

胡柚中3种主要黄酮类物质的含量测定

吴倩, 朴香兰*, 杨静

(中央民族大学 中国少数民族传统医学研究院, 北京 100081)

摘要:目的: 建立常山胡柚3种主要黄酮类物质含量的测定方法, 并比较常山胡柚中皮、肉、籽中该3种黄酮类物质含量的差异。方法: 采用反相高效液相色谱法分离检测胡柚中柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的含量; 流动相为乙腈-水(23:77, V/V), 柱温25℃, 流速1.0mL/min, 检测波长283nm。结果: 柚皮苷在3.22~1030μg/mL、橙皮苷在0.59~380μg/mL、新橙皮苷在0.077~990μg/mL范围内, 黄酮类物质的质量浓度与峰面积呈良好的线性关系; 柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷的平均回收率分别为98.43%(RSD=4.07%)、98.70%(RSD=4.30%)、99.90%(RSD=3.47%); 并以柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷为标准比较胡柚副产物皮、籽与胡柚肉含量的差异, 初步得出皮>肉>籽。结论: 该方法简便、准确、可靠、重复性好, 可用于常山胡柚的质量控制。

关键词: 胡柚; 柚皮苷; 橙皮苷; 新橙皮苷; 含量测定

Determination of Three Major Flavonoids in *Citrus paradisi* cv. Changshan Huyou Fruit

WU Qian, PIAO Xiang-lan*, YANG Jing

(Institute of Chinese Minority Traditional Medicine, Minzu University of China, Beijing 100081, China)

Abstract: Objective: To establish a method for determining naringin, hesperidin, and neohesperidin in *Citrus paradisi* cv. Changshan Huyou fruit and compare their contents in different parts such as peel, pulp and seeds. Methods: The contents of naringin, hesperidin and neohesperidin were determined by a reversed-phase HPLC method. Methanol extracts of samples and the standard substances were separated on a YMC C₁₈ column (4.6 mm × 250 mm, 5 μm) using a mobile phase made up of acetonitrile and water (23:77, V/V) at a flow rate of 1 mL/min and detected by a UV detector at a wavelength of 283 nm. The column temperature was set at 25 °C. Results: The calibration curves were linear in the range of 3.22—1030 μg/mL for naringin, 0.59—380μg/mL for hesperidin, and 0.077—990μg/mL for neohesperidin, respectively. The average recoveries of naringin, hesperidin and neohesperidin were 98.43% (RSD = 4.07%), 98.70% (RSD = 4.30%) and 99.90% (RSD = 3.47%), respectively. The contents of naringin, hesperidin, neohesperidin were the highest in the peel and the lowest in the seeds of *Citrus paradisi* cv. Changshan Huyou fruit. Conclusions: This method is simple, accurate, reliable and reproducible and can therefore be used for the quality control of *Citrus paradisi* cv. Changshan Huyou fruit.

Key words: *Citrus paradisi* cv. Changshan Huyou; naringin; hesperidin; neohesperidin; determination

中图分类号: TS207.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)18-0168-03

胡柚为芸香科植物柚(*Citrus grandis* L. Osbeck)与甜橙(*Citrus sinensis* L. Osbeck)的杂交品种^[1]。在中医学上, 胡柚属于凉性果品, 具有清凉祛火、平喘化痰、生津止咳、健胃壮身、降血脂、抗便秘、抗衰老等特殊的药理功效, 因而其本身就是一种理想的保健水果, 常食有益于身体健康^[2]。

胡柚中含有丰富的VC、VB₁、VB₂、VA、挥发

油类、黄酮类化合物、香豆素类、柠檬苦素类及三萜类化合物等。随着对胡柚研究的深入, 发现副产物果皮和籽含有许多活性成分。如皮和籽中含有挥发油类物质、柚皮苷(naringin)、橙皮苷(hesperidin)、新橙皮苷(neohesperidin)等黄酮类物质^[3-5]、柠檬苦素类似物、天然色素等成分。

黄酮是一种广泛分布在药用植物和植物的果实的一

收稿日期: 2010-11-11

基金项目: 国家自然科学基金面上基金项目(30973960); 国家自然科学基金中韩合作研究项目(81011140347);

国家民委科研项目(09ZY17)

作者简介: 吴倩(1986—), 女, 硕士研究生, 研究方向为天然药物化学。E-mail: chengsekafeiwuqian@126.com

* 通信作者: 朴香兰(1965—), 女, 副教授, 博士, 研究方向为天然药物化学。E-mail: xlpiao@163.com

类重要的二次代谢产物,主要为植物和蔬菜提供风味和颜色,主要以苷元形式存在。在食品工业中,柚皮苷可作为天然着色剂和风味改良剂。虽然柚皮苷具有苦味,但用在饮料以及高级糖果中却具有增强风味的作用。柚皮苷还可作为合成高甜度、无毒、低能量的新型甜味剂二氢柚苷查耳酮和新橙皮苷二氢查耳酮的原料^[6]。在碱性条件下经氧化处理,得到其甜度是蔗糖的100倍的二氢查耳酮甜味剂。黄酮类物质有很好的药理作用,如抗炎^[7]、抗氧化^[8]、免疫调节^[9]和对缺血再灌注损伤的保护^[10]等。药理作用表明胡柚中柚皮苷和橙皮苷具有较好的抗菌活性,能抑制金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、志贺氏菌、埃希大肠杆菌及某些真菌的生长,其中对真菌的抑制效果好于对细菌的抑制效果^[11]。一些流行病学研究表明黄酮类物质的摄入可以降低心脑血管发生率和不同型癌症的发生率,胡柚皮中的黄酮类物质作为自由基清除剂存在构效关系,是一种良好的自由基清除剂。柚皮苷清除自由基的 IC_{50} 为1.6mg/mL,清除 $\cdot OH$ 的 IC_{50} 为925.87mg/mL,表明胡柚皮提取物具有较强的清除自由基的能力,可以预防体内形成过多的 $\cdot OH$ 和其他活性氧自由基,达到防衰、抗癌、抗心血管病的目的^[12]。

本实验以高效液相色谱法(high performance liquid chromatography, HPLC)法测定常山胡柚中柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷含量,建立常山胡柚主要黄酮类物质的含量测定方法,并比较常山胡柚皮、籽、肉中黄酮类物质的含量,为以后研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

常山胡柚为市购,由本实验室鉴定为胡柚 *Citrus paradisi*。

柚皮苷、橙皮苷、新橙皮苷 美国 Sigma 公司;乙腈(色谱纯) 美国 Fisher 公司;色谱水为 Millipore 超纯水。

1.2 仪器与设备

LC-20A 高效液相色谱仪(配有 LC-20A 泵、SIL-20A 自动进样器、SPD-M20 检测器、CTO-10AS 柱温箱和 CBM-20A 系统控制器) 日本岛津公司;KQ-500E 型超声波清洗机 昆山市超声仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 色谱条件

色谱柱: YMC C₁₈(4.6mm × 250mm, 5 μm); 流动相为乙腈-水(23:77, V/V); 流速: 1.0mL/min; 检测波长: 283nm; 柱温: 25℃; 进样量: 5 μL。

1.3.2 对照品溶液

分别精密称取柚皮苷 1.03mg、橙皮苷 0.38mg、新

橙皮苷 0.99mg, 加入适量甲醇溶解并定容, 配制成质量浓度分别为 1.03、0.38、0.99mg/mL 的对照品储备液, 分别精密量取一系列体积的各对照品储备液适量, 以甲醇稀释, 制成一系列的混合对照品溶液, 避光保存。

1.3.3 供试品溶液

分别精密称量胡柚皮 8.206g、胡柚籽 5.128g、胡柚肉 17.677g、各加入 2 倍甲醇, 密封, 称量, 超声处理(功率 500W、频率 40kHz)30min, 取出, 放冷, 再称量, 用甲醇补足减失的质量, 摇匀, 将提取液过 0.45 μm 滤膜, 待用。

2 结果与分析

2.1 线性范围和检出限(limit of detection, LOD)考察

精密吸取 1.3.2 节对照品储备液各 5 μL 注入液相色谱仪中, 记录柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷的峰面积。以对照品质量浓度为横坐标、峰面积为纵坐标, 绘制标准曲线。以信噪比为 3 确定柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷的 LOD 见表 1。

表 1 3 种物质的线性和最低检出限结果($n=6$)
Table 1 Linear regression equations and detection limits of 3 flavonoids ($n=6$)

化合物	线性方程	相关系数 r	线性范围 / (μg/mL)	最低检测限 / (μg/mL)
柚皮苷	$Y = 5189.7787X + 18495.14$	0.9995	3.22-1030	0.00258
橙皮苷	$Y = 522.7624X + 619.97$	0.9998	0.59-380	0.05937
新橙皮苷	$Y = 3789.0986X + 10934.22$	0.9998	0.077-990	0.03867

2.2 稳定性实验和精密度实验

精密吸取 1.3.3 节中的供试品溶液各 5 μL, 于 0、2、4、6、8、12h 分别进样, 结果见表 2。日内精密度: 分别精密吸取 1.3.3 节中的供试品溶液各 5 μL, 按上述色谱条件, 连续进样 6 次, 结果见表 2; 日间精密度: 分别精密吸取 1.3.3 节中的供试品溶液各 5 μL, 按上述色谱条件, 连续 4d 进样, 结果见表 2。

表 2 稳定性和精密度实验结果
Table 2 Stability and precision of the proposed HPLC method

部位	化合物	稳定性 RSD/%	精密度 RSD/%	
			日内	日间
果皮	柚皮苷	4.18	2.31	3.09
	橙皮苷	3.94	3.82	1.91
	新橙皮苷	4.33	1.62	3.45
果肉	柚皮苷	7.69	1.96	4.87
	橙皮苷	7.08	1.89	5.04
	新橙皮苷	7.77	5.40	4.73
籽	柚皮苷	4.09	2.52	0.81
	橙皮苷	4.13	3.26	2.38
	新橙皮苷	4.74	3.99	3.76

表3 3种物质的回收率结果

Table 3 Average spike recoveries and RSDs for 3 flavonoids

柚皮苷						橙皮苷						新橙皮苷					
加标量	样品量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%	加标量	样品量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%	加标量	样品量/ μg	测得量/ μg	回收率/%	平均回收率/%	RSD/%
低		23.01	95.5			低		19.12	96.1			低		40.33	97.7		
中	13.46	23.76	103.0	98.43	4.07	中	9.51	19.87	103.6	98.70	4.30	中	20.79	41.57	103.9	99.90	3.47
高		32.82	96.8			高		28.79	96.4			高		50.21	98.1		

注：“高、中、低”加标量的质量浓度分别为样品质量浓度的120%、100%、80%。

表4 胡柚皮、籽、肉中3种黄酮类物质含量的测定结果

Table 4 Flavonoids contents in *Citrus paradisi* cv. Changshan Huyou fruit peel, pulp and seeds determined by the proposed HPLC method

化合物	果皮			果肉			籽		
	柚皮苷	橙皮苷	新橙皮苷	柚皮苷	橙皮苷	新橙皮苷	柚皮苷	橙皮苷	新橙皮苷
含量/ $\mu\text{g/g}$	1345.92	950.62	2078.82	102.43	59.13	86.68	17.00	2.20	2.92

2.3 回收率实验

精密称取柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷对照品适量，加入到已测知柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷含量的胡柚皮中，按1.3.3节制备的供试品溶液，测定柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷的含量，计算回收率，结果见表3。

2.4 实际样品测定

按上述所建立的方法分别测定胡柚皮、胡柚肉、胡柚籽中柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷的含量，结果见表4。

3 结 论

氧化性应激与多种疾病的发生有关，其中包括自身免疫性疾病、糖尿病、白内障、癌症、心脑血管病、骨关节病、老年痴呆等的产生与发展都可由自由基及其代谢产物诱发^[13-15]，尽管机体有各种各样的抗氧化物进行对自由基的阻断，但是当这种阻断不充分时，自由基的产生和消除之间的平衡就会丧失，氧化损伤就会发生。为了加强防预系统、促进抗氧化能力，有必要从体外补充各种具有抗氧化能力的物质，包括各种抗氧化食品和药品，即自由基的防御与捕捉性抗氧化物，以维持内环境的生态平衡，这对于防止上述疾病的发生和保持机体健康十分重要，因此对外源性抗氧化物的研究已成为现代医药研究的一个重要方面，尤其是水果、蔬菜的研究^[16-18]。

针对胡柚中的黄酮类主成分柚皮苷、橙皮苷和新橙皮苷，通过含量测定的比较，发现皮中3种黄酮类物质含量最高，其次为胡柚肉，在胡柚籽中含量最低。在几乎占果实总重的一半的胡柚皮中除含有水分、维生素、矿物质这些人体必需的营养素外，还含有多种对人体健康有益的非营养性生理活性成分，如黄酮类化合物，这些成分均高于胡柚果实。而胡柚果实食用或加工后，剩下大量果皮，不仅污染环境，而且也浪费资源。所以应该充分利用胡柚皮，对胡柚皮进行深度加工，生产出高附加值产品如黄酮类化合物、柠檬苦素类似物、香精油、色素、果胶等，可拓展对胡柚果的利用途径，对发展农村经济具有重要意义。在胡柚果皮的利用上，必须选择

合理而有效的利用途径及提取分离方法以提高产品的质量；将提取工艺产业化，应用于实际生产，争取能在生产成本低，生产效率高的条件下获得高附加值产品。

参考文献：

- [1] 任贻军, 张宏琳, 李建英. 胡柚的化学成分及药理作用研究[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(21): 9976-9977.
- [2] 仲山民, 胡芳名, 田荆祥. 常山胡柚果实的综合利用研究[J]. 江西林业科技, 2003(2): 15-17.
- [3] 赵雪梅, 叶兴乾, 席屿芳, 等. 胡柚皮有效成分的分离鉴定及其药理活性[J]. 果树学报, 2006, 23(3): 458-461.
- [4] 赵雪梅, 叶兴乾, 朱大元. 胡柚皮的化学成分研究(III)[J]. 中草药, 2009, 40(1): 6-8.
- [5] 赵雪梅, 叶兴乾, 席屿芳, 等. 胡柚皮中的化学成分研究(I)[J]. 中药杂志, 2003, 28(3): 237-239.
- [6] 吴厚玖. 柚苷和新橙皮苷氢化条件的研究[J]. 中国南方果树, 1996(2): 10-12.
- [7] MARIA I A, JOAO R, HELDER V R, et al. Anti-inflammatory activity of naringin and the biosynthesised naringenin by naringinase immobilized in microstructured materials in a model of DSS-induced colitis in mice[J]. Food Research International, 2009, 42(8): 1010-1017.
- [8] ANNIDA B, VENUGOPAL P M. Effect of hesperidin on matrix metalloproteinases and antioxidant status during nicotine-induced toxicity[J]. Toxicology, 2007, 238(2): 90-98.
- [9] CHIA C Y, SHANG J K, CHIH C L, et al. The immunomodulation of endotoxin-induced acute lung injury by hesperidin *in vivo* and *in vitro*[J]. Life Sciences, 2007, 80(20): 1821-1831.
- [10] VAIBHAV G, ADITI A, ANIL K. Protective effect of naringin against ischemic reperfusion cerebral injury: Possible neurobehavioral, biochemical and cellular alterations in rat brain[J]. European Journal of Pharmacology, 2009, 616(1): 147-154.
- [11] 李春美, 杜靖, 谢笔均. 柚皮提取物的抑菌作用[J]. 食品与发酵工业, 2003(6): 38-41.
- [12] 赵雪梅, 叶兴乾, 席屿芳. 胡柚皮中黄酮类化合物提取及抗氧化性研究[J]. 果树学报, 2003, 20(4): 261-265.
- [13] VALKO M, LEIBFRITZ D, MONCOL J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease[J]. International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 2007, 39(1): 44-84.
- [14] CHOI M J, KIM B K, PARK K Y, et al. Anti-aging effects of cyanidin under a stress-induced premature senescence cellular system[J]. Biological and Pharmaceutical Bulletin, 2010, 33(3): 421-426.
- [15] BOKOV A, CHAUDHURI A, RICHARDSON A. The role of oxidative damage and stress in aging[J]. Mechanisms of Ageing and Development, 2004, 125(10/11): 811-826.
- [16] PIAO X L, KIM H Y, YOKOZAWA T, et al. Protective effects of broccoli (*Brassica oleracea*) and its active components against radical-induced oxidative damage[J]. Journal of Nutritional Science and Vitaminology (Tokyo), 2005, 51(3): 142-147.
- [17] RODRIGUEZ E B, RODRIGUEZ-AMAYA D B. Lycopene epoxides and apo-lycopenals formed by chemical reactions and autooxidation in model systems and processed foods[J]. Journal of Food Science, 2009, 74(9): 674-682.
- [18] SUTHAR M, RATHORE G S, PAREEK A. Antioxidant and antidiabetic activity of *Helicteres isora* (L.) fruits[J]. Indian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2009, 71(6): 695-699.