;

冷冻干燥机:SCIENTZ-10N 型,宁波新芝生物科技股份有限公司;

二两装高速中药粉碎机:111 型,瑞安市永历制药机械有限公司;

高速离心机:HC-3514 型,安徽中科中佳科学仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 标准品溶液制备 精确称取一定量的芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷分别用甲醇溶解于 50 mL 容量瓶中并定容,制成质量浓度分别为 1.053, 1.363, 1.102, 1.096 g/L 的单标溶液,测定其出峰时间及紫外吸收光谱。

精确称取一定量芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷和柠檬苦素,用甲醇溶解于同一 50 mL 容量瓶中并定容,制成质量浓度分别为 1.080, 1.146, 1.104, 1.176, 0.812 g/L 的混标母液,用甲醇倍比稀释至 0.50, 0.25, 1.25×10^{-1} , 6.25×10^{-2} , 3.13×10^{-2} , 1.56×10^{-2} , 7.81×10^{-3} , 3.91×10^{-3} , 1.95×10^{-3} , 9.77×10^{-4} 倍,测定其浓度。

1.3.2 样品制备 精确称取冻干柚子粉末(100 目)样品 0.107 7 g 于 50 mL 容量瓶中,用甲醇定容,超声提取 30 min,用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤,待测。

取新鲜柚子以果肉榨汁,取 1 g 柚子汁溶于 10 mL 甲醇,超声提取 30 min 后,6 000 r/min 离心 10 min,取上清液,将上清液与甲醇($V_{\text{上清液}} : V_{\text{甲醇}}$)以 1 : 50 的比例再次混合,静置 30 min,10 000 r/min 离心 10 min,取上清

液,用 0.45 μ m 微孔滤膜过滤后待测。

1.3.3 HPLC 梯度洗脱方法 参考朱露等^[4]和蔡艳芳等^[5]的方法,设计如表 1 中的 5 种方法。根据所获 HPLC 色谱图从中选出最适宜的方法予以评价。

1.3.4 HPLC 测定条件 色谱柱 Bio-Bond 5 μ m C₁₈ (4.6 mm \times 250 mm);流动相为乙腈(A)和水(B),流速 1 mL/min,进样量 10 μ L,柱温 40 $^{\circ}$ C。配二极管阵列紫外检测器(PDA),分别在 283 nm 和 220 nm 检测 4 种黄酮苷和柠檬苦素。

混标溶液洗脱条件由表 1 中的 5 种洗脱方法逐个试用,单标溶液洗脱条件和柚子样品的洗脱条件为表 1 中选取的最优方法。

1.3.5 重复性的测定 取 1.3.2 中的供试品溶液,制成平行样品 5 份,以 1.3.4 中的 HPLC 条件进行测定,每份样品连续进样 3 次,记录峰面积,分别计算 5 种成分的含量和相对标准偏差(RSD)。

1.3.6 精确度与加样回收率的测定 精密称取 201.5 mg 柚子幼果粉末,置于 50 mL 容量瓶中,分别加入不同质量的 5 种标准品,定容。以 1.3.2 中的方法处理后,制成平行样品 5 份,在 1.3.4 中的 HPLC 条件下进行测定,每份样品连续进样 3 次,记录峰面积,按式(1)计算平均回收率。用平均回收率和相对标准偏差(RSD)评价精确度高低。

$$R = \frac{m_1}{m_2 + m_2} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

R——回收率,%;

m_1 ——测得量,mg;

m_2 ——样品中成分质量,mg;

m_3 ——加标量,mg。

2 结果与分析

2.1 测定条件的确定

2.1.1 测定波长 图 1 分别为芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷和柠檬苦素的紫外吸收光谱图。由图 1(a)~(d)可知,芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷的最大吸收波长分别为 282, 282, 283, 283 nm,为操作

表 1 5 种不同的洗脱程序

Table 1 5 different elution programs

方法 1		方法 2		方法 3		方法 4		方法 5	
时间程序/min	$V_{\text{乙腈}} : V_{\text{水}}$								
0	22 : 78	0	22 : 78	0	22 : 78	0	22 : 78	0	22 : 78
10	22 : 78	10	22 : 78	10	22 : 78	8	22 : 78	8	22 : 78
12	45 : 55	12	65 : 35	12	80 : 20	10	90 : 10	10	95 : 5
22	45 : 55	21	65 : 35	21	80 : 20	16	90 : 10	16	95 : 5
24	22 : 78	23	22 : 78	23	22 : 78	18	22 : 78	18	22 : 78
25	22 : 78	25	22 : 78	25	22 : 78	20	22 : 78	20	22 : 78

与计算方便,选取 283 nm 为 4 种黄酮苷的紫外吸收波长。由图 1(e)可知,当检测波长 < 240 nm 时,波长越小,柠檬苦素的响应值越大,但考虑到既能检测到柠檬苦素又尽可能减少杂质或溶剂导致的紫外吸收误差,选择

220 nm 为测定柠檬苦素的吸收波长。据此,定量测定上述 5 种成分时,柠檬苦素选择采用 220 nm 时的吸收峰面积,而 4 种黄酮则采用 283 nm 测定时的吸收峰面积。

图2(a)~图2(e)分别为芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、

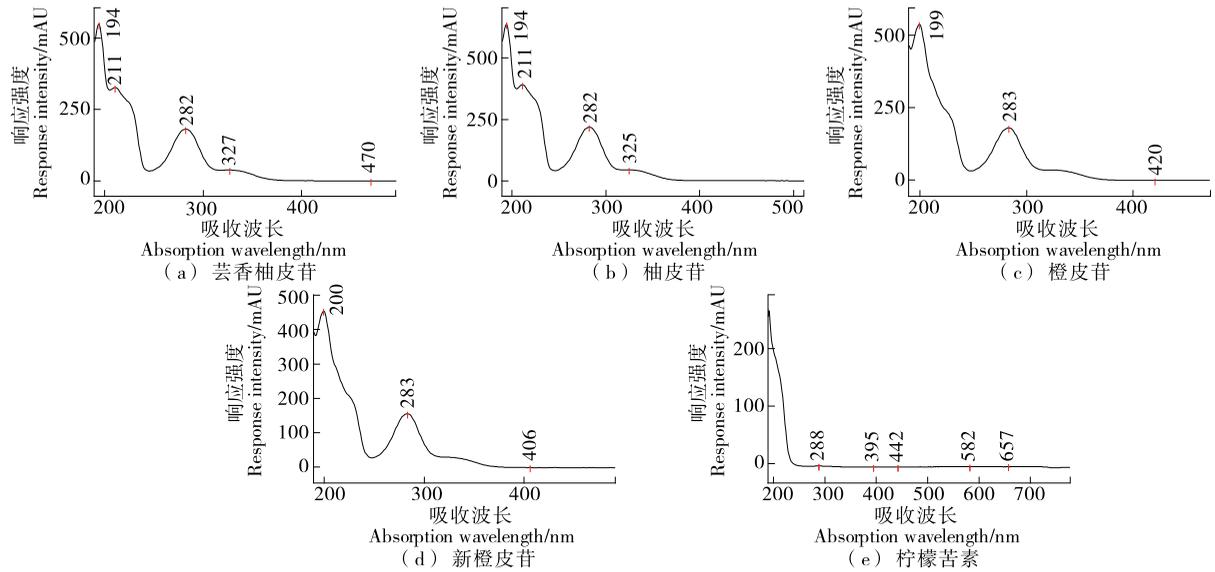
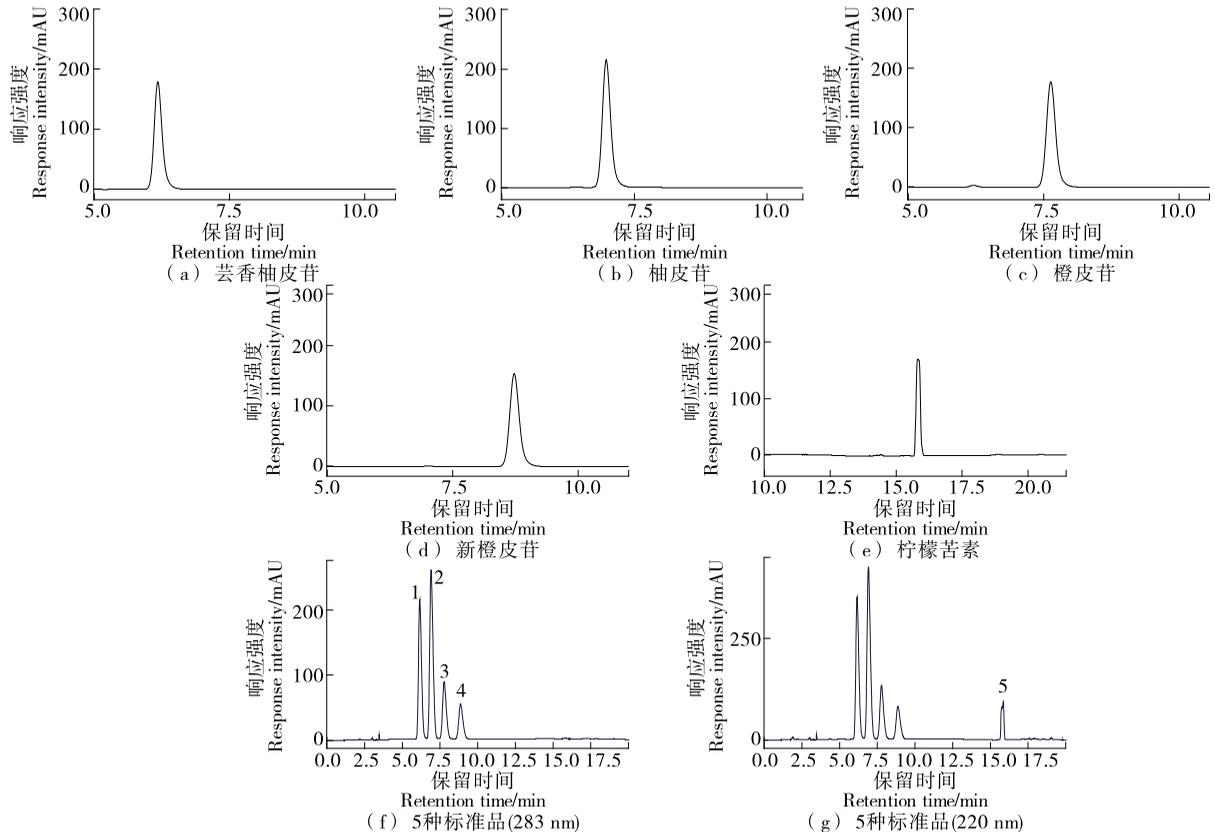


图 1 4 种黄酮苷和柠檬苦素的紫外吸收光谱图

Figure 1 UV absorption spectra of four flavonoid glycosides and limonin



1. 芸香柚皮苷 2. 柚皮苷 3. 橙皮苷 4. 新橙皮苷 5. 柠檬苦素

图 2 5 种标准品在 283 nm 和 220 nm 处的色谱图

Figure 2 Chromatograms of 5 standards at 283 nm and 220 nm

新橙皮苷和柠檬苦素的单标在方法5的洗脱程序下所获色谱图,图2(f)和图2(g)为上述5种物质的混标在方法5的洗脱程序下所获色谱图。由单标和混标的出峰时间对比分析可知,图2(f)和图2(g)中峰1~5分别为芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷和柠檬苦素。

2.1.2 最佳HPLC梯度洗脱条件 如图3所示,逐步提高流动相中乙腈比例,可使柠檬苦素的出峰时间提前。柠檬苦素出峰时间由方法1中21.15 min提前至方法5中15.84 min[图2(g)],提前了5.31 min,这是因为C₁₈反相色谱柱的填料以硅胶为基质,表面键合有极性相对较弱的官能团。因此,选择系统洗脱时间最短的方法5测定4种物质;在该条件下,各成分的分离度均大于1.5,满足测定要求^[6]。

2.2 测定方法的可靠性

2.2.1 标准曲线、线性范围、检测限和定量限 在1.3.4的条件下,对不同质量浓度的4种黄酮苷与柠檬苦素标准品进行测定。以各组分的峰面积为纵坐标(y),对应质

量浓度为横坐标(x)绘制标准曲线,得到5种物质的线性方程(见表2)。信噪比(S/N)为3时所对应的质量浓度即为检出限(LOD),信噪比为10时对应的质量浓度为定量下限(LOQ)^[7]。

2.2.2 重复性 按照1.3.5的处理方法,得出表3的重复性进样结果,其相对标准偏差(RSD)均小于2%,表明此种方法重复性良好。

2.2.3 精确度与加样回收率 按照1.3.6的处理方法,得出表4中一系列结果,5种成分的平均回收率范围为98.47%~99.81%,RSD均小于2%,表明此种方法测量精确,回收率良好。

2.3 柚子幼果与柚子汁中5种物质的含量

根据上述测定方法与标准曲线,测定按照1.3.5准备的柚子样品,测得柚子幼果(图4)中芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷和柠檬苦素的质量分数分别为8.49%,8.05%,1.30%,1.31%,1.46%;测得柚子汁(图5)中芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷和柠檬苦素的质量分

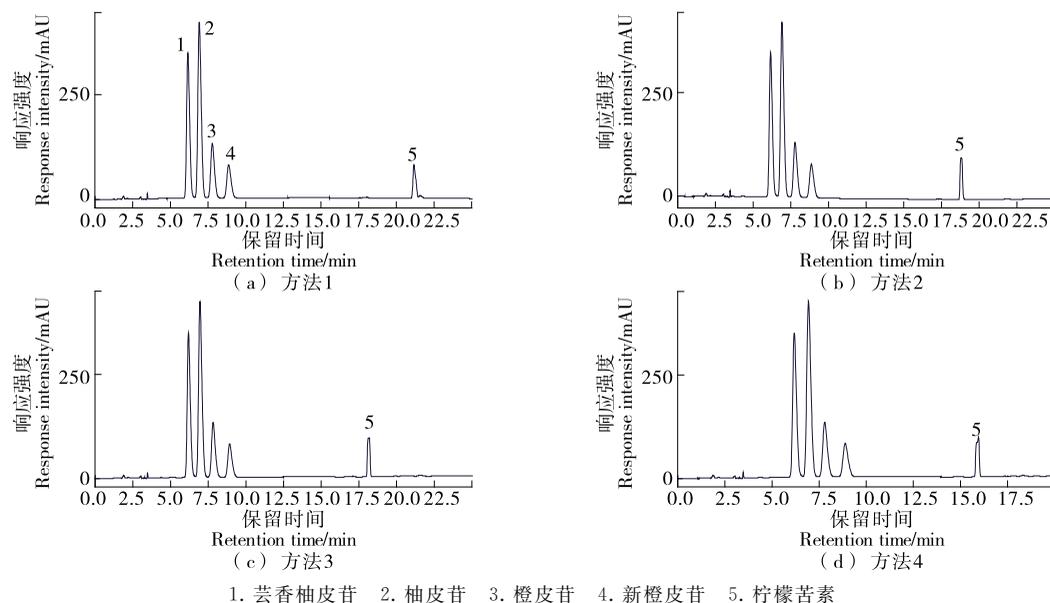


图3 不同洗脱条件下的色谱图(220 nm)

Figure 3 Comparison of tailing of limonoid peaks under different elution conditions (220 nm)

表2 5种成分的标准曲线、相关系数、线性范围、检出限、定量限[†]

Table 2 Standard curve, correlation coefficient, linear range, detection limit, and limit of quantification for the five components

成分	标准曲线	相关系数	线性范围/ (mg · L ⁻¹)	检出限/ (mg · L ⁻¹)	定量限/ (mg · L ⁻¹)
芸香柚皮苷	$y=18\ 154x-6\ 563.4$	0.999 8	6.78~724.56	0.48	1.18
柚皮苷	$y=18\ 050x-6\ 965.3$	0.999 9	9.57~764.22	0.69	1.51
橙皮苷	$y=19\ 308x-11\ 514$	0.999 8	4.89~736.68	0.32	0.86
新橙皮苷	$y=20\ 058x-7\ 319.5$	0.999 7	2.54~744.02	0.21	0.67
柠檬苦素	$y=7\ 511.5x+10\ 528$	0.999 9	10.57~489.67	1.52	3.15

[†] 4种黄酮苷测定波长:283 nm;柠檬苦素测定波长:220 nm。

数分别为 1.41%, 2.63%, 0.23%, 0.16%, 0.78%。

由图 4、图 5 可知:4 种黄酮物质分离度高,峰型好;但柠檬苦素峰型受到样品中杂质的影响,有一定的偏差,需要注意选择积分曲线;由表 5 可知:不同品种、不同生长期和不同部位的柑橘作物中成分质量分数各不相同。

尽管如此,通过上述方法一次测定且同时获得上述 5 种成分的含量是非常方便的。此前,人们或分为 2~3 次分别测量 5 种物质,或仅测其中的 3~4 种,试验所建立的 HPLC 方法可方便地同时测得其含量,为测定柑橘水果中类黄酮和苦味物质节约大量的成本与时间。

表 3 5 种成分的重复进样结果

Table 3 Repeated injection results of the five components

成分	含量/(mg · g ⁻¹)					平均值	RSD/%
	1	2	3	4	5		
芸香柚皮苷	84.78	85.35	84.92	85.17	84.93	85.03	0.27
柚皮苷	79.89	80.93	80.21	79.74	80.32	80.22	0.58
橙皮苷	13.12	12.86	13.21	12.89	13.11	13.04	1.18
新橙皮苷	13.09	12.85	13.38	13.18	13.21	13.14	1.48
柠檬苦素	14.51	14.72	14.37	14.85	14.21	14.53	1.78

表 4 5 种成分的加样回收率[†]

Table 4 Sample recovery for 5 components

成分	样品中对照品质量/mg	加入对照品量/mg	理论值/mg	测得量/mg	平均回收率/%	RSD/%
芸香柚皮苷	17.11	3.45	20.56	20.25, 20.47, 20.69, 20.29, 20.31	99.23	0.89
柚皮苷	16.22	4.36	20.58	20.53, 19.89, 20.83, 20.21, 20.38	98.97	1.72
橙皮苷	2.62	2.78	5.40	5.30, 5.46, 5.29, 5.51, 5.39	99.81	1.79
新橙皮苷	2.62	2.62	5.24	5.28, 5.09, 5.05, 5.23, 5.15	98.47	1.84
柠檬苦素	2.94	1.84	4.78	4.81, 4.62, 4.74, 4.83, 4.76	99.41	1.73

[†] 取样量 201.5 mg。

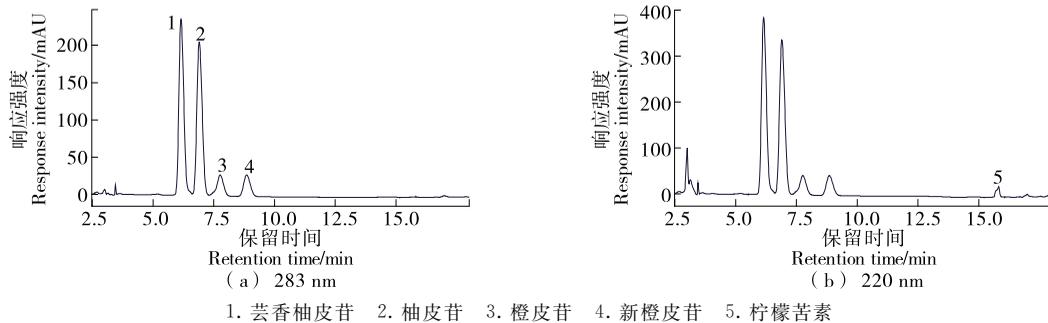


Figure 4 Chromatograms of young pomelo sample solution at 220 nm and 283 nm

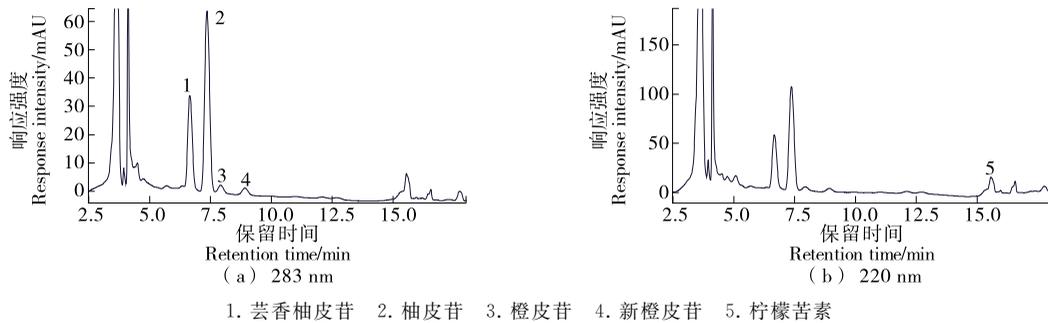


Figure 5 Chromatograms of young pomelo sample solution at 283 nm and 220 nm

表 5 不同柚子品种与部位的 5 种成分质量分数

Table 5 Contents of five components in different pomelo varieties and parts

样品	芸香柚皮苷	柚皮苷/%	橙皮苷/%	新橙皮苷/%	柠檬苦素/%	文献来源
台湾平柚皮	—	2.98	0.34	0.09	—	[8]
化州柚幼果	—	9.85	—	—	—	[9]
柚子籽	—	—	—	—	1.15	[10]
柚皮	—	—	—	—	0.47	[11]
马甲柚汁	—	2.06	5.30	4.10	0.48	[12]

† —表示未检测。

3 结论

试验建立的高效液相色谱法在 20 min 内,利用 PDA 检测器在 283 nm 与 220 nm 分别完成了对柚子幼果及柚子果汁中芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷和柠檬苦素 5 种关键的黄酮类和苦味物质的同时定量测定,测得柚子幼果中 5 种成分的质量分数分别为 8.49%, 8.05%, 1.30%, 1.31%, 1.46%, 柚子果汁中芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷和柠檬苦素的质量分数分别为 1.41%, 2.63%, 0.23%, 0.16%, 0.78%。但最终确定的方法中,新橙皮苷与柠檬苦素峰[图 2(g)]之间的时间间隔仍然较长,后续可使用不同流动相组分或洗脱方法予以减少。

参考文献

- [1] 周金花. 柚果废弃物中活性成分的提取分离及活性研究[D]. 长沙: 中南大学, 2007: 1-2.
- [2] 王松林, 彭荣, 崔榕, 等. 类柠檬苦素生物转化与脱苦研究进展[J]. 食品科学, 2015, 36(9): 279-283.
- [3] 冯桂仁, 姚晓玲, 袁奇, 等. 热处理与胡柚汁中柠檬苦素变化的相关性分析[J]. 食品与机械, 2012, 28(4): 26-28.
- [4] 朱露, 雷鹏, 黄琪, 等. 反相高效液相色谱法测定枳实中芸香柚皮苷、柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的含量[J]. 中南药学, 2013, 11(12): 934-937.
- [5] 蔡艳芳, 江国荣. 反相高效液相色谱法测定枳实中柠檬苦素的含量[J]. 临床合理用药杂志, 2015, 8(32): 90-91.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 三部[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 419.
- [7] 邓琪, 袁仲安, 黄雪松. 高效液相双柱法测定油脂中的甘油三酯氧化聚合物[J]. 食品科学, 2020, 41(2): 321-326.
- [8] WANG Y C, CHUANG Y C, HSU H W. The flavonoid, carotenoid and pectin content in peels of citrus cultivated in Taiwan[J]. Food Chemistry, 2008, 106(1): 277-284.
- [9] 李泮霖, 李锋, 余剑军, 等. 化州柚幼果生长过程中柚皮苷含量的动态变化研究[J]. 中药材, 2012, 35(4): 538-539.
- [10] QIN Si, LV Cheng-hao, WANG Qing-shan, et al. Extraction, identification, and antioxidant property evaluation of limonin from pummelo seeds[J]. Animal Nutrition, 2018, 4(3): 281-287.
- [11] YANG Yuan-fan, ZHANG Liang-zheng, DU Xi-ping, et al. Recovery and purification of limonin from pummelo citrus grandis peel using water extraction, ammonium sulfate precipitation and resin adsorption[J]. Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2017, 1 060: 150-157.
- [12] 高歌. 超高压技术在红柚汁加工与柚皮果胶提取中应用研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2018: 1-2.
- [17] ZHONG Hai-lin, LAUCHLI A. Changes of cell wall composition and polymer size in primary roots of cotton seedlings under high salinity[J]. Journal of Experimental Botany, 1993(4): 4.
- [18] 王媛莉, 李梅青, 董明, 等. 草酸铵超声辅助提取豆腐柴果胶[J]. 食品科学, 2011(10): 88-91.
- [19] XIE Zhong-lei, CHEN Zhuo, SUN Wen-tian, et al. Distribution of aluminum and fluoride in tea plant and soil of teagarden in central and southwest China[J]. Chinese Geographical Science, 2007, 17: 376-382.
- [20] RENGEL Z, REID R J. Uptake of Al across the plasma membrane of plant cells[J]. Plant & Soil, 1997, 192(1): 31-35.
- [21] CHANG Y C, YAMAMOTO Y, MATSUMOTO H. Accumulation of aluminium in the cell wall pectin in cultured tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) cells treated with a combination of aluminium and iron [J]. Plant Cell & Environment, 2010, 22(8): 1 009-1 017.
- [22] WALLACE G, FRY S. Phenolic components of the plant cellwall[J]. International Review of Cytology, 1994, 151: 229-267.
- [23] STRACK D, JÜRGEN H, MMKEN M, et al. Cell wall-conjugated phenolics from coniferae leaves[J]. Phytochemistry, 1988, 27(11): 3 517-3 521.
- [24] DREWITT P N, BUTTERWORTH K R, SPRINGALL C D, et al. Plasma levels of aluminium after tea ingestion in healthy volunteers [J]. Food and Chemical Toxicology, 1993, 31(1): 19.
- [25] FAIRWEATHER-TAIT S J, PIPER Z, FATEMIS J A, et al. The effect of tea on iron and aluminium metabolism in the rat [J]. British Journal of Nutrition, 1991, 65(1): 61-68.

(上接第 50 页)