

四种果皮中橙皮苷含量的测定

曹峰

莱芜市食品药品检验检测中心, 山东 莱芜 271100

摘要: 为建立一种测定橙皮、橘皮、柚皮及柠檬皮中橙皮苷含量的高效液相色谱法。以 Symmertry Shield RP18 柱为分离柱, 甲醇-2.5%乙酸溶液 (40:60 V:V) 为流动相, 柱温 30 °C, 紫外检测器在波长 283 nm 条件下检测, 一次进样 7 min 内完成分析过程。橙皮苷在 2.0~100.0 mg/L 范围内有良好的线性关系 ($R=0.9999$); 平均加标回收率为 98.9%, 检出限为 2.0×10^{-3} g/kg; 精密度实验 ($n=6$) 表明, 橙皮苷峰面积的相对标准偏差 (RSD) 为 0.05%。该方法简便快捷, 可准确测定四种果皮中橙皮苷的含量。

关键词: 高效液相色谱法; 四种果皮; 橙皮苷

中图分类号: O657.7

文献标识码: A

文章编号: 1000-2324(2016)03-0404-04

Determination of Hesperidin Contents in Four Kinds of Peels

CAO Feng

Laiwu Food and Drug Inspection Center, Laiwu 271100, China

Abstract: In order to develop a method for determination of hesperidin contents in orange peel, citrus peel, pomelo peel and lemon peel by HPLC. Hesperidin was qualitatively analyzed through a Symmertry Shield RP18 column. The mobile phase was methanol-2.5% acetic acid (40:60 V:V) and the column temperature was 30 °C. A UV detector detected at 283 nm and the separation was achieved within 7 min. The standard working curve of hesperidin had a good liner relation in the concentration ranging from 2.0 to 100.0 mg/L ($R=0.9999$). The average recovery was 98.9% and detection limit was 2.0×10^{-3} g/kg. The precision test ($n=6$) showed that the relative standard deviation (RSD) for the peak areas was 0.05%. This method was simple and rapid and could determine the content of hesperidin in four kinds of peels.

Keywords: HPLC; four kinds of peels; hesperidin

橙皮苷 (Hesperidin) 是一种双氢黄酮类糖苷^[1], 为黄酮类化合物中最重要的一种。研究表明, 橙皮苷具有抗氧化、抗过敏、抑菌消炎、抗病毒、抗癌、维持渗透压、降低血压、降低低密度胆固醇、调节免疫、改变体内酶活性、改善微循环等生理功能^[2,3], 具有很高的药用价值, 是治疗心血管疾病药物的重要原料^[4]。此外, 橙皮苷还可作为天然抗氧化剂和食品添加剂的原料, 在食品及保健品领域有着广泛的用途^[5]。

橙皮苷主要存在于柑橘类水果中, 尤其是在柑、橘、甜橙和柠檬等的果皮中含量较多^[1], 但除橘皮可作为中药材陈皮外, 橙皮、柚皮、柠檬皮等常作为废弃物扔掉, 从环境、经济和资源利用角度都不尽科学合理。因此, 准确测定橙皮、橘皮、柚皮及柠檬皮中橙皮苷含量, 为橙皮苷提取原料的选择提供理论依据, 对充分利用四种果皮具有重要意义。目前橙皮苷的检测方法主要有高效液相色谱法^[6]、紫外分光光度法^[7]、高效液相色谱-串联质谱联用法^[8]、核磁共振氢谱法^[9]等, 其中高效液相色谱法具有灵敏度高、重现性好、操作简便等优点, 是最常用的测定方法之一。

为充分提取果皮中的橙皮苷, 本实验参考相关文献^[10-12]并加以改进, 以甲醇作为提取液, 超声提取 3 次, 大大提高了橙皮苷的提取率, 并建立了一种准确、简便、快速测定四种果皮中橙皮苷含量的高效液相色谱法, 旨在为为橙皮、橘皮、柚皮、柠檬皮资源的充分利用提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 设备与材料

Waters e2695 高效液相色谱仪(带自动进样器, Empower 3 工作站), 美国 Waters 公司; Waters 2489 紫外/可见光检测器, 美国 Waters 公司; UV-9000S 双光束紫外可见分光光度计, 上海元析仪器有限公司; JAC-300N 超声波振荡器, 济宁市奥波超声电气有限公司; TGL-20M 台式高速离心机, 上海卢湘仪离心机仪器有限公司。

收稿日期: 2014-06-03

修回日期: 2014-06-30

作者简介: 曹峰(1978-), 男, 硕士, 工程师, 主要从事食品检验检测工作. E-mail: caofeng3709@163.com

橙皮苷标准品,美国 ACROS 公司;甲醇(色谱纯)、冰乙酸(优级纯),天津市科密欧化学试剂有限公司;实验用水为超纯水。

1.2 色谱条件

色谱柱为 Symmertry Shield RP18 柱(4.6 mm×150 mm, 5.0 μm; 美国 Waters 公司),流动相为甲醇-2.5%乙酸溶液(40:60 V:V),流速为 1 mL/min,进样量 20 μL,柱温 30 °C,紫外检测器波长 283 nm。以保留时间定性,峰面积定量。

1.3 样品处理

将干燥后的橙皮、橘皮、柚皮及柠檬皮四种果皮样品粉碎,过 60 目筛,分别称取样品 0.2 g(精确至 0.001 g),放入 250 mL 具塞三角瓶中,加入 50 mL 甲醇,于超声波振荡器中超声提取 45 min(功率 200 W,温度 50 °C),然后以 6000 r/min 的转速离心 15 min,移取上清液于 250 mL 容量瓶中,剩余残渣再超声提取 2 次,每次 20 mL 甲醇,超声提取 10 min,合并提取液,用甲醇定容至 250 mL,经 0.22 μm 滤膜过滤后待测。

1.4 标准品溶液的配制

精确称量橙皮苷标准品 5.00 mg,用甲醇超声溶解并定容至 50 mL,即得 100.0 mg/L 橙皮苷标准品溶液,作为储备液。

分别精确移取橙皮苷标准品储备液 0.20 mL、0.50 mL、1.00 mL、2.50 mL、5.00 mL 于 5 只 10 mL 的容量瓶中,用甲醇溶解并定容至刻度,即得 2.0 mg/L、5.0 mg/L、10.0 mg/L、25.0 mg/L、50.0 mg/L 橙皮苷标准品溶液。

2 结果与分析

2.1 色谱条件的优化

2.1.1 检测波长的选择 利用紫外可见分光光度计对橙皮苷标准品溶液在波长 200~350 nm 范围内进行紫外扫描,结果见图 1 所示。

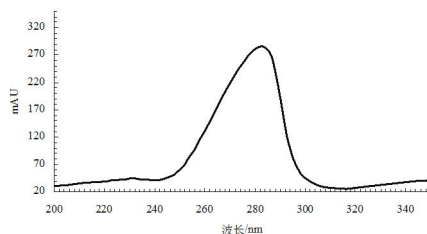


图 1 橙皮苷的扫描光谱图
Fig.1 Absorption spectrum of hesperidin

由图 1 可以看出橙皮苷在波长 283 nm 左右有最大吸收,与《中国药典》中药材陈皮质量标准中橙皮苷含量测定的检测波长一致,且在最大吸收波长条件下检测干扰少,灵敏度高,因此本研究选择 283 nm 作为检测波长。

2.1.2 流动相及洗脱条件的选择 参照相关文献^[13,14],本研究对比了乙腈-0.5%磷酸、乙腈-0.5%乙酸、甲醇-2.5%乙酸溶液、甲醇-0.5%磷酸 4 种流动相体系,结果表明乙腈-0.5%磷酸、乙腈-0.5%乙酸、甲醇-2.5%乙酸溶液 3 种流动相体系的分离效果较好,由于甲醇毒性小于乙腈且乙酸腐蚀性要小于磷酸,因此本研究选择甲醇-2.5%乙酸溶液为流动相。

将甲醇与 2.5%乙酸溶液在体积比分别为 10:90、20:80、30:70、40:60 及 50:50 的条件下对橙皮苷标准品及 4 种果皮提取液进行等度洗脱,结果发现两者体积比为 20:80 时橙皮苷在 30 min 内未能出峰,30:70 时橙皮苷出峰时间在 15 min 左右,而体积比在 40:60 时橙皮苷 5 min 左右就能出峰,且峰形良好。尽管提高有机相甲醇的比例,橙皮苷的出峰时间能够提前,但橙皮苷色谱峰与杂质峰不能很好分离,考虑到检测效果,选择甲醇与 2.5%乙酸溶液体积比为 40:60。

2.1.3 柱温及色谱条件的确定 柱温对色谱柱的分离效果有一定影响,随着温度升高,柱压下降,被

分析物质的保留时间缩短, 由于橙皮苷耐热性较好, 考虑到分析效果及分析时间, 选择柱温为 30 ℃。

通过以上实验, 最终确定色谱条件为: 流动相为甲醇-2.5%乙酸溶液(体积比 40:60), 流速为 1 mL/min, 进样量 20 μL, 紫外检测器波长 283 nm, 柱温 30 ℃。在此条件下橙皮苷标准物质及四种果皮样品色谱图见图 2 所示。

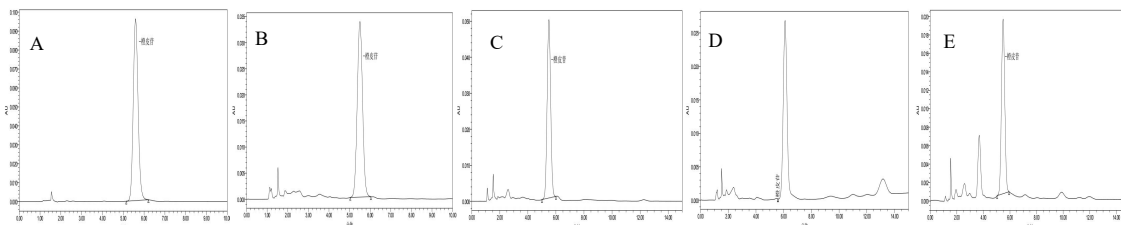


图 2 橙皮苷标准物质及四种果皮色谱图

A:橙皮苷标准物质; B:橙皮; C:橘皮; D:柚皮; E:柠檬皮

Fig.2 Chromatogram of hesperidin standard materials and four kinds of peels

A: Hesperidin standard; B: Orange peel; C: Citrus peel; D: Pomelo peel; E: Lemon peel

2.2 橙皮苷的线性和检出限

在优化的色谱条件下, 对 1.4 中配制的不同浓度的橙皮苷标准物质溶液进行测定, 结果显示在此范围内浓度和峰面积之间有良好的线性关系。橙皮苷的标准曲线见图 3, 回归方程、相关系数(R)、检出限(在优化的色谱条件下以 3 倍信噪比为检出限)、相对标准偏差(RSD)见表 1。

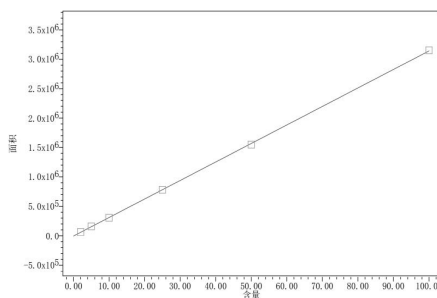


图 3 橙皮苷的标准曲线

Fig.3 Standard curve of hesperidin

表 1 回归曲线的基本参数及检出限

Table 1 Fundamental parameters of regression equation and detection limit

线性范围	回归方程	相关系数	相对标准偏差	检出限
Linear range/mg·L ⁻¹	Calibration equation	R	RSD/%	Detection limit/g·kg ⁻¹
2.0~100.0	Y=31500X-4670	0.9999	1.19	2.0×10 ⁻³

备注: Y, 峰面积; X, 质量浓度 (mg/L)

Note: Y, peak area; X, mass concentration (mg/L)

2.3 检测方法的精密度实验

将浓度为 10.0 mg/L 的橙皮苷标准品溶液进样 20 μL, 连续重复 6 次, 测其峰面积, 结果见表 2。

表 2 精密度实验结果 (n=6)

Table 2 Results of precision test (n=6)

橙皮苷浓度	峰面积	峰面积平均值	标准偏差	相对标准偏差
Hesperidin concentration/mg·L ⁻¹	Peak area/μV*s	Average peak area/μV*s	SD	RSD/%
10.0	307234	306995	161	0.05
	306809			
	306824			
	307098			
	307001			
	307012			

由表 2 可以看出, 连续 6 次测定的橙皮苷峰面积的 RSD 为 0.05%, 因此本方法精密度良好。

2.4 样品加标回收率的测定

以橙皮为样品, 按线性范围加入一定量的橙皮苷标准物质, 按照 1.3 中的方法处理后进行加标

回收实验, 平行测定6次, 结果见表3。

表3 加标回收实验 (n=6)
Table 3 The recovery test (n=6)

样品编号 Sample numbers	本底值 Background/mg·L ⁻¹	加标量 Added/mg·L ⁻¹	实测值 Found/mg·L ⁻¹	回收率 Recovery/%	平均回收率 Average recovery/%	相对标准偏差 RSD/%
1	19.505	1.000	20.121	98.0		
2	19.505	2.000	21.078	97.8		
3	19.505	5.000	24.089	97.9		
4	19.505	10.000	29.617	100.6	98.9	1.58
5	19.505	20.000	39.049	97.7		
6	19.505	30.000	49.715	101.1		

从表中结果可以看出, 在优化的分析条件下橙皮苷的平均加标回收率为98.9%, 相对标准偏差(RSD)为1.58%, 测定结果准确可靠, 完全满足样品的检测要求。

2.5 样品中橙皮苷含量的测定

将1.3项制备的橙皮、橘皮、柚皮及柠檬皮供试样品溶液按1.2色谱条件平行测定6次, 结果见表4。

表4 四种果皮中橙皮苷含量 (n=6)
Table 4 The hesperidin contents in four kinds of peels (n=6)

样品名称 Sample names	橙皮苷含量 Hesperidin contents/g·(100 g) ⁻¹	平均含量 Average content/g·(100 g) ⁻¹	相对标准偏差 RSD/%
橙皮(脐橙)	2.42, 2.44, 2.40, 2.41, 2.39, 2.46	2.42	1.08
橘皮(蜜桔)	3.46, 3.48, 3.50, 3.44, 3.49, 3.51	3.48	0.75
柚皮(红心柚)	未检出	未检出	/
柠檬皮(香柠檬)	1.24, 1.23, 1.22, 1.25, 1.21, 1.23	1.23	1.15

由表4可以看出, 4种果皮中橘皮(蜜桔)的橙皮苷含量最高, 为3.48 g/100 g, 其次为橙皮(脐橙)2.42 g/100 g, 柠檬皮(香柠檬)1.23 g/100 g, 其中柚皮(红心柚)中未检出橙皮苷, 与但俊峰^[15]的研究结果相似。

3 结论

本方法采用甲醇为提取液, 甲醇-2.5%乙酸溶液(体积比为40:60)为流动相, 紫外检测器波长为283 nm, 橙皮苷在2.0~100.0 mg/L范围内有良好的线性关系($R=0.9999$); 平均加标回收率为98.9%, 检出限为 2.0×10^{-3} g/kg; 精密度试验显示6次测定橙皮苷标准品, 其峰面积的相对标准偏差为0.05%。研究结果表明该方法分离效果好、快速简便、精密度好, 可以准确测定4种果皮中橙皮苷的含量, 适合检测机构的日常检测。

参考文献

- [1] 张凤, 黄芳, 李健. 正交试验优化橘皮中橙皮苷提取工艺[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(21): 11048-11049
- [2] 宁方刚, 许建中, 李小波, 等. 橙皮苷的高效液相色谱定量分析[J]. 中国食品添加剂, 2011(11): 220-223, 234
- [3] 齐兵, 何志勇, 秦肪, 等. 陈皮中橙皮苷的提取与纯化工艺研究[J]. 食品工业科技, 2012, 33(24): 343-346
- [4] 朱玉昌, 周大寨, 王成. 甜橙皮中橙皮苷提取工艺[J]. 食品科学, 2010, 31(22): 264-267
- [5] 朱荣莉, 高少洁, 雷杰, 等. 桔皮中橙皮苷提取工艺的研究[J]. 食品与发酵科技, 2012, 48(6): 57-60
- [6] WANG Ningfang. Determination of Hesperidin in Citrus Peel by HPLC[J]. Agricultural Science & Technology, 2013, 14(4): 554-556, 576
- [7] 贺丽娜, 叶华, 郭方道. 橙皮苷分析方法研究[J]. 广州化工, 2012, 40(14): 126-128
- [8] 许海棠, 李家璇, 陈其锋, 等. HPLC-MS/MS法测定四季感冒胶囊中的4种有效成分[J]. 广西民族大学学报: 自然科学版, 2013, 19(3): 91-94
- [9] 李建发, 全志利, 蓝丹, 等. 核磁共振氢谱定量分析橙皮苷含量[J]. 实验室研究与探索, 2012, 31(6): 18-21
- [10] 谈安群, 吴厚玖, 王华, 等. 索氏法与超声波辅助提取甜橙皮苷比较研究[J]. 中国食品学报, 2012, 12(6): 80-87
- [11] 梁志鸿, 刘晓红, 李建敏, 等. 从柑桔皮中超声提取橙皮苷[J]. 食品科技, 2012, 37(3): 225-228
- [12] 朱红菊, 丁玉, 贾亚伟. 桔皮中橙皮苷的新型双水相萃取[J]. 食品与生物技术学报, 2013, 32(9): 995-1001
- [13] 甘伟发, 黄庆华, 吉国辉, 等. 茶枝柑皮提取物中黄酮类成分的含量测定[J]. 广东药学院学报, 2013, 29(3): 273-276
- [14] 杨慈海, 杨春丽. 高效液相色谱法测定养胃颗粒中橙皮苷的含量[J]. 北方药学, 2013, 10(10): 5-6
- [15] 但俊峰. 不同生长期柚果中功能性成分的分析研究[D]. 杭州: 浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 2008: 10-23