

关于新甲基橙皮苷二氢查耳酮食品级产品 标准和检测方法的研究

王振东, 陈良, 王洋

(山东奔月生物科技有限公司, 山东 淄博 255000)

摘要:新甲基橙皮苷二氢查耳酮(NHDC)作为一种食品添加剂、苦味抑制剂及功能添加剂,在食品、医药及饲料等领域应用越来越广泛,但该产品在食品领域的国内标准相对欠缺,主要介绍一种食品级 NHDC 的产品检测方法,并实验得出可用于指导企业生产的产品标准,供产品开发、企业生产和国家标准的完善参考使用。

关键词:新甲基橙皮苷二氢查耳酮;食品添加剂;产品标准;高效液相色谱;原子荧光

中图分类号:TS203.3 文献标志码:A doi:10.3969/j.issn.1000-9973.2016.11.032

文章编号:1000-9973(2016)11-0135-05

Research on Food-grade Product Standards and Testing Methods of Neohesperidin dihydrochalcone

WANG Zhen-dong, CHEN Liang, WANG Yang

(Shandong Benyue Biological Technology Co., Ltd., Zibo 255000, China)

Abstract: Neohesperidin dihydrochalcone(NHDC) has been widely applied as a kind of food additive, bitterness inhibitor and functional additive in food, medicine, feed and other fields. But its domestic standards are lack in food field. Introduce the testing methods of food-grade NHDC, and the product standards are obtained based on experiments for reference of product development, enterprise producing and improvement of national standard.

Key words: Neohesperidin dihydrochalcone; food additive; product standard; high performance liquid chromatography; atomic fluorescence

1963 年,美国学者奥·欧·赫洛维兹用柑橘类果皮为原料制成甜度极高的甜味剂——二氢查尔酮衍生物,它包括新甲基橙皮苷二氢查耳酮、柚皮苷二氢查耳酮以及橙皮素二氢查耳酮-4'- β -D-葡萄糖苷。其中,新甲基橙皮苷二氢查耳酮(NHDC)是将从天然柑橘植物中提取得到的新橙皮苷氢化而成的黄酮类衍生物,或者以柚皮苷为原料通过水解和氢化反应合成的^[1]。

新甲基橙皮苷二氢查耳酮的口感纯正,甜度是蔗

糖的 1500~1800 倍,具有很好的稳定性,并且几乎不提供热量,对人体安全无害。新甲基橙皮苷二氢查耳酮主要特点是甜味清爽、愉快,甜味来得慢,后味较长,随着浓度的增加,其对蔗糖的相对甜度下降,且能降低人们对饮料和药剂中苦味的敏感程度。新甲基橙皮苷二氢查耳酮具有较好的药理作用,尤其对肥胖症患者和糖尿病人来说显得更为重要^[2]。

目前,新甲基橙皮苷二氢查耳酮的安全性已经

收稿日期:2016-05-20

作者简介:王振东(1978-),男,山东禹城人,学士,研究方向:食品添加剂。

在世界范围内得到了广泛认可,已经有三十多个国家批准其作为食品添加剂使用,美国调味品与抽提物制造商联合会于 1993 年将其列入该联合会工人的无毒化合物名单内;阿根廷将其列入国家食品目录中;在澳大利亚,它由国家食品管理局推荐批准为调味物质。欧盟食品科学委员会于 1987 年对新甲基橙皮苷二氢查耳酮做出了使用安全的结论,将其列入甜味剂和食品添加剂目录中,并提出其最大的 ADI 值为 5 mg/kg。中华人民共和国卫生部于 1997 年批准新甲基橙皮苷二氢查耳酮可作为食品、香料等添加剂, FEMA 编号 3811^[3]。

目前检测方法主要依据 GB 29938—2013《食品安全国家标准 食品香料通则》的规定,主要的检测方法依据 GB/T 11539—2008《香料 填充柱气相色谱分析通用法》和 GB/T 11538—2006《精油 毛细管柱气相色谱分析通用法》。由于 NHDC 沸点达 600 °C 以上,采用气相色谱检验无法准确测量其含量,故探索使用高效液相色谱法检测 NHDC 食品级产品含量^[4]。

本实验选择山东奔月生物科技有限公司生产的新甲基橙皮苷二氢查耳酮,通过高效液相色谱法检测其含量和副产物,并用原子荧光法检测铅和砷的含量,以及烘箱法检测其水分,电热板硝化法测定灼烧残渣。

新甲基橙皮苷二氢查耳酮物理特性:

分子式: $C_{28}H_{36}O_{15}$, 见图 1; 熔点: 152~156 °C; 相对分子质量: 612.58。

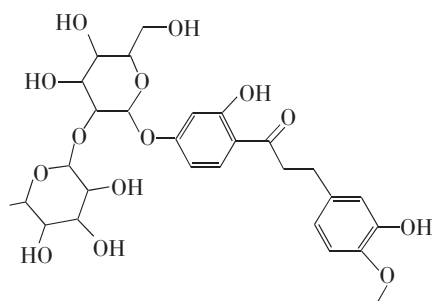


图 1 新甲基橙皮苷二氢查耳酮分子式

1 材料与方法^[5-10]

1.1 仪器和试剂

1.1.1 仪器

P230II 高效液相色谱仪 大连依利特分析仪器有限公司; 溶剂过滤器 天津津腾实验设备有限公司;

As3120 超声清洗器 天津奥特莱恩斯实验设备有限公司; 原子荧光光度计 北京海光仪器有限公司; 电热板 龙口市文太电炉制造有限公司; 箱式电阻炉、恒温干燥箱 北京市永光明医疗仪器有限公司。

1.1.2 试剂

新甲基橙皮苷二氢查耳酮标准物质(欧洲药品质量管理局, NO. 399000); 柚皮苷二氢查尔酮标准物质(加拿大多伦多研究化学 N378990); 甲醇、磷酸、草酸、盐酸、铁氰化钾、氢氧化钠、硼氢化钾、硝酸镁、硫脲; 色谱纯; 铅和砷的标准储备液; 硝酸-高氯酸 9:1 的混合液; 1% 硝酸; 去离子水: 符合 GB/T 6682 中一级水的规定。

样品: 新甲基橙皮苷二氢查耳酮 山东奔月生物科技有限公司。

1.2 新甲基橙皮苷二氢查耳酮含量和副产物的检测

1.2.1 色谱条件

色谱柱: C_{18} 色谱柱, 4.6 mm (内径) × 250 mm (长), 粒度 5 μ m; 流动相: 甲醇: 0.1% 磷酸为 48:52; 流速: 1.0 mL/min; 检测波长: 282 nm; 柱温: 25 °C。

1.2.2 分析步骤

1.2.2.1 标准溶液的制备

称取适量新甲基橙皮苷二氢查耳酮和柚皮苷二氢查尔酮的标准品, 精确到 0.0001 g, 用流动相配制成 1.0 mg/mL 的标准溶液。

1.2.2.2 试样溶液的制备

称取适量试样, 精确到 0.0001 g, 用流动相配制成 1.0 mg/mL 的试样溶液。

1.2.2.3 测定

在 1.2 参考色谱条件下, 分别对标准溶液和试样溶液进行色谱分析。记录试样溶液色谱图和标准品色谱图中新甲基橙皮苷二氢查耳酮与柚皮苷二氢查尔酮的峰面积。

1.2.2.4 结果计算

试样中新甲基橙皮苷二氢查耳酮或柚皮苷二氢查尔酮含量以质量分数 X 计, 数值以 % 表示, 按下式计算:

$$X = \frac{R_U}{R_S} \times \frac{C_S}{C_U} \times 100.$$

式中: R_U 为试样溶液色谱图中新甲基橙皮苷二氢查耳酮或柚皮苷二氢查尔酮的峰面积值; R_S 为标准溶

液相色谱图中新甲基橙皮苷二氢查耳酮或柚皮苷二氢查耳酮的峰面积值; C_U 为试样溶液扣除水分的实际浓度, mg/mL; C_S 为标准溶液扣除水分的实际浓度, mg/mL。

每个试样取 2 个平行样进行测定, 以其算术平均值为结果, 结果保留到小数点后 3 位。

1.2.2.5 色谱图

新甲基橙皮苷二氢查耳酮色谱图见图 2, 柚皮苷二氢查耳酮色谱图见图 3。

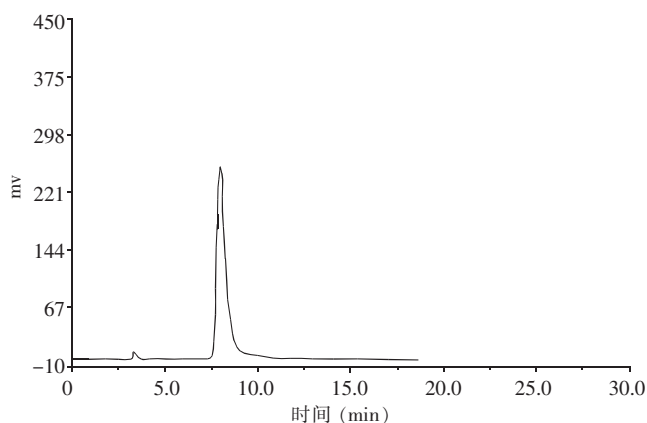


图 2 新甲基橙皮苷二氢查耳酮色谱图

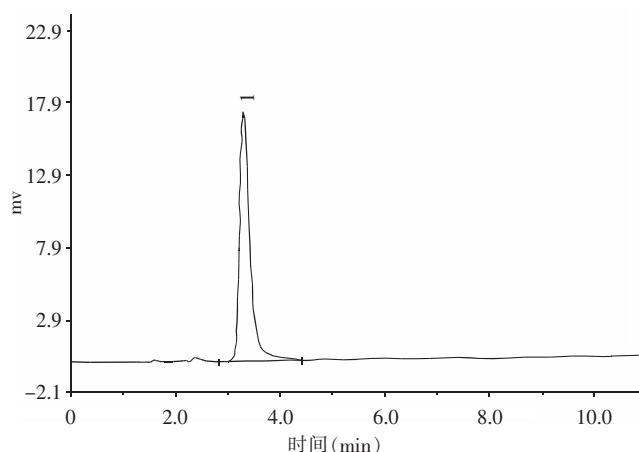


图 3 柚皮苷二氢查耳酮色谱图

1.3 水分的检测

在恒温干燥箱中烘至恒重的干燥瓶放入适量样品, 分别记录干燥瓶和样品重量, 记为 m 和 m_1 , 将干燥瓶和样品置于恒温干燥箱中, $105\text{ }^{\circ}\text{C}$ 干燥 3 h, 取出样品瓶, 记录重量 m_2 。

$$\text{水分含量} = (m_2 - m - m_1) / m_1 \times 100\%$$

1.4 灼烧残渣的检测

1.4.1 坩埚的处理

将坩埚置于马弗炉中, 在 $650\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下加热 4 h, 直至恒重, 取出放入干燥器中, 降至室温, 称量坩埚重量 m_1 。

1.4.2 样品的处理

准确称量 1.0000 g 样品 m_2 置于坩埚中, 在通风橱内置于电炉上灰化, 变成焦炭状, 停止加热, 在样品中滴加 1 mL 浓盐酸, 再放至电炉上第 2 次灼烧。

第 2 次发烟结束后, 将坩埚用坩埚钳放入马弗炉, 升温至 $650\text{ }^{\circ}\text{C}$, 烘 4 h。

将烘完的坩埚从马弗炉中取出, 放入干燥器中, 待降至室温时称量总重 m , 记录数据。

1.4.3 灼烧残渣的含量

$$\text{含量} = (m - m_1) / m_2 \times 100\%$$

1.5 铅含量的检测

1.5.1 样品的处理

1.5.1.1 湿法处理

准确称量 0.2000 g 样品 (m) 置于 100 mL 的锥形瓶中, 用硝酸-高氯酸 (9:1) 10 mL 处理样品, 放置过夜, 第 2 天先放置于电炉上加热, 使得液体由深黄色变为淡黄色或者透明, 然后放凉, 加入 20 mL 蒸馏水, 继续加热赶酸, 直到锥形瓶里的液体剩余 0.5~1 mL, 然后用少量水多次冲洗, 把样品转入 100 mL 容量瓶中, 加入盐酸 2 mL, 10% 的铁氰化钾 10 mL, 定容至 100 mL。

1.5.1.2 干法处理

准确称量 1.0000 g 样品放入坩埚中, 放于电炉上加热, 直至产生焦炭状物质, 放凉 5 min, 将坩埚放入马弗炉在 $(650 \pm 50)\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下加热 4 h, 然后取出坩埚滴加 1% 的硝酸 1 mL, 继续放到电炉上加热处理, 直至硝酸挥发完全, 接下来用少量水多次冲洗, 把样品转入 100 mL 容量瓶中, 加入盐酸 2 mL, 10% 的铁氰化钾 10 mL, 定容至 100 mL。

1.5.2 药品的配制

1.5.2.1 载流

2% 的盐酸, 将 10 mL 的盐酸加入 500 mL 去离子水中, 搅拌均匀。

1.5.2.2 还原剂

2% 的硼氢化钾和 0.5% 的氢氧化钠混合溶液, 用 2 g 氢氧化钠和 8 g 硼氢化钾溶于 400 mL 去离子水

中,搅拌均匀。

1.5.2.3 混合溶液

将 10 g 铁氰化钾溶于 100 mL 去离子水中,搅拌均匀,在滴加前配制。

1.5.2.4 草酸溶液的配制

称取 1.0 g 草酸溶解于 100 mL 去离子水中,搅拌均匀,在滴加前配制。

1.5.3 铅标准溶液的配制

先将铅的标准储备液逐级稀释成 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 的标准溶液吸取 1000 $\mu\text{g/mL}$ 的铅标准储备液 1 mL 放入 100 mL 容量瓶中,定容至 100 mL,这时浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$,再从 10 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液中吸取 1 mL,定容到 100 mL,即配制成 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 的标准溶液,见表 1。

表 1 铅标准溶液的配制

序号	加入 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 标准溶液的体积 (mL)	加入盐酸体积 (mL)	加入铁氰化钾混合溶液体积 (mL)	定容体积 (mL)	标准溶液浓度 (ng/mL)
1	0	2.0	10	100	0
2	1	2.0	10	100	1.00
3	2	2.0	10	100	2.00
4	4	2.0	10	100	4.00
5	8	2.0	10	100	8.00
6	10	2.0	10	100	10.00

1.5.4 实验过程

设置原子荧光仪的参数:负高压 280 V,灯电流 70 mA,载气 400 mL/min,屏蔽气 900 mL/min。

测量铅的标准曲线:首先用空白测量,消除水的荧光强度带来的影响,然后依次把铅的标准溶液进行测量,获得标准曲线,见图 4。

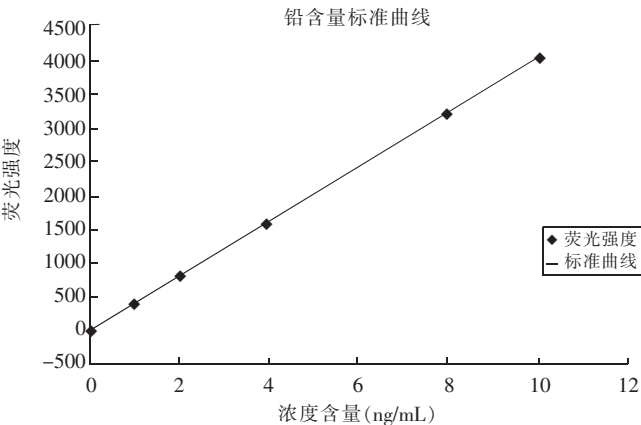


图 4 铅含量标准曲线

1.5.5 样品铅含量的测定

根据样品测得的数值,比对在铅标准曲线上的位

置,从而计算样品铅含量。

1.6 砷含量的检测

1.6.1 样品的处理

准确称量 1.0000 g 样品放入坩埚中,加入 5 mL 硝酸镁溶液放于电炉上加热,直至产生焦炭状物质,放凉 5 min,将坩埚放入马弗炉在 (650 ± 50) $^{\circ}\text{C}$ 下加热 4 h,然后取出坩埚滴加 10 mL 盐酸,直到剧烈反应完全,接下来用少量水多次冲洗,把样品转入 100 mL 容量瓶中,加入盐酸 3 mL,10% 的硫脲溶液 5 mL,定容至 100 mL。

1.6.2 药品的处理

1.6.2.1 载流

3% 的盐酸,将 15 mL 的盐酸加入 500 mL 去离子水中,搅拌均匀。

1.6.2.2 还原剂

1% 的硼氰化钾和 0.5% 的氢氧化钠混合溶液,用 2 g 氢氧化钠和 4 g 硼氰化钾溶于 400 mL 去离子水中,搅拌均匀。

1.6.2.3 硫脲溶液的配制

配制 50 g/L 的溶液,25 g 硫脲溶解于 500 mL 水中。

1.6.2.4 硝酸镁溶液的配制

配制 150 g/L 的硝酸镁溶液,称取 30 g 硝酸镁溶于 200 mL 水中。

1.6.3 砷标准溶液的配制

先将砷的标准储备液逐级稀释成 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 的标准溶液(吸取 1000 $\mu\text{g/mL}$ 的砷标准储备液 1 mL 放入 100 mL 容量瓶中,定容到 100 mL,这时浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$,再从 10 $\mu\text{g/mL}$ 的溶液中吸取 1 mL,定容到 100 mL,即配制成 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 的标准溶液,见表 2。

表 2 砷标准溶液的配制

序号	加入 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 标准溶液的体积 (mL)	加入盐酸体积 (mL)	加入硫脲溶液体积 (mL)	定容体积 (mL)	标准溶液浓度 (ng/mL)
1	0	3.0	10	100	0
2	1	3.0	10	100	1.00
3	2	3.0	10	100	2.00
4	4	3.0	10	100	4.00
5	8	3.0	10	100	8.00
6	10	3.0	10	100	10.00

1.6.4 实验过程

设置原子荧光仪的参数:负高压 280 V,灯电流

70 mA,载气 400 mL/min,屏蔽气 900 mL/min。

测量砷的标准曲线:首先用空白测量,消除水的荧光强度带来的影响,然后依次把砷的标准溶液进行测量,获得标准曲线,见图 5。

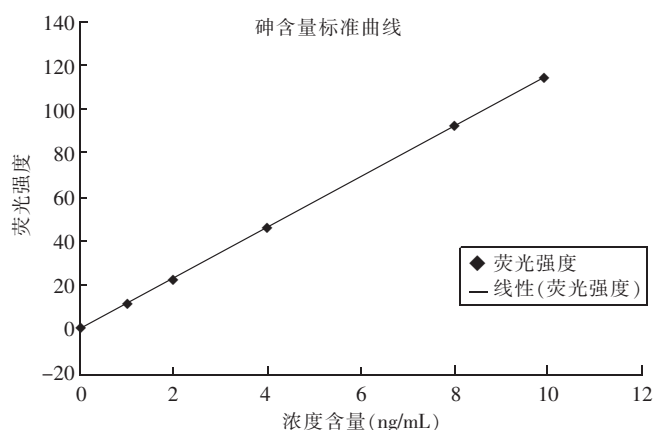


图 5 砷含量标准曲线

1.6.5 测量样品砷含量

根据样品测得的数值,比对在砷标准曲线上的位置,从而计算样品砷含量。

1.7 实验结果

实验结果见表 3。

表 3 实验结果

项目	指标	平均结果
新甲基橙皮苷二氢查耳酮(以干基计,%)	≥ 96.0	99.123
柚皮苷二氢查耳酮(%)	≤ 2.0	0.996
水分(%)	≤ 10.0	8.30
灼烧残渣(%)	≤ 0.2	0.09
铅(以 Pb 计,mg/kg)	≤ 1	0.0090
砷(以总砷计,mg/kg)	≤ 1	0.0023

2 结论与分析^[11]

本文使用检测新甲基橙皮苷二氢查耳酮的波长为 282 nm,这是 NHDC 最适合的吸收波长,流动相采用甲醇:磷酸(0.1%)为 48:52,既增加了样品的溶解度,又能有效地提高出峰效果。对于水分、灼烧残渣、铅和砷含量的检测皆符合食品级检验要求。本检测主要目的是提供新甲基橙皮苷二氢查耳酮的主含量、副产物、水分、灼烧残渣、铅和砷一系列检测的方法,弥补现在 NHDC 没有国家检验标准的不足,其中主含量和副产物的检测采用高效液相色谱法,相对于 GB 29938—2013《食品国家安全标准 食品香料通则》中推荐的气相色谱法检测,更加高效和简易;水分的检

测采用烘干法而不采用卡尔费休法,主要原因是通过卡尔费休法测量其水分不准确,而 NHDC 不含易挥发物质,所以通过烘干法可以快速准确测定其水分含量。本文主要提供简单、有效、可行、实用的检测方法,并结合多次实验得出新甲基橙皮苷二氢查耳酮的主要成分含量标准,为行业发展提供参考借鉴,并为国家标准进一步完善提供依据。

参考文献:

- [1]徐国波,袁小红,索志荣,等. HPLC 法测定合成新橙皮苷二氢查耳酮[J]. 食品研究与开发,2010,31(11):153-155.
- [2]邓虹,赵华修,代用,等. 新橙皮苷二氢查耳酮的高效液相色谱检测方法[J]. 饲料博览,2014(8):52-54.
- [3]陈良,刘传滨,张钦,等. 新橙皮苷二氢查耳酮的应用研究进展[J]. 中国调味品,2015,40(10):70-73.
- [4]Waalkens-Berendsen D H, Kuilman-Wahls M E M, Bär A. Embryotoxicity and teratogenicity study with neohesperidin dihydrochalcone in rats [J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2004, 40:74-79.
- [5]Suhrez J, Herrera M D, Marhuenda E. Hesperidin and Neohesperidin dihydrochalcone on different experimental models of induced gastric ulcer[J]. Phytotherapy Research, 1996, 10(7):616-618.
- [6]Özlem Atli, B Ergun, G Altiokka. Determination of hesperidin and neohesperidin in fruit juices using high performance liquid chromatographic (HPLC) method[J]. Toxicology Letters, 2007, 172:222.
- [7]杨恒,鲁明芳,郑建仙. 新橙皮苷二氢查耳酮制备工艺的研究[J]. 中国食品添加剂,2010(4):191-195.
- [8]朱思明. 橙皮苷及其衍生物抗氧化活性的机理分析[J]. 华南理工大学学报(自然科学版),2005,33(4):79-81.
- [9]Bok S H, Jeong T S, Hwan B K, et al. Use of neohesperidin dihydrochalcone for the manufacture of a medicament for preventing or treating elevated blood lipid level-related diseases[P]. European, EP1113726, 2004-03-24.
- [10]Takii H, Matsumoto K, Kometani T, et al. Lowering effect of phenolic glycosides on the rise in postprandial glucose in mice [J]. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 1997, 61(9):1531-1535.
- [11]Lee J H, Lee S H, Kim Y S, et al. Protective effects of neohesperidin and poncirin isolated from the fruits of *Poncirus trifoliata* on potential gastric disease[J]. Phytotherapy Research, 2009, 23(12):1748-1753.