

HPLC-DAD-FLD同时测定柑橘果汁中12种多甲氧基黄酮和香豆素类物质

李贵节^{1,2,3,4}, 谭祥¹, 王华^{1,*}, 吴厚玖¹, Russell ROUSEFF¹

(1.西南大学柑桔研究所, 中国农业科学院柑桔研究所, 重庆 400712;

2.重庆第二师范学院, 重庆市功能性食品协同创新中心, 重庆市功能性食品工程技术研究中心, 重庆 400067;

3.西南大学食品科学学院, 重庆 400715; 4.重庆第二师范学院生物与化学工程学院, 重庆 400067)

摘要: 建立高效液相色谱-串联二极管阵列检测器和荧光检测器 (high performance liquid chromatography-diode array detector-fluorescence detector, HPLC-DAD-FLD) 同时检测柑橘果汁中12种多甲氧基黄酮、香豆素及呋喃香豆素类物质的方法。以0.01%磷酸、甲醇、乙腈组成三元流动相进行梯度洗脱, 12种物质在30 min内实现基线分离。利用DAD和FLD获得各物质的紫外和荧光光谱信息, 将柑橘果汁样品组分的光谱与之比对, 并结合色谱保留时间, 实现样品成分的定性分析。分别以320 nm和450 nm为紫外和荧光的检测波长, 研究该方法的定量性能。结果显示: 标准曲线线性关系良好; 荧光定量限低至 $\mu\text{g/L}$ 级, 可作为紫外定量的重要补充手段; 果汁回收率的紫外和荧光检测值分别为95.2%~104.8%和94.5%~103.5%。该方法对样品定性、定量分析准确, 适合柑橘多甲氧基黄酮、香豆素等能发射荧光物质的检测。

关键词: 高效液相色谱; 荧光检测; 柑橘果汁; 多甲氧基黄酮; 香豆素

Simultaneous Determination of Twelve Compounds of Polymethoxyflavones, Coumarins and Furocoumarins in Citrus Juices by Using HPLC-DAD-FLD

LI Guijie^{1,2,3,4}, TAN Xiang¹, WANG Hua^{1,*}, WU Houjiu¹, Russell ROUSEFF¹

(1. Citrus Research Institute, Southwest University, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 400712, China;

2. Chongqing Collaborative Innovation Center for Functional Food, Chongqing Engineering Research Center of Functional Food, Chongqing University of Education, Chongqing 400067, China;

3. College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China;

4. College of Biological and Chemical Engineering, Chongqing University of Education, Chongqing 400067, China)

Abstract: A method using high performance liquid chromatography with diode array detection and fluorescence detection (HPLC-DAD-FLD) was developed to simultaneously analyze 12 compounds of polymethoxyflavones (PMFs), coumarins and furocoumarins in citrus juice samples. Baseline separation of twelve compounds was achieved within 30 min using gradient elution with a ternary mobile phase composed of 0.01% phosphoric acid, methanol and acetonitrile. Qualitative identification of the components in citrus juices was confirmed by comparing their UV and fluorescence (FL) spectra and retention times with those of the reference standards. Quantitative analysis of the juice components was operated at a UV wavelength of 320 nm ($\text{OD}_{320\text{ nm}}$) and a fluorescence emission of 450 nm. The calibration curves showed good linearity. The limit of quantitation (LOQ) with FLD was at as low as $\mu\text{g/L}$ level so that FLD could be an important complementary tool to UV detection. The recovery tests showed a good accuracy for both UV (95.2%–104.8%) and FL (94.5%–103.5%) examination. In general, this method is accurate and reliable for qualitative and quantitative analysis of citrus juice components, especially the ones having fluorescence emission like PMFs and coumarins.

收稿日期: 2016-12-29

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201503142-12); 重庆市功能性食品协同创新中心建设项目(167001); 中央高校基本科研业务费专项(XDJK2016E048); 重庆市功能性食品协同创新中心科研项目(ccicff-rp-201604); 重庆市统筹城乡教师教育研究中心2015年工作室项目(JDGZS201507); 重庆第二师范学院2016年校级大学生创新创业训练计划项目(201605)

作者简介: 李贵节(1983—), 男, 副教授, 博士研究生, 研究方向为食品化学与营养学及功能性食品学。E-mail: ligj@cque.edu.cn

*通信作者: 王华(1963—), 男, 研究员, 本科, 研究方向为柑橘加工。E-mail: wanghua@cric.cn

Key words: high performance liquid chromatography (HPLC); fluorescence detection; citrus juice; polymethoxyflavones; coumarins

DOI:10.7506/spkx1002-6630-201720016

中图分类号: TS207.3

文献标志码: A

文章编号: 1002-6630 (2017) 20-0112-07

引文格式:

李贵节, 谭祥, 王华, 等. HPLC-DAD-FLD同时测定柑橘果汁中12种多甲氧基黄酮和香豆素类物质[J]. 食品科学, 2017, 38(20): 112-118. DOI:10.7506/spkx1002-6630-201720016. <http://www.spkx.net.cn>

LI Guijie, TAN Xiang, WANG Hua, et al. Simultaneous determination of twelve compounds of polymethoxyflavones, coumarins and furocoumarins in citrus juices by using HPLC-DAD-FLD[J]. Food Science, 2017, 38(20): 112-118. (in Chinese with English abstract) DOI:10.7506/spkx1002-6630-201720016. <http://www.spkx.net.cn>

柑橘是芸香科柑橘属植物的总称, 其果实是世界第一、我国第二大栽培水果^[1]。柑橘果汁富含VC、钙、磷、钾、柠檬酸、类胡萝卜素等成分, 以其较高的营养价值和独特的口感风味深受人们的喜爱^[2]。柑橘果汁中还含有一大类氧杂环化合物, 如多甲氧基黄酮(polymethoxyflavones, PMFs)和香豆素类(包括呋喃香豆素类), 其氧杂环母核结构如图1所示。它们都是柑橘的次生代谢产物, 经由莽草酸途径合成前体^[3-4], 大都具有广泛的生物活性^[5]。

多甲氧基黄酮几乎只天然存在于柑橘果实中, 其定义为甲氧基数不小于4的一类黄酮^[6]。PMFs具有较高的口服生物活性, 有很强的抗过敏、抗氧化、抗炎症、抑菌及抗癌抗肿瘤等有益作用^[7-8]。对皮肤癌变如黑色素瘤细胞, PMFs在体外和体内实验中均表现出良好的预防、抑制和抗增生作用^[9-12]。此外, PMFs的种类和含量差异还能用于柑橘产品鉴别、品种及原产地区分等领域^[13-14]。

柑橘中的香豆素及其呋喃衍生物的积累则主要源于植株对外界不利因素的响应, 这类物质常存在于柠檬、来檬、佛手柑等果实中^[15]。有研究显示, 香豆素类物质具有

抗氧化、抗微生物、护肝和预防肿瘤坏死等功能^[16-19]。然而, 部分呋喃香豆素对人体会产生不利作用, 如香叶氧基呋喃香豆素二聚体导致葡萄柚汁抑制肝药酶, 从而影响药物代谢^[20]; 佛手柑内酯等具有一定的光致敏性, 可能诱发皮肤的光敏病变^[21-22]。因此, 对于香豆素类物质在柑橘果汁中分布的追踪, 对食源性疾病的预防具有一定的意义。

多甲氧基黄酮、香豆素及呋喃香豆素虽备受关注, 但少有研究同时对三者柑橘鲜果及产品中的分布进行研究^[23-24]; 对果汁中三者的定性和定量分析更是仅有一篇报道, 且仅使用了紫外检测器进行分析定量^[25]。事实上, 上述物质在激发状态下大都能发射荧光, 从而提供了另一条分析检测的途径。本研究采用高效液相色谱-串联二极管阵列检测器和荧光检测器(high performance liquid chromatography-diode array detector-fluorescence detector, HPLC-DAD-FLD), 通过对各物质的紫外和荧光特征光谱的获取, 确定仪器分析的最佳条件, 并利用2种检测器分别定量, 建立同时检测柑橘果汁中12种多甲氧基黄酮、香豆素及呋喃香豆素类物质的方法。

表1 标准对照物质信息

Table 1 Information about standard references used in this study

类别	编号	名称	系统命名	CAS号	纯度	生产商
多甲氧基 黄酮类	1	川陈皮素 nobiletin	5,6,7,8,3',4'-六甲氧基黄酮	478-01-3	HPLC 98%	加拿大TRC公司
	2	橘皮素 tangeretin	5,6,7,8,4'-五甲氧基黄酮	481-53-8	Primary 99.2%	美国ChromaDex公司
	3	甜橙黄酮 sinensetin	5,6,7,3',4'-五甲氧基黄酮	2306-27-6	HPLC 98%	加拿大TRC公司
	4	七甲氧基黄酮 heptamethoxy-flavone	3,5,6,7,8,3',4'-七甲氧基黄酮	1178-24-1	HPLC≥98%	上海源叶生物科技有限公司
香豆素类	内标物质2	香豆素 coumarin	2H-1-苯并吡喃-2-酮	91-64-5	HPLC≥98%	上海源叶生物科技有限公司
	5	柠美内酯 limettin	5,7-二甲氧基香豆素	487-06-9	Primary 98.1%	美国ChromaDex公司
	6	异橙皮内酯 isomeranzin	7-甲氧基-8-(3-甲氧基-2-氧代丁基)香豆素	1088-17-1	HPLC≥98%	上海源叶生物科技有限公司
	7	东莨菪亭 scopoletin	7-羟基-6-甲氧基香豆素	92-61-5	Primary 97.8%	美国ChromaDex公司
呋喃香豆 素类	8	伞形花内酯 umbelliferone	7-羟基香豆素	93-35-6	HPLC≥98%	上海源叶生物科技有限公司
	内标物质1	补骨脂素 psoralen	7H-呋喃[3,2-G]苯并吡喃-7-酮	66-97-7	HPLC≥98%	上海源叶生物科技有限公司
	9	佛手柑素 bergamottin	5-香叶基氧基补骨脂素	7380-40-7	Primary 96.8%	美国ChromaDex公司
	10	佛手柑内酯 bergapten	5-甲氧基补骨脂素	484-20-8	HPLC 98%	加拿大TRC公司
	11	环氧佛手柑素 epoxy-bergamottin	5-(6',7'-环氧)香叶基氧基补骨脂素	206978-14-5	Primary 90.2%	美国ChromaDex公司
	12	佛手酚 bergaptol	5-羟基补骨脂素	486-60-2	Primary 96.2%	美国ChromaDex公司

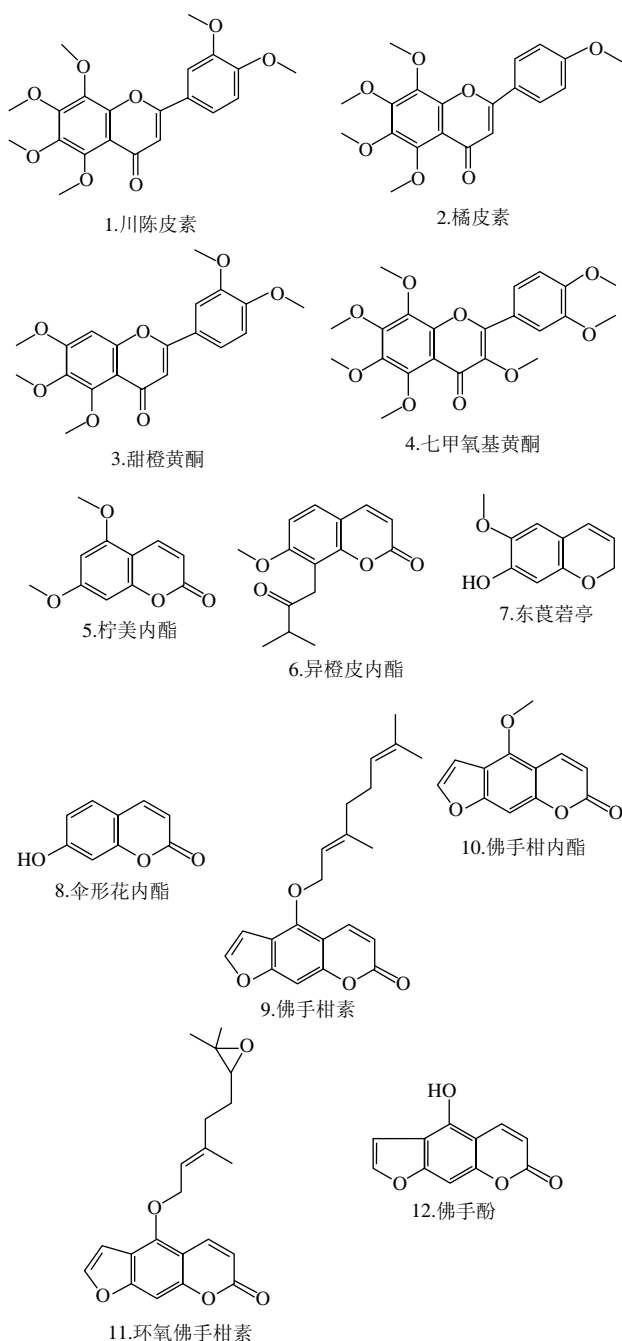


图1 多甲氧基黄酮、香豆素及呋喃香豆素类结构简式

Fig. 1 Schematic structures of polymethoxyflavones, coumarins and furocoumarins

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

柑橘新鲜果实均采自西南大学柑桔研究所、中国农业科学院柑桔研究所柑橘圃。非浓缩(not from concentrate, NFC)橙汁取自西南大学柑桔研究所, NFC葡萄柚汁购自美国Florida's Natural公司。

标准对照物质: 川陈皮素、橘皮素、甜橙黄酮、七

甲氧基黄酮、柠美内酯、异橙皮内酯、东莨菪亭、伞形花内酯、佛手柑素、佛手柑内酯、环氧佛手柑素、佛手酚; 内标物质: 补骨脂素、香豆素, 详细信息见图1、表1。

磷酸、甲醇、乙腈(均为色谱纯) 美国Sigma公司; 乙酸乙酯(分析纯) 国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

Ultimate 3000 HPLC仪、DAD、FLD 德国Thermo Scientific公司; KQ5200DE超声清洗器 江苏昆山市超声仪器有限公司; HN200多功能氮吹仪 山东济南海能仪器股份有限公司; Milli-Q Reference超纯水系统 德国Merck-Millipore公司; MPZ9柑橘榨汁机 德国博朗公司; 0.22 μm 有机相微孔滤头 上海安谱科学仪器有限公司。

1.3 方法

1.3.1 对照标准品溶液的制备

准确称取1~12号对照标准物质各5.00 mg, 分别用甲醇(或乙腈)溶液溶解, 并定容至5.00 mL, 配成1.00 g/L的标准品母液备用。

对于内标物质, 准确称取补骨脂素和香豆素各10.00 mg, 分别用甲醇溶液溶解, 并定容至5.00 mL, 配制成2.00 g/L的内标母液备用。

采用逐级稀释法用甲醇将标准品母液配制成一系列质量浓度的混合标准品溶液。添加5 μL 补骨脂素母液到混合标准品中, 并随混标一同稀释。

1.3.2 样品的制备

采用手动压榨法制取新鲜柑橘果汁。量取10 mL鲜榨柑橘汁或NFC果汁, 加入10 μL 香豆素母液作内标, 再加入10 mL乙酸乙酯振荡萃取, 静置分层后收集上清液, 水相再重复以10 mL乙酸乙酯萃取; 共提取3次, 合并有机相, 用氮气吹干, 加入1 mL甲醇后超声波处理重溶解, 0.22 μm 微孔滤膜过滤, 再加入5 μL 补骨脂素母液后待测。

1.3.3 色谱条件

色谱柱: Thermo Scientific HyPURITY C₁₈ (4.6 mm \times 150 mm, 3 μm); 流动相: 0.01%磷酸溶液、甲醇和乙腈, 采用梯度洗脱; 检测器设置: DAD波长扫描范围210~400 nm; FLD激发波长扫描范围250~400 nm, 发射波长扫描范围340~560 nm。其他设置: 柱温30 $^{\circ}\text{C}$, 流速1 mL/min, 进样量5.0 μL 。以紫外吸收光谱扫描图、荧光发射光谱扫描图以及色谱峰保留时间三者结合进行定性判断。采用外标法定量。

2 结果与分析

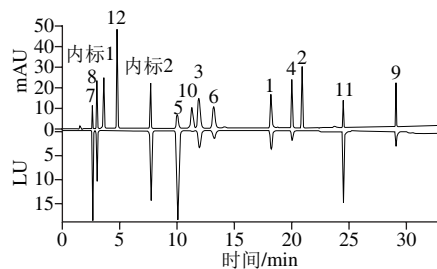
2.1 流动相的选择和洗脱条件优化

对于12种多甲氧基黄酮、香豆素和呋喃香豆素类物质而言, 因其母环都含有苯并吡喃酮结构, 性质较为相似, 因此需采用梯度洗脱的方式进行分离。考虑伞形花内酯及佛手酚等物质含有易解离的酚羟基, 故流动相

需为弱酸性以改变峰形和限制拖尾。实验发现,加入乙酸调节pH值时存在较强的基线干扰,故选用干扰较小的0.01%磷酸溶液。设置原始流动相洗脱程序为斜线梯度:洗脱开始时,0.01%磷酸-乙腈溶液(50:50, V/V);洗脱时间为30 min时,0.01%磷酸-乙腈溶液(10:90, V/V)。实验发现,通过加入少量的甲醇可微调柠美内酯、佛手柑内酯、甜橙黄酮和异橙皮内酯的相对位置,从而获得最佳分离度。经最终优化后的洗脱程序见表2,在该条件下,得到12种物质混合标准品(包含加入的内标物质1)的紫外和荧光响应色谱图。如图2所示,各物质峰形良好,在30 min内实现所有成分的基线分离;荧光信号以倒峰的形式呈现,以便与紫外信号更清晰地对应。除佛手酚和橘皮素外,其他物质都有荧光响应。

表2 流动相洗脱程序
Table 2 Gradient elution program

洗脱 时间/min	流动相体积分数/%		
	A 0.01%磷酸溶液	B 甲醇	C 乙腈
0	64	1	35
14	64	1	35
18	50	5	45
21	50	5	45
27	10	0	90
31	10	0	90
32	64	1	35



正峰为紫外信号,波长320 nm;倒峰为荧光信号,激发波长340 nm,发射波长450 nm;图中峰号与表1编号对应。

图2 12种标准对照物质及内标物质的HPLC图

Fig. 2 HPLC chromatogram of mixture of twelve reference standards and internal standards

2.2 紫外、荧光光谱及其应用

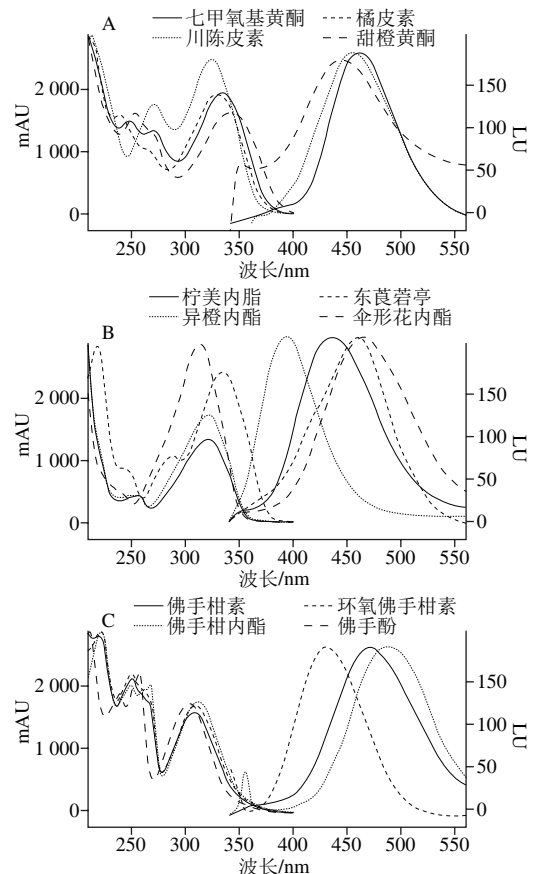


图3 多甲氧基黄酮(A)、香豆素(B)和呋喃香豆素(C)的紫外吸收光谱(210~400 nm)和荧光发射光谱(340~560 nm)

Fig. 3 UV spectra (210~400 nm) and fluorescence emission spectra (340~560 nm) of polymethoxyflavones, coumarins and furocoumarins

如图3所示,FLD亦可记录荧光的激发光谱,但由于激发光谱常与紫外吸收光谱类似,故本方法仅考虑发射光谱。总体上,各物质的光谱信息具有特征性,故可据此将待分析样品成分的光谱图与标准物质的光谱图进行对比,对待测成分进行准确判断。

表3 12种标准物质紫外和荧光检测线性关系、LOD和LOQ

Table 3 Linear relationship, limit of detection and limit of quantitation of UV and fluorescence examination for the twelve reference standards

编号	化合物	线性范围/(mg/L)	校正因子	紫外信号				荧光信号				
				线性方程	R^2	LOD/(mg/L)	LOQ/(mg/L)	校正因子	线性方程	R^2	LOD/(mg/L)	LOQ/(mg/L)
1	川陈皮素	0.50~500	0.71	$Y=2.17X+18.40$	0.999 7	0.30	1.01	7.41	$Y=0.23X+0.49$	0.999 8	0.51	1.69
2	橘皮素	0.10~500	0.34	$Y=7.62X+3.86$	0.999 8	0.06	0.20					
3	甜橙黄酮	1.00~500	1.52	$Y=3.14X+6.56$	1.000 0	0.92	3.06	31.40	$Y=2.04X+2.21$	1.000 0	0.42	1.40
4	七甲氧基黄酮	0.50~500	0.60	$Y=4.64X+8.96$	0.999 9	0.12	0.39	51.48	$Y=0.21X-0.27$	0.998 9	1.43	4.77
5	柠美内酯	0.10~500	1.40	$Y=6.40X-0.85$	1.000 0	0.06	0.21	0.14	$Y=49.78X+8.300$	0.998 6	0.001 5	0.005
6	异橙皮内酯*	0.05~500	1.75	$Y=4.29X+28.19$	0.999 6	0.01	0.05	46.36	$Y=8.15X+2.84$	0.999 8	0.07	0.24
7	东莨菪亭	0.05~500	0.51	$Y=3.59X+65.92$	0.999 3	0.03	0.11	0.11	$Y=39.63X-21.43$	0.998 4	0.000 3	0.000 9
8	伞形花内酯	0.05~500	1.40	$Y=5.33X+7.28$	0.999 8	0.02	0.07	2.17	$Y=0.18X+1.37$	0.999 8	0.03	0.10
9	佛手柑素	0.20~500	1.17	$Y=2.98X-1.58$	0.999 9	0.13	0.44	58.04	$Y=3.28X-0.63$	0.999 9	0.10	0.34
10	佛手柑内酯	0.20~500	3.90	$Y=0.17X+0.00$	0.999 9	0.17	0.55	131.31	$Y=2.93X-1.96$	0.999 9	0.43	1.45
11	环氧佛手柑素	0.50~500	2.38	$Y=1.59X+2.24$	1.000 0	0.27	0.90	1.13	$Y=0.23X+0.10$	1.000 0	0.38	1.27
12	佛手酚	0.10~500	0.41	$Y=3.34X+24.28$	0.999 5	0.06	0.20					

注:*.异橙皮内酯的荧光信号在发射波长为395 nm处获得,表4同。

国内大量关于柑橘成分分析的报道都是基于紫外光谱^[26-30]。然而, 受限于样品浓度、仪器分辨率以及人为因素等, 仅凭紫外光谱难免会有判断误差。如图3所示, 各组内物质紫外谱图具有一定的相似性, 如柠美内酯和异橙皮内酯的最大吸收波长相近(324 nm和322 nm), 佛手柑素和环氧佛手柑素的谱图非常类似, 这无疑对复杂样品的准确判断提出了挑战。荧光光谱的引入为解决这一问题提供了辅助手段。柠美内酯和异橙皮内酯的荧光峰值发射波长分别为437 nm和395 nm, 佛手柑素和环氧佛手柑素波长分别为479 nm和431 nm, 均有明显的区别。

本研究采用相同色谱条件下的紫外、荧光光谱以及保留时间3种不同手段, 为样品成分的准确检测设置三重保障。同时, 利用光谱数据对定量分析的波长进行了折中选择, 最终确定为: 紫外吸收波长320 nm, 荧光激发波长340 nm、发射波长450 nm。异橙皮内酯由于荧光最大发射波长与其他物质相差过大, 故以波长395 nm单独定量。

2.3 标准曲线、检出限(limit of detection, LOD)和定量限(limit of quantitation, LOQ)结果

在上述色谱分析条件下, 测定0.06~4500 mg/L系列质量浓度的混合标准溶液。以测得各物质积分峰面积为纵坐标, 质量浓度(mg/L)为横坐标, 绘制标准曲线。12种物质的回归方程、相关系数、方法LOD和LOQ如表3所示。测定质量浓度范围内, 各物质质量浓度与峰面积呈现良好的线性关系, R^2 在0.998 4以上。不同检测方法所得LOD及LOQ各不相同, 甜橙黄酮、柠美内酯、东莨菪亭和佛手柑素用荧光检测更加灵敏, 其中东莨菪亭的荧光LOQ为0.000 9 mg/L, 比紫外检测的灵敏度高100倍以上。

混合标准溶液中加入内标物质补骨脂素, 其目的是监测在逐级稀释的过程中各对照标准品加入量是否正确。对被测标准物质而言, 其校正因子为常数, 公式如下:

校正因子= (被测物浓度×内标物峰面积) / (被测物峰面积×内标物浓度)

2.4 回收率结果

分别对混合柑橘果汁样品进行80%、100%、120% 3个水平的加标回收实验, 每个实验做3次重复, 验证整套方法的准确性。如表4所示, 2种方法检测混合果汁中各成分的回收率所得结果相近, 分别为紫外回收率95.2%~104.8%和荧光回收率94.5%~103.5%, 相对标准偏差分别为0.8%~4.1%和0.7%~4.1%。该结果表明, 本实验方法准确度较高, 利用紫外和荧光2种方法同时定量分析PMFs、香豆素和呋喃香豆素具有高可信度。

表4 柑橘混合果汁加标回收率
Table 4 Recovery of the analytes in spiked samples of mixed citrus juice

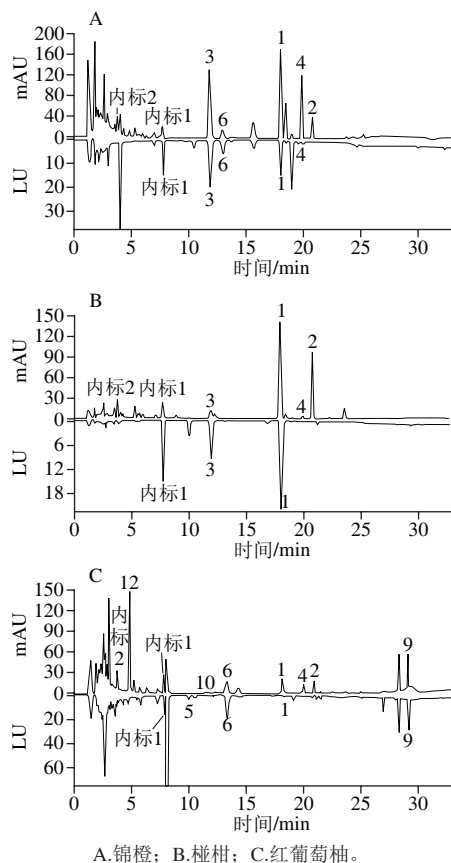
编号	化合物	加入量/ (mg/L)	紫外测定			荧光测定		
			本底值/ (mg/L)	测定量/ (mg/L)	回收率/%	本底值/ (mg/L)	测定量/ (mg/L)	回收率/%
1	川陈皮素	4.11 ^a		9.22	99.2		9.22	97.3
		5.14 ^b	5.14	10.25	99.4	5.22	10.18	96.5
		6.17 ^c		11.32	100.2		11.35	99.4
		3.50		7.80	98.1			
2	橘皮素	4.37	4.37	8.71	99.3			
		5.24		9.62	100.1			
		2.57		5.78	100.1	5.62	96.1	3.2
3	甜橙黄酮	3.21	3.21	6.40	99.4	3.15	6.30	98.1
		3.85		7.05	99.7		7.12	103.1
		1.03		2.29	96.9		2.21	99.8
4	七甲氧基黄酮	1.29	1.29	2.57	99.2	1.18	2.40	94.6
		1.55		2.83	99.5		2.72	99.5
		0.66		1.50	100.9		1.54	96.4
5	柠美内酯	0.83	0.83	1.70	104.8	0.90	1.70	96.4
		1.00		1.82	99.4		1.89	99.4
		1.72		3.87	100.0		3.95	103.5
6	异橙皮内酯	2.15	2.15	4.32	100.9	2.17	4.33	100.5
		2.58		4.71	99.2		4.71	98.4
		1.90		4.25	98.2		4.31	94.5
7	东莨菪亭	2.38	2.38	4.76	100.0	2.51	4.79	95.8
		2.86		5.25	100.5		5.33	98.7
		0.26		0.57	97.7		0.55	101.6
8	伞形花内酯	0.32	0.32	0.63	96.9	0.29	0.60	96.9
		0.38		0.69	96.4		0.68	101.6
		1.23		2.75	98.2		2.83	96.6
9	佛手柑素	1.54	1.54	3.04	97.4	1.64	3.18	100.0
		1.85		3.36	98.5		3.45	97.9
		1.53		3.45	100.8		3.36	100.1
10	佛手柑内酯	1.91	1.91	3.83	100.5	1.83	3.72	99.0
		2.29		4.21	100.3		4.10	99.0
		0.82		1.81	96.8		1.85	96.8
11	环氧佛手柑素	1.02	1.02	2.05	101.0	1.06	2.06	98.0
		1.22		2.23	98.9		2.27	98.9
		0.45		1.00	98.2			
12	佛手酚	0.56	0.56	1.11	98.2			
		0.67		1.20	95.2			

注: a、b、c分别为样品本底值的80%、100%和120%水平。

2.5 样品分析

采用1.3.2节和1.3.3节方法对NFC锦橙汁、鲜榨椪柑汁和NFC红葡萄柚汁3个样品中的PMFs、香豆素和呋喃香豆素进行定性和定量检测。如图4所示, 各样品的紫外和荧光光谱图在5 min以后呈现出良好的分离度, 1~5 min范围内出现峰堆集情况, 反映出乙酸乙酯提取了部分极性较强的成分。由图4可见, 不同品种的柑橘果汁中含有的PMFs、香豆素和呋喃香豆素差异较大, 锦橙汁主要含PMFs以及少量的异橙皮内酯; 椪柑汁主要含PMFs, 但甜橙黄酮含量较锦橙汁低; 红葡萄柚汁则主要含呋喃香豆素, 如佛手酚和佛手柑素, 以及少量的香豆素和PMFs; 这3类柑橘汁都不含东莨菪亭、伞形花内酯和环氧佛手柑素。进一步定量分析, 由表5可知, 各物质含

量的荧光和紫外测定值的差异范围在-6.2%~9.7%以内,两者吻合度较好。红葡萄柚含有极微量的柠美内酯,其含量无法由紫外检出,但可被荧光检出并准确定量;反之,椪柑中的七甲氧基黄酮可被紫外检出,却低于荧光的定量限。因此,结合紫外、荧光信号共同进行定量检测,有助于扩大含量分析的范围,提高定量的精度。



A.锦橙; B.椪柑; C.红葡萄柚。

图4 3种柑橘果汁样品的HPLC图

Fig. 4 HPLC chromatograms of three citrus juice samples

表5 3种柑橘果汁样品中的多甲氧基黄酮、香豆素和呋喃香豆素含量
Table 5 Contents of polymethoxyflavones, coumarins and furocoumarins in three citrus juice samples determined by HPLC-DAD-FLD

编号	化合物	保留时间/min	质量浓度/(mg/L)					
			锦橙		椪柑		红葡萄柚	
			紫外	荧光	紫外	荧光	紫外	荧光
7	东莨菪亭	2.7	ND	ND	ND	ND	ND	ND
8	伞形花内酯	3.1	ND	ND	ND	ND	ND	ND
12	佛手酚	4.9	ND	ND	ND	ND	13.01	
5	柠美内酯	10.1	ND	ND	ND	ND	ND	0.04
10	佛手柑内酯	11.3	ND	ND	ND	ND	9.71	9.54
3	甜橙黄酮	12.1	4.82	4.52	0.54	0.50	ND	ND
6	异橙皮内酯	13.2	0.30	0.34	ND	ND	5.18	4.94
1	川陈皮素	18.1	7.31	7.96	9.41	9.79	1.90	1.93
4	七甲氧基黄酮	20.2	1.51	1.56	0.33	<LOQ	0.74	0.74
2	橘皮素	21.0	0.34		11.95		0.66	
11	环氧佛手柑素	24.6	ND	ND	ND	ND	ND	ND
9	佛手柑素	29.1	ND	ND	ND	ND	3.74	3.77

注: ND.未检出。

3 结论

本实验建立了HPLC-DAD-FLD同时检测柑橘果汁中的12种多甲氧基黄酮、香豆素及呋喃香豆素类物质的方法,上述物质在30 min内实现基线分离。采用2种不同的检测器可同时获得各物质的紫外和荧光光谱信息,提高检测灵敏度,检出限可低至 $\mu\text{g/L}$ 级,能满足柑橘果汁中该类氧杂环化合物的分析检测要求。

参考文献:

- [1] 吴厚玖,孙志高,王华. 试论我国柑橘加工业发展方向[J]. 食品与发酵工业, 2006, 32(4): 85-89. DOI:10.3321/j.issn:0253-990X.2006.04.024.
- [2] 杨子玉,唐颂,任婧楠,等. 不同品种柑橘汁的品质比较研究[J]. 食品工业科技, 2015, 36(13): 121-125. DOI:10.13386/j.issn1002-0306.2015.13.017.
- [3] 夏涛,高丽萍. 类黄酮及茶儿茶素生物合成途径及其调控研究进展[J]. 中国农业科学, 2009, 42(8): 2899-2908. DOI:10.3864/j.issn.0578-1752.2009.08.031.
- [4] 乔小燕,马春雷,陈亮. 植物类黄酮生物合成途径及重要基因的调控[J]. 天然产物研究与开发, 2009, 21(2): 354-360. DOI:10.3969/j.issn.1001-6880.2009.02.040.
- [5] MABRY T J, ULUBELEN A. Chemistry and utilization of phenylpropanoids including flavonoids, coumarins, and lignans[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1980, 28(2): 188-196. DOI:10.1021/jf60228a02.
- [6] 吴宏伟. 陈皮多甲氧基黄酮有效部位研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2006: 7; 12.
- [7] LI S, PAN M H, LO C Y, et al. Chemistry and health effects of polymethoxyflavones and hydroxylated polymethoxyflavones[J]. Journal of Functional Foods, 2009, 1(1): 2-12. DOI:10.1016/j.jff.2008.09.003.
- [8] LI S, WANG H, GUO L, et al. Chemistry and bioactivity of nobiletin and its metabolites[J]. Journal of Functional Foods, 2014, 6: 2-10. DOI:10.1016/j.jff.2013.12.011.
- [9] ZHANG C, LU Y, TAO L, et al. Tyrosinase inhibitory effects and inhibition mechanisms of nobiletin and hesperidin from citrus peel crude extracts[J]. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2007, 22(1): 91-98. DOI:10.1080/14756360600953876.
- [10] MORLEY K L, FERGUSON P J, KOROPATNICK J. Tangeretin and nobiletin induce G1 cell cycle arrest but not apoptosis in human breast and colon cancer cells[J]. Cancer Letters, 2007, 251(1): 168-178. DOI:10.1016/j.canlet.2006.11.016.
- [11] MONTANARI A, CHEN J, WIDMER W. Citrus flavonoids: a review of past biological activity against disease-discovery of new flavonoids from dancy tangerine cold pressed peel oil solids and leaves[J]. Flavonoids in the Living System, 1998, 439: 103-116.
- [12] MANTHEY J A, GUTHRIE N. Antiproliferative activities of citrus flavonoids against six human cancer cell lines[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2002, 50(21): 5837-5843. DOI:10.1021/jf02021d.
- [13] PAN G G, KILMARTIN P A, SMITH B G, et al. Detection of orange juice adulteration by tangelo juice using multivariate analysis of polymethoxylated flavones and carotenoids[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2002, 82(4): 421-427. DOI:10.1002/jsfa.1051.

- [14] ESCRICHE I, KADAR M, JUAN-BORR S M, et al. Using flavonoids, phenolic compounds and headspace volatile profile for botanical authentication of lemon and orange honeys[J]. Food Research International, 2011, 44(5): 1504-1513. DOI:10.1016/j.foodres.2011.03.049.
- [15] 张韶瑜, 孟林, 高文远, 等. 香豆素类化合物生物学活性研究进展[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(6): 410-414. DOI:10.3321/j.issn:1001-5302.2005.06.002.
- [16] UM M Y, MOON M K, AHN J, et al. Coumarin attenuates hepatic steatosis by down-regulating lipogenic gene expression in mice fed a high-fat diet[J]. The British Journal of Nutrition, 2013, 109(9): 1590-1597. DOI:10.1017/S0007114512005260.
- [17] LEOPOLDINI M, MALAJ N, TOSCANO M, et al. On the inhibitor effects of bergamot juice flavonoids binding to the 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGR) enzyme[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(19): 10768-10773. DOI:10.3168/jds.2006-897.
- [18] MANDALARI G, BENNETT R N, BISIGNANO G, et al. Antimicrobial activity of flavonoids extracted from bergamot (*Citrus bergamia* Risso) peel, a byproduct of the essential oil industry[J]. Journal of Applied Microbiology, 2007, 103(6): 2056-2064. DOI:10.1111/j.1365-2672.2007.03456.x.
- [19] TROMBETTA D, CIMINO F, CRISTANI M, et al. *In vitro* protective effects of two extracts from bergamot peels on human endothelial cells exposed to tumor necrosis factor- α (TNF- α)[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2010, 58(14): 8430-8436. DOI:10.1021/jf1008605.
- [20] FUKUDA K, GUO L, OHASHI N, et al. Amounts and variation in grapefruit juice of the main components causing grapefruit-drug interaction[J]. Journal of Chromatography B, Biomedical Sciences and Applications, 2000, 741(2): 195-203.
- [21] SHIM S C, CHOI K Y, SONG P S. Studies on the phototoxicity of coumarin derivatives- I. Photocyclodimerization of 5,7-dimethoxycoumarin[J]. Photochemistry and Photobiology, 1978, 27(1): 25-31. DOI:10.1111/j.1751-1097.1978.tb07560.x.
- [22] KAIDBEY K H, KLIGMAN A M. Photosensitization by coumarin derivatives: structure-activity relationships[J]. Archives of Dermatology, 1981, 117(5): 258-263. DOI:10.1001/archderm.1981.01650050014012.
- [23] FEGER W, BRANDAUER H, GABRIS P, et al. Nonvolatiles of commercial lime and grapefruit oils separated by high-speed countercurrent chromatography[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2006, 54(6): 2242-2252. DOI:10.1021/jf052267t.
- [24] RUSSO M, BONACCORSI I, COSTA R, et al. Reduced time HPLC analyses for fast quality control of citrus essential oils[J]. Journal of Essential Oil Research, 2015, 27(4): 307-315. DOI:10.1080/10412905.2015.1027419.
- [25] DUGO P, PIPERNO A, ROMEO R, et al. Determination of oxygen heterocyclic components in citrus products by HPLC with UV detection[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 57(15): 6543-6551. DOI:10.1021/jf901209r.
- [26] 冉玥, 焦必宁, 赵其阳, 等. 超高效液相色谱法同时测定柑橘中11种类黄酮物质[J]. 食品科学, 2013, 34(4): 168-172.
- [27] 章翀玮, 魏东芝, 周文瑜, 等. 柑橘类黄酮成分的同步HPLC检测(英文)[J]. 中成药, 2007, 29(1): 99-104. DOI:10.3969/j.issn.1001-1528.2007.01.029.
- [28] GUO L Q, BAO H, YANG J. Correlation of furanocoumarin composition and rat cytochrome P450 3A inhibition among citrus fruit juices[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 970-977.
- [29] 秦锋, 汪涛, 蒋学华. 高效液相色谱法测定大鼠血浆中水合橙皮内酯的浓度及药动学研究[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(3): 550-552.
- [30] 杨洁, 孙婷, 姚华, 等. RP-HPLC-DAD法测定陈皮中3种多甲氧基黄酮的质量分数[J]. 吉林大学学报(理学版), 2014, 52(2): 348-352. DOI:10.13413/j.cnki.jdxblxb.2014.02.37.